



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CAROLINA CAVALCANTE BITU

Cirurgiã-Dentista

**Análise da participação dos genes homeobox HOXA1 e HOXB7 em
carcinomas espinocelulares orais**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Doutor em
Estomatopatologia na Área de Patologia.**

Orientador: Prof.Dr. Ricardo Della Coletta

PIRACICABA/2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

B549a Bitu, Carolina Cavalcante.
Análise da participação dos genes homeobox HOXA1 e
HOXB7 em carcinomas espinocelulares orais / Carolina
Cavalcante Bitu. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ricardo Della Coletta.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma espinocelular. 2. Proliferação celular. 3.
Prognóstico. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Analysis of the participation of homeobox genes HOXA1 and
HOXB7 in oral squamous cell carcinomas

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Carcinoma, Squamous cell. 2. Cell
proliferation. 3. Prognosis

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Adriana Franco Paes Leme, Denise
Tostes Oliveira, Estela Kaminagakura, Márcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 30-03-2011

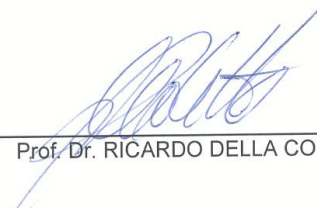
Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 30 de Março de 2011, considerou a candidata CAROLINA CAVALCANTE BITU aprovada.



Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Profa. Dra. ESTELA KAMINAGAKURA

Profa. Dra. DENISE TOSTES OLIVEIRA

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco e Hilacira pelo amor e apoio incondicionais.

A minha família que é o meu alicerce.

Ao meu irmão Felipe por todo o amor, carinho e dedicação.

Obrigada por aumentar a nossa família e o nosso amor. Espero que seja muito feliz.

Ao Pedro, que me encontrou e que sempre me guia.

A Deus, que está acima de todas as coisas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, a quem agradeço por todas as excelentes oportunidades que recebi.

Agradeço de todo meu coração

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. **Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes e Pablo Agustin Vargas**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela excelência e dedicação ao ensino;

Aos grandes amigos **Fernanda Villar, Débora, Naíla, Fernanda Capuano, Renata Fernandes, Ana Carolina e Maíra** pela amizade e companheirismo;

Aos grandes amigos e colegas **Adriele, Alan, Ana Carolina, Camila, Luiz e Rebeca**, a vocês dedico profunda gratidão e desejo tudo de melhor.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular: **Débora, Fabiana, Lívia, Andréia, Rose, Elizabete, Michelle, Lays, Marco, Sibele, Camilla, Luciana, Sibele e Manoela**, pelo companheirismo, ajuda em todas as horas e pelos momentos de trabalho e diversão compartilhados;

Aos amigos e colegas da Patologia **Andréia, Ana Terezinha, Jorge, Fernanda, Michelle Kellermann, Patrícia, Victor, Bruno, Felipe, Lara, Sabino, Marcondes, Renato, Sabrina, Fernanda, Mário, Marianne**, pela amizade e boas risadas;

Às pesquisadoras **Sabrina Daniela da Silva e Isabela Werneck Cunha** pela inestimável contribuição com dados clínicos e amostras;

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Adriano, Fabiana Casaroti, João, Rosa, Geovânia e Luana** e à funcionária do Orocentro **Aparecida**, pelo auxílio, colaboração e generosidade;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de qualquer maneira para a realização deste trabalho, meu mais profundo agradecimento;

“Velhos amigos se vão, novos amigos vem. É como a passagem dos dias. Um dia acaba e outro começa. O importante é o quanto eles foram especiais em sua vida: um amigo de verdade, um dia que valeu a pena.”

Dalai Lama

RESUMO

Os membros da família HOX de genes homeobox são classicamente conhecidos por regular a proliferação e a diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário. Contudo, inúmeros estudos demonstraram uma expressão alterada de alguns membros desta família em neoplasias, incluindo melanomas, leucemias e cânceres de cólon, pulmão, rim e próstata. Estudos em nosso laboratório caracterizaram o perfil de expressão dos 39 genes da família HOX em amostras orais de tecido normal e carcinoma espinocelular (CEC), identificando alguns genes diferencialmente expressos. Dentre estes genes estavam HOXA1 e HOXB7. Interessantemente, as expressões aberrantes de HOXA1 e/ou HOXB7 em neoplasias malignas foram relacionadas a um controle da proliferação, desdiferenciação, invasão e efetividade no reparo do DNA. Os objetivos deste estudo foram compreender os efeitos da superexpressão e da neutralização dos genes HOXA1 e HOXB7 na modulação dos principais eventos biológicos associados aos fenótipos tumorais e determinar o valor prognóstico da expressão destes genes para pacientes afetados por CEC oral. Para alcançar estes objetivos, construímos clones da linhagem celular de queratinócitos normais HaCAT superexpressando os genes HOXA1 (HaCAT-HOXA1) ou HOXB7 (HaCAT-HOXB7), inibimos a expressão endógena destes genes na linhagem de CEC oral SCC-9 por meio da técnica de RNA de interferência e realizamos análise imuno-histoquímica em 132 amostras de CEC oral para correlacionar às positivities de HOXA1 e HOXB7 com as características clínico-patológicas dos tumores. Nossos resultados revelaram que as superexpressões de HOXA1 e HOXB7 significativamente promoveram a proliferação das células HaCAT, enquanto que a inibição destes genes nas células SCC-9 resultou em uma dramática inibição da proliferação. As superexpressões de HOXA1 e HOXB7 não foram capazes de modular as taxas de apoptose, adesão e invasão, a expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima (TEM) e não promoveu crescimento independente de ancoragem (soft-agar). Tumores classificados com expressão elevada de HOXA1 demonstraram estágio clínico T e N mais avançados, menor diferenciação das células neoplásicas e elevado potencial proliferativo. Pacientes apresentando tumores com elevada positividade para

HOXA1 demonstraram uma sobrevida de 5 anos significativamente menor que pacientes com tumores demonstrando baixa positividade para HOXA1 ($p=0,026$). A expressão imuno-histoquímica de HOXB7 correlacionou significativamente com consumo de bebidas alcoólicas, estágio clínico N, infiltração vascular e potencial proliferativo dos tumores. Expressão elevada de HOXB7 foi também significativamente correlacionada com menor sobrevida global ($p=0,009$) e uma tendência para menor sobrevida livre de doença foi observada para pacientes com tumores classificados com forte expressão de HOXB7 ($p=0,083$). Uma positiva correlação entre as expressões de HOXA1 e HOXB7 foi evidenciada ($r_s=0,25$ e $p=0,008$). Em conclusão, nossos resultados sugerem que as superexpressões dos genes HOXA1 e HOXB7 podem contribuir para a progressão tumoral por promoverem a proliferação das células tumorais e indicam que HOXA1 e HOXB7 podem ser determinantes importantes do prognóstico de pacientes com CEC oral.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, HOXA1, HOXB7, proliferação celular, prognóstico.

ABSTRACT

HOX genes are master regulators of cellular proliferation and differentiation during embryogenesis. However, some members of the HOX family have been shown to be dysregulated in malignancies, including melanomas, leukemias and cancers of colon, lung, kidney and prostate. In previous studies we have described the expression profile of all 39 HOX genes in oral samples from normal mucosa and squamous cell carcinoma (SCC), identifying some differentially expressed. Among those were HOXA1 and HOXB7. The aberrant expression of both genes has been related with the regulation of proliferation, differentiation and invasion, and with the control of the DNA repair effectiveness. The goals of this study were to verify the role of HOXA1 and HOXB7 on modulation of tumor-associated phenotypes and to determine whether their expressions are associated with clinicopathological features of the tumors. To achieve our goals, we generated clones from HaCAT human epithelial cell line overexpressing HOXA1 (HaCAT-HOXA1) or HOXB7 (HaCAT-HOXB7), inhibited the endogenous levels of these genes in the SCC-9 human oral carcinoma cell line by interference RNA (iRNA), and performed immunohistochemical analysis in 132 oral SCC samples. Our results demonstrated that both HOXA1 and HOXB7 overexpression in HaCAT cells promote proliferation, whereas downregulation of HOXA1 and HOXB7 endogenous levels in SCC-9 cells decreases it. HOXA1 and HOXB7 overexpression did not influence apoptosis, cellular adhesion and invasion, expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and also did not promote anchorage-independent growth (soft-agar). High number of HOXA1-positive cells significantly correlated with T and N stage, tumor cellular differentiation and proliferative potential of the tumors. Patients whose tumors contained high number of HOXA1-positive cells had shorter overall survival in 5 years than patients with low positivity of this protein ($p=0.026$). The immunohistochemical expression of HOXB7 was significantly correlated to alcohol consumption, clinical N stage, vascular infiltration and tumor proliferative potential. High expression of HOXB7 was also significantly correlated to shorter overall survival ($p=0.009$), and a tendency towards shorter disease-free survival was observed in patients with tumors containing elevated HOXB7 expression ($p=0.083$). A positive

correlation between HOXA1 and HOXB7 immunohistochemical expression was observed ($r_s=0.25$, $p<0.008$). In conclusion, our results suggest that overexpression of HOXA1 and HOXB7 can contribute to tumor progression by increasing tumor cell proliferation and indicate that both HOXA1 and HOXB7 may be important determinants of OSCC patient's prognosis.

Key words: Squamous cell carcinoma, HOXA1, HOXB7, cellular proliferation, prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	- "basic fibroblast growth factor" - fator de crescimento de fibroblastos básico
BMP4	- "bone morphogenic protein 4" - proteína morfogênica óssea 4
BSA	- "bovine serum albumine" - albumina sérica bovina
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
CEC	- carcinoma espinocelular
CpG	- sítio na região promotora onde o nucleotídeo guanosina é precedido por citosina (ilhas de suscetibilidade de metilação)
DMEM	- Dulbecco's modified Eagle's medium – meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- "deoxynucleotide triphosphate"- desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	- ditionitrito
EDTA	- ethylenediamine tetraacetic acid" – ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	- "epithelial-mesenchymal transition" - transição epitélio-mesênquima
EPAS1	- "endothelial PAS domain-containing protein 1"- proteína 1 endotelial contendo domínio PAS
ERBB2	- "erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2"- oncogene viral eritroblástico de leucemia homólogo 2
FBS	- "fetal bovine serum"- soro fetal bovino
FGF2	- "fibroblast growth factor 2"- fator de crescimento de fibroblastos 2
FITC	- "fluorescein isothiocyanate"- isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	- "glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase"- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GRB2	- "growth factor receptor-bound protein 2"- proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento

h	- hora
HEPES	- "4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid" - ácido 4-2hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfônico
IER3	- "immediate early response 3 gene"- gene de resposta precoce imediata
MAP kinase	- "mitogen-activated protein"- proteína ativada por mitogênio
ml	- mililitro
MLL	- "mixed lineage leukemia"- leucemina de linhagem mista
mm	- milímetro
MMP2	- "matrix metalloproteinase 2"- metaloproteinase de matriz 2
nm	- nanômetro
°C	- graus Celsius
OD	- "optical density"- densidade óptica
PARP1	- "poly [ADP-ribose] polymerase"- poli [ADP-ribose] polimerase
PBS	- "phosphate buffered saline"- salina tamponada com fosfato
PCNA	- "proliferating cell nuclear antigen"- antígeno celular nuclear de proliferação
PCR	- "polymerase chain reaction"- reação em cadeia da polimerase
PDGFA	- "platelet-derived growth factor"- fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	- ácido desoxirribonucleico
SDFR1	- "stromal cell derived factor receptor"- receptor de fator derivado do estroma
SDS-PAGE	- "sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis"- dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
TBE	- tris/borato/EDTA
U/uL	- unidade/microlitro
V	- volts
VEGFA	- "vascular endothelial growth factor A"- fator de crescimento endotelial A

WNT5a - "4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid"-

mg - micrograma

μL - microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2.1. Genes Homeobox.....	5
2.2. Família HOX de Genes Homeobox.....	7
2.3. Mecanismos de Ação dos Genes HOX.....	8
2.4. Regulação dos Genes HOX.....	12
2.5. Genes HOX em Tecidos Adultos.....	14
2.6. Alterações de Desenvolvimento em Humanos.....	16
2.7. Genes HOX e Câncer.....	17
2.8. HOXA1.....	26
2.9. HOXB7.....	28
3. Proposição.....	35
4. Materiais e Métodos.....	37
4.1. Aprovação do Comitê de Ética.....	37
4.2. Amostras.....	37
4.3. Imuno-histoquímica.....	39
4.4. Cultura de Células.....	39
4.5. Plasmídeos, Transfecção e Seleção dos Clones Superexpressando HOXA1 e HOXB7.....	40
4.6. RT-PCR.....	41
4.6.1. Isolamento de RNA Total.....	41
4.6.2. Análise da Concentração e Integridade do RNA.....	42
4.6.3. Síntese de cDNA.....	42
4.6.4. Reação de PCR “Duplex”.....	43
4.7. Western Blot.....	43
4.8. Análise da Proliferação Celular.....	45
4.8.1. Incorporação de BrDU.....	45
4.8.2. Expressão Imuno-citoquímica de Ki-67.....	45
4.9. Análise da Apoptose.....	46
4.10. Ensaio de Adesão Celular.....	46
4.11. Análise da Transição Epitélio-Mesênquima (TEM).....	47

4.12. Ensaio de Invasão Celular.....	48
4.13. Crescimento Independente de Ancoragem (Soft-Agar).....	48
4.14. RNA de Interferência.....	48
4.15. Análise Estatística.....	49
5. Resultados.....	51
5.1. Expressão de HOXA1 e HOXB7 em Amostras Orais de Tecido Normal e CEC.....	51
5.2. Efeitos da Superexpressão do Gene HOXA1 na Linhagem Celular de Queratinócitos HaCAT.....	56
5.3. Efeito da Inibição da Expressão de HOXA1 sobre a Proliferação das Células SCC-9.....	65
5.4. Correlação entre a Expressão de HOXA1 e as Características Clínico-Patológicas dos CECs Orais.....	68
5.5. Efeitos da Superexpressão do Gene HOXB7 na Linhagem Celular de Queratinócitos HaCAT.....	76
5.6. Efeito da Inibição da Expressão de HOXB7 sobre a Proliferação das Células SCC-9.....	84
5.7. Correlação entre a Expressão de HOXB7 e as Características Clínico-Patológicas dos CEC orais.....	87
5.8. Correlação entre as Expressões Imuno-histoquímicas de HOXA1 e HOXB7 em Amostras de CECs Orais.....	94
6. Discussão.....	95
6.1. Expressão de HOXA1 Controla a Proliferação Celular e Correlaciona com um Prognóstico Desfavorável.....	96
6.2. HOXB7 Modula a Proliferação Celular e Sua Expressão é Associada ao Prognóstico dos Pacientes com CEC oral.....	100
7. Conclusões.....	105
Referências.....	106
Anexo.....	127

1. Introdução

É amplamente aceito que muitas das vias que estimulam a oncogênese representam aberrações de processos normais que controlam a embriogênese. Existem vários exemplos nos quais genes que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular e tecidual estão implicados em oncogênese. Entre os principais exemplos estão os genes homeobox da família HOX, que codificam fatores de transcrição com papel crucial na organogênese e morfogênese durante o desenvolvimento e que recentemente foram associados a funções importantes em tecidos adultos (Mortlock & Innis, 1997; Chen *et al.*, 2005; Garcia-Barceló *et al.*, 2007). Baseado na significância global destes genes para o desenvolvimento e diferenciação celular e na freqüente expressão desregulada em cânceres, os genes HOX providenciam um excelente modelo para explorar a íntima relação entre embriogênese e oncogênese (Carrio *et al.*, 2005).

Os genes homeobox foram originalmente identificados na década de 80 devido à grande homologia com os genes homeóticos de *Drosófilas*, também conhecidos como complexo HOM-C, que promovem alterações nos segmentos corporais das moscas quando alterados (alterações homeóticas) (Graux *et al.*, 2004). Posteriormente, foi demonstrado que estes genes estão virtualmente presentes em todas as espécies de seres eucariontes (Tiberio *et al.*, 1994). Desde sua descoberta na década de 80, mais de 200 seqüências gênicas similares já foram identificadas, sendo que todas apresentam uma região altamente conservada de 183 nucleotídeos que codifica o domínio de 61 aminoácidos conhecido como homeodomínio (Holland *et al.*, 2007). O homeodomínio é a região responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox.

Entre as diversas famílias de genes homeobox, a família HOX é a maior e mais bem estudada. Em humanos e camundongos, a família HOX é a homóloga

ao complexo HOM-C de *Drosófilas* (Abate-Shen, 2002). Durante a embriogênese, a expressão dos membros da família HOX de genes homeobox inicia-se durante o período de gastrulação e controla a identidade de vários tecidos partindo da região anterior (área branquial) até a região mais posterior (Cillo *et al.*, 2001). Embora genes homeobox sejam definidos como genes do desenvolvimento e a rígida regulação tempo-espacial é crucial para o desenvolvimento normal dos órgãos (Warot *et al.*, 1997; Satokata & Maas, 1994; Mortlock & Innis, 1997; Garcia-Barceló *et al.*, 2007), alguns estudos demonstraram a expressão de membros da família HOX em tecidos normais adultos (Neville *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2004; Morgan, 2006). A manutenção da homeostasia dos tecidos adultos é fundamental e deve ser intimamente controlada para a adequada função dos órgãos. Em tecidos adultos, os estudos revelaram que os genes HOX controlam a proliferação e diferenciação celular e as interações célula-célula e células-matriz extracelular (Morrison, 1998; Barber & Rastegar, 2010). Os padrões de expressão dos genes HOX em cada órgão, bem como suas funções, variam de acordo com as interações com os diferentes tipos celulares que compõem o tecido (Yamamoto *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Portanto, a expressão alterada dos membros da família HOX de genes homeobox, que são capazes de controlar a proliferação e a identidade (diferenciação) celular, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral (Abate-Shen, 2002; Waltregny *et al.*, 2002). Na verdade, inúmeros membros da família HOX já foram identificados em um padrão desregulado em uma grande variedade de malignidades quando comparado ao tecido normal correspondente, incluindo as leucemias e os tumores sólidos como mama, endométrio, cérebro, cólon, próstata, pulmão e rim (Chen *et al.*, 2005; Vider *et al.*, 2000; Freschi *et al.*, 2005).

Embora exista um grande número de estudos que demonstraram a expressão desregulada de genes homeobox em cânceres, nosso conhecimento neste campo está distante de completo. Assumindo que a expressão gênica alterada pode promover fenótipos importantes para a oncogênese, uma análise mais ampla e profunda pode colaborar com o conhecimento da função destes

genes nos estágios específicos da oncogênese e do papel destes genes nos diferentes tipos de tumores. Em suporte a um papel causal dos genes homeobox em promover oncogênese, a superexpressão com ganho de função do produto protéico destes genes tem promovido fenótipos associados à tumorigênese. Por exemplo, a superexpressão de membros da família HOX de genes homeobox transforma linhagens celulares de fibroblastos normais, induzindo a proliferação e o crescimento tumoral em camundongos nude (Aberdam *et al.*, 1991, Maulbecker *et al.*, 1993). Interessantemente, HOXA10 diretamente liga-se a região promotora do gene p21, induzindo uma paralisação no ciclo celular e, a subsequente, diferenciação celular (Del Bene & Wittbrodt, 2005), mostrando a especificidade das funções dos genes HOX em tecidos distintos. Similarmente, a expressão forçada de HOXD10, o qual não é normalmente expresso em cânceres de mama, em uma linhagem celular altamente agressiva deste tipo de tumor (linhagem MDA-MB-231) reduziu a proliferação celular, bloqueou a migração e resultou em diferenciação com formação de estruturas similares a ductos de glândulas mamárias (Carrio *et al.*, 2005). Estes exemplos e outros indicam que a expressão desregulada dos genes homeobox em cânceres pode ser causal.

Em especial, os genes HOXA1 e HOXB7 foram descritos como tendo uma expressão aberrante em diversos tipos de cânceres, promovendo a transcrição de genes envolvidos, de modo geral, com a proliferação, identidade e morte celular (Zhang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). O gene HOXA1 foi associado a carcinomas de mama, colo uterino, pulmão e melanomas (Abe *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Experimentos funcionais associados com a expressão forçada de HOXA1 resultaram em uma maior proliferação celular, migração e transição epitélio-mesênquima (TEM) (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Da mesma maneira, o gene HOXB7 apresenta-se como um gene central no desenvolvimento dos carcinomas de ovário e mama e mielomas múltiplos. Seu papel inclui ativar genes como bFGF (Carè *et al.*, 1996; Waltregny *et al.*, 2006), resultando em um aumento do potencial de invasividade e proliferação celular. Apesar de muitos estudos terem avaliado a expressão dos genes HOX em

tumores sólidos de diferentes origens, encontramos poucos manuscritos recentes na literatura analisando a expressão destes genes em cânceres orais (Hassan *et al.*, 2006; Acquafreda *et al.*, 2010; Yamatoji *et al.*, 2010; Liborio *et al.*, 2011), demonstrando que a participação dos genes HOX em tecidos orais ainda é pouco conhecida.

Frente à escassez de estudos de genes homeobox em cânceres orais, estudos em nosso laboratório caracterizaram o padrão de expressão dos 39 genes da família HOX em amostras orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular (CEC) com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos (Bitu, 2008; Destro, 2008; De Souza Setúbal Destro, *et al.*, 2010). Amostras de mucosa oral normal de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o câncer oral (hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas) e amostras orais de mucosa normal e CEC provenientes do mesmo paciente foram submetidos a ensaios semi-quantitativos de transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) “duplex” com primers para o gene controle GAPDH e primers específicos para cada um dos membros da família HOX de genes homeobox. De maneira geral, poucos transcritos foram expressos pelas amostras de mucosa oral normal.

Comparado às amostras de mucosa normal proveniente de pacientes com e sem fator de risco para CEC oral, nós observamos que as expressões de HOXA1, HOXA2 e HOXD8 foram estatisticamente maiores nas amostras oriundas de indivíduos com história de tabagismo e etilismo. Estes resultados sugerem que a expressão alterada de alguns membros da família HOX de genes homeobox pode estar associada com o desenvolvimento e/ou progressão do CEC oral. Então, o objetivo geral deste estudo foi caracterizar o papel biológico de dois dos genes homeobox com expressão diferenciada, HOXA1 e HOXB7, em CECs orais.

2. Revisão da Literatura

2.1. Genes Homeobox

No começo do século passado, mudanças homeóticas na estrutura e desenvolvimento foram observadas em mutantes de moscas-da-fruta *Drosophila melanogaster*. Os fenótipos destes mutantes levaram Morgan e Bridges (1921) a propor a existência de genes responsáveis pelo correto desenvolvimento têmporo-espacial em insetos, mas foi apenas da década de 80 que estes genes denominados HOX foram caracterizados, revelando também a existência de homólogos altamente conservados na maioria dos animais (Hart *et al.*, 1985).

Estes genes foram inicialmente descobertos como genes causadores de transformações homeóticas, ou seja, substituição de uma parte ou segmento do corpo por outro não encontrado normalmente naquele lugar (Lord *et al.*, 2005; Samuel & Naora, 2005). De fato, os genes homeobox codificam fatores de transcrição que atuam durante a embriogênese e o desenvolvimento tecidual por meio de um sistemático controle da proliferação e diferenciação celular (Yoshida *et al.*, 2006). Posteriormente, os genes homeobox foram encontrados em todas as espécies que tiveram seu genoma mapeado, indicando que sua origem é antiga e precede a divergência filogenética (Lemons & McGinnis, 2006). Desde sua descoberta na década de 80, mais de 200 membros diferentes, formando uma superfamília, já foram descritos (Holland *et al.*, 2007). A característica comum de todos estes genes é a presença de uma seqüência altamente conservada, das moscas-da-fruta aos humanos (Svingen & Tonissen, 2006), de 183 nucleotídeos, codificando um domínio de 61 aminoácidos, chamado homeodomínio (Stein, *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2005; Freschi *et al.*, 2005). O homeodomínio está usualmente localizado na posição terminal ou subterminal da proteína correspondente, sendo responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox (Samuel & Naora, 2005; Svingen & Tonissen, 2006). Este domínio

consiste de três α -hélices que formam um núcleo de repetição (motif) hélice-volta-hélice e um domínio adicional conhecido como braço N-terminal, adjacente a primeira hélice (Svingen & Tonissen, 2006). Classicamente, a sequência TAAT box é a região reconhecida pelo homeodomínio para a ligação ao DNA (Abate-Shen, 2002). O homeodomínio reconhece as seqüências específicas do DNA através dos resíduos de aminoácidos adjacentes ao braço N-terminal e a terceira hélice. Os aminoácidos 3 e 5 do braço N-terminal medeiam o contato com o sulco menor e os aminoácidos 47 e 51 da terceira hélice medeiam contato com o sulco maior da molécula de DNA (Piper *et al.*, 1999; LaRonde-LeBlanc & Wolberger, 2003; Svingen & Tonissen, 2006).

Embora os produtos protéicos dos genes homeobox (homeoproteínas) tenham demonstrado a função de fatores de transcrição (alguns ativadores e outros repressores), existem poucos exemplos de genes alvo que são especificamente regulados *in vivo* por estas proteínas. Uma das principais limitações na identificação destes genes alvos parece estar relacionada com a relativa inespecificidade de ligação das homeoproteínas ao DNA *in vitro*, associada com a alta especificidade *in vivo*. Adicionalmente, é hipotetizado que a especificidade na função das homeoproteínas é controlada em muitos níveis, incluindo modificações pós-transcricionais, transporte núcleo-citoplasma e interações com outras proteínas (co-fatores) (Mann & Chan, 1996; Bromleigh & Freedman, 2000).

A função dos genes homeobox é seletiva, sobreposta e, muitas vezes, combinada, resultado em um processo altamente complexo (Greer *et al.*, 2000). Inúmeros estudos demonstraram o envolvimento de diferentes genes homeobox em processos cruciais das células eucariontes, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular, interação célula-célula e célula- matriz extracelular (Bromleigh & Freedman, 2000; Raman *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se que estes genes têm efeitos divergentes no ciclo celular, de um lado, estimulando a proliferação de células progenitoras, e por

outro, induzindo a diferenciação celular (Leroy *et al.*, 2004; Zacchetti *et al.*, 2007; Argiropoulos & Humphries, 2007). Os genes homeobox regulam um amplo espectro de funções biológicas durante o desenvolvimento embrionário, incluindo a formação dos membros, o padrão do esqueleto axial, a morfogênese craniofacial, o desenvolvimento do sistema nervoso central, trato gastrointestinal e órgãos reprodutivos, entre outros (Satokata & Maas, 1994; Mortlock & Innis, 1997; Garcia-Barceló *et al.*, 2007; van den Akker *et al.*, 2008). Interessantemente, alguns genes homeobox específicos regulam funções importantes no adulto, incluindo gametogênese (Ota *et al.*, 2006), angiogênese (Rhoads *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2006) e hematopoiese (Sauvageau *et al.*, 1994; Leroy *et al.*, 2004).

Os genes homeobox são divididos em duas grandes classes: classe I que contém os genes agrupados (genes da família HOX) e a classe II que inclui os genes homeobox divergentes e dispersos pelo genoma (Owens & Hawley, 2002). A maioria dos genes homeobox está dispersa e não agrupada em complexos (Alberts *et al.*, 2004). Com base na similaridade da sequência de nucleotídeos, posição dos íntrons, organização em clusters e associação dos produtos protéicos com co-fatores, os genes homeobox são divididos em, pelo menos, 20 famílias distintas, incluindo as famílias bicoid (BCD), caudal (CAD), engrailed (EN), even-skipped (EVE), muscle segment homeobox genes (MSX), paired (PAX), pit-Oct-unc (POU), empty spiracles (EMX), ortodenticle (OTX) e sinus oculus (SIX) (Gehring *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 2007). A família mais estudada e melhor caracterizada é a família HOX (Svingen & Tonissen, 2006).

2.2. Família HOX de Genes Homeobox

O complexo HOM-C, descrito em *Drosophila melanogaster*, é considerado o protótipo dos genes homeobox (Yekta *et al.*, 2008). Suas contrapartes em humanos e camundongos, os genes HOX, estão entre os genes homeobox mais estudados entre os vertebrados (Abate-Shen, 2002). Em

vertebrados, os genes HOX são localizados contiguamente e em clusters, com seu número variando de acordo com a complexidade anatômica. Mamíferos apresentam 39 genes HOX organizados em 4 grupos, denominados A, B, C e D, localizados respectivamente em 4 cromossomos diferentes (7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31) (Chen *et al.*, 2005) (Fig. 1). Existem 13 grupos de parálogos, numerados de 1 a 13, começando a partir da extremidade 3' de seus loci (Freschi *et al.*, 2005). Estima-se que os genes HOX nos mamíferos tenham surgido através da combinação de dois eventos evolucionários diferentes, a cis-amplificação e a transduplicação, a partir de complexos ancestrais (Abate-Shen, 2002). Os genes HOX que se originaram por transduplicação, também chamados de parálogos, compartilham uma similaridade maior entre si quando comparados aos genes localizados em posições adjacentes do mesmo cromossomo (Svingen & Tonissen, 2006). Como outros membros da superfamília de genes homeobox, os genes HOX codificam fatores de transcrição, cada um diferenciado por seu domínio de ligação ao DNA chamado homeodomínio, localizado no exon 2, sendo este extremamente conservado entre as espécies quando comparado com outros genes da família homeobox.

2.3. Mecanismos de Ação dos Genes HOX

Proteínas HOX podem funcionar como monômeros ou homodímeros para diretamente conduzir a transcrição de genes alvos e como heterodímeros ou heterotrímeros com membros da família de co-fatores homeobox TALE (three amino acid loop extension), dependendo do tipo celular, sendo que Pbx1 foi o primeiro co-fator das proteínas HOX a ser caracterizado (Abate-Shen, 2002; Laurent, *et al* 2008). As interações entre HOX e Pbx1 nos parálogos 1-8 são dependentes de um hexapeptídeo, do qual 4 aminoácidos representam a sequência (núcleo) principal de ligação (YPWM), localizado na porção N-terminal das proteínas HOX (Chang *et al.*, 1995; Phelan *et al.*, 1995). Já nos parálogos 9 e

10, onde a sequência YPWM não está presente, a ligação com Pbx1 é dependente de um resíduo de triptofano na região N-terminal próxima ao homeodomínio (Shen *et al.*, 1997b), enquanto nos parálogos 11-13 a função de Pbx1 é substituída por Meis1, visto que Pbx1 não interage com as proteínas destes parálogos (Shen *et al.*, 1997a). Outros mecanismos de regulação gênica, incluindo splicing alternativo, parecem participar do controle dos genes da família HOX (Kornfeld *et al.*, 1989), mas estes mecanismos não estão ainda bem caracterizados. Ainda, a regulação endócrina de genes HOX foi descrita no ciclo menstrual, onde os níveis de expressão de HOXA10 e HOXA11 acompanham as mudanças cíclicas de estrógeno e progesterona (Daftary & Taylor, 2006). Um trabalho sugeriu que proteínas HOX podem seqüestrar outras proteínas para aumentar ou reprimir a expressão gênica (Shen *et al.* 2001). Apesar de muitos dos genes alvos dos membros da família HOX ainda não estarem completamente caracterizados, já foi demonstrado que genes HOX são parte integral do processo de desenvolvimento de membros e órgãos ao longo do eixo ântero-posterior (Dolle *et al.*, 1993; Mortlock & Innis, 1997; Perez-Cabrera *et al.*, 2002; Zachetti *et al.*, 2007; Cardoso, 1995; Simpson, 1999; Wellik, 2009).

A maneira pela qual os genes HOX controlam e são controlados no desenvolvimento de vertebrados ocorre de acordo com três preceitos básicos (Abate-Shen, 2002). O primeiro é a posição cromossomal do gene ao longo do eixo 3' a 5' do cromossomo onde estão localizados, o que corresponde com a sua expressão ao longo do eixo ântero-posterior do animal, sendo a seqüência de expressão dos genes HOX durante o desenvolvimento bastante semelhante aos genes do complexo HOM-C de *Drosófilas*, refletindo a posição de cada gene dentro do cluster (Martinez & Amemiya, 2002). Isto quer dizer que os genes localizados nas extremidades 3' são transcritos primeiramente e na região anterior do embrião, enquanto que os genes localizados nas extremidades 5' são transcritos subsequente e em regiões caudais, sendo esta uma propriedade conhecida como regra da colinearidade (Zhao *et al.*, 2005; Morgan, 2006; Lemons

& McGinnis, 2006). O desenvolvimento das regiões branquial e do romboencéfalo é controlado pelos genes dos grupos 1 a 4, o desenvolvimento da porção torácica é regulado pelos genes HOX centrais, correspondentes aos grupos 5-8, enquanto os genes dos grupos 9-13 regulam a região lombo-sacral do embrião, trato urinário e genitália (Morgan, 2006).

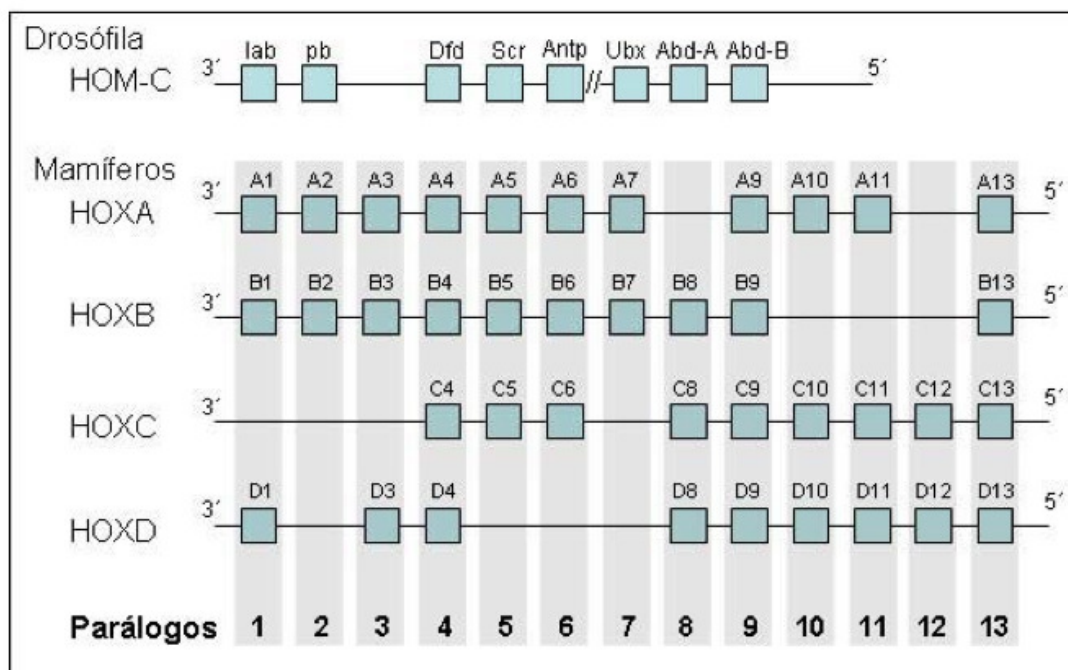


Figura 1. Representação esquemática do alinhamento dos 4 loci de genes HOX em humanos com o complexo HOM-C de Drosófila. Os 13 grupos parálogos estão marcados na porção inferior da figura. Adaptado do artigo de Maconochie (1996).

O segundo preceito é de que os genes HOX localizados mais a 5' terão uma fenótipo dominante em relação aos genes localizados mais a 3', o que é descrito como prevalência posterior. No entanto, é importante denotar que em vertebrados, os quatro clusters de genes HOX permitem que cada gene HOX individual tenha até quatro cognatos em relação à similaridade entre suas seqüências (parálogos), sendo parcialmente redundantes em suas funções, mas

também adquirindo funções diversas (Svingen & Tonissen, 2006). Portanto, o fenômeno de dominância posterior que ocorre em *Drosófilas*, onde o programa morfogênético do embrião é especificado pelo membro da família HOX com localização mais posterior expresso no momento, em camundongos e, provavelmente humanos, é substituído pela teoria da redundância (Papageorgiou, 2006). Esta teoria afirma que o padrão de desenvolvimento de uma célula ou tecido é resultado da expressão combinada de vários membros da família HOX, e não da atividade específica ou dominante de um membro individual (Maconochie, 1996; Greer *et al.*, 2000). O melhor exemplo desta teoria é demonstrado pelos membros do parálogo 9 (HOXA9, HOXB9 e HOXD9) durante o desenvolvimento da glândula mamária. As glândulas mamárias em animais sem a expressão individual ou em pares (knockout simples ou duplo) destes genes são normais, enquanto que glândulas sem a expressão dos 3 membros (knockout triplo) apresentam uma intensa hipoplasia durante a gravidez e lactação (Chen & Capecchi, 1999), indicando que a morfogênese das glândulas mamárias é dependente de uma regulação quantitativa dos genes HOX ao invés da regulação qualitativa encontrada em *Drosófilas*. A similaridade de estrutura, sequência e expressão dos parálogos têm levantado questões sobre o grau de redundância funcional entre eles. No entanto, mutações individuais de genes HOX tem invariavelmente levado a fenótipos com variações no padrão axial, o que ilustra que a compensação funcional por parálogos não é absoluta e que papéis mais importantes são desempenhados por genes HOX individuais no desenvolvimento (Maconochie *et al.*, 1996).

O terceiro preceito é o de que os genes HOX são expressos em ordem temporal também de acordo com sua posição 3' a 5' dentro de cada cluster, o que é denominado colinearidade temporal (Shah & Sukumar, 2010). Um exemplo disso é o de que camundongos knockout para os genes HOXA11 e HOXD11 apresentam um desenvolvimento ósseo incompleto, revelando um papel importante destes genes na formação óssea (Boulet & Capecchi, 2003).

Especificamente, embriões mutantes apresentam membros menores comparado a animais normais, uma vez que o programa de maturação do tecido ósseo é alterado. Nestes animais a produção do tecido cartilaginoso é normal, mas a sua ossificação é retardada, sugerindo que estes genes têm papel importante nas etapas finais da diferenciação dos osteoblastos (Boulet & Capecchi, 2003). Camundongos mutantes para os genes HOXA3 ou HOXD3 não apresentam anormalidades no eixo corporal, mas mutantes duplos para estes genes demonstram uma perda da vértebra atlas e remodelação da coluna vertebral (Condie & Capecchi, 1994). Camundongos knockout para os genes HOXA13 e HOXD13 apresentaram ausência da bexiga e estenose prematura do cordão umbilical (Warot *et al.*, 1997). Interessantemente, animais haploinsuficientes para HOXA13 sobrevivem até a idade adulta, mas apresentavam anormalidades importantes dos órgãos reprodutores e reto, demonstrando sua importância na formação das porções posteriores dos aparelhos digestivo e genital (Warot *et al.*, 1997).

2.4. Regulação dos Genes HOX

O processo do desenvolvimento em mamíferos é estabelecido através de muitas vias moleculares agindo em harmonia nos níveis genômicos, proteômicos e epigenéticos (Barber & Rastegar, 2010). A expressão dos produtos dos genes HOX é seletiva e pode ser controlada em diversos níveis, incluindo os estágios transcricionais e pós- transcricionais (Mann & Chan, 1996). A epigenética se refere a mudanças na expressão gênica que são herdadas através de mecanismos além daqueles que determinam a sequência de DNA, que controlam a morfologia e identidade celular (Barber & Rastegar, 2010). Dentro deste contexto pouco conhecido, as proteínas dos grupos polycomb e trithorax parecem ter papel importante (Sparmann & Lohuizen, 2006). Elas operam um mecanismo comum que é parte integral do controle da expressão dos genes HOX por meio de

alterações epigenéticas (Fanti *et al.*, 2008). Ilhas CpG nos promotores de genes HOX silenciados são comumente metiladas (Hershko *et al.*, 2003, Rauch *et al.*, 2007). Os membros do grupo polycomb operam em complexos que modificam as propriedades locais da cromatina, levando ao silenciamento gênico (Ringrose & Paro, 2000). Os complexos polycomb e trithorax direcionam a trimetilação das histonas - as proteínas do grupo polycomb resultam em trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27) e proteínas trithorax trimetilam a lisina 4 da histona H3 (H3K4) - e as mudanças na conformação da cromatina por essas modificações permitem a metilação e desmetilação das ilhas CpG (Hanson *et al.* 1999; Fanti *et al.*, 2008). Além da participação das proteínas dos grupos polycomb e trithorax no controle transcricional dos genes HOX, o efeito do ácido retinóico no desenvolvimento do sistema nervoso central foi demonstrado (Daftary & Taylor, 2006). Nos estágios iniciais da embriogênese, o ácido retinóico regula a expressão dos parálogos localizados na porção 3' da família HOX de genes homeobox (Daftary & Taylor, 2006).

MicroRNAs (miRNAs) codificados em clusters HOX são conservados entre *D. melanogaster* e humanos (Chopra *et al.*, 2006, Yekta *et al.*, 2008, Stark *et al.*, 2008), e incluem, até o momento, mir-10a (Weiss *et al.* 2009) e mir-196b (Popovic *et al.*, 2009). Estes miRNAs são tidos tradicionalmente como reguladores da expressão de genes HOX por meio de clivagem ou interferência entre o RNA mensageiro e a maquinaria de tradução (Chopra *et al.*, 2006). Em trabalho por Han *et al.* (2007) foi examinada a regulação destes miRNAs e seus transcritos alvos, revelando a interação de mir-10a com HOXA3 e HOXD10 por modelos de bioinformática e culturas celulares. Os genes HOX também podem ser regulados por RNAs não codificantes longos (lincRNAs) e lincRNAs foram descritos em uma orientação antisense em alguns clusters de genes HOX (Sessa *et al.*, 2007, Sasaki *et al.*, 2007). Embora este mecanismo de regulação não seja bem conhecido, os resultados dos poucos estudos na literatura sugerem que lincRNAs podem ativar ou reprimir a expressão de genes HOX colineares (Sessa *et al.*, 2007; Petruk *et al.*, 2007).

2.5. Genes HOX em Tecidos Adultos

Os membros da família HOX foram primeiramente identificados como reguladores do padrão de formação ântero-posterior durante a embriogênese, mas inúmeros estudos têm demonstrado a participação destes genes em células adultas diferenciadas (Bagot *et al.*, 2000; Cillo *et al.*, 2001; Daftary & Taylor, 2006). Ainda assim, pouco se conhece sobre a função destes genes nos tecidos adultos. No pulmão adulto, 11 membros da família HOX são expressos, incluindo 5 membros do locus A (HOXA2 ao HOXA6), 5 membros do locus B (HOXB2 ao HOXB6) e o gene HOXD1 (Tiberio *et al.*, 1994). O gene HOXA5 se mantém altamente expresso durante a formação pulmonar e em pulmões de recém-nascidos, mostrando que os genes HOX possuem diferentes papéis na regulação da maturação pulmonar (Mandeville *et al.*, 2006). A expressão dos vários genes HOX que se encontram altamente expressos no pulmão fetal diminui com o avanço da gestação, principalmente o gene HOXB5 (Volpe *et al.*, 2003). Níveis elevados da proteína HOXB5 têm sido encontrados em casos de malformação adenomatóide cística congênita e em seqüestrações bronquiopulmonares quando comparado com o tecido pulmonar normal, sugerindo um papel importante deste gene no processo de formação de anormalidades pulmonares (Volpe *et al.*, 2003). A expressão dos membros da família HOX em tecidos humanos normais, incluindo rim, mama, cólon, cérvix uterino e fígado, é similar aos encontrados na análise pulmonar, contudo, cada órgão adulto demonstra uma combinação específica de expressão de genes HOX. Nos órgãos citados, a expressão envolve um número muito superior de membros da família HOX, sendo 30 expressos no rim e na mucosa intestinal (Cillo *et al.*, 2001).

Em cérvix uterino, a maioria dos genes do locus B foi detectada (7/10) na camada basal do epitélio, indicando seu papel na proliferação e/ou diferenciação do epitélio cervical (López *et al.*, 2006). O gene HOXA10 está ligado à diferenciação funcional do útero adulto e parece ser regulado por hormônios como estrógeno, progesterona e testosterona (Daftary & Taylor, 2006). Mulheres

portadoras da síndrome do ovário policístico apresentam níveis elevados de testosterona e uma redução nos níveis de expressão de HOXA10, o que correlaciona com a dificuldade de implantação dos embriões e, portanto, infertilidade destas mulheres (Daftary & Taylor, 2006). Coletivamente, estes estudos indicam que a plasticidade dos órgãos adultos, onde proliferação, diferenciação e regeneração de muitos tipos celulares são intensas, pode estar associada com a expressão de genes da família HOX.

A hematopoiese também é um processo conhecidamente regulado por genes da família HOX (Sauvageau *et al.*, 1994). Interessantemente, como o sistema hematopoiético não possui uma orientação espacial, a expressão diferencial dos genes HOX se manifesta pela especificidade de cada linhagem celular (Daftary & Taylor, 2006). HOXA7 apresenta níveis elevados de expressão em células indiferenciadas, porém seus níveis são reduzidos durante a diferenciação monocítica e mantidos durante a diferenciação granulocítica (Leroy *et al.*, 2004). Quatro dos 11 genes do cluster A (HOXA4, HOXA5, HOXA9 e HOXA10) estão expressos em linhagens CD34+, contudo apenas o membro HOXA10 é expresso exclusivamente por estas células (Sauvageau *et al.*, 1994). A superexpressão individual de alguns membros da família HOX provoca uma perturbação no padrão de diferenciação das células hematopoiéticas indiferenciadas (Dorrance *et al.*, 2006). A superexpressão de HOXA5 em células da medula óssea e do cordão umbilical promove a expansão de células mielóides progenitoras e a redução na proliferação e diferenciação dos eritrócitos (Argiropoulos & Humphries, 2007). Estudos utilizando oligonucleotídeos antisense contra HOXA5 demonstraram que este gene regula a proliferação dos eritrócitos e controla a hematopoiese granulocítica/monocítica (Strathdee *et al.*, 2007a). Estes achados demonstram que o gene HOXA5 tem um papel importante como regulador da diferenciação celular durante a hematopoiese (Fuller *et al.*, 1999). Juntamente com o gene HOXA5, a superexpressão de HOXA10 está associada com perturbações na diferenciação mielóide e de linfócitos B (Argiropoulos & Humphries, 2007). Estes estudos sugerem que os genes da família HOX são

importantes para a hematopoiese e que diferentes combinações de expressão destes genes estão envolvidas na diferenciação e maturação de linhagens celulares específicas.

2.6. Alterações do Desenvolvimento em Humanos

Mutações naturais em humanos foram descritas nos membros HOXA13, HOXD10 e HOXD13 da família HOX (Grier *et al.*, 2005; Shrimpton *et al.*, 2004; Mortlock & Innis, 1997). Mutações em HOXD13 promovem simpolidactilia, uma combinação de sindactilia e polidactilia (Grier *et al.*, 2005). Indivíduos afetados por esta alteração apresentam mutação por inserção de uma sequência de polialaninas no exon 1 do gene HOXD13, resultando em uma mutação com ganho de função (Goodman *et al.*, 1997). Crossing-over desigual é provavelmente o mecanismo pelo qual esta mutação ocorre, visto que as expansões nas sequências de polialaninas são freqüentemente derivadas da recombinação entre 2 alelos normais, porém incorretamente pareados (Warren, 1997).

Mutações em HOXA13 induzem a síndrome da mão-pé-genital (Mortlock & Innis, 1997). Esta síndrome apresenta anormalidades nos membros, incluindo falanges curtas e fusão e calcificação dos ossos do pulso, e nos genitais, como bifurcações parcial ou completa do útero e hipospadias (Mortlock & Innis, 1997). Uma mutação no gene HOXD10 foi encontrada em uma família segregando simultaneamente, de forma autossômica dominante com penetrância incompleta, as doenças de Charcot-Marie-Tooth e tálus vertical congênita (Shrimpton *et al.*, 2004). Estas doenças são caracterizadas por deformidades nas porções distais dos membros inferiores. Nesta família foi identificado uma transversão de uma timina para uma adenina na posição 956 do exon 2 do gene HOXD10, resultando em uma mutação de sentido trocado (missense) no códon 319, com a substituição de uma metionina (ATG) por uma lisina (AAG) (Shrimpton *et al.*, 2004).

A síndrome fetal do valproato é outra alteração do desenvolvimento associada com alterações na expressão de genes HOX. O valproato sódico é amplamente usado como droga antiepilética e seu uso durante a gravidez é comprovadamente teratogênico (Faiella *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2006), com fetos apresentando mal-formações do tubo neural, defeitos cardíacos, fissuras orais e anomalias dos genitais e membros (Kulkarni *et al.*, 2006). Experimentos com culturas celulares demonstraram que o tratamento com valproato sódico induz uma significativa alteração do padrão de expressão dos genes HOXD1, HOXD8, HOXD10, HOXD11 e HOXD12, sugerindo uma explicação para as alterações homeóticas (Faiella *et al.*, 2000).

2.7. Genes HOX e Câncer

As descobertas das últimas décadas demonstram que muitas das vias moleculares que fundamentam o desenvolvimento e a progressão tumoral são aberrações de processos que controlam a embriogênese. Dentro deste contexto, os genes homeobox são considerados os maestros que controlam a íntima relação entre embriogênese e tumorigênese (Yoshida *et al.*, 2006). Os mecanismos da desregulação dos genes HOX em cânceres são variados e apenas recentemente começam a ser entendidos. Em certos tecidos, alguns genes HOX que normalmente têm funções supressoras de tumor são silenciados e, em outros tecidos, genes HOX que são expressos de forma aberrante, quando consideramos seu padrão têmporo-espacial, resultam em efeitos oncogênicos.

Muitos estudos registraram diferenças na expressão dos genes da família HOX entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno ainda permanece obscura na maioria dos casos. É de consenso geral que a expressão aberrante de genes da família HOX possa contribuir para a desregulação dos principais processos associados com o desenvolvimento e/ou progressão tumoral, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular,

neovascularização e migração e invasão dos tecidos adjacentes (Grier *et al.*, 2005; Rhoads *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2006). Em alguns cânceres, como leucemia, a superexpressão de genes HOX, mediada pela fusão de certas proteínas, promove expansão clonal (Calvo *et al.*, 2002), enquanto que em outros, como o neuroblastoma, a perda de expressão de um único gene HOX induz tumorigênese (Zhang *et al.*, 2007). Em alguns tumores, a expressão anormal dos genes HOX leva diretamente à tumorigênese através da prevenção de apoptose, alterações nas vias de sinalização celular, modulação da transição epitélio-mesênquima (TEM) ou promoção de invasão (Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Estes estudos denotam o sistema rigidamente regulado através do qual a expressão dos genes HOX dirige a organogênese normal e também a tumorigênese.

Os mecanismos pelos quais os genes HOX exercem seus efeitos são variados, mas com notada especificidade (Mann & Chan, 1996). Em um esforço para classificar estas mudanças, os mecanismos que induzem a desregulação foram utilizados como critérios.

O primeiro mecanismo é a desregulação tempo-espacial, na qual o padrão de expressão dos genes HOX que surge em um tecido específico é diferente do encontrado no tecido normal. Então, o gene não é expresso pelo tecido normal, mas é encontrado no câncer. Na análise dos níveis de expressão dos genes HOX em amostras de tecido de CEC esofágico e de mucosa esofágica normal, foram identificados 13 genes da família HOX com expressão alterada (Chen *et al.*; 2005). Os genes HOXA10, HOXA13, HOXB9, HOXC4, HOXC4, HOXC8, HOXD9, HOXD10 e HOXD13 foram expressos somente pelas amostras de CEC, sugerindo uma possível participação destes membros no desenvolvimento e progressão tumoral (Chen *et al.*, 2005). Takahashi *et al.* (2007) compararam os níveis de expressão de todos os genes HOX em 48 CECs de esôfago e 7 amostras de tecido esofágico normal por meio de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). Como esperado, o esôfago normal, uma estrutura do trato

gastrointestinal anterior, expressou um maior número de genes localizados na porção 3', enquanto que as amostras de tecido tumoral demonstraram uma expressão significativamente aumentada dos genes da porção 5'. Este estudo ainda revelou que o gene HOXA5, que tradicionalmente é expresso por células basais do epitélio normal, foi encontrado em abundância nas células tumorais. Em outro estudo foi observado que os genes HOXD3 e HOXD4 são expressos apenas por linhagens celulares normais de mama, enquanto os genes HOXA3, HOXB1 e HOXC13 são expressos nas linhagens celulares tumorais (Svingen & Tonissen, 2003). Na região cervical, os genes HOXA1, HOXB2, HOXB4, HOXC5, HOXC10 e HOXD13 foram encontrados somente em cânceres, não sendo expressos em tecidos normais (Hung *et al.*, 2003). Em linhagens celulares de carcinoma de endométrio, os autores demonstraram que os parálogos HOXB13 e HOXC13 foram expressos pela grande maioria das linhagens celulares, e que a inibição de HOXB13 por oligonucleotídeos antisense diminuiu em 90% a capacidade de invasão das células tumorais (Zhao *et al.*, 2005). A comparação entre o padrão de expressão dos genes HOX entre uma linhagem de queratinócito cervical normal e linhagens celulares derivadas de carcinoma cervical foi similar, com exceção dos genes HOXC5 e HOXC8 que foram expressos somente em linhagens celulares derivadas de carcinoma cervical, sugerindo uma possível associação destes genes com o processo de transformação maligna (Alami *et al.*, 1999). Em outro estudo, somente os genes HOXA2, HOXA7, HOXC5, HOXC8 e HOXD12 não foram expressos em amostras de tecido cervical normal e o gene HOXC5 foi expresso em 9 das 11 linhagens celulares de carcinoma cervical avaliadas, sugerindo que além do gene HOXC5, os genes HOXB2, HOXB4, HOXC10 e HOXD13 também podem estar envolvidos no processo de transformação de células cervicais normais em células malignas (Magli *et al.*, 1991). HOXC6 foi expresso em áreas diferenciadas do epitélio intestinal, mas foi silenciado na maioria das amostras de câncer (Freschi *et al.*, 2005). Em conjunto, estes exemplos sugerem que os passos que levam à tumorigênese estão associados com o ganho de uma nova expressão de membros da família HOX.

O segundo mecanismo é o de dominância, no qual os genes HOX são expressos em um nível maior do que o observado em um tecido normal. Então, os genes são superexpressos em tumores quando comparados com tecidos normais correspondentes. Um exemplo é a expressão de HOXA9 em leucemia mielóide aguda (AML) (Golub *et al.*, 1999). Análises por microarray revelaram que HOXA9 é superexpresso em leucemias mielóides quando comparadas com células mielóides normais, e que a superexpressão estava correlacionada com prognóstico ruim e falha na resposta ao tratamento quimioterápico (Golub *et al.*, 1999). Estudos adicionais demonstraram que HOXA9 pode existir como uma proteína fusionada com a proteína nucleoporina NUP98 em células de leucemia, aumentando o potencial maligno deste gene HOX (Ghannam *et al.*, 2004). A análise comparativa da expressão dos genes HOX em tecidos mamários normais e tumorais demonstrou expressão diferenciada dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXC11, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9 e HOXD10 (Makiyama *et al.*, 2005). Todos estes genes HOX, exceto HOXC11, apresentaram maiores níveis de expressão nas amostras de tecido normal em relação aos tecidos neoplásicos (Makiyama *et al.*, 2005). Em CECs de esôfago, os genes HOXA2, HOXA7, HOXA9, HOXC6 e HOXC9 foram expressos pelas amostras tumorais e de mucosa normal, mas os membros HOXA7, HOXA9 e HOXC6 apresentaram níveis de expressão consideravelmente mais altos no CEC quando comparado com os de mucosa normal (Chen *et al.*, 2005). Em cânceres de cólon, os genes HOXB6, HOXB8, HOXC8 e HOXC9 foram mais expressos em linhagens celulares derivadas de pólipos intestinais e de carcinoma colo-retal do que em linhagens normais (Vider *et al.*, 2000). Na mucosa de cólon, todos os membros da família HOX estão expressos, porém em adenocarcinomas o gene HOXA9 foi significativamente mais expresso quando comparado à mucosa normal (Freschi *et al.*, 2005).

Os níveis de expressão dos genes HOXA11, HOXA13, HOXB9, HOXD12 e HOXD13 estão aumentados em melanomas em comparação com os

níveis encontrados em nevos pigmentados (Maeda *et al.*, 2005). Além disso, os níveis de expressão de HOXA1, HOXA2, HOXC4 e HOXB13 são maiores em melanomas com metástases a distância comparado com tumores não metastáticos (Maeda *et al.*, 2005). Ainda neste trabalho, a expressão dos genes HOX foi distinta quando se comparou melanomas de diferentes espessuras. Os membros HOXA11 e HOXB2 apresentaram níveis elevados de expressão em amostras de melanoma no estágio pT4 e o gene HOXC13 foi mais expresso nos tumores pT1-pT3 quando comparado com os tumores pT4, revelando que a expressão alterada destes 3 genes HOX pode estar associada com a fase de crescimento vertical do melanoma. Coletivamente, estes estudos demonstram que diferentes membros da família HOX podem estar associados ao desenvolvimento e/ou comportamento biológico dos melanomas cutâneos.

Por meio dos mecanismos listados acima, a desregulação da expressão dos genes HOX pode afetar várias vias que promovem a tumorigênese. Em alguns tumores, as vias da organogênese, tais como as vias sinalizadoras de receptores, são alteradas e direcionam o crescimento tumoral (Myers *et al.*, 2002). Por outras vezes, a expressão de genes HOX é alterada e resulta na manutenção de um estado embrionário através do qual há a ativação de vias anti-apoptóticas ou supressão de diferenciação (Raman *et al.*, 2000). Adicionalmente, novos mecanismos, tais como as interações protéicas, podem também permitir que as proteínas HOX exerçam seu papel oncogênico.

O papel dos membros da família HOX no processo de diferenciação celular pode ocorrer de 2 maneiras. Na primeira, a expressão é necessária para a indução da diferenciação e maturação terminal (Economides & Capecchi, 2003; Jung *et al.*, 2005, Trivedi *et al.*, 2007; McMullin *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 1999), enquanto que na segunda o padrão de diferenciação só é obtido a partir do silenciamento do gene (Lu & Kamps, 1997, Trivedi *et al.*, 2008). Independente do mecanismo, a participação de gene HOX na alteração no padrão de diferenciação celular é freqüente em tumores. Jung e colaboradores demonstraram que a

expressão exógena de HOXB13 na linhagem LNCaP de câncer de próstata suprime a transativação do receptor de andrógeno e, conseqüentemente, previne o crescimento destas células (Jung *et al.*, 2004a, Jung *et al.*, 2004b). Interessantemente, um trabalho anterior revelou que HOXB13 é necessário para o completo desenvolvimento da próstata de ratos (Economides & Capecchi, 2003). Os genes HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8 não são normalmente expressos em tecido prostático normal ou linhagens celulares, mas são expressos em biópsias de tumores primários e células cancerígenas (Miller *et al.*, 2003). Além disso, a superexpressão de HOXC8 em linhagens celulares e amostras de câncer de próstata correlacionam com a perda de diferenciação celular (Waltregny *et al.*, 2002) e a proliferação hormônio-independente (Kikugawa *et al.*, 2006). Em progenitores hematopoiéticos, a expressão de HOXB3 pode especificamente levar ao desenvolvimento da leucemia mielóide e impedir a diferenciação linfóide normal (Lawrence *et al.*, 1996), e de maneira contrária, a expressão de HOXC4 pode especificamente direcionar a diferenciação linfoblástica (Bijl *et al.*, 1996).

Em algumas circunstâncias, genes HOX têm sido especificamente implicados como fatores causais de propriedades invasivas de alguns cânceres. Na maioria dos casos, os genes HOX envolvidos são aberrantemente expressos em tecidos onde a expressão não é esperada (Wu *et al.*, 2006). HOXC10 foi analisado quanto ao seu papel na indução da capacidade invasiva de células de câncer de colo de útero, visto que a expressão elevada de HOXC10 foi encontrada em queratinócitos cervicais imortalizados por papilomavírus humano e células de carcinoma cervical (Zhai *et al.*, 2007). Neste estudo os autores demonstraram que linhagens celulares que tiveram a expressão de HOXC10 bloqueada apresentaram uma significativa redução na capacidade invasiva (Zhai *et al.*, 2007). Estudo com linhagens celulares de mama normal demonstraram que a superexpressão de HOXB13 promove a invasividade celular, a proliferação e a formação de colônias (Miao *et al.*, 2007). Interações com a via do receptor de

estrogênio, tanto direta quando indiretamente, por HOXB13 parecem ser importantes, mas estes mecanismos ainda estão sendo elucidados.

A expressão aberrante dos genes HOX pode também contribuir para a oncogênese por permitir a ativação de vias anti-apoptóticas. Em linhagens celulares e em amostras de câncer de mama foi observada uma correlação entre perda de expressão de HOXA5 e metilação do promotor (Raman *et al.*, 2000). Investigando esta conexão *in vitro*, os sítios de ligação de HOXA5 ao promotor da TP53 foram identificados e os resultados confirmaram que HOXA5 induz a expressão de p53, resultando em taxas aumentadas de apoptose. Chen *et al.* (2004) posteriormente encontraram que HOXA5 também pode induzir a apoptose independentemente de seu efeito em TP53 ao induzir a ação da caspase 2 e caspase 8 em células de câncer de mama. Chu *et al.* (2004) demonstraram que HOXA10 tem um efeito similar ao do HOXA5 na ativação da expressão de p53 em linhagens de carcinoma de mama positivos para receptores de estrogênio. O papel dos genes HOX na supressão da apoptose foi também estudado por Morgan e colaboradores que descreveram o peptídeo HXR9, o qual interfere especificamente na ligação das proteínas HOX aos co-fatores PBX (Morgan *et al.*, 2007). A expressão anormal, aumentada, de múltiplos genes HOX é evidente em células B16 (Plowright *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2007). O tratamento de células de carcinoma pulmonar do tipo não-pequenas células e de melanoma com HXR9 aumentou a expressão de genes-alvo, incluindo FOS que já havia sido previamente descrito como um iniciador para a apoptose (Kasibhatia *et al.*, 1998), gerando um incremento significativo na taxa de apoptose.

Além de regular a apoptose, os genes HOX também podem controlar a proliferação celular. O fenótipo de proliferação causado pela expressão aberrante dos genes HOX é bem caracterizado em leucemias (Argiropoulos & Humphries, 2007). Ao contrário do que acontece em tumores sólidos, onde a desregulação dos genes HOX é resultado de mutações com ganho ou perda de função, a superexpressão dos genes HOX em leucemias se dá geralmente por

translocações, resultando em expressão constitucional do gene HOX translocado, ou por regulação alterada pelo homólogo MLL (Calvo *et al.*, 2002). A superexpressão de alguns genes dos loci A e B podem levar a uma proliferação aumentada de clones específicos e seus progenitores em leucemias (Lawrence & Largman, 1992). Destes, HOXA9 especificamente resulta em indução da proliferação de células derivadas da medula óssea. Além disso, a proteína fusionada NUP98-HOXA9 sinergisticamente aumenta a proliferação de clones de leucemia, particularmente de pacientes com leucemia mielóide aguda (Calvo *et al.*, 2002). Os mecanismos pelos quais HOXA9 induz a proliferação dos clones de leucemia ainda estão sendo elucidados, no entanto, as leucemias requerem a superexpressão de MEIS1 em células mielóides com a proteína fusionada NUP98-HOXA9 (Calvo *et al.*, 2002) e desta forma pode ser mediada através do direto aumento do elemento responsivo de ligação à proteína 1 cAMP (Hu *et al.*, 2009). Em estudo recente, a expressão de HOXA9 em uma linhagem de leucemia de células B causou a maior expressão de receptores de fator de crescimento insulina-like tipo 1 (IGF1R) (Whelan *et al.*, 2008), induzindo de maneira autócrina a proliferação destas células. É importante lembrar que alguma expressão de HOXA9 é necessária para a hematopoiese normal porque a falta completa de HOXA9 em camundongos é associada à pancitopenia (deficiência de todos os tipos celulares sanguíneos maduros) (Lawrence *et al.*, 1997, Hu *et al.*, 2009), sugerindo que os efeitos proliferativos de HOXA9 são seletivos nas células tumorais.

Em tecidos específicos, a expressão aberrante dos genes HOX apresenta efeitos diretos na sinalização de receptores celulares. A expressão de HOXB13 pode funcionar como um supressor de tumor ao suprimir a transativação de receptores de andrógeno (RA) em linhagens de câncer de próstata (Jung *et al.*, 2004a; Jung *et al.*, 2004b). Estes estudos também demonstraram que as interações físicas entre HOXB13 e RA previnem a atividade transcricional de RA dependente de hormônios. Isto implica que HOXB13 normalmente interrompe o

desenvolvimento da próstata em resposta a estímulo androgênico. Paradoxalmente, HOXB13 desregula as vias que controlam as respostas ao receptor de estrógeno no ovário e nos cânceres de mama, nos quais tem efeitos oncogênicos (Miao *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2004). HOXB13 endógeno é especificamente pouco expresso em linhagens celulares de câncer de mama que são expostas ao estradiol (que se liga e ativa receptores de estrógeno), onde CHDH e ILI7RB são mais expressos, presumivelmente como alvos dos receptores de estrógeno (RE) (Wang *et al.*, 2007). Apesar disso, nenhuma mutação no gene HOXB13 ou em seu promotor foram encontradas, sugerindo que uma mutação em um gene que regula HOXB13 ou em um gene que leva a ativação de outro fator de crescimento está envolvida em sua via de sinalização o que permite o crescimento de um clone independente de RE (Loi *et al.*, 2009). Miao *et al.* (2007) demonstraram que HOXB13 diretamente aumenta a expressão de RE ao ativar o elemento de resposta ao estrogênio (ERE) no promotor ESR1 em linhagem celular de câncer de ovário. Através de um mecanismo ainda não identificado, HOXB13 também se liga aos EREs de uma forma dependente de RE que está presente em genes que direcionam a proliferação, perda da inibição por contato e diminuição da apoptose. Além disso, esta superexpressão diretamente se correlaciona com resistência ao tamoxifeno de uma forma dose-dependente.

Interessantemente, os efeitos oncogênicos dos membros da família HOX são específicos para cada tipo celular/tecido, como exemplificado pelo gene HOXD10. Em câncer de mama, a repressão permite o aumento da proliferação (Carrio *et al.*, 2005), enquanto que em câncer de pulmão a superexpressão confere proliferação (Plowright *et al.*, 2009). O gene HOXA1 já havia sido descrito em associação a outros genes HOX em sua desregulação em tecidos e linhagens celulares tumorais, no entanto, foi bastante investigado de maneira isolada em cânceres variados (Zhang *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2006).

2.8. HOXA1

O gene HOXA1, assim como os membros do seu parálogo, é um dos primeiros genes da família HOX a ser expresso durante a embriogênese e é altamente sensível à regulação pelo ácido retinóico (Maconochie *et al.*, 1996). HOXA1 é fundamental para o desenvolvimento do ectoderma neural (Frohman & Martin, 1992) e sua expressão é mais tarde crucial para a formação da região posterior do sistema nervoso central (Frohman *et al.*, 1990). Mutações em HOXA1 causaram um fenótipo denominado síndrome Bosley-Salih-Alorainy (BSAS; OMIM #601536), a qual é uma variação da síndrome de retração de Duane (DRS) tipo 3, caracterizada por presença de surdez, malformações na musculatura cerebral e autismo (Tischfield *et al.*, 2005). As mutações descritas em HOXA1 foram de sentido trocado, resultado de uma inserção de uma guanina entre os nucleotídeos 175 e 176 (175-176insG), e sem sentido, caracterizada por uma substituição homozigota de uma citosina por uma guanina na posição 84 (84C>G).

No tecido tumoral HOXA1 parece exercer um papel importante nos estágios iniciais da oncogênese. Em uma análise abrangente dos 39 genes HOX em carcinomas pulmonares, a expressão de HOXA1, além de HOXA5, HOXA10 e HOXC6, foi significativamente maior nos tumores comparado com o tecido pulmonar normal e esta expressão correlacionou com o padrão de proliferação e resistência a apoptose (Abe *et al.*, 2006). Na região cervical uterina, o gene HOXA1 foi expresso somente em cânceres, não sendo expressos em tecidos normais (Hung *et al.*, 2003). O gene HOXA1 também foi detectado em linhagens celulares de carcinoma de mama, sendo que sua expressão foi positivamente regulada pelo tratamento destas células com progestina, um hormônio esteróide associado ao processo de diferenciação celular (Chariot & Castronovo, 1996). Drabkin *et al.* (2002) também demonstraram uma maior expressão de HOXA1 na glândula mamária murina neoplásica, sugerindo que HOXA1 atua como promotor do crescimento celular nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral. HOXA1 também estimula a ativação transcricional de

algumas moléculas pró-oncogênicas, incluindo ciclina D1 e Bcl-2, induzindo a proliferação e sobrevivência de células de carcinoma mamário humano, sendo considerado pelos autores um “oncogene” (Zhang *et al.*, 2003). De fato, a expressão forçada de HOXA1 em células epiteliais imortalizadas de mama foi suficiente para promover sua transformação oncogênica, com conseqüente formação de colônias em ensaios de “soft-agar” (crescimento independente de ancoragem) e formação tumoral agressiva *in vivo* (Zhang *et al.*, 2006). Resultados similares foram observados em células hematopoiéticas primárias quando HOXA1 foi superexpresso em associação com o co-fator Meis1 (Golub *et al.*, 1999; Bach *et al.*, 2010). O gene HOXA1 juntamente com HOXA10 demonstrou diferenças no perfil de metilação em amostras de carcinomas ductais *in situ* comparado com hiperplasias ductais atípicas, revelando que o padrão de metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora do gene HOXA1 muda significativamente em lesões pré-invasivas (Park *et al.*, 2011).

E-caderina, uma molécula envolvida na adesão celular e capaz de estimular a sinalização intracelular e potencializar a sobrevivência das células neoplásicas (Zhang *et al.*, 2006), estimula a expressão de HOXA1 (Zhang *et al.*, 2006). Neste contexto, HOXA1 induz a sobrevivência celular e permite que E-caderina estimule a proliferação independente de ancoragem das células tumorais. Os mecanismos pelo quais HOXA1 medeia à transformação oncogênica ainda não foram completamente definidos, porém Mohankumar *et al.* (2007) demonstraram que genes envolvidos na via de ativação da proteína p44/42 MAP-Kinase (GRB2, MAP kinase kinase (MEK1) e SDFR1) ou genes regulados por esta via p44/42 MAP quinase (IER3, EPAS1, PCNA e catalase) são controlados por HOXA1.

Em estudos anteriores (Bitu, 2008; Destro, 2008), nós verificamos o perfil de expressão dos membros dos loci A e B da família HOX em amostras orais de tecido normal e CEC. Pares de amostras orais de mucosa normal e CEC do mesmo paciente e amostras de mucosa oral normal de indivíduos sem história de

tabagismo ou alcoolismo foram utilizadas para este propósito. Figura 2 ilustra o diagrama de expressão (presença ou ausência) dos membros do locus A nas amostras deste estudo. Transcritos dos membros HOXA6 e HOXA9 não foram expressos por nenhuma das amostras, enquanto que as amostras de tecido oral normal obtidas de pacientes sem exposição aos principais fatores de risco associados ao CEC oral expressaram poucos dos transcritos. Apenas os membros HOXA1, HOXA2 e HOXA4 foram expressos pelas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral. Interessantemente, as amostras de tecido normal provenientes dos pacientes com CEC oral demonstraram um padrão de expressão mais abundante comparando com as amostras dos pacientes sem fatores de risco para o câncer. Comparando as amostras orais de mucosa normal e CEC do mesmo paciente, observamos que os genes HOXA5, HOXA7 e HOXA10 foram expressos em maior número nas amostras de CEC, enquanto que os membros HOXA2, HOXA4 e HOXA11 foram expressos em maior número nas amostras de mucosa oral normal. Levando em consideração a abundância dos transcritos de mRNA (expressão relativa do gene alvo normalizada pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH), verificamos que os níveis de expressão dos membros HOXA4, HOXA5, HOXA7 e HOXA10 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral comparado com as amostras de tecido oral normal de pacientes sem fatores de risco e do próprio paciente com CEC. A expressão de HOXA1, HOXA2 e HOXA13 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral comparado com amostras normais de pacientes livres de fatores de risco para a oncogênese oral, mas não foram diferentes das amostras de mucosa normal de pacientes com CEC.

2.9. HOXB7

Os genes HOX do locus B têm sido implicados na hematopoiese normal, com o gene HOXB7 exercendo um papel chave na diferenciação mielomonocítica (Lill *et al.*, 1995). HOXB7 é expresso durante as fases iniciais do

desenvolvimento do trato urinário, onde controla a proliferação celular que precede os eventos de diferenciação e formação específica dos tecidos que formam este sistema (Kondo *et al.*, 2008). Interessantemente, HOXB7 é expresso em músculo esquelético fetal, mas não no adulto (Miano *et al.*, 1996). No entanto, a maioria do conhecimento que se tem sobre HOXB7 é derivada de estudos com células neoplásicas e tumores.

HOXB7 foi o único gene do locus B expresso constitutivamente em 25 diferentes linhagens celulares e em 5 amostras cirúrgicas de melanoma humano (Caré *et al.*, 1996). Em culturas de melanócitos normais e em nevos melanocíticos, o gene HOXB7 é expresso somente nas células em proliferação (Maeda *et al.*, 2005). Braig *et al.* (2010) demonstraram que a menor expressão do microRNA miR-196a em células de melanoma está relacionada a maior expressão de HOXB7, que por sua vez aumenta a expressão de bFGF e BMP4, aumentando o potencial migratório das células. Wu *et al.* (2006) demonstraram que HOXB7 foi especificamente mais expresso nos sítios primários e de metástase óssea de cânceres de mama quando comparado com os níveis encontrados em tecido mamário normal. Estudos *in vitro* revelaram que linhagens celulares transfectadas com o gene HOXB7 adquiriam características de TEM, incluindo mudanças na morfologia e no arranjo do citoesqueleto e perda de expressão de moléculas de adesão (Wu *et al.*, 2006). HOXB7 desempenha papel importante na progressão maligna do câncer de mama através da liberação de bFGF (Waltregny *et al.*, 2002). A associação entre HOXB7 e bFGF foi confirmada em ensaios de transativação direta, no qual HOXB7 foi capaz de se ligar à região promotora de bFGF e desencadear sua transcrição gênica (Waltregny *et al.*, 2002). A inibição da atividade de HOXB7 com oligonucleotídeos antisense demonstrou uma redução na capacidade invasiva das linhagens celulares derivadas do câncer de ovário (Yamashita *et al.*, 2006). A superexpressão do gene HOXB7 também parece estar envolvida no desenvolvimento do mieloma múltiplo. Storti *et al.* (2010) demonstraram a superexpressão de HOXB7 em 40% de pacientes com mieloma múltiplo. A expressão forçada de HOXB7 em linhagens de mieloma alterou

significativamente seu perfil transcricional de VEGFA, FGF2, MMP2, WNT5a e PDGFA, aumentando a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). De maneira contrária, o bloqueio da tradução de HOXB7 com o uso de RNA de interferência diminuiu a expressão de fatores angiogênicos (Storti *et al.*, 2010). Recentemente, Rubin *et al.* (2007) demonstraram que células superexpressando o gene HOXB7 apresentam aumento de sobrevivência e da taxa de reparo do DNA quando comparado com seus respectivos controles. Além disso, verificaram que o gene HOXB7 não age somente como um ativador transcricional, mas também atua como um oncogene, interagindo com membros da proteína-quinase dependente de DNA e desempenhando papel importante no reparo do DNA. Assim, acredita-se que o gene HOXB7 se liga a proteínas importantes envolvidas no processo de reparo de DNA e manutenção da estabilidade genômica (Rubin *et al.*, 2007).

Quando camundongos MMTV-Hoxb7 foram cruzados com camundongos MMTV-ErbB2, a geração expressando ambos os transgenes apresentaram uma latência tumoral maior e o número de tumores primários foi reduzido. No entanto, o fardo tumoral final foi maior e mais freqüente, e metástases maiores se formaram nos camundongos contendo ambos os transgenes (Chen *et al.*, 2008). Isso sugere que HOXB7 suprime a tumorigênese na presença de ErbB2, possivelmente por aumentar a atividade da enzima ribose polimerase poli (adp) (PARP) e por prevenir mutações oncogênicas precoces. No entanto, uma vez que a tumorigênese já está iniciada, HOXB7 promove a sobrevivência tumoral, o crescimento e as metástases à distância. Isto também pode ser devido ao reparo de DNA mediado por PARP, o que estabilizaria as mutações oncogênicas e preveniria a apoptose, similarmente ao que acontece via BRCA em anemia de Fanconi (Chirnomas *et al.*, 2006). Investigações na interação entre PARP1 e HOXB7 indicaram que a poli (ADP) ribosilação de HOXB7 por PARP1 dificulta a ligação ao promotor do fator de crescimento de fibroblastos (FGF1) por HOXB7 (Shah & Sukumar, 2010). Como discutido acima, a interação

de HOXB7 e PARP1 pode manter as mutações oncogênicas adquiridas em câncer de mama e causar resistência, particularmente a terapia por radiação. Estudos que avaliem as modificações promovidas por HOXB7 podem fornecer um melhor entendimento do exato papel de HOXB7 na tumorigênese.

Nossos resultados prévios, em especial atenção aos membros do cluster B, revelaram que a expressão de 4 membros (HOXB1, HOXB3, HOXB5 e HOXB8) foi totalmente silenciada em amostras de mucosa oral normal e CEC oral. Apenas os genes HOXB2, HOXB7 e HOXB13 foram expressos em mais que 50% das amostras deste estudo (Fig. 3). Contudo, quando os níveis de expressão foram levados em consideração, nós identificamos que o gene HOXB7 foi significativamente mais expresso em CECs orais comparado com amostras de pacientes normais.

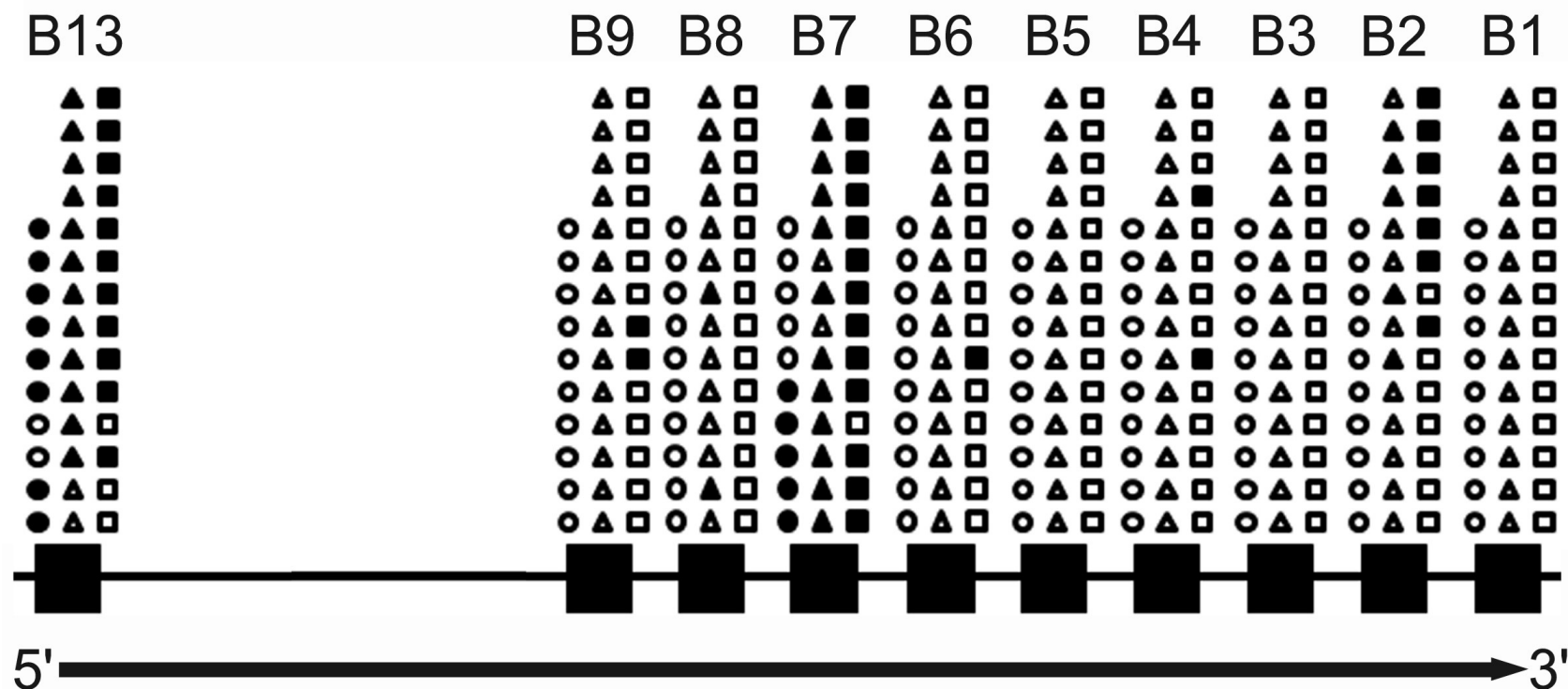


Figura 3. Diagrama da expressão dos membros do cluster HOXB em amostras orais de mucosa normal e CEC. Cada símbolo representa uma amostra e suas posições são preservadas em toda a imagem. Círculos representam amostras de mucosa oral normal derivada de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o câncer bucal (tabagismo e alcoolismo), e triângulos e quadrados representam respectivamente amostras de mucosa oral normal e CEC do mesmo paciente. Símbolos sem preenchimento são genes silenciados (sem expressão) e o preenchimento indica expressão ativa. Maioria dos genes do cluster HOXB foi silenciada, com exceção dos genes HOXB7 e HOXB13.

3. Proposição

1. Estudar o efeito da superexpressão dos genes HOXA1 e HOXB7 sobre a proliferação, apoptose, adesão, invasão, TEM e crescimento independente de ancoragem na linhagem celular HaCAT de queratinócitos imortalizados mas não transformados;
2. Estudar o efeito da inibição dos genes HOXA1 e HOXB7 em linhagem celular de CEC oral SCC-9;
3. Analisar a correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos produtos dos genes HOXA1 e HOXB7 e as características clínico-patológicas de amostras teciduais de CEC oral.

4. Materiais e Métodos

4.1. Aprovação do Comitê de Ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo 060/2006; anexo).

4.2. Amostras

Fragmentos de mucosa oral normal foram coletados de 10 indivíduos clinicamente saudáveis sem história de tabagismo e etilismo que foram submetidos ao tratamento cirúrgico para remoção de lesões benignas comuns no Orocentro.. Os pares de amostras orais de tecido de CEC e de tecido morfológicamente de normal de 14 pacientes foram coletados no interior da lesão, evitando áreas de necrose, e à margem da lesão, respectivamente. Cada fragmento de tecido foi fixado em 10% formalina e processado para análise histológica em coloração de hematoxilina e eosina ou imuno-histoquímica.

Também utilizamos 132 amostras de CEC oral, distribuídas em 2 arranjos de tecido, foram utilizadas neste estudo. Todos os pacientes foram diagnosticados e tratados no Departamento de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital AC Camargo, São Paulo. Informações clínicas, demográficas, de tratamento, recorrência e sobrevida foram coletadas dos prontuários médicos como descrito em (Silva *et al.*, 2010). As características histopatológicas, incluindo grau de diferenciação tumoral, infiltração vascular e infiltração neural, foram determinadas em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Todas as recorrências foram confirmadas histopatologicamente. Sobrevida livre de doença foi determinada como o período entre o tratamento inicial e a confirmação da recorrência, enquanto que sobrevida global foi o período entre o diagnóstico do paciente e morte ou a

última visita de acompanhamento. Um resumo das principais características clínicas e histopatológicas é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínico-patológicas das amostras de CEC oral deste estudo.

Parâmetro	n	%
Idade		
Média ± Desvio Padrão	56,25 ± 10,53	
Variação	31-79	
Gênero		
Homem	107	81,06
Mulher	25	18,94
Raça		
Caucasiana	113	85,60
Não-Caucasiana	19	14,40
Hábito de Fumar		
Não	12	9,09
Sim	120	90,91
Hábito de Beber		
Não	28	21,22
Sim	104	78,78
Localização		
Língua	95	71,97
Assoalho Bucal	10	7,58
Gengiva	10	7,58
Mucosa Jugal	9	6,82
Região Retromolar	6	4,54
Lábio	2	1,51
Estádio T		
T1	13	9,84
T2	34	25,75
T3	34	25,75
T4	51	38,66
Estádio N		
N0	69	52,28
N1	36	27,27
N2	20	15,15
N3	7	5,3
Tratamento		
Cirurgia	39	29,54
Radioterapia	2	1,51
Cirurgia + Radioterapia	81	61,37
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	10	7,58
Diferenciação Histopatológica		
Bem Diferenciado	23	17,42
Moderadamente Diferenciado	49	37,13
Indiferenciado	60	45,45
Margem Cirúrgica		
Livre	116	87,88
Comprometida	16	12,12
Infiltração Vascular		
Não	83	62,88
Sim	49	37,12

Infiltração Neural		
Não	84	63,64
Sim	48	36,36
Recorrência		
Não	73	55,3
Sim	59	44,7
Status		
Vivo sem Doença	50	37,88
Vivo com Doença	2	1,51
Morto pela Doença	59	44,70
Morto por Outra Causa	8	6,06
Sem Informação	13	9,85

4.3. Imuno-histoquímica

O protocolo utilizado foi o da técnica estreptoavidina-biotina-peroxidase. Resumidamente, cortes foram tratados com solução aquosa de 3% H_2O_2 para inativar a peroxidase endógena e em seguida foram submetidas a método de recuperação antigênica em solução de 10 mM ácido cítrico pH 6.0 em panela de pressão elétrica por 15 min. Após lavagem com salina tamponada com fosfato (PBS), os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) por 1 h e então incubados com os anticorpos primários por 16 h a 4°C (Tabela 2). Em seguida, os cortes foram incubados com o sistema LSAB como recomendado pelo fabricante (LSAB+ System-HRP kit, Dako, Glostrup, Denmark). As reações foram reveladas em solução contendo 0,6 mg/ml de 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB; Sigma), 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de H_2O_2 . Contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer. Controles positivos (amostra de CEC oral não pertencente ao estudo) e negativos (amostra não incubadas com o anticorpo primário) foram incluídos. A porcentagem de células com positividade nuclear foi calculada com auxílio do software de análise de imagens Kontron 400 (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.4. Cultura de Células

Este estudo utilizou as linhagens celulares humanas SCC-9 e HaCAT.

A linhagem SCC-9 é derivada CEC de língua e comercializada pela ATCC (Manassas, VA, EUA), enquanto que a linhagem HaCAT é formada por queratinócitos normais imortalizados, mas não transformados (Boukamp et al., 1988), e foi gentilmente cedida pelo Dr. André Vettore (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo-SP). A linhagem SCC-9 foi descongelada e cultivada como recomendado em uma mistura 1:1 de DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab Ltda, Campinas-SP), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e solução antibiótica/antimicótica (Invitrogen) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A linhagem HaCAT foi cultivada em DMEM (Invitrogen) contendo 10% FBS, 2 mM L-glutamina (Invitrogen) e antibióticos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
HOXA1	Policlonal	Zymed Lab, San Francisco, CA, USA	1:100
HOXB7	Policlonal	Dako Corp., Carpinteria, CA, USA	1:200
Ki-67	MIB-1	Dako Corp. Carpinteria, CA, USA	1:100

4.5. Plasmídeos, Transfecção e Seleção dos Clones Superexpressando HOXA1 e HOXB7

A superexpressão de HOXA1 e HOXB7 foi obtida com a transfecção de plasmídeos de expressão na linhagem celular HaCAT, a qual demonstrou uma menor expressão destes transcritos quando comparado com linhagens de CEC oral (Bitu, 2008; Destro, 2008). O plasmídeo pCMV Tag2b (Stratagene) contendo a sequência completa do mRNA humano do gene HOXA1 foi doação

do Dr. Peter E. Lobie, University of Auckland, Auckland, New Zealand (Mohankumar *et al.*, 2007) e o plasmídeo pcDNA3.1⁽⁺⁾ (Invitrogen) contendo a seqüência humana do cDNA de HOXB7 foi obtido junto a Dra. Sara Sukumar, University of Johns Hopkins, Baltimore-MA, USA (Rubin *et al.*, 2007). O vetor pCMV Tag2b expressa o produto de interesse fusionado na sua porção N-terminal ao peptídeo sintético FLAG (DYKDDDDK), permitindo o monitoramento da expressão com anticorpos específicos. Vetores vazios foram utilizados como controle.

A transfecção dos vetores foi realizada com o método de lipossomo, utilizando o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Em essência, células cultivadas a uma confluência de 50-60% foram tratadas por 30 h com 3 ml de Opti-MEM (Invitrogen) contendo 6 µl de Lipofectamina 2000 (1 µg/µl) e 6 µg do plasmídeo de interesse. Após o período de transfecção, as células foram lavadas e cultivadas DMEM contendo 10% FBS até confluência, de onde foram expandidas 1:10 e cultivadas com meio de cultura contendo o antibiótico de seleção (400 µg/ml, Geneticina-G418, Invitrogen). Previamente a realização deste experimento, as células HaCAT foram testadas quanto a sensibilidade ao antibiótico de seleção, por meio de crescimento em concentrações crescentes (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 800 µg/ml). As colônias sobreviventes foram isoladas com o auxílio de anéis de clonagem, propagadas, testadas quanto da superexpressão do gene de interesse e estocadas em nitrogênio líquido. A eficiência da superexpressão foi avaliada por reações de transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e Western blot.

4.6. RT-PCR

4.6.1. Isolamento de RNA Total

A técnica de isotiocianato de guanidina foi usada para extração do RNA total dos clones celulares (Chomczynski & Sacchi, 1987). Os clones foram lavados com PBS gelado e 1,5 ml do reagente TRIzol (Invitrogen) foi adicionado

e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após adição de 0,3 ml de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 9.000 xg a temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 0,75 ml de álcool isopropano foi adicionado para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 9.000 xg a 4°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de 75% etanol. Após nova centrifugação a 6.000 xg a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspenso em água livre de DNases e de RNases e estocado a temperatura de -80°C até o momento de sua utilização.

4.6.2. Análise da Concentração e Integridade do RNA

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria com comprimento de onda de 260 e 280 nm (Espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA). A relação de 1 OD a 260 nm sendo equivalente a 50 µg/ml de RNA total foi utilizada em nossas determinações. A pureza e integridade do RNA isolado foram determinadas por gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% e 0,2 µg de brometo de etídio. Dois µg de RNA foram misturados com 5x tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) e aquecidos durante 5 min a 65°C. Após a separação eletroforética a 70 V por 2 h, o gel foi documentado com o sistema Kodak Digital Science™ equipado com a câmera digital DC40 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA).

4.6.3. Síntese de cDNA

Previamente à síntese do cDNA, 5 µg de RNA total foram incubados

com 1 unidade da enzima desoxirribonuclease I (DNase I, Amp Grade, Invitrogen) por 15 min em temperatura ambiente para eliminação de contaminantes de DNA genômico. Inibição da DNase foi realizada pela adição de 1 µl de EDTA a 25 mM pH 8 (Invitrogen) e aquecimento a 65 °C por 10 min. A síntese do cDNA foi realizada em 2 etapas. Na primeira etapa, foi adicionado 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen) e 1 µl da mistura de dNTPs a 10mM (Invitrogen). Após incubação por 5 min a 65 °C e resfriamento da amostras em gelo, foi adicionado 4 µl de 5x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 µl DTT a 0,1 M, 1 µl (40 unidades) da enzima RNaseOUT (Invitrogen) e 1 µl (200 unidades) da enzima Superscript II RT (Invitrogen). Esta mistura foi incubada por 50 min a 42 °C e por 15 min a 70 °C.

4.6.4. Reação de PCR “Duplex”

A reação de PCR “duplex” foi realizada com pares de primers específicos para HOXA1 e HOXB7 e o gene controle GAPDH. Para cada reação, 2 µl do cDNA foram amplificados em um termociclador (Modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta pelos pares de primers específicos para HOXA1 ou HOXB7, pares de primers específicos para o gene GAPDH (Tabela 3), 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs e 0,05 U/µl Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram iniciadas por desnaturação a 94 °C por 2 min, seguidas por 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos e 68 °C por 1,5 minutos. Ao final destes ciclos a reação foi incubada a 68 °C por 10 minutos, para garantir uma extensão completa de todos os produtos amplificados. Os produtos de PCR foram misturados com tampão de aplicação (Gel loading solution, Sigma) e separados eletroforicamente a uma corrente de 150 V por 1 h em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% em tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA). Os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,2 µg de brometo de etídeo durante 15 min e documentados no sistema de fotodocumentação Kodak Digital science™ equipado com a câmera digital DC120.

4.7. Western Blot

As células foram lavadas com PBS gelado e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% ácido desoxicólico, 0,5% dodecil sulfato de sódio, 1 mM fluoreto de metilfenilsulfonil, 1 mM N-etilmaleimida, 1mM ditioneitol, 10 µg/ml inibidor de tripsina de soja, 1 µg/ml leupeptina e 1 µg/ml aprotinina). Após a centrifugação, concentrações de proteína total foram medidas usando um ensaio protéico de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Quantidades de 50 µg (para reações com o anticorpo anti-FLAG) e 80 µg (para reações com o anticorpo anti-HOXB7) de proteína total foram separadas eletroforéticamente em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) com tampão redutor e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2 h com 10% de leite desnatado em PBS contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas com um dos anticorpos primários por 2 h. Os anticorpos primários foram: anti-FLAG (Stratagene, Santa Clara, CA, EUA), anti-HOXB7 (Zymed, San Francisco, CA, EUA) e anti- β -actina (Sigma). Após 3 lavagens consecutivas com solução de PBS com 0,01% de Tween-20, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h. As soluções contendo os anticorpos foram preparadas com solução de 5% leite desnatado em PBS. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas usando o kit de quimioluminescência para Western blot Enhanced Chemiluminescent Western blot kit (GE Healthcare, Vienna, Austria).

Tabela 3. Pares de primers utilizados nos ensaios de PCR “duplex”.

Gene	Primer sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
HOXA1	GAGACCCAAGTGAAGATCTGGTT	CCTTCTCGTCGTTTCCTGGCG
HOXB7	GAAAGACAGATCAAGATTTGGTT	CTGGGCTTCTCTTCGTCTCCCTTTCTCATG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

4.8. Análise da Proliferação Celular

A análise da proliferação celular foi realizada pelo método de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) ao DNA e pela expressão imunocitoquímica de Ki-67.

4.8.1. Incorporação de BrdU

Células foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 células por poço em lâminas de cultura de 8 poços (Lab-Tek™ System, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 h de cultivo na ausência de FBS para promoção do sincronismo celular, a proliferação celular foi induzida pelo cultivo com meio contendo 10% de FBS. Transcorrido 24 h de indução da proliferação celular, as células foram lavadas e meio de cultura fresco acrescido de BrdU na diluição de 1:1000 foi adicionado. Após 1 h de incorporação, as células foram lavadas e fixadas em 70% de etanol por 15 min. A incorporação de BrdU nas células em proliferação foi revelada através da análise imuno-histoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Kit de proliferação celular, GE). O índice de incorporação expresso como a porcentagem de células positivas para BrdU foi determinado pela contagem de 1.500 células de cada clone celular utilizando o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss).

4.8.2. Expressão imuno-citoquímica de Ki-67

Células foram cultivadas como descrito acima, seguida por fixação em 70% etanol. Após a inibição da peroxidase endógena, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-Ki-67 (Dako) na concentração de 1:200 por 1 h. Em seqüência, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina (Strept ABC Complex/HRP Duet kit, Dako Corp.) por 30 min a 37°C, diluído a 1:500 e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Corp.) por mais 30 min. As reações foram reveladas com solução 0,6 mg/ml de DAB (Sigma) acrescida de 0,1% de H₂O₂ e 0,11% de DMSO e contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. A percentagem de positividade para Ki-67 foi calculado contando-se 1.500 células em 3 reações independentes, usando o sistema KONTRON 400.

4.9. Análise da Apoptose

A marcação com anexina V-FITC com posterior análise por citometria de fluxo foi utilizada para determinar o índice de apoptose dos clones celulares. As células em cultura foram coletadas, lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de ligação (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1,8 mM CaCl₂) contendo anexina V-FITC na concentração de 1:500. Após marcação por 20 min no escuro, as células foram lavadas e incubadas com iodeto de propídeo (PI, Sigma) O número de células em apoptose foi determinado pelo número de células positivas para anexina V e negativas para PI dividido pelo número total de células no citômetro de fluxo FACScalibur equipado com um laser de argônio (Beckton-Dickinson, San José, CA, USA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisando para cada amostra.

4.10. Ensaio de Adesão Celular

A influência de HOXA1 e HOXB7 na adesão celular foi verificada em superfícies tratadas com proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I ou fibronectina) ou não (plástico). No dia anterior ao experimento, poços em quadriplicata de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com 100 µl de PBS contendo 2 µg de cada uma das proteínas da matriz extracelular (BD Biosciences, Bredford, MA, USA) por 16 h a 4°C. No dia do experimento, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µl de PBS e preenchidos com mesmo volume de 3% BSA em PBS. Este bloqueio ocorreu por 2 h à temperatura de 37°C. Durante este período, as células foram liberadas das placas de cultura pela ação de tripsina, ressuspensas em meio de cultura contendo 10% FBS e 3% BSA e diluídas a uma final concentração de 3×10^3 células por 100 µl de meio de cultura. Após a lavagem dos poços, 100 µl foram adicionados e incubados por 1 h 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após 3 lavagens com PBS para remoção das células não aderidas, as células foram fixadas com solução de 10% formalina por 15 min. O número de células aderido foi determinado pela coloração com azul de toluidina (Humphries, 2001). Resumidamente, células foram lavadas e coradas com 1% azul de toluidina em solução aquosa de 1% bórax por 5 min. Após exaustiva lavagem para remoção do excesso de corante, 100 µl da solução aquosa de 1% SDS foi adicionado e incubado por 5 minutos. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de ELISA e absorbância a 650 nm foi medida.

4.11. Análise da Transição Epitélio-Mesênquima (TEM)

Para verificar se a superexpressão dos genes HOXA1 e HOXB7 induzem TEM, a expressão das proteínas E-caderina e β-catenina foram avaliadas por Western blot. As reações foram realizadas como descrito acima com anticorpos primários específicos contra as proteínas de interesse (Tabela 4).

Tabela 4. Anticorpos primários usados nos experimentos de western blot para avaliar a transição epitélio-mesênquima.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
E-caderina	36/E-cadherin	BD Biosciences	1:2.500
β -catenina	14/ β -catenin	BD Biosciences	1:750

4.12. Ensaio de Invasão Celular

Os ensaios de invasão foram realizados no sistema Transwell/Matrigel (Coletta *et al.*, 2008). Em essência, os insertos de 6,5 mm de diâmetro com membrana de polycarbonato contendo poros de 8,0 μ m (Transwell®, Corning, Corning, NY, EUA) receberam uma fina camada de Matrigel diluído 1:1 em meio de cultura (50 μ l, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e foram incubados a 37°C por 2 h. Durante este período, células cultivadas na ausência de FBS por 24 h foram tripsinizadas e levadas a uma concentração de 8×10^4 células/200 μ l de meio de cultura sem FBS. A câmara inferior do sistema recebeu 500 μ l de meio de cultura acrescido de 10% FBS (fator quimiotático), enquanto que a câmara superior recebeu 200 μ l da solução de células. Após o período de 72 h, o número de células que invadiram o Matrigel e se localizaram na porção inferior da membrana de polycarbonato foi determinada por coloração com azul de toluidina. As células SCC-9 foram utilizadas como controle positivo do ensaio, visto que apresentam uma alta capacidade invasiva.

4.13. Crescimento Independente de Ancoragem (Soft-Agar)

Previamente ao plaqueamento dos clones celulares, 3 ml de meio de cultura contendo 0,4% de ágar foram adicionados aos poços de uma placa de 6 poços. Sobre esta camada foram plaqueados 3×10^5 células de cada clone

celular diluídos em 3 ml de meio de cultura acrescido de 10% FBS e 0,4% ágar. As células HaCAT e SCC-9 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. O meio de cultura contendo 10% FBS foi trocado a cada 2 ou 3 dias e a formação de colônias foi documentada depois de 4 semanas.

4.14. RNA de Interferência

Para confirmar o efeito da superexpressão de HOXA1 e HOXB7 na proliferação celular, nós utilizamos a técnica de RNAi para inibir a expressão de HOXA1 e HOXB7 na linhagem SCC-9, a qual demonstra níveis elevados de expressão deste dois genes. Para garantir a inibição, nós optamos pela transfecção transiente de 3 moléculas pequenas de RNAi (short interference RNA, siRNA) para cada transcrito. As moléculas de siRNA foram quimicamente sintetizadas, aneladas e purificadas industrialmente (Invitrogen). Resumidamente, células foram plaqueadas a uma confluência de 50% e transfectados com 100 nM da mistura contendo partes iguais das 3 seqüências de siRNA, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Em paralelo, células foram transfectadas apenas com o reagente Lipofectamina 2000 (mock) e com uma seqüência não-específica de siRNA, o qual continha a mesma proporção de nucleotídeos citosina e guanina para ser usado como controle negativo da reação. Depois de 30 h de transfecção, as células foram lavadas em PBS, incubadas com meio de cultura e utilizadas para determinar a eficiência da neutralização por ensaios de RT-PCR e western blot ou para avaliar ensaios de proliferação celular (incorporação de BrdU ao DNA e expressão imuno-citoquímica de Ki-67).

4.15. Análise Estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados, pelo menos, 2 vezes. Resultados utilizados na análise estatística são apresentados como

media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica de HOXA1 e HOXB7 entre os tecidos orais de mucosa normal e CEC, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. Similarmente, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os níveis de proliferação entre os clones super-expressando HOXA1 e HOXB7 e para verificar o efeito do siRNA na proliferação das células SCC-9. A correlação entre a expressão imuno-histoquímica de HOXA1 e HOXB7 foi determinada pelo método de correlação de Spearman. Para determinar a correlação entre a positividade para HOXA1 e HOXB7 e os parâmetros clínico-patológicos dos tumores, nós utilizamos o teste qui-quadrado. Para fins estatísticos, as amostras foram divididas em dois grupos baseado no valor da mediana da expressão de HOXA1 ou HOXB7. Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas através do método de Kaplan-Meier e o teste Log-rank foi empregado para comparar as curvas de sobrevida. O risco de ocorrência (hazard ratio, HR) foi avaliado por análise multivariada de Cox com as variáveis com $p \leq 0,10$ na análise univariada. O nível de significância empregado foi de 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas NCSS e GraphPad Prism 5.

5. Resultados

5.1. Expressão de HOXA1 e HOXB7 em Amostras Orais de Tecido Normal e CEC

Como descrito anteriormente, nós verificamos que quando comparado com amostras de mucosa oral normal, os CECs orais apresentam níveis significativamente maiores de expressão dos genes HOXA1 e HOXB7 (Bitu, 2008; Destro, 2008). A fim de confirmar se a abundância dos produtos protéicos destes genes é consistente aos achados dos experimentos de RT-PCR, ou seja, maior em amostras de CEC do que em amostras de tecido normal, realizamos ensaios de imuno-histoquímica nas mesmas amostras. As positivities para HOXA1 e HOXB7 foram estritamente nucleares e em amostras de tecido normal foram restritas as camadas basais e supra-basais do epitélio (Fig. 4 e 6). Nas amostras de CEC, as expressões de HOXA1 e HOXB7 foram difusas e abundantes. Como esperado, os números de células positivas para HOXA1 ($p<0,01$) e HOXB7 ($p<0,001$) foram significativamente maiores em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa normal (Fig. 5 e 7).

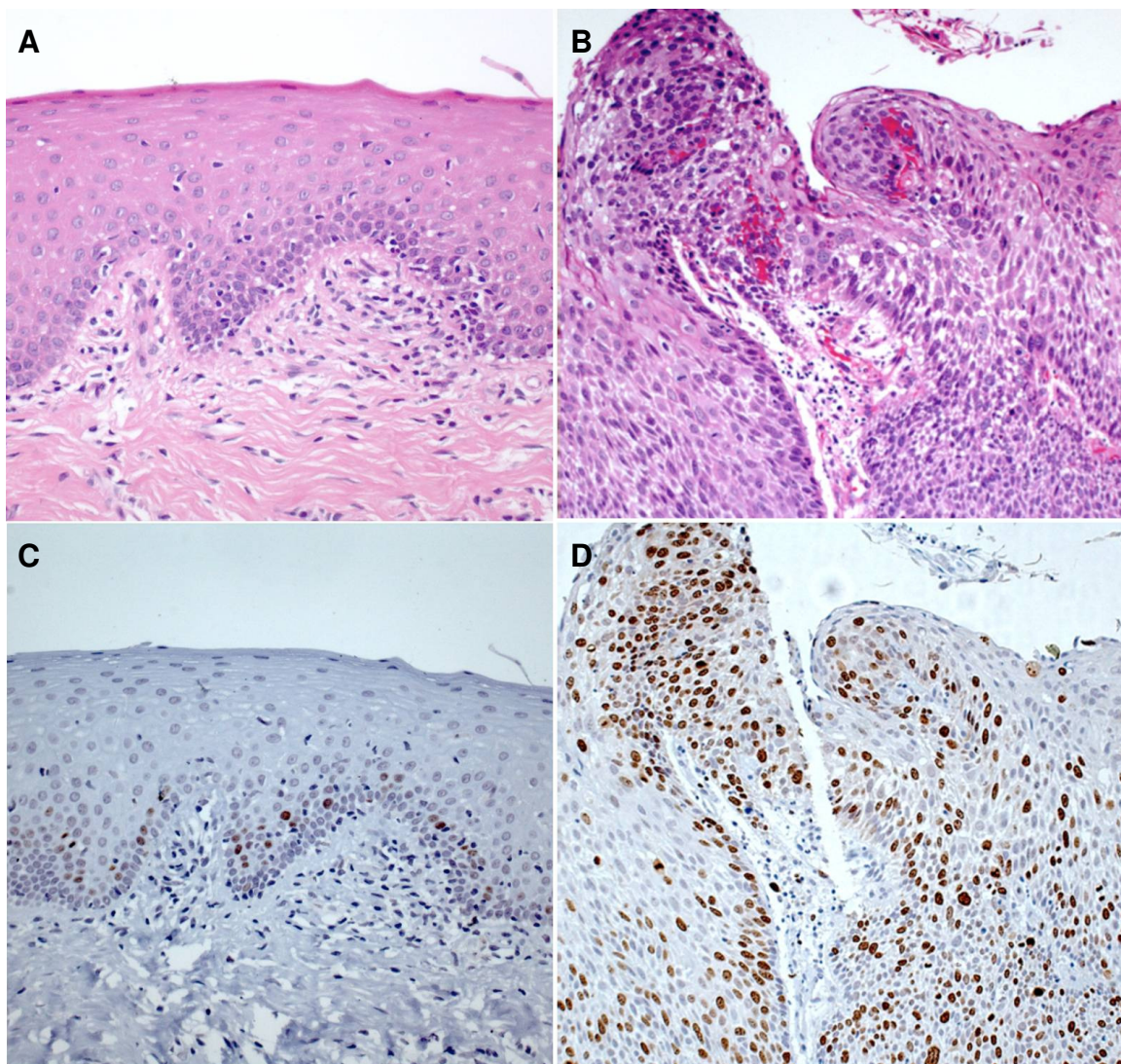


Figura 4. Análise imuno-histoquímica para HOXA1 em amostras orais de tecido normal e CECs. Fotos representativas de uma das amostras de tecido normal (A e C) e uma das amostras de CEC (B e D) são apresentadas. A detecção de HOXA1 nas amostras de tecido normal foi esporádica e restrita às camadas basal e supra-basal do epitélio. Por outro lado, a positividade nas amostras de CEC foi intensa e dispersa por todo o epitélio neoplásico. Figuras A e B representam amostras coradas com hematoxilina e eosina. (aumento 200x)

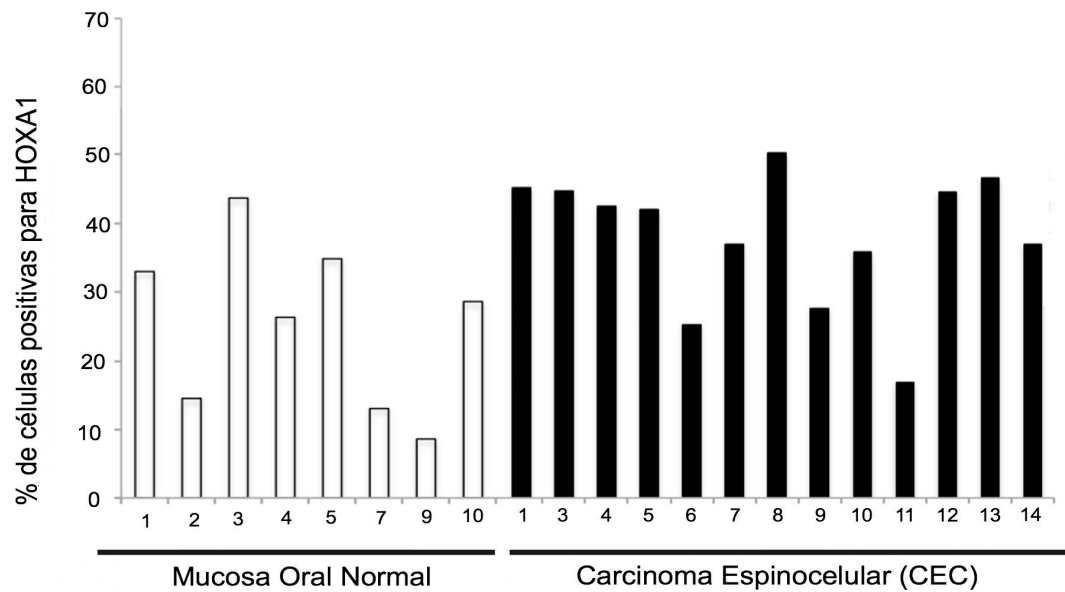


Figura 5. Superexpressão de HOXA1 em amostras de CEC oral. Comparado com amostras de mucosa normal, a porcentagem de células positivas para HOXA1 foi significativamente maior em amostras de CEC ($p < 0,01$).

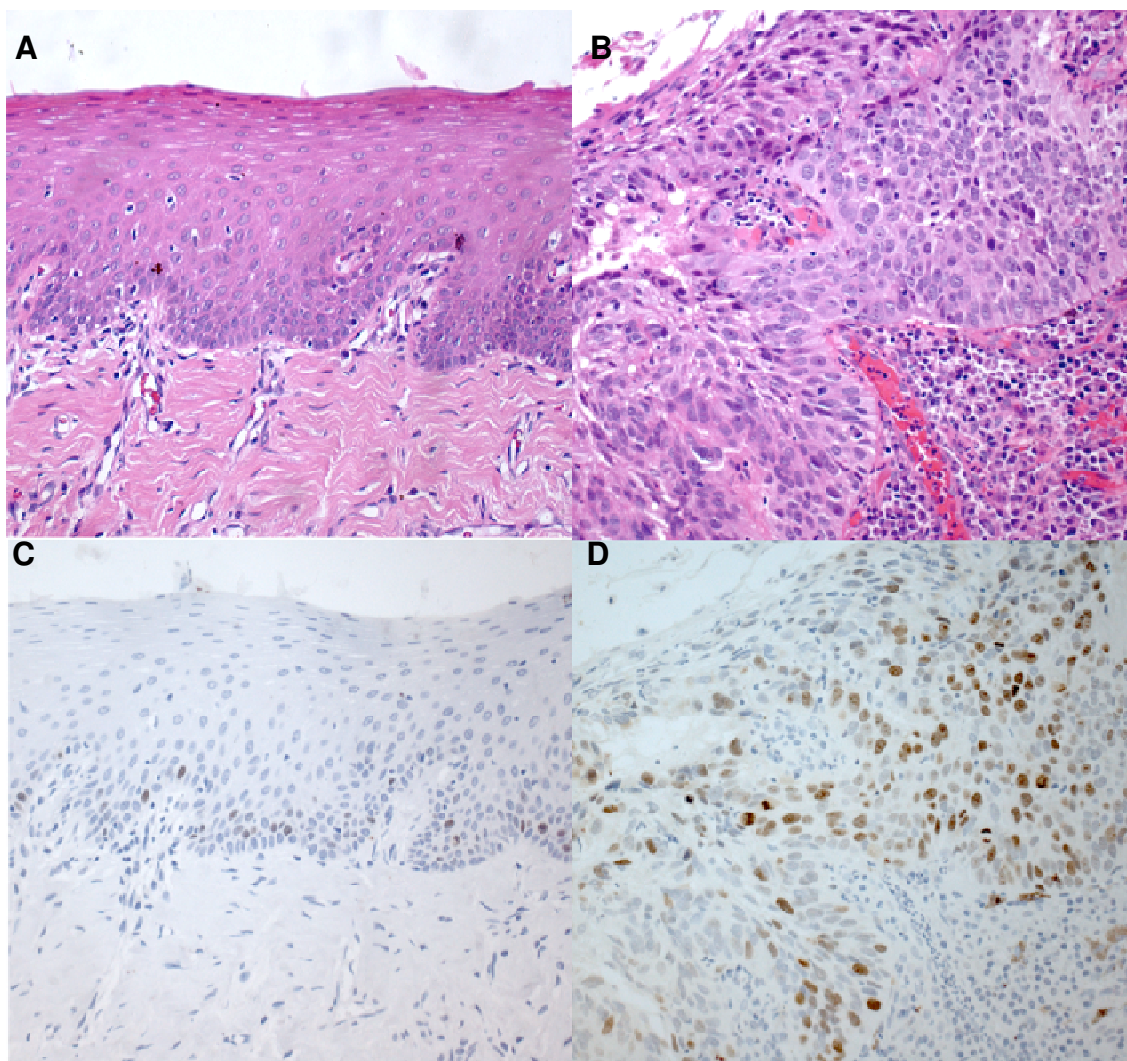


Figura 6. Análise imuno-histoquímica para HOXB7 em amostras orais de tecido normal e CECs. Fotos representativas de uma das amostras de tecido normal (A e C) e uma das amostras de CEC (B e D) são apresentadas. Em amostras de mucosa normal, a expressão de HOXB7 foi limitada ao núcleo de células epiteliais localizadas nas camadas basais e supra-basais, enquanto que as células positivas para HOXB7 foram encontradas em todas as ilhas e cordões de células tumorais. Figuras A e B representam amostras coradas com hematoxilina e eosina. (aumento 200x)

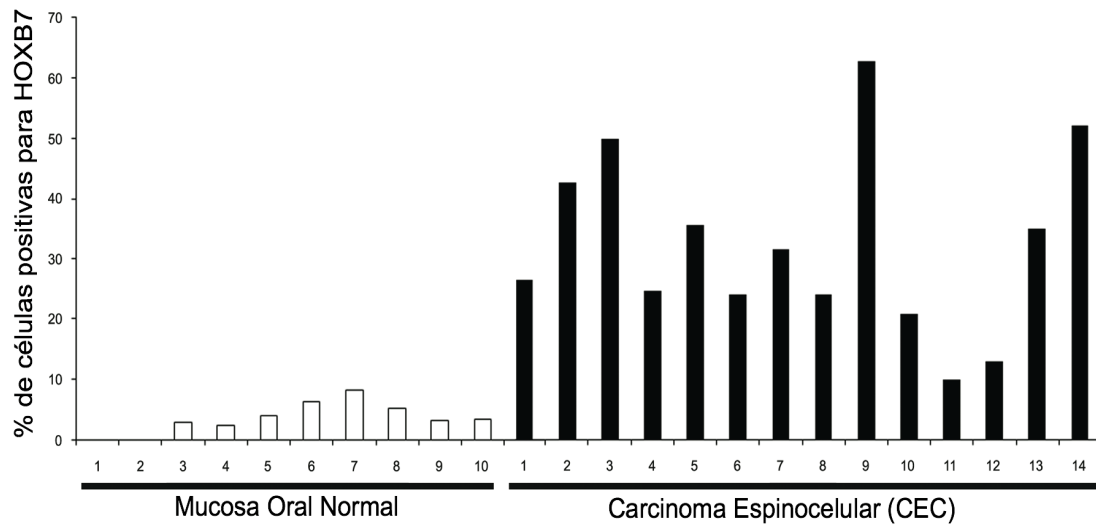


Figura 7. Frequência de células positivas para HOXB7 é maior em amostras de CEC oral comparado com mucosa normal. A porcentagem de células positivas para HOXB7 foi significativamente maior nas amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal ($p < 0,001$).

5.2. Efeitos da Superexpressão do Gene HOXA1 na Linhagem Celular de Queratinócitos HaCAT

Para determinar os efeitos da superexpressão de HOXA1 na oncogênese oral, nós optamos por superexpressar este gene na linhagem celular HaCAT, que apresenta baixos níveis endógenos de expressão de HOXA1. Clones com expressão estável de HOXA1 foram obtidos por transfecção do plasmídeo pCMV Tag2b-HOXA1 e aquisição de resistência ao antibiótico de seleção Gentamicina. Como controle, as células HaCAT foram transfectadas com o plasmídeo vazio (pCMV Tag2b). Figura 8 ilustra, por ensaios de RT-PCR e Western blot, o sucesso da superexpressão de HOXA1. Três clones controle (HaCAT-Controle) e 3 clones superexpressando HOXA1 (HaCAT-HOXA1) foram utilizados neste estudo.

O primeiro fenótipo estudado foi o índice de proliferação celular que foi determinado por avaliar o índice de incorporação de BrDU e o índice imunocitoquímico da expressão de Ki-67. Os clones HaCAT-HOXA1 demonstraram um potencial de proliferação celular significativamente maior que os clones HaCAT-Controle (Fig. 9A, $p < 0,01$). A superexpressão de HOXA1 gerou um incremento de aproximadamente 20% no índice de incorporação de BrDU das células HaCAT. Consistentemente, os clones HaCAT-HOXA1 também apresentaram um número significativamente maior de células positivas para Ki-67 em relação aos clones controle (Fig. 9B, $p < 0,05$).

A influência da superexpressão de HOXA1 nas taxas de morte celular por apoptose das células HaCAT foi investigada por marcação com Anexina V-FITC com posterior detecção por citometria de fluxo. Como ilustrado pela Figura 10, o número de células em apoptose foi relativamente baixo e nenhuma influência de HOXA1 foi observada.

Para investigarmos a relação da perda de identidade epitelial dos clones superexpressando HOXA1, nós avaliamos a capacidade de adesão celular e a existência de TEM, características que são freqüentemente realçadas durante os eventos de gênese dos carcinomas. As influências de HOXA1 na

adesão celular foram testadas em superfícies tratadas com colágeno tipo I e fibronectina. Como controle, superfícies não tratadas (adesão ao plástico) foram utilizadas. A adesão celular foi facilitada na presença de colágeno tipo I e fibronectina, mas nenhuma diferença na porcentagem de células aderidas entre os clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 foi observada (Fig. 11). Células epiteliais em TEM perdem a expressão de marcadores clássicos da estrutura dos desmossomos como E-caderina e adquirem a expressão de marcadores de células mesenquimais, principalmente β -catenina (Kim *et al.*, 2001). Então, para verificar se a superexpressão de HOXA1 induz TEM, reações de western blot com anticorpos específicos anti-E-caderina e anti- β -catenina foram realizadas. Não foram observadas diferenças na produção destas moléculas entre os clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 (Fig. 12). O potencial invasivo dos clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 foi determinado por experimentos de câmaras Transwell/Matrigel. A superexpressão de HOXA1 não foi capaz de modular a capacidade invasiva das células HaCAT (Fig. 13).

Para avaliar a capacidade das células HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 sobreviverem e reproduzirem em ambiente independente de ancoragem, cultivamos estes clones em meio contendo 0,4% de ágar (ensaio de soft-agar). Como controle positivo, nós usamos a linhagem de CEC oral SCC-9, que apresenta excelente crescimento. A superexpressão de HOXA1 não foi capaz de conferir crescimento independente de ancoragem as células HaCAT (Fig. 14). Os painéis superiores da Figura 14 revelam o crescimento abundante de colônias de células SCC-9, validando o resultado dos experimentos.

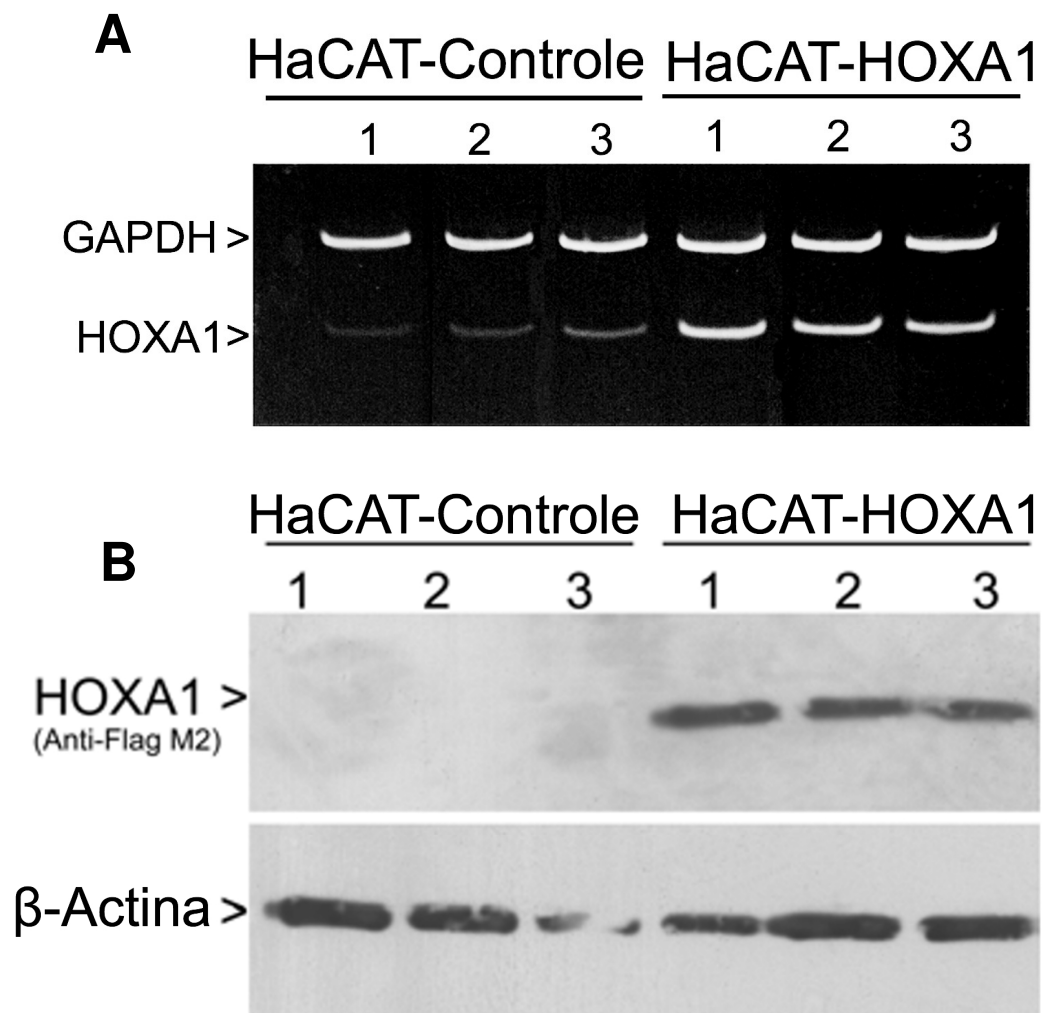


Figura 8. Avaliação da expressão de HOXA1 pelos clones de HaCAT. Após transfecção, seleção e clonagem, os clones foram caracterizados por ensaios de RT-PCR (A) e Western blot (B). Para os ensaios de western blot, o anticorpo anti-FLAG foi utilizado.

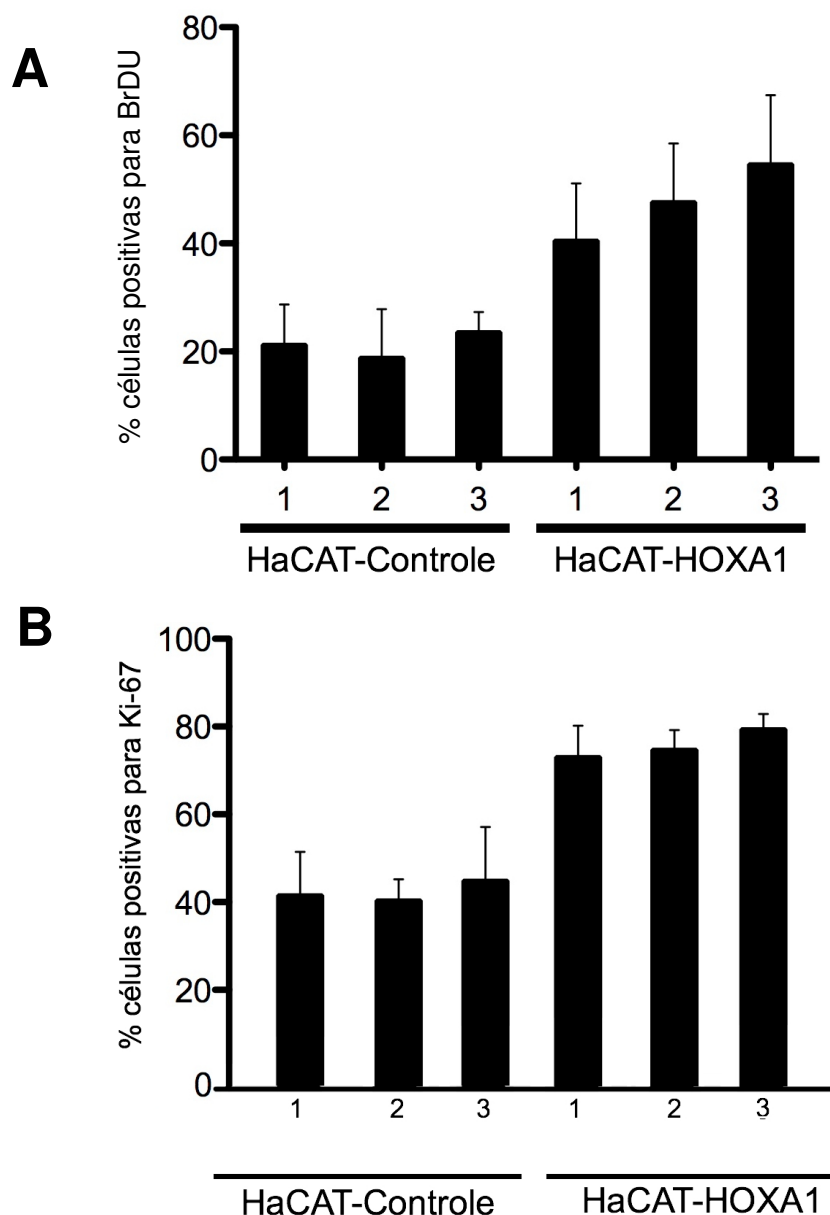


Figura 9. Superexpressão de HOXA1 induz proliferação celular. (A) Índice de incorporação de BrDU e (B) expressão imuno-citoquímica de Ki-67. Os ensaios de proliferação celular revelaram que a superexpressão de HOXA1 resultou em um aumento significativo da proliferação das células HaCAT. Clones HaCAT-HOXA1 demonstraram um índice de incorporação de BrDU ($p < 0,01$ entre os grupos) e de expressão imuno-citoquímica de Ki-67 ($p < 0,05$ entre os grupos) significativamente maiores que os clones HaCAT-Control.

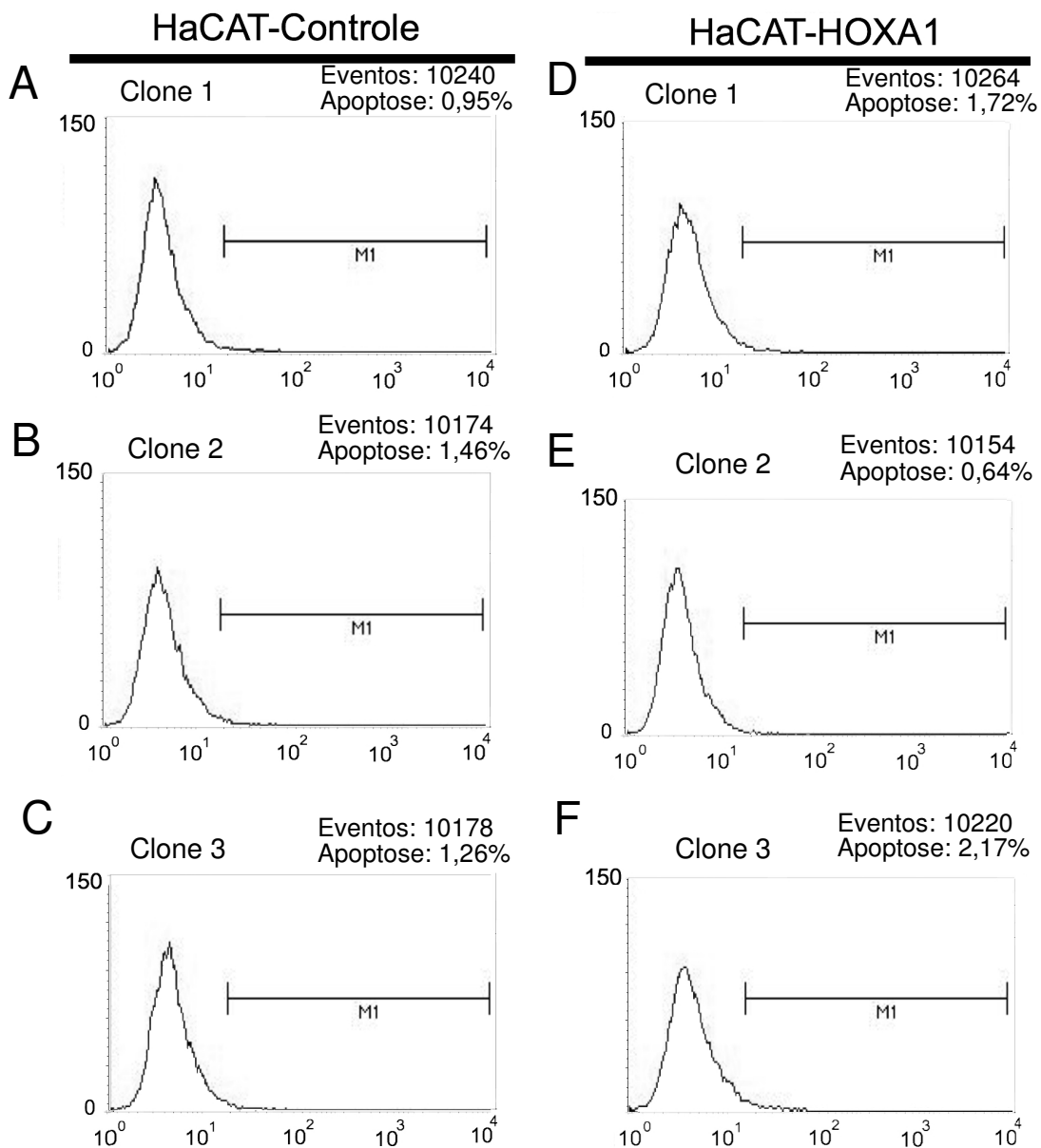


Figura 10. Determinação dos índices de apoptose nos clones HaCAT-Control e HaCAT-HOXA1. Células foram cultivadas em condições ideais e o número de células em apoptose foi determinado com marcação com Anexina V-FITC. Histogramas em A, B e C representam os clones HaCAT-Control e os D, E e F representam os clones HaCAT-HOXA1. Note que uma pequena proporção de células foi positiva para Anexina V, revelando um baixo índice de apoptose para todos os clones.

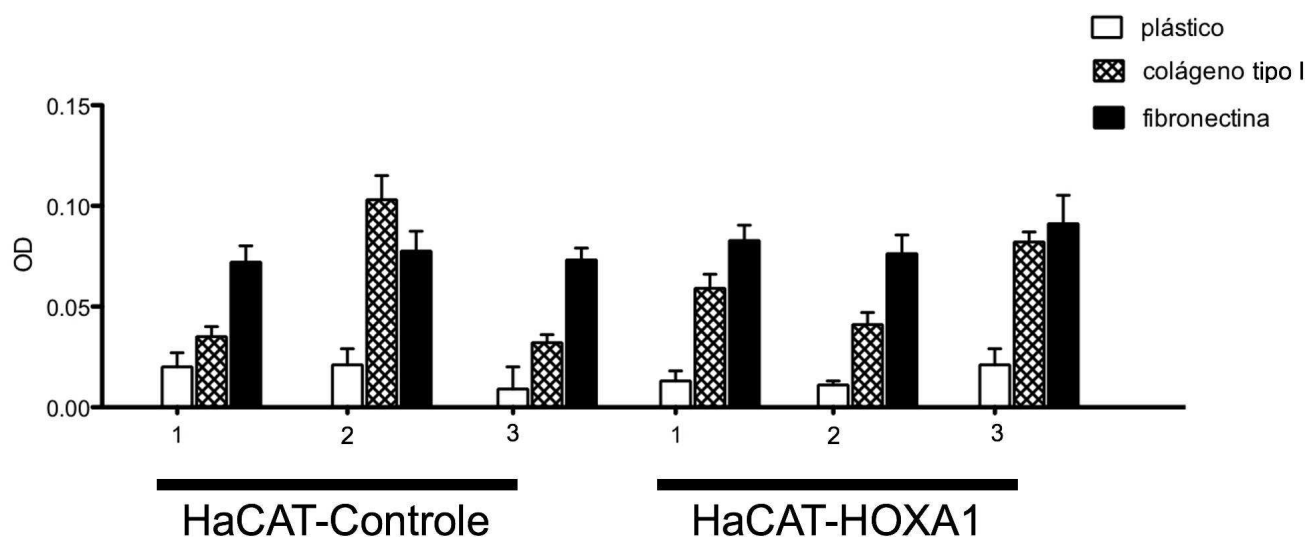


Figura 11. Ensaio de adesão celular com os clones celulares HaCAT-Control e HaCAT-HOXA1. Os resultados são apresentados na forma de media $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo realizado em quadriplicata. Nenhuma influência da superexpressão de HOXA1 na adesão das células HaCAT foi observada. Na presença de proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina), a adesão celular foi maior comparado com a adesão em superfícies sem tratamento.

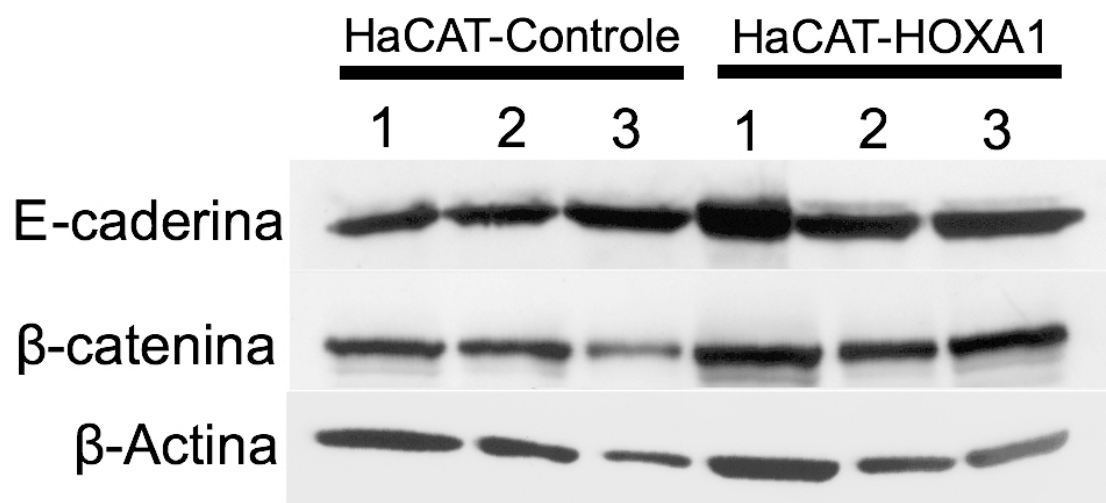


Figura 12. Produção de E-caderina e β -catenina nos clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1. Células foram cultivadas e submetidas a ensaio de western blot com anticorpos anti-E-caderina e anti- β -catenina como descrito em Materiais e Métodos. A detecção de β -actina foi utilizada como controle. Não houve diferença de expressão de E-caderina e β -catenina entre os clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1.

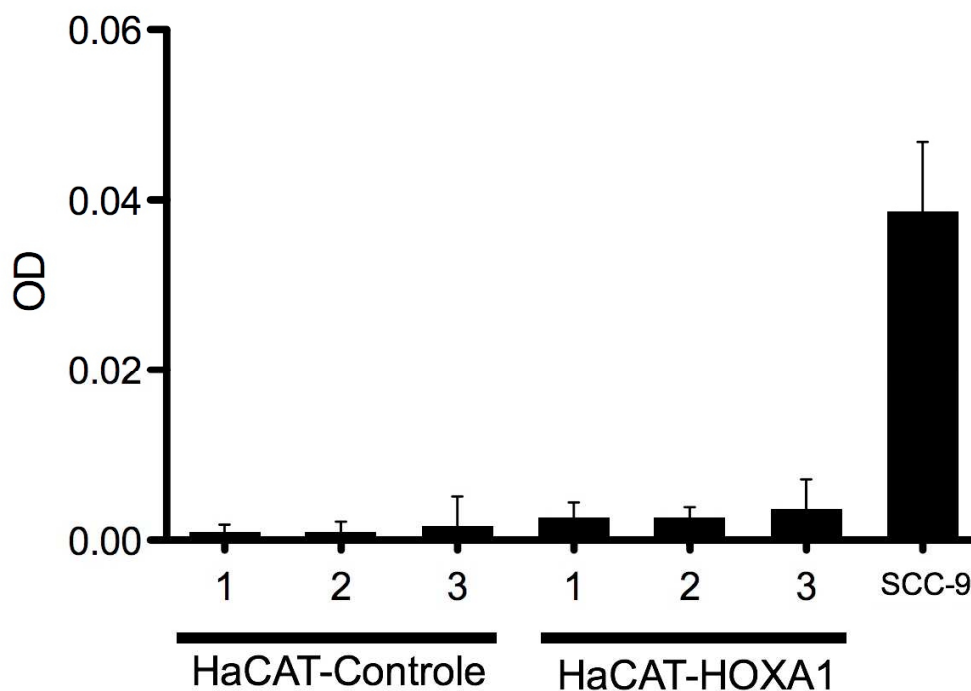


Figura 13. Ensaio de invasão celular com o sistema Transwell/Matrigel. O potencial invasivo dos clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 foi verificado sobre a influência quimiotática de 10% de FBS em um período de 72 h. A linhagem de câncer oral SCC-9 foi utilizada como controle positivo. A quantidade de células dos clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1 que foram capazes de invadir a camada de Matrigel foi muito baixa em relação à quantidade de células da linhagem SCC-9 e não houve diferença entre os grupos HaCAT-Controle e HaCAT-HOXA1.

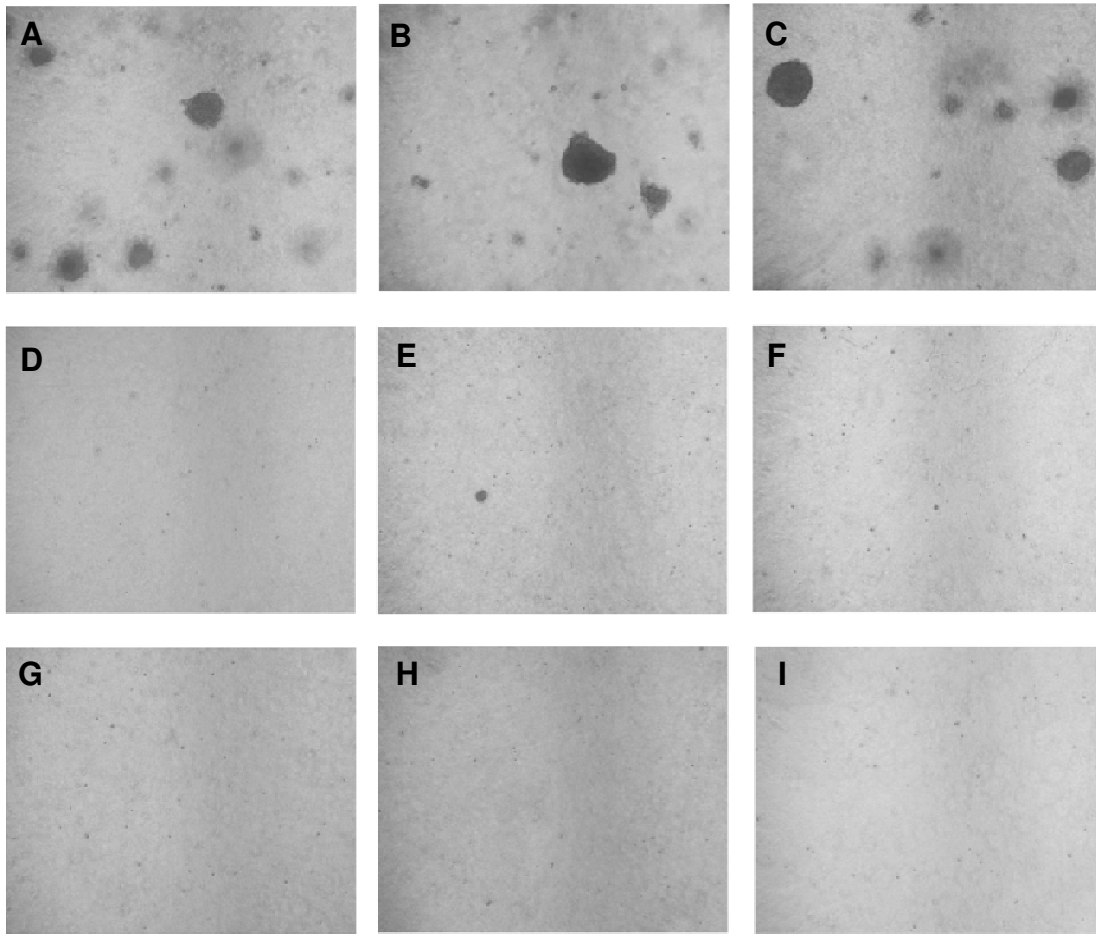


Figura 14. Avaliação da influência da superexpressão de HOXA1 no crescimento celular independente de ancoragem (crescimento em soft-agar) das células HaCAT. A, B e C correspondem as células SCC-9 (controle positivo), D, E e F aos clones HaCAT-Control 1, 2 e 3 e G, H e I representam os clones HaCAT-HOXA1 1, 2 e 3. Super-expressão de HOXA1 não favoreceu o crescimento independente de ancoragem das células de queratinócitos normais HaCAT.

5.3. Efeito da Inibição da Expressão de HOXA1 sobre a Proliferação das Células SCC-9

Para confirmar que o efeito endógeno de HOXA1 é controlar a proliferação celular, nós inibimos a expressão de HOXA1 nas células SCC-9 pelo método de RNA de interferência. A linhagem SCC-9 foi escolhida para este propósito por apresentar uma expressão elevada de HOXA1. Os níveis de HOXA1 mRNA após o tratamento com oligonucleotídeos específicos (siRNA HOXA1) foi significativamente menor comparando com os níveis de expressão das células tratadas com os oligonucleotídeos não-específicos (siRNA controle) ou apenas com a solução de transfecção Lipofectamina 2000 (Mock) (Fig. 15). Células tratadas com os oligonucleotídeos específicos tiveram a expressão reduzida para 30% da observada em células tratadas oligonucleotídeos controle ($p < 0,01$). A redução nos níveis de transcrito de HOXA1 foi significativamente associada a uma redução na capacidade proliferativa das células SCC-9, como revelado pelos ensaios de incorporação de BrDU e expressão imuno-citoquímica de Ki-67 (Fig. 16). Em comparação com as células cultivadas na presença de oligonucleotídeos controle, o índice de incorporação de BrDU das células com níveis reduzidos de HOXA1 (células tratadas com siRNA HOXA1) foi significativamente reduzido em aproximadamente 40%.

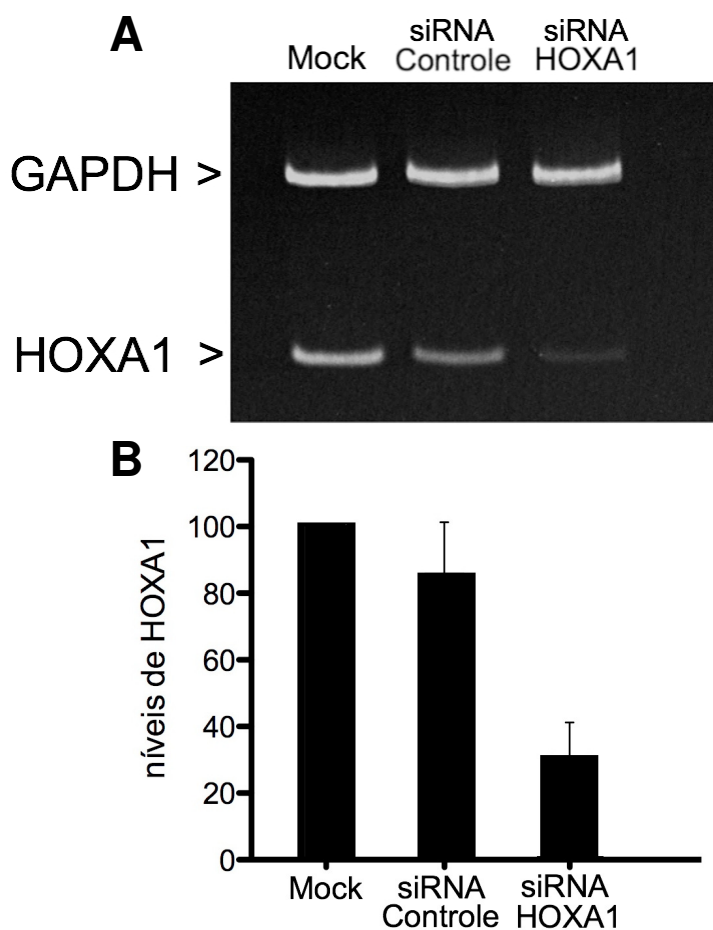


Figura 15. Eficácia da neutralização de HOXA1 pelo método de siRNA. Células SCC-9 foram tratadas por 30 h com Lipofectamina 2000 (Mock), oligonucleotídeos não-específicos (siRNA controle) ou com oligonucleotídeos que reconhecem sequências específicas de HOXA1 mRNA (siRNA HOXA1). Seguido por um período de cultivo de 24 h, as células foram coletadas e submetidas a ensaio de RT-PCR. (A) Reação de duplex RT-PCR para HOXA1 e o gene normalizador GAPDH. (B) Análise densitométrica de 3 experimentos independentes demonstrando uma inibição significativa na expressão de HOXA1 nas células tratadas com siRNA HOXA1 ($p < 0,01$).

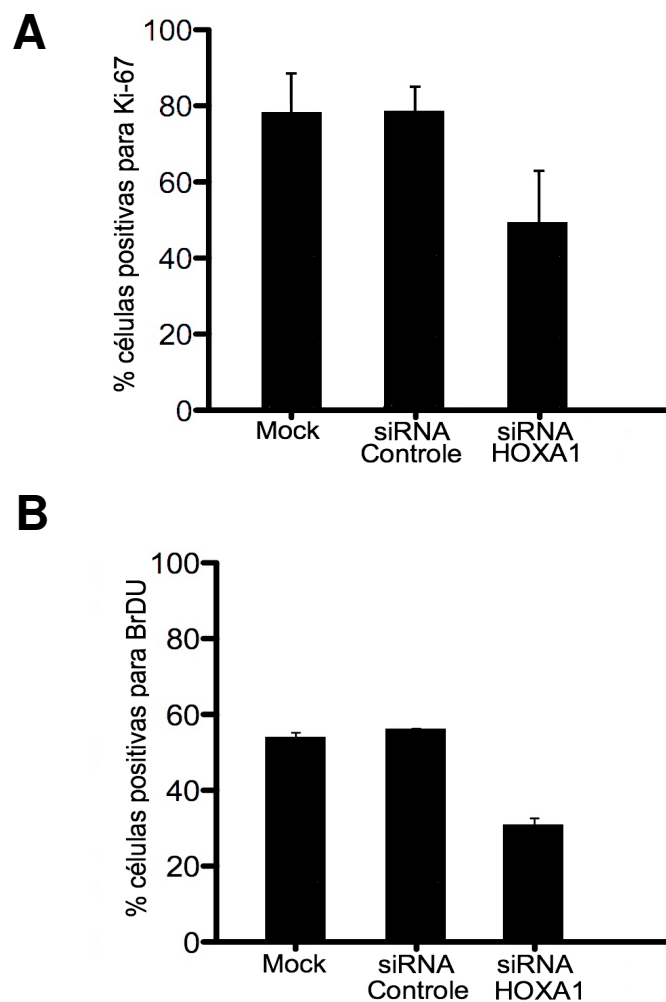


Figura 16. Inibição de HOXA1 é associada com uma redução no potencial proliferativo das células SCC-9. Células foram transfectadas apenas com o reagente Lipofectamina 2000 (Mock), com a sequência não-específica de oligonucleotídeos (siRNA controle) ou com as sequências específicas contra HOXA1 (siRNA HOXA1), seguido por ensaios de incorporação de BrDU (A) e índice de expressão imuno-citoquímica de Ki-67 (B). O potencial proliferativo das células SCC-9 tratadas com siRNA HOXA1 foi significativamente inibido em comparação com as células tratadas com siRNA controle ($p < 0,05$ para índice de expressão imuno-citoquímica de Ki-67 e $p < 0,01$ para ensaio de incorporação de BrDU).

5.4. Correlação entre a Expressão de HOXA1 e as Características Clínico-Patológicas dos CECs Orais

Após confirmar que a expressão de HOXA1 é significativamente maior em CECs orais comparado com amostras de tecido normal e que a expressão de HOXA1 regula proliferação celular, nós decidimos investigar se a expressão do produto deste gene apresenta correlação com as características clínico-patológicas dos tumores. Para isso, realizamos reações de imuno-histoquímica em 127 amostras de CECs orais. Células positivas para HOXA1 foram facilmente identificadas por uma marcação nuclear (Fig. 17). As correlações da expressão de HOXA1 com os parâmetros clínico-patológicos são demonstradas na Tabela 5. A presença de um número elevado de células positivas para HOXA1 foi significativamente correlacionada com estágio clínico T ($p=0,039$), estágio clínico N ($p=0,046$) e padrão diferenciação celular dos tumores ($p=0,026$). A maior expressão de HOXA1 também foi correlacionada com menor recorrência ($p=0,012$). A positividade de HOXA1 não foi correlacionada à idade, gênero, etnia, localização, consumo habitual de álcool ou tabaco, comprometimento de margens cirúrgicas, infiltração vascular e infiltração neural.

A taxa de proliferação dos tumores foi avaliada pela reação imuno-histoquímica para Ki-67. Núcleos com coloração amarronzada, independente da intensidade, foram interpretados como positivo para Ki-67. A mediana da expressão imuno-histoquímica de Ki-67 foi empregada para dividir os tumores em 2 grupos, um a cima e outro abaixo da mediana (exibindo alta e baixa atividade proliferativa), que foram associados com a positividade para HOXA1. A positividade para HOXA1 foi significativamente maior em tumores exibindo uma elevada proporção de células positivas para Ki-67 (Tabela 5).

A positividade para HOXA1 significativamente correlacionou com o período de sobrevida global (tempo transcorrido entre o diagnóstico da doença e a morte do paciente), onde pacientes que demonstraram um tumor com um número elevado de células positivas apresentaram um período de sobrevida global significativamente menor que os pacientes com baixa positividade (Fig. 18). Não houve associação entre a sobrevida livre de doença e a positividade

para HOXA1 (Fig. 19). Para determinar se HOXA1 apresenta um valor preditivo independente de outros fatores para a sobrevida global dos pacientes com câncer bucal, nós realizamos análise multivariada. Os modelos foram controlados para estágio T, estágio N, graduação histológica, recorrência e positividade para Ki-67. Esta análise demonstrou que a expressão de HOXA1 é um indicador independente da sobrevida global em 5 anos de pacientes com CEC oral (Tabela 6). As taxas de sobrevida global em 5 anos foram 76,88% e 55,55% para pacientes com baixa e alta expressão de HOXA1, respectivamente. Como antecipado, nenhuma correlação com o período de sobrevida livre de doença foi observada em relação à expressão de HOXA1, mas uma significativa correlação foi observada com estágio N (Tabela 7).

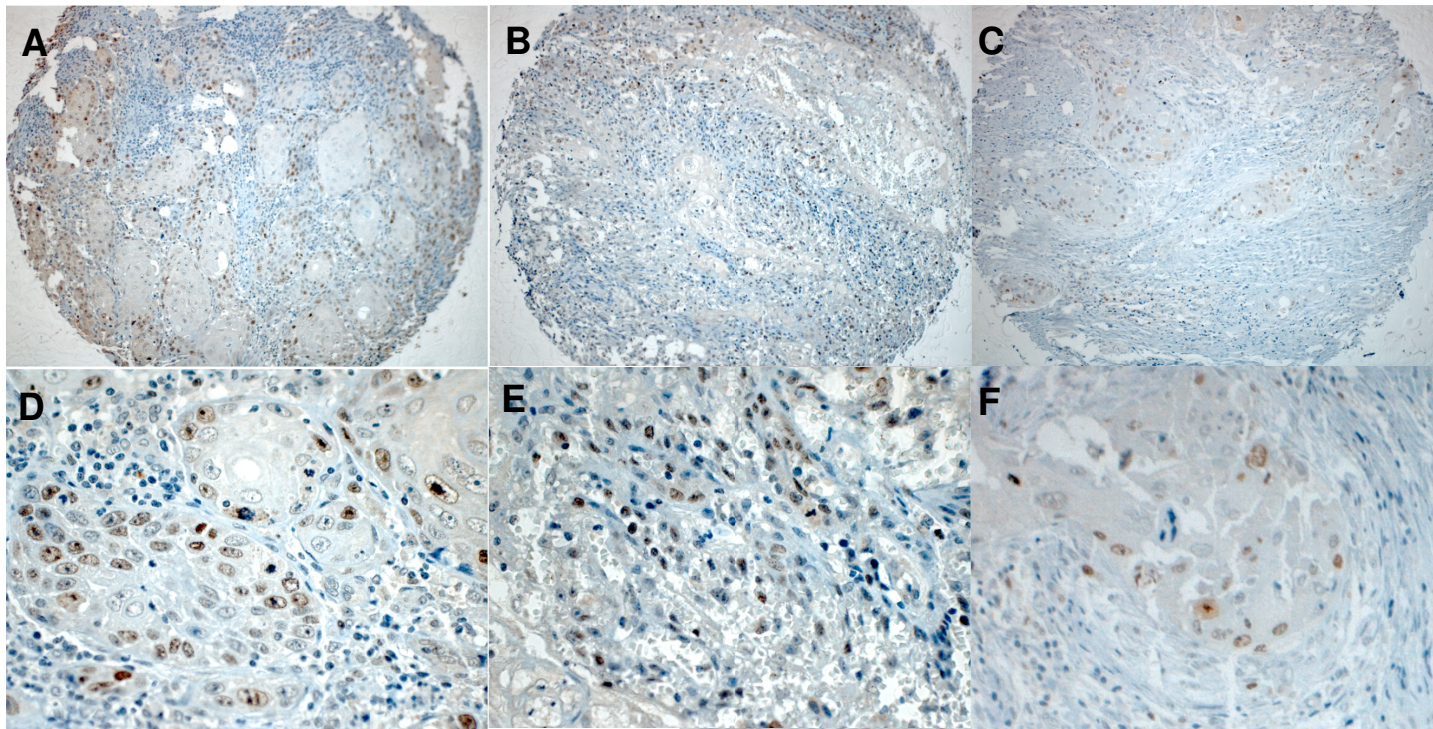


Figura 17. Análise imuno-histoquímica para HOXA1 nos arranjos de tecido. Imagens representativas de 3 tumores são apresentadas. Observe a positividade nuclear específica para HOXA1. (aumento de 10x para A, B e C e aumento de 200x para D, E e F)

Tabela 5. Correlação clínico-patológica da expressão de HOXA1 em amostras de CEC (n=127).

Parâmetro	% de células positivas		Valor de p
	< 37 n (%)	≥ 37 n (%)	
Idade			
< 56 anos	37 (48,68)	26 (50,98)	0,79
≥ 56 anos	39 (51,32)	25 (49,02)	
Gênero			
Homem	60 (78,94)	43 (84,31)	0,44
Mulher	16 (21,06)	8 (15,69)	
Raça			
Caucasiana	64 (84,21)	44 (86,27)	0,75
Não-Caucasiana	12 (15,79)	7 (13,73)	
Hábito de Fumar			
Não	8 (10,52)	4 (7,84)	0,61
Sim	68 (89,48)	47 (92,16)	
Hábito de Beber			
Não	14 (18,42)	13 (25,49)	0,34
Sim	62 (81,58)	38 (74,51)	
Localização			
Língua	53 (69,73)	38 (74,5)	0,55
Outra Localização	23 (30,27)	13 (25,5)	
Estádio T			
T1 + T2	33 (43,42)	13 (25,49)	0,039*
T3 + T4	43 (56,58)	38 (74,51)	
Estádio N			
N0	45 (59,21)	21 (41,17)	0,046*
N+	31 (40,79)	30 (58,83)	
Diferenciação Histopatológica			
BD + MD	48 (63,15)	22 (43,13)	0,026*
Indiferenciado	28 (36,85)	29 (56,87)	
Margem Cirúrgica			
Livre	66 (86,84)	45 (88,23)	0,81
Comprometida	10 (13,16)	6 (11,77)	
Infiltração Vascular			
Não	48 (63,16)	33 (64,7)	0,85
Sim	28 (36,84)	18 (35,3)	
Infiltração Neural			
Não	44 (57,89)	36 (70,58)	0,14
Sim	32 (42,11)	15 (29,42)	
Recorrência			
Não	35 (46,05)	35 (68,62)	0,012*
Sim	41 (53,95)	16 (31,38)	
Células positivas para Ki-67			
< 23%	56 (73,68)	14 (27,45)	0,0001*
≥ 23%	20 (26,32)	37 (72,55)	

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente Diferenciado.

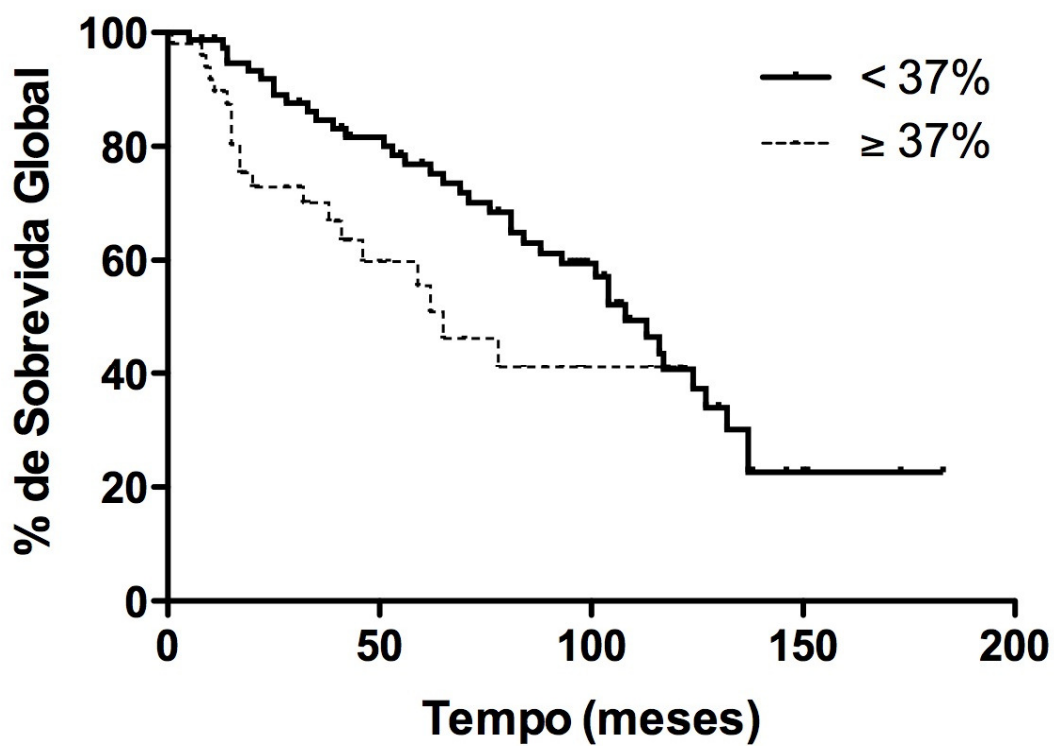


Figura 18. Curva de sobrevida global dos pacientes com CEC oral deste estudo divididos em relação à expressão de HOXA1. O período de sobrevida após 5 anos dos pacientes com tumores apresentado fraca expressão de HOXA1 foi maior que a de pacientes com elevada expressão. ($p=0,073$)

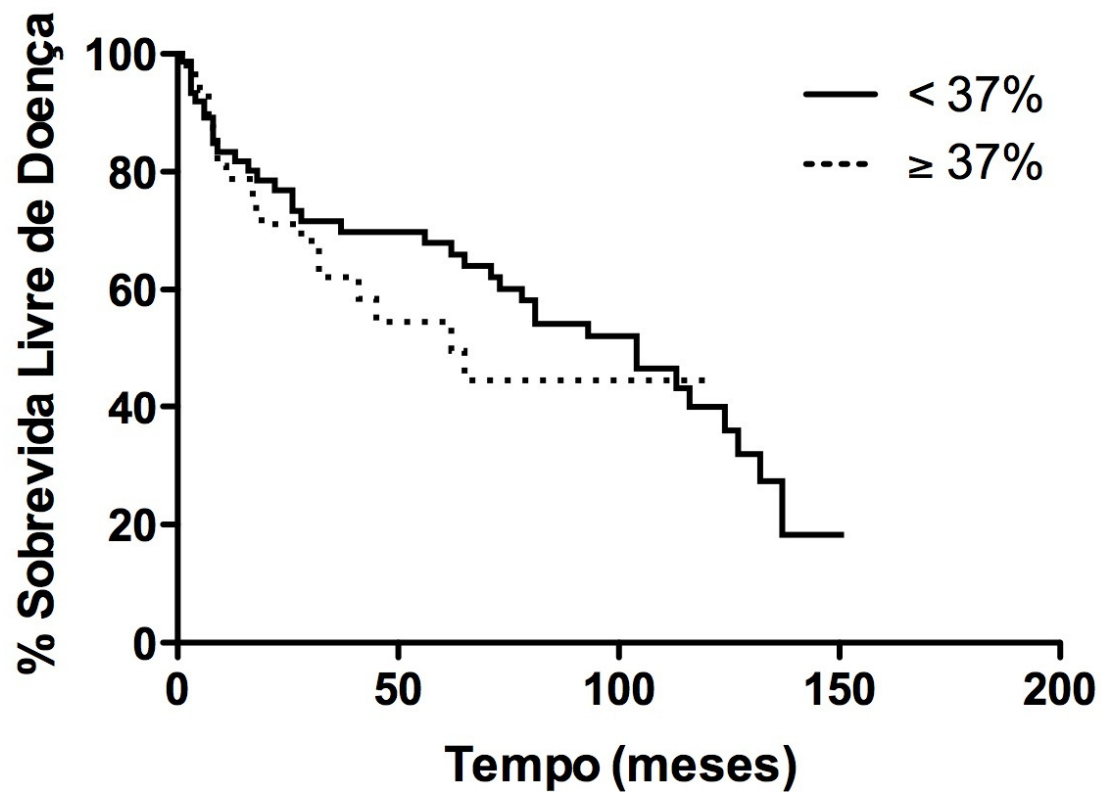


Figura 19. Curva de sobrevida livre de doença. Nenhuma correlação entre a expressão de HOXA1 e o período de sobrevida livre de doença foi observada. (p= 0,27)

Tabela 6. Análise multivariada da probabilidade de sobrevida global em 5 anos em pacientes com CEC oral (n=127).

Parâmetro	Probabilidade de sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de p	HR (95% IC)
HOXA1			
< 37%	76,88	0,026*	Referência
≥ 37%	55,55		0,48 (0,25-0,91)
Estádio T			
T1/T2	78,26	0,46	Referência
T3/T4	63,91		0,82 (0,48-1,39)
Estádio N			
N0	77,71	0,017*	Referência
N+	64,77		0,62 (0,36-1,07)
Graduação histológica			
BD + PD	70,67	0,86	Referência
Indiferenciado	68,49		0,81 (0,71-2,06)
Recorrência			
Não	84,69	0,003*	Referência
Sim	56,22		0,31 (0,18-0,52)
Positividade para Ki-67			
< 24%	67,83	0,70	Referência
≥ 24%	66,83		0,97 (0,57-1,65)

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente Diferenciado.

Tabela 7. Probabilidade de sobrevida livre de doença de 5 anos em pacientes com CEC oral por meio de análise multivariada (n=127).

Parâmetro	Probabilidade de sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	Valor de p	HR (95% IC)
HOXA1			
< 37%	67,92	0,43	Referência
≥ 37%	54,54		0,79 (0,43-1,42)
Estádio T			
T1/T2	68,67	0,56	Referência
T3/T4	59,40		0,85 (0,50-1,46)
Estádio N			
N0	72,54	0,03*	Referência
N+	53,99		0,54 (0,31-0,94)
Gradação histológica			
BD + MD	67,93	0,32	Referência
Indiferenciado	58,56		0,80 (0,66-1,20)
Recorrência			
Não	81,58	0,0001*	Referência
Sim	43,07		0,23 (0,13-0,39)
Positividade para Ki-67			
< 24%	66,85	0,67	Referência
≥ 24%	59,73		0,77 (0,78-2,23)

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente Diferenciado.

5.5. Efeitos da Superexpressão do Gene HOXB7 na Linhagem Celular de Queratinócitos HaCAT

Uma vez que os resultados apontam para uma superexpressão de HOXB7 em CECs orais, a mesma estratégia utilizada para avaliar o papel de HOXA1 na tumorigênese oral foi utilizada para HOXB7. A superexpressão de HOXB7 na linhagem celular HaCAT foi obtida por meio da transfecção do plasmídeo pcDNA 3.1⁽⁺⁾ contendo a sequência do cDNA de HOXB7. O sucesso na construção dos clones superexpressando HOXB7 (HaCAT-HOXB7) e dos clones controle (HaCAT-Controle), gerados pela transfecção do plasmídeo vazio, foi verificado por ensaios de western blot (Fig. 20). Os mesmos fenótipos relacionados à gênese tumoral analisados para HOXA1 foram verificados nos clones celulares superexpressando HOXB7.

Os clones HaCAT-HOXB7 apresentaram um número de células positivas para BrDU significativamente maior do que os clones controle (Fig. 21A, $p < 0,0001$). E de maneira consistente, os clones superexpressando HOXA1 também apresentaram um número significativamente maior de células marcadas positivamente para Ki-67 (Fig. 21B, $p < 0,001$). A modulação da expressão de HOXB7 não foi capaz de alterar a taxa de apoptose (Fig. 22), a capacidade de adesão (Fig. 23), o potencial de invasão (Fig. 24), e nem de induzir TEM (Fig. 25) e crescimento independente de ancoragem (Fig. 26) das células HaCAT.

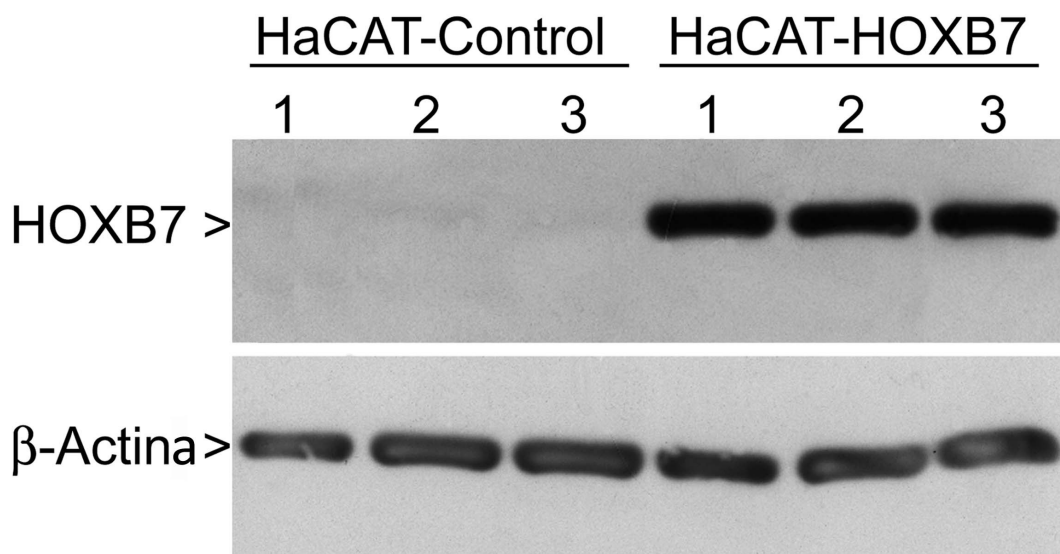


Figura 20. Expressão de HOXB7 nos clones de células HaCAT. Ensaio de western blot com anticorpos anti-HOXB7 e anti- β -actina. Note a abundante expressão de HOXB7 no clones transfectados com o plasmídeo pcDNA3.1⁽⁺⁾-HOXB7 (HaCAT-HOXB7) comparado com os clones transfectados com o plasmídeo vazio (HaCAT-Controle).

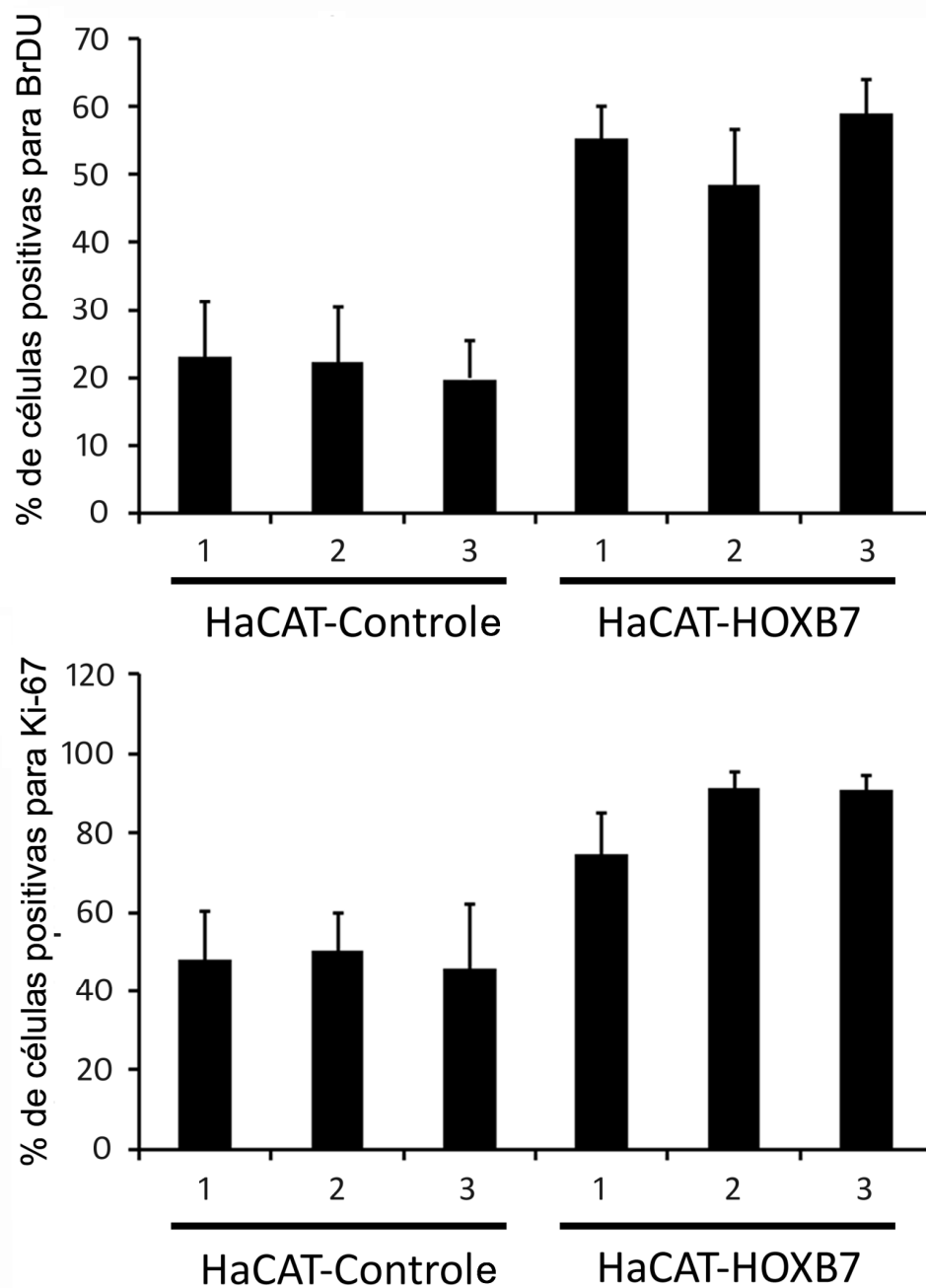


Figura 21. HOXB7 induz a proliferação celular. (A) Índice de incorporação de BrDU e (B) índice imuno-citoquímico da expressão de Ki-67. Cones HaCAT-HOXB7 demonstraram uma capacidade proliferativa significativamente maior que os clones controle ($p < 0,0001$ entre os grupos para BrDU e $p < 0,001$ entre os grupos para Ki-67).

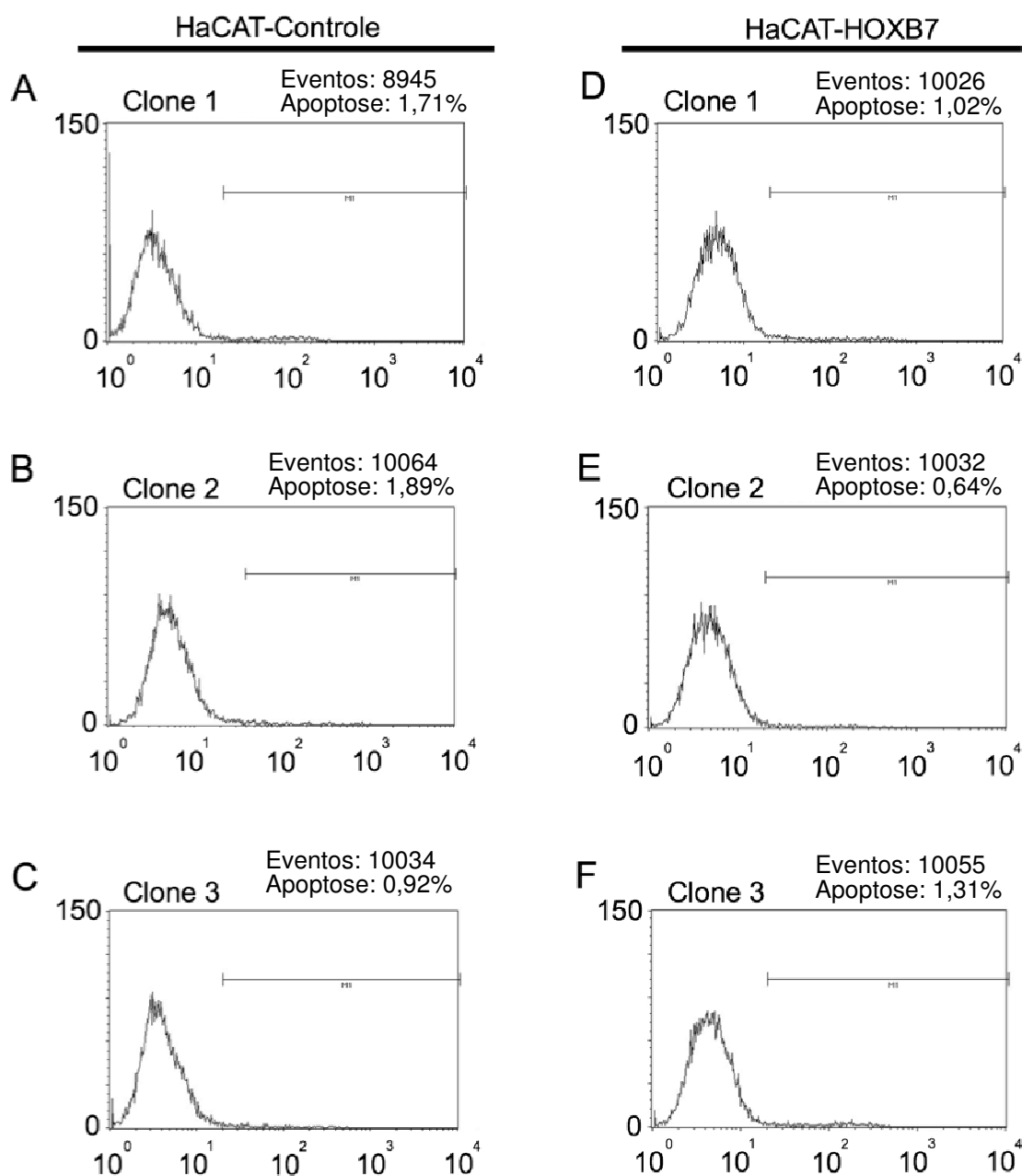


Figura 22. Índice de apoptose dos clones HaCAT-Control e HaCAT-HOXB7. Histogramas em A, B e C representam o índice apoptótico dos clones HaCAT-Control 1, 2 e 3 e histogramas em D, E e F representam o índice dos clones HaCAT-HOXB7 1, 2 e 3. Um pequeno número de células em apoptose nos clones de ambos os grupos foi observado.

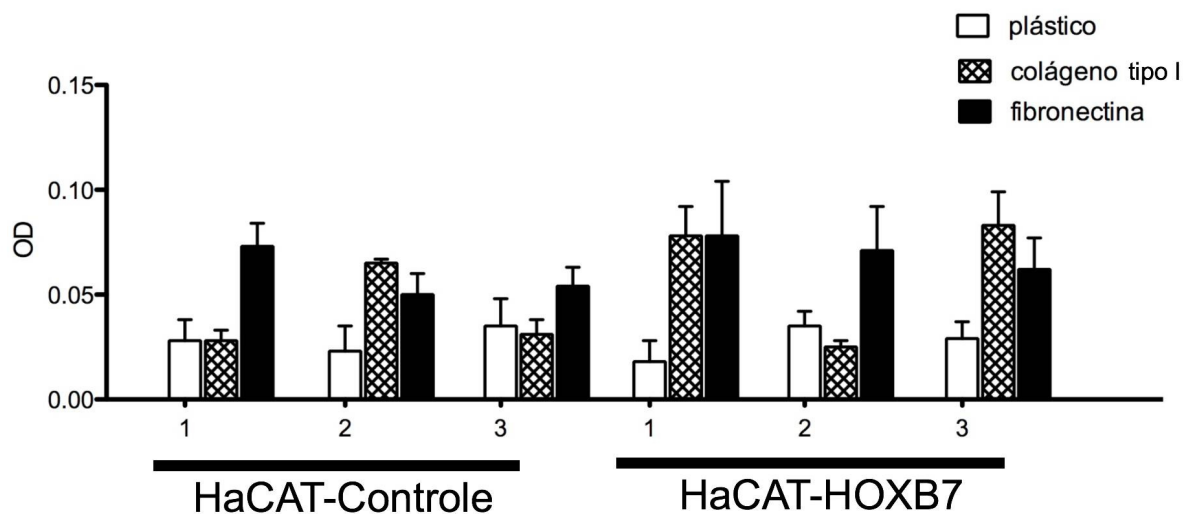


Figura 23. Ensaio de adesão celular dos clones HaCAT-Control e HaCAT-HOXB7. Resultado representativo de um ensaio realizado em quadruplicata. As células demonstraram uma maior adesão as superfícies cobertas com colágeno tipo I e fibronectina em relação à superfície não tratada (plástico), porém não houve diferença entre os níveis de adesão entre os grupos.

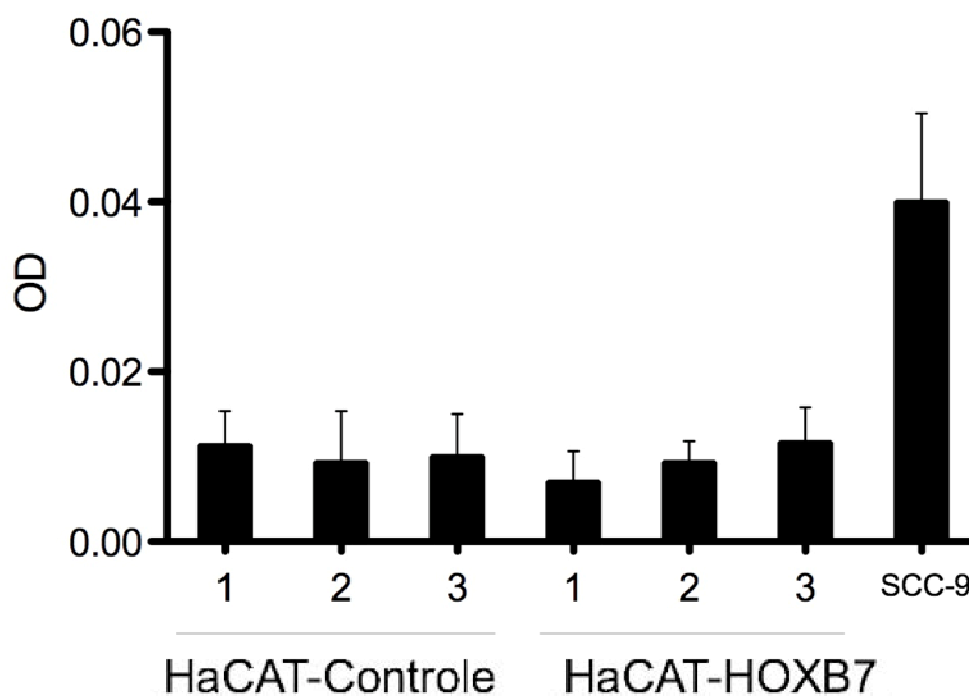


Figura 24. Potencial de invasão dos clones HaCAT-Controle e HaCAT-HOXB7. Células SCC-9 foram utilizadas como controle positivo. A baixa capacidade de invasão das células HaCAT foi mantida mesmo após a superexpressão de HOXB7.

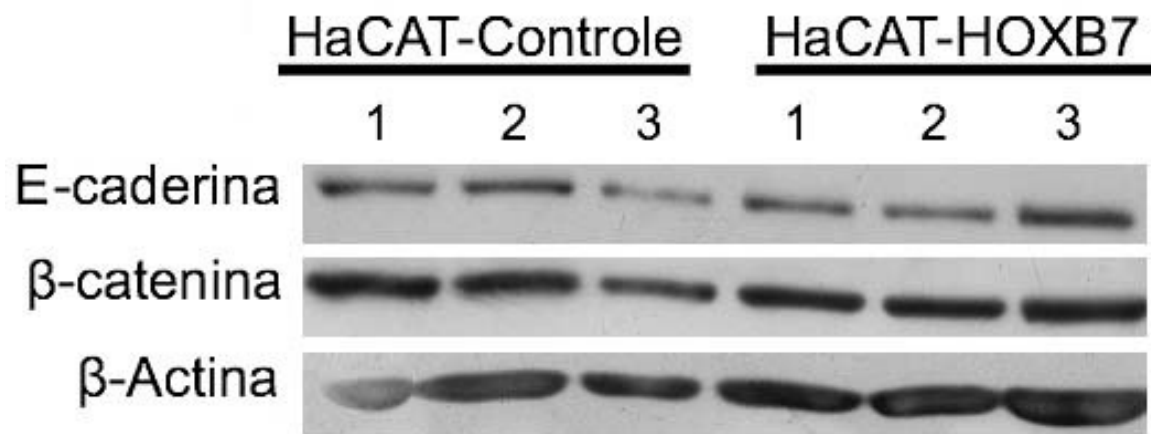


Figura 25. Análise da TEM dos clones superexpressando HOXB7. Ensaio de western blot com anticorpos anti-E-caderina e anti-β-catenina foram realizados com os clones HaCAT-Control e HaCAT-HOXB7. A expressão de β-actina foi utilizada como controle. Não houve diferença de expressão dos marcadores de TEM entre os clones estudados.

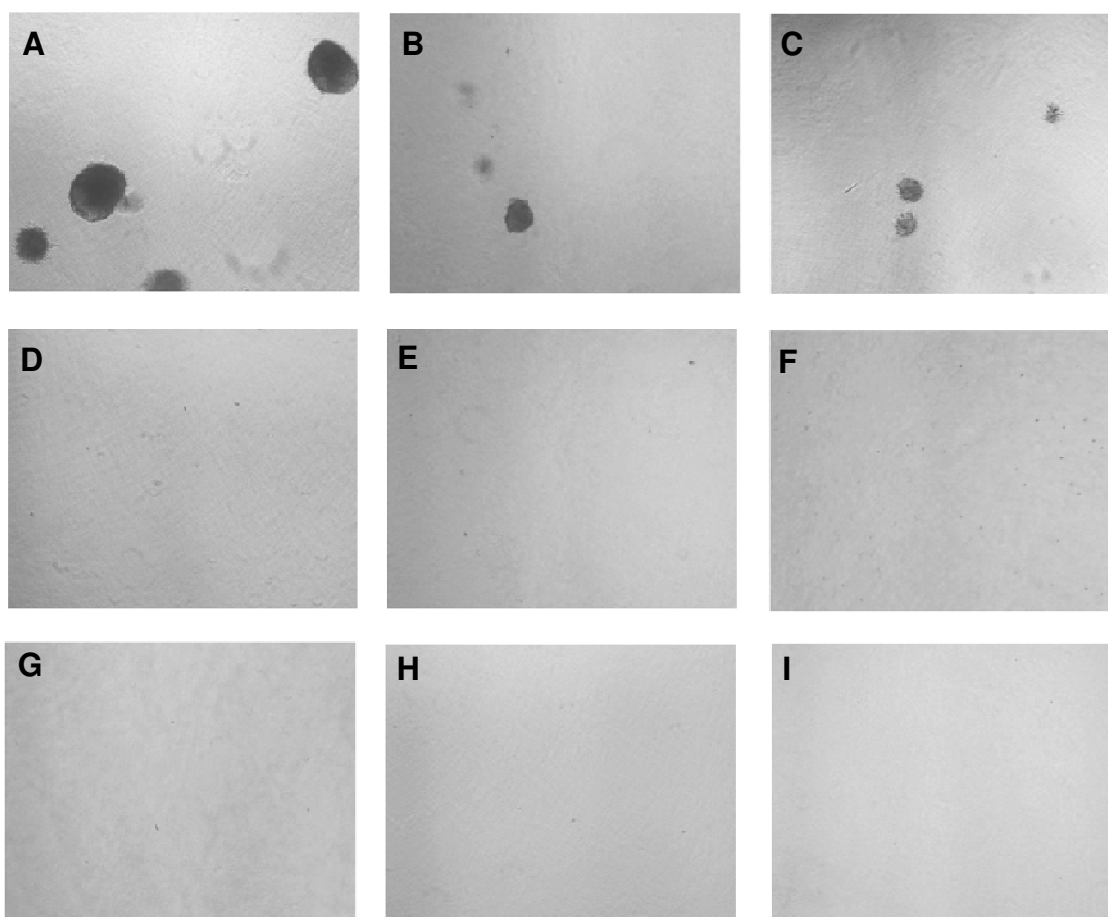


Figura 26. Análise da influência da superexpressão de HOXB7 no crescimento independente de ancoragem das células HaCAT. Insertos A, B e C representam ensaios com a linhagem SCC-9 (controle positivo). Insertos em D, E e F correspondem aos clones HaCAT-Controle 1, 2 e 3 e em G, H e I estão os clones HaCAT-HOXB7 1, 2 e 3. A linhagem SCC-9 apresentou excelente crescimento e formação de colônias, enquanto que os clones de células HaCAT não, visto que dependem de ancoragem para o crescimento celular.

5.6. Efeito da Inibição da Expressão de HOXB7 sobre a Proliferação das Células SCC-9

A inibição da expressão de HOXB7 foi realizada com sucesso pelo do método de RNAi com oligoribonucleotídeos (siRNA). As reduções na expressão de HOXB7 mRNA e proteína foram marcantes. O tratamento apenas com Lipofectamina (Mock) ou com o siRNA controle não tiveram efeito significativo sobre a expressão de HOXB7, demonstrando a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos utilizados (Fig. 27). Após a inibição de HOXB7, as células foram imediatamente utilizadas para investigar as mudanças em seu comportamento proliferativo. A redução de HOXB7 foi associada com uma redução significativa na capacidade proliferativa das células SCC-9 (Fig. 28). O índice de incorporação de BrDU das células SCC-9 após a inibição de HOXB7 foi reduzido em aproximadamente 5x ao comparado ao das células SCC-9 com tratamento Mock ou siRNA controle (Fig. 28A, $p > 0,001$). Similarmente, uma redução de mais de 2x no índice de expressão de Ki-67 foi observado nas células SCC-9 com expressão reduzida de HOXB7 (Fig. 28B, $p > 0,005$).

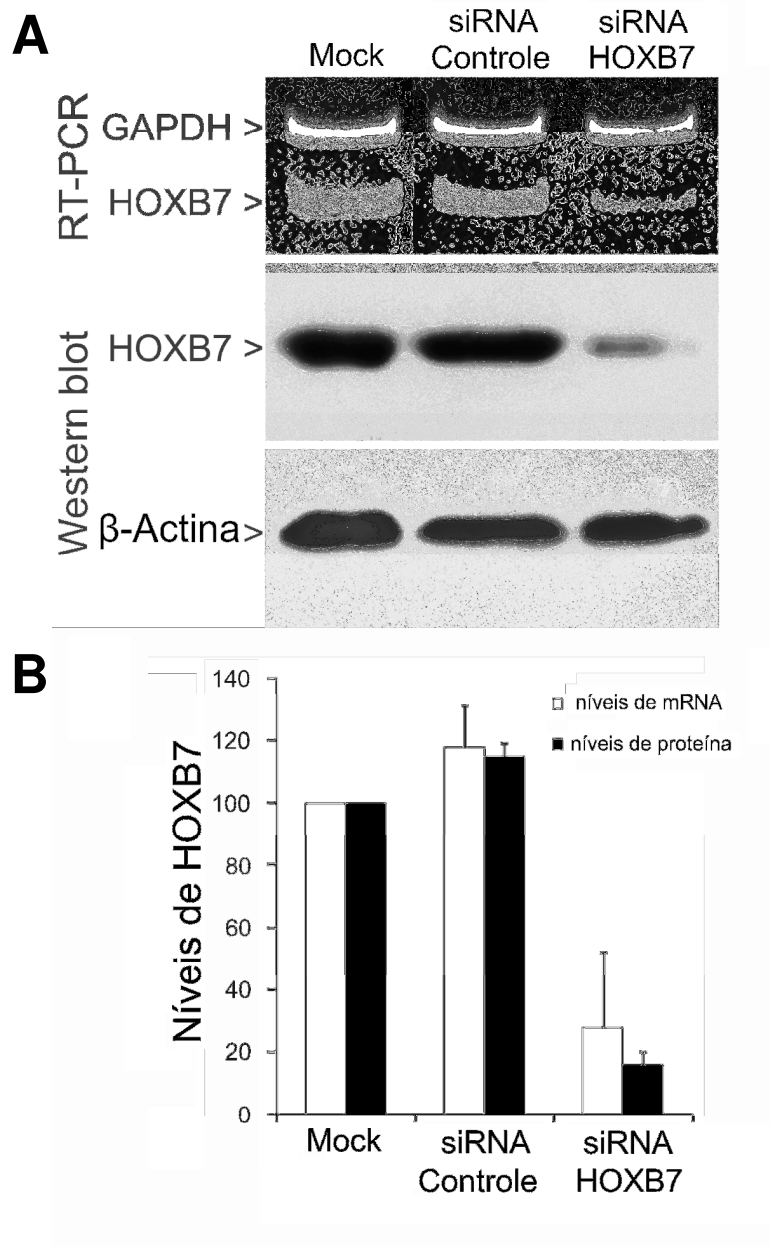


Figura 27. (A) Ensaios de RT-PCR e western blot das células SCC-9 tratadas com os oligonucleotídeos específicos contra HOXB7 (siRNA HOXB7) e com os respectivos controles (Mock e siRNA controle). (B) Análise densitométrica da expressão de HOXB7. Os resultados representam a media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. Note que a inibição na expressão de HOXB7 foi de mais de 90% em comparação com as células tratadas com siRNA controle.

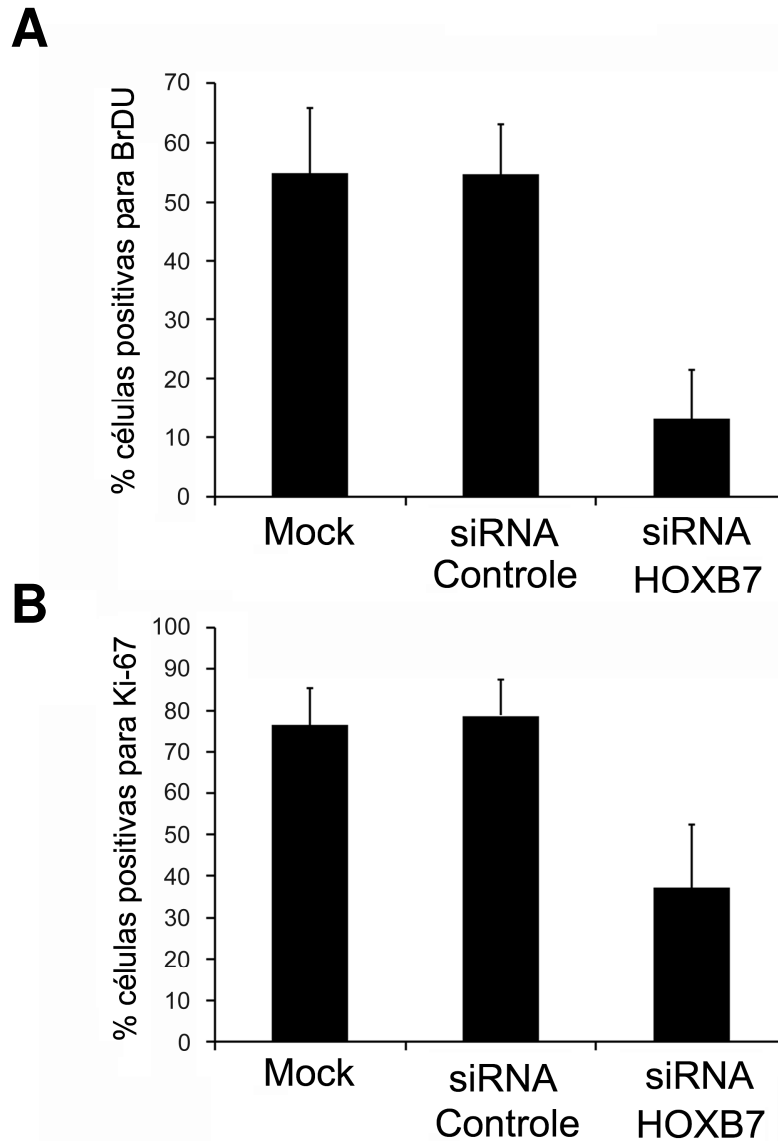


Figura 28. HOXB7 controla a proliferação das células de CEC oral. (A) Ensaio de incorporação de BrDU e (B) índice imuno-citoquímico da expressão de Ki-67. Não houve diferença entre os grupos de células transfectadas com Lipofectamina 2000 (Mock) ou com siRNA controle, no entanto, as células transfectadas com siRNA HOXB7 apresentaram uma significativa redução nos níveis de proliferação celular ($p < 0,001$ para ensaio de BrdU e $p < 0,005$ para ensaio de Ki-67).

5.7. Correlação entre a Expressão de HOXB7 e as Características Clínico-Patológicas dos CECs orais

A correlação entre a expressão imuno-histoquímica de HOXB7 e as características clínico-patológicas dos CECs foi verificada em uma amostra de 115 tumores orais. Figura 29 ilustra o padrão de marcação nuclear com o anticorpo HOXB7. Correlações positivas e significantes entre a positividade para HOXB7 e o consumo de álcool ($p=0,047$), o estágio N ($p=0,013$), a presença de invasão vascular ($p=0,021$) e o potencial proliferativo dos tumores ($p=0,012$) foram observadas (Tabela 5). A expressão de HOXB7 não foi correlacionada com idade, gênero, etnia, localização, estágio T, consumo de tabaco, comprometimento de margens cirúrgicas, infiltração neural e recorrência (Tabela 8).

Pacientes com tumores apresentando uma forte marcação para HOXB7 (número de células positivas maior que 31%) apresentaram um período de sobrevida em 5 anos significativamente menor que pacientes com fraca positividade para HOXB7 (Fig. 30). A positividade para HOXB7 não influenciou significativamente o período de sobrevida livre de doença dos pacientes, embora uma tendência possa ser observada (Fig. 31). Para determinar se HOXB7 apresentava um valor preditivo independente de outros fatores para a sobrevida global dos pacientes com CEC oral, análise multivariada controlada para estágio T, estágio N, invasão vascular e positividade para Ki-67 foi realizada. Esta análise demonstrou que a expressão de HOXB7 é um indicador independente da sobrevida global em 5 anos de pacientes com CEC oral (Tabela 9). Pacientes com baixa expressão imuno-histoquímica para HOXB7 apresentaram uma taxa de sobrevida global em 5 de 88,03%, enquanto que a taxa de sobrevida de pacientes com forte expressão de HOXB7 foi de apenas 55,78%. Embora o valor de p não tenha atingido o patamar de significância, uma tendência de correlação entre o período de sobrevida livre de doença em 5 anos e a expressão de HOXB7 foi observada (Tabela 10, $p=0,083$).

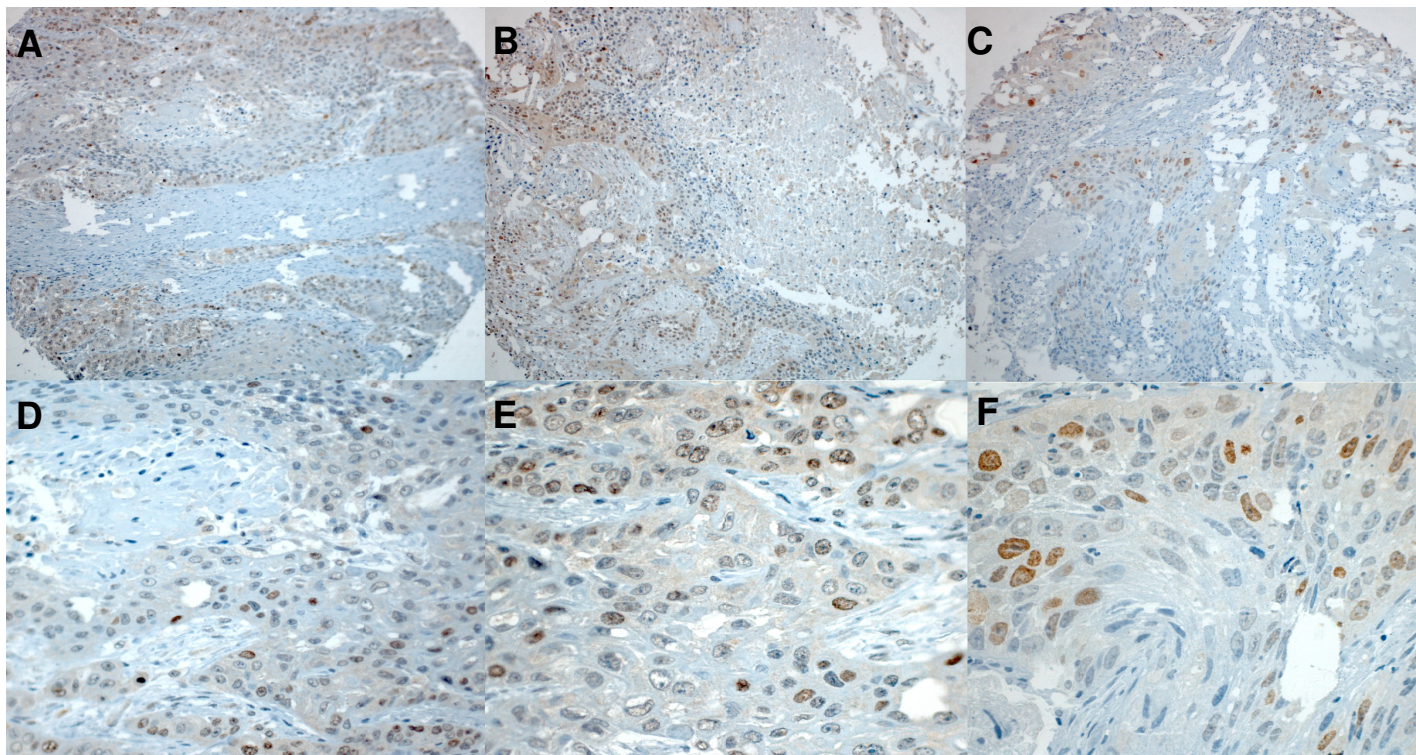


Figura 29. Análise imuno-histoquímica para HOXB7 nos arranjos de tecido. Imagens representativas de 3 tumores são apresentadas. Observe a positividade nuclear específica para HOXB7. (aumento de 10x para A, B e C e aumento de 200x para D, E e F).

Tabela 8. Correlação clínico-patológica da expressão de HOXB7 nas amostras de CEC (n=115).

Parâmetro	% de células positivas		Valor de p
	< 31 n (%)	≥ 31 n (%)	
Idade			
< 56 anos	33 (55)	25 (45,45)	0,30
≥ 56 anos	27 (45)	30 (54,55)	
Gênero			
Homem	48 (80)	45 (81,82)	0,80
Mulher	12 (20)	10 (18,18)	
Raça			
Caucasiana	55 (91,67)	46 (83,63)	0,18
Não-Caucasiana	5 (8,33)	9 (16,37)	
Hábito de Fumar			
Não	8 (13,34)	3 (5,45)	0,15
Sim	52 (86,66)	52 (94,55)	
Hábito de Beber			
Não	18 (30)	8 (14,55)	0,047
Sim	42 (70)	47 (85,45)	
Localização			
Língua	44 (73,33)	40 (72,72)	0,94
Outra Localização	16 (26,67)	15 (27,28)	
Estádio T			
T1 + T2	25 (41,66)	15 (27,27)	0,10
T3 + T4	35 (58,34)	40 (72,73)	
Estádio N			
N0	40 (66,67)	24 (43,63)	0,013
N+	20 (33,33)	31 (56,37)	
Diferenciação Histopatológica			
BD + MD	31 (51,67)	28 (50,91)	0,93
Indiferenciado	29 (48,33)	27 (49,09)	
Margem Cirúrgica			
Livre	50 (83,34)	50 (90,91)	0,22
Comprometida	10 (16,66)	5 (9,09)	
Infiltração Vascular			
Não	44 (73,33)	29 (52,72)	0,021
Sim	16 (26,67)	26 (47,28)	
Infiltração Neural			
Não	37 (61,67)	38 (69,1)	0,40
Sim	23 (38,33)	17 (30,9)	
Recorrência			
Não	37 (61,67)	31 (56,37)	0,56
Sim	23 (38,33)	24 (43,63)	
Células positivas para Ki-67			
< 23%	39 (65)	23 (41,81)	0,012
≥ 23%	21 (35)	32 (58,18)	

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente Diferenciado.

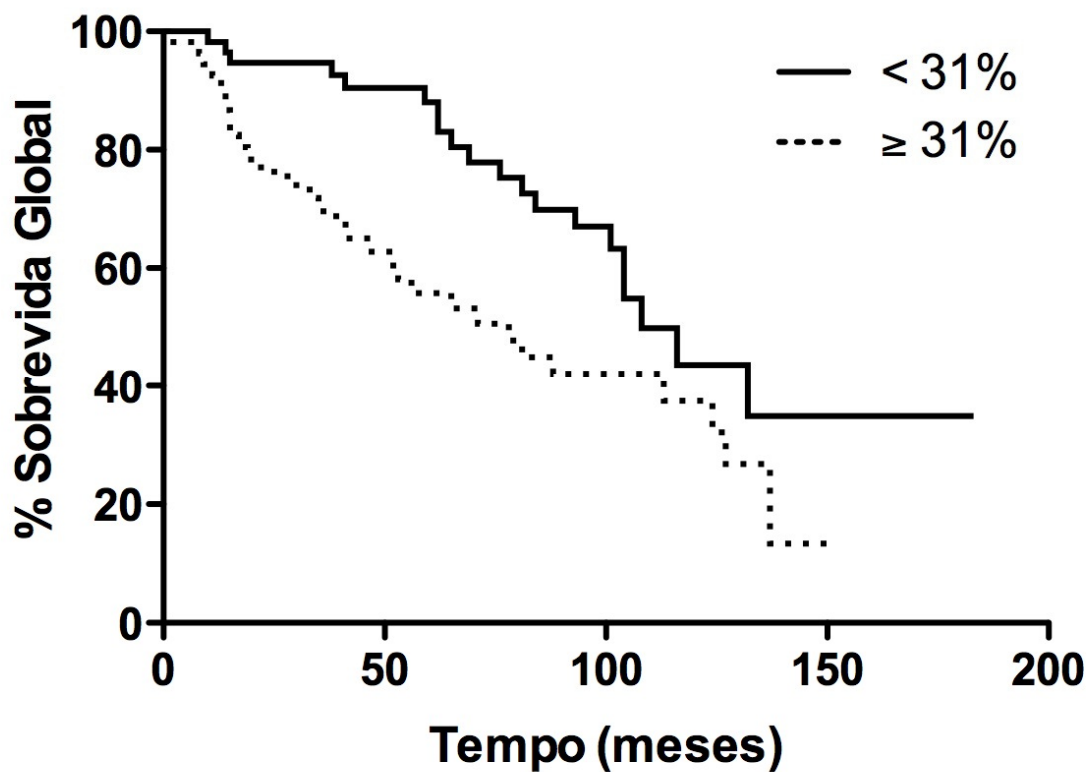


Figura 30. Sobrevida global dos pacientes com CEC oral é influenciada pela positividade de HOXB7. Curva de Kaplan-Meier para os pacientes com CEC oral divididos pela expressão imuno-histoquímica de HOXB7. Pacientes que apresentaram tumores classificados com expressão baixa de HOXB7 demonstraram uma maior probabilidade de sobrevida global em 5 anos comparado com pacientes com tumores com alto numero de células positivas para HOXB7. ($p= 0,001$)

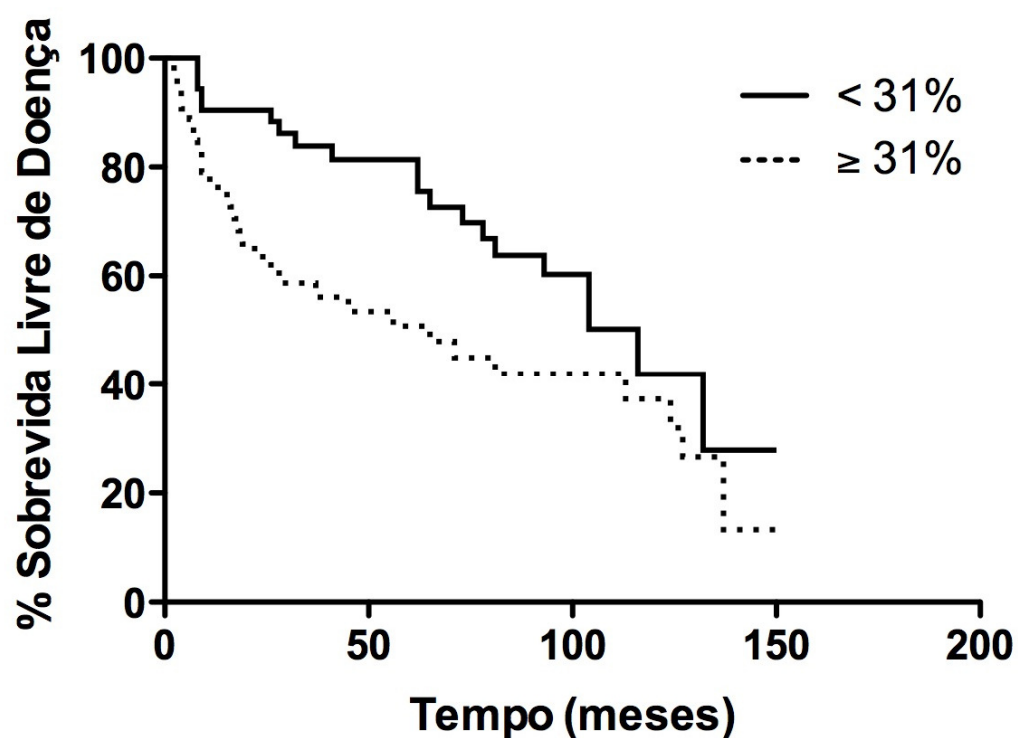


Figura 31. Curva de sobrevida livre de doença dos pacientes com CEC oral deste estudo dividido em relação à positividade de HOXB7. Pacientes com tumores demonstrando um menor número de células positivas para HOXB7 apresentaram uma tendência a maior sobrevida livre de doença comparado com pacientes com tumores contendo um elevado número de células positivas para HOXB7. ($p=0,07$)

Tabela 9. Análise multivariada da probabilidade de sobrevida global em 5 anos em pacientes com CEC oral (n=115).

Parâmetro	Probabilidade de sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de p	HR (95% IC)
HOXB7			
< 31%	88,03	0,009*	Referência
≥ 31%	55,78		0,47 (0,27-0,83)
Estádio T			
T1/T2	79,48	0,49	Referência
T3/T4	68,59		0,91 (0,49-1,67)
Estádio N			
N0	80,06	0,08*	Referência
N+	62,91		0,70 (0,39-1,24)
Invasão Vascular			
Não	76,33	0,32	Referência
Sim	65,72		0,80 (0,45-1,44)
Positividade para Ki-67			
< 24%	75,03	0,46	Referência
≥ 24%	69,06		0,94 (0,53-1,66)

Tabela 10. Probabilidade de sobrevida livre de doença de 5 anos em pacientes com CEC oral por meio de análise multivariada (n=115).

Parâmetro	Probabilidade de sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	Valor de p	HR (95% IC)
HOXB7			
< 31%	81,38	0,083	Referência
≥ 31%	60,77		0,72 (0,27-1,83)
Estádio T			
T1/T2	73,61	0,56	Referência
T3/T4	62,90		0,90 (0,49-1,64)
Estádio N			
N0	76,19	0,03*	Referência
N+	53,89		0,58 (0,32-1,04)
Invasão Vascular			
Não	68,91	0,33	Referência
Sim	62,10		0,84 (0,47-1,51)
Positividade para Ki-67			
< 24%	66,49	0,66	Referência
≥ 24%	66,48		1,13 (0,64-1,99)

5.8. Correlação entre as Expressões Imuno-histoquímicas de HOXA1 e HOXB7 em Amostras de CEC Oral

Uma vez que existiu uma grande similaridade dos resultados *in vitro* e *in vivo* entre HOXA1 e HOXB7, nós decidimos verificar a correlação entre a expressão imuno-histoquímica do produto protéico destes 2 genes nas amostras de CEC oral. Cento e dez amostras foram incluídas nesta análise, visto que foram analisadas para os 2 marcadores. Interessantemente, uma forte e positiva correlação entre a expressão imuno-histoquímica destes 2 marcadores foi observada nas amostras de CEC oral, como revelado pelo coeficiente de Spearman (r_s) de 0,25 e um valor de p de 0,008.

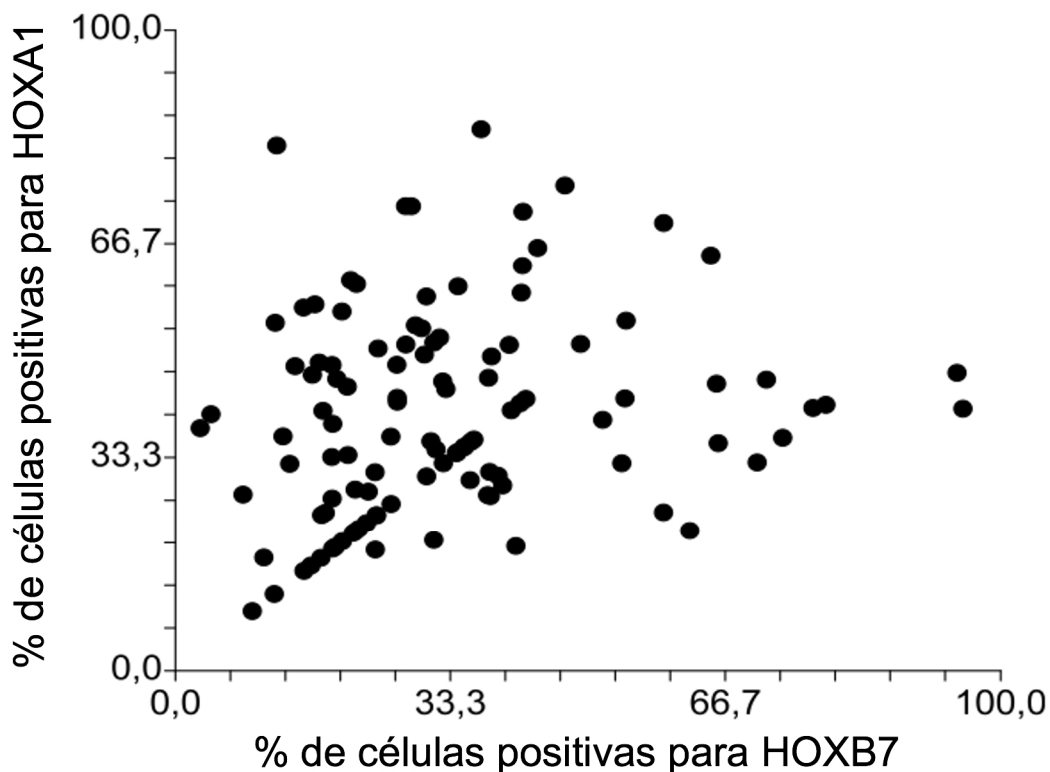


Figura 32. Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de HOXA1 e HOXB7 nas amostras de CEC oral (n=110). Uma forte e positiva correlação entre HOXA1 e HOXB7 foi observada ($r_s=0,25$ e $p=0,008$).

6. Discussão

Apesar dos recentes avanços nos protocolos de tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CEC oral permanece entre 50 e 60% (Bagan & Scully, 2008; Sklenicka *et al.*, 2010; Jerjes *et al.*, 2010). Este baixo índice de sobrevida é principalmente associado ao fato de que a maioria dos pacientes com CEC oral é diagnosticado com a doença em estágio avançado, facilitando a recorrência local e o desenvolvimento de metástases regional e à distância (Warnakulasuriya, 2009; Scully & Bagan, 2009). Então, prevenir e diagnosticar a doença nos estádios iniciais estão entre os principais desafios da atualidade. Contudo, o melhor conhecimento dos eventos biológicos associados à gênese do CEC oral e a caracterização de biomarcadores podem contribuir para a identificação e tratamento de pacientes afetados por este tipo de tumor. Por exemplo, biomarcadores podem contribuir na identificação de metástases ocultas ou podem auxiliar na discriminação de pacientes de alto e baixo risco de desenvolverem metástases, permitindo um tratamento mais individualizado (Arellano-Garcia *et al.*, 2010).

As descobertas das últimas décadas demonstraram muitos pontos em comum entre os processos de embriogênese e oncogênese. Entre estes pontos estão a intensa proliferação, diferenciação e morte celular, a proeminente neovascularização e a constante migração e invasão dos tecidos adjacentes. Sendo assim, é sugerido que genes associados ao desenvolvimento celular e tecidual possam posteriormente ser utilizados em processos de oncogênese. Os genes HOX são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). Embora estes genes sejam classicamente conhecidos por controlar a morfogênese celular e tecidual (Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Samuel & Naora, 2005), estudos demonstraram a participação destes genes em eventos biológicos cruciais para a célula eucariótica adulta em condições normais e na oncogênese (Gehring & Hiromi,

1986; Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Del Bene & Wittbrodt, 2005; Grier *et al.*, 2005; Samuel & Naora, 2005). Em contraste ao encontrado para tumores de outras partes do corpo, existem poucos estudos que avaliaram a expressão dos genes da família HOX em cânceres de boca (Hassan *et al.*, 2006; Acquafreda *et al.*, 2010; Yamatoji *et al.*, 2010; Liborio *et al.*, 2011). Visto que nossos estudos apontaram para uma expressão significativamente maior dos genes HOXA1 e HOXB7 em CECs orais comparado com mucosa normal (Bitu, 2008; Destro, 2008), o presente estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos da superexpressão dos genes HOXA1 e HOXB7 na oncogênese oral e verificar o valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica destes genes. Para facilitar a compreensão dos nossos achados, a discussão é apresentada como o restante da tese.

6.1. Expressão de HOXA1 Controla a Proliferação Celular e Correlaciona com um Prognóstico Desfavorável

Hassan e colaboradores (2006), em um estudo sobre o padrão de expressão dos genes HOX por meio de ensaios de RT-PCR, demonstraram que a expressão de HOXA1 é significativamente maior em CECs orais quando comparado com mucosas normais. De maneira similar aos nossos estudos prévios, esta avaliação limitou-se a comparar a abundância dos transcritos gênicos, sem confirmar a produção protéica e sem a realização de ensaios funcionais. Para ampliar nosso conhecimento, na primeira parte do presente estudo nós realizamos análise imuno-histoquímica, nas mesmas amostras de mucosa normal e CEC utilizadas para quantificar a abundância de transcritos, para determinar os níveis protéicos de HOXA1. Como esperado, o número de células positivas para HOXA1 nas amostras de CEC foi significativamente maior do que nas amostras de mucosa normal de pacientes que não tinham o hábito de consumir bebidas alcoólicas e tabaco. Em adição, a técnica de imuno-histoquímica forneceu importantes informações sobre quais células expressam HOXA1. Em tecidos normais a positividade foi restrita ao núcleo de células

epiteliais das camadas basal e supra-basal, enquanto que nas amostras de CEC oral as células positivas foram dispersas por todo o epitélio tumoral. Nenhuma outra célula do micro-ambiente tumoral demonstrou positividade para HOXA1. Interessantemente, não há relatos da expressão imuno-histoquímica de HOXA1, mas os estudos com outros membros do locus HOXA revelaram a produção destes genes por células epiteliais. Yoshida *et al.* (2006) demonstraram a expressão imuno-histoquímica de HOXA10 no epitélio do endométrio secretor, assim como em linhagens celulares de carcinoma de endométrio. Abe *et al.* (2006) também demonstraram a expressão imuno-histoquímica restrita de HOXA5 e HOXA10 em células epiteliais normais e neoplásicas do pulmão. Em seu estudo sobre o padrão de expressão dos genes HOX em mucosa esofágica normal e tumoral, Takahashi *et al.* (2006) demonstraram que a expressão de HOXA5 é restrita às camadas basais do epitélio nas amostras de mucosa normal, mas a expressão é observada em quase todas as células tumorais, com ausência de expressão em células do estroma. Em conjunto, estes resultados demonstram a expressão dos membros do locus HOXA, incluindo HOXA1, em células epiteliais em proliferação, sugerido uma participação deste gene no controle da proliferação em condições normais e de neoplasia.

Os efeitos da superexpressão de HOXA1 foram avaliados em poucos estudos. Bach *et al.* (2010) demonstraram a capacidade do gene HOXA1 transformar células hematopoiéticas primárias *in vitro* e *in vivo*, o que resultou no desenvolvimento de leucemias mielóides agudas em camundongos. Em dois estudos independentes, Zhang e colaboradores (2003; 2006) demonstraram em células epiteliais normais (MCF10A) e tumorais (MCF7) de mama que a expressão forçada de HOXA1 foi capaz de promover características tumorais importantes, incluindo crescimento independente de ancoragem, crescimento tumoral agressivo *in vivo*, diminuição drástica da taxa de apoptose, além de maior proliferação celular. Para entender melhor o papel de HOXA1 nos eventos moleculares envolvidos na oncogênese oral, decidimos modular a expressão de HOXA1 em linhagens celulares de queratinócitos normais e neoplásicos. A linhagem HaCAT de queratinócitos normais imortalizados mas não

transformados, que apresenta níveis endógenos reduzidos de expressão de HOXA1, foi selecionada para a superexpressão do gene HOXA1, enquanto que a inibição de HOXA1 por RNA de interferência foi realizada nas células de câncer bucal SCC-9, que apresenta altos níveis endógenos de expressão de HOXA1. A superexpressão de HOXA1 induziu significativamente a capacidade proliferativa das células HaCAT, como revelado pelos índices de incorporação de BrDU e expressão imuno-citoquímica de Ki-67. Em concordância, a inibição de HOXA1 foi associada com uma significativa redução na proliferação das células SCC-9. Os resultados que apontam para um papel de HOXA1 no controle da proliferação celular são similares aos descritos por Zhang *et al.* (2003), onde a expressão forçada de HOXA1 promoveu a proliferação das células MCF10A. A inibição da expressão de HOXA1 também foi associada a um controle da expressão de moléculas relacionadas à modulação da proliferação celular, incluindo c-Myc, Bcl-2 e ciclina D1 (Zhu *et al.*, 2005).

A modulação da expressão de HOXA1 nas células HaCAT não foi capaz de alterar os outros eventos biológicos analisados, incluindo apoptose, adesão, invasão, TEM e crescimento independente de ancoragem. Estudo prévio demonstrou que a superexpressão de HOXA1 por si só não foi suficiente para estimular a TEM de células de mama normal (Zhang *et al.*, 2006). No entanto, demonstraram que a expressão de HOXA1 é modulada por E-caderina o que, em certo ponto, pode fornecer às células epiteliais malignas a oportunidade de manter independentemente a expressão de HOXA1 e diminuir a expressão de E-caderina para então começarem a sofrer o processo de TEM, aumentando seu potencial de invasão e metástase independente de anoikis. Como contexto, é importante destacar que a sobrevivência das células epiteliais é depende de sinais gerados pela interação das células com a membrana basal, e na ausência de ancoragem as células são induzidas a morte celular por anoikis (Frisch & Screaton, 2001). Esta forma de morte celular impede as células epiteliais de proliferar e sobreviver fora de seu contexto tecidual normal (Grossman, 2002). O processo de TEM em carcinomas está ligado à perda das características epiteliais durante a progressão tumoral (Kim *et al.*, 2010). A

repressão de E-caderina, molécula considerada como a “guardiã” da identidade epitelial, e o aumento da quantidade de β -catenina nuclear estão relacionadas à maior invasividade tumoral e pior prognóstico (Berx *et al.*, 1995; Thiery, 2002).

No presente estudo, apesar da expressão forçada de HOXA1 induzir a proliferação celular de forma consistente, ela não foi capaz de induzir transformação. Uma das razões pelas quais as células HaCAT não apresentaram este fenótipo, como aconteceu com células normais de mama e células hematopoiéticas, pode ser justamente a diferença entre elas, já que o padrão de expressão e as funções dos genes HOX parecem ser dependentes do tipo celular (Maeda *et al.*, 2005; Svingen & Tonissen, 2006; Hassan *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Comparando o padrão de expressão das amostras normais de tecido oral com o padrão da linhagem celular HaCAT, houveram inúmeras diferenças que podem ser creditadas ao processo de imortalização da linhagem celular por transfecção de gene viral ou pela aquisição de mutações. Portanto, a linhagem celular HaCAT reproduz, até certo ponto, o padrão de expressão dos genes HOX em mucosa oral normal.

A análise imuno-histoquímica revelou que o número de células positivas para HOXA1 foi significativamente correlacionado com indicadores de pior prognóstico, incluindo estágio clínico T, estágio clínico N, padrão de diferenciação celular dos tumores e recorrência. Contudo, a correlação com recorrência foi inversa da esperada, sendo que recorrência (neste momento não foi possível separar recorrência entre local, regional e à distância) foi observada mais freqüentemente em pacientes com tumores apresentando menor número de células positivas para HOXA1. O significado e impacto deste achado precisam ser melhores compreendidos e confirmados em um novo grupo de amostras. Em adição, a expressão de HOXA1 foi significativamente correlacionada com o potencial proliferativo dos tumores, como revelado pelo elevado número de células positivas para Ki-67, o que pode ter importantes implicações clínicas. Na prática clínica, o tratamento e prognóstico do câncer oral são baseados principalmente na classificação clínica do tumor (estádio TNM). Contudo, marcadores moleculares associados à progressão da doença

podem complementar as observações clínicas e melhorar o manejo do paciente. Assim como em outros tipos de câncer, a proliferação celular tem algum valor prognóstico para CECs orais. Em geral, a alta atividade proliferativa dos tumores está associada com um pior prognóstico (Pich *et al.*, 2003). Mais importante foi o achado que a expressão de HOXA1 tem um valor significativo e independente para o prognóstico do paciente, como revelado pela influência no período de sobrevida global em 5 anos. Então, tumores com elevada expressão de HOXA1 demonstram um comportamento mais agressivo que tumores com baixa expressão. Os estudos sobre o valor prognóstico de biomarcadores, incluindo Ki-67, PCNA, p53, EGFR, moléculas relacionadas a apoptose, aneuploidia e muitos outros, são importantes e contribuem para o conhecimento dos processos biológicos relacionados aos CECs orais (Pai & Westra, 2009). Nosso estudo adiciona mais um provável fator relacionado à oncogênese oral, contudo novos estudos são necessários para verificar a real contribuição que este marcador possa ter para o diagnóstico, tratamento e prognóstico de pacientes afetados por CEC oral. É importante destacar nosso interesse em experimentos futuros de explorar a relação de HOXA1 com moléculas reguladoras da proliferação celular, incluindo fatores de crescimento, citocinas, ciclinas, quinases dependentes de ciclina e seus inibidores, e de determinar a expressão imuno-histoquímica em lesões orais com potencial de malignização.

6.2. HOXB7 Modula a Proliferação Celular e sua Expressão é Associada ao Prognóstico dos Pacientes com CEC Oral

A expressão desregulada de HOXB7 foi descrita em alguns tumores, incluindo mielomas múltiplos (Storti *et al.*, 2010), cânceres de mama (Wu *et al.*, 2006) e CECs orais (Hassan *et al.*, 2006; Destro, 2008). O presente estudo confirmou tal observação, visto que o número de células positivas para a marcação imuno-histoquímica de HOXB7 foi significativamente maior nas amostras de CEC do que em amostras de mucosa normal. Como esperado, a marcação em amostras de mucosa oral normal foi restrita ao núcleo das células

das camadas epiteliais em proliferação (camadas basal e supra-basal). Em amostras de CEC, a positividade foi difusa pelo epitélio tumoral, além de mais intensa. O padrão de expressão dos genes HOX em linhagens celulares de CEC oral e na linhagem celular de queratinócitos HaCAT foi previamente realizada, revelando os menores níveis de expressão na linhagem HaCAT e os maiores na linhagem de CEC SCC-9. Portanto, utilizamos estas linhagens para a realização de estudos funcionais. Nossos resultados demonstraram que a expressão de HOXB7 é suficiente para regular a proliferação celular. Rubin *et al.* (2007) demonstram que as células MCF10A transfectadas com HOXB7 adquirem capacidade de proliferar em meio com quantidades reduzidas de soro fetal bovino (1%) ao contrário do observado em células controle, que precisavam de meio suplementado com 10% de soro. Em relato por Carè e colaboradores (1998), a superexpressão de HOXB7 em células de câncer de mama SKBR3 promoveu proliferação celular e angiogênese através da expressão aumentada de bFGF e diversos fatores angiogênicos. Em tumores formados pelo transplante das células SKBR3 superexpressando HOXB7, uma elevada expressão de fatores angiogênicos, produzindo tumores bem vascularizados foi observada, permitindo a hipótese que HOXB7 é fundamental para o processo de progressão tumoral não só por induzir proliferação, mas também por promover neovascularização (Carè *et al.*, 2001). Em tumores de ovário o gene HOXB7 foi encontrado mais expresso do que em amostras de tecido ovariano normal (Naora *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, a expressão forçada de HOXB7 em linhagem de células superficiais de ovário causou o maior acúmulo e secreção de bFGF e o aumento da proliferação celular, mostrando que HOXB7 pode ter um papel no desenvolvimento de carcinomas ovarianos.

Adicionalmente, o estudo de Rubin e colegas (2007) revelou que células MCF10A com expressão elevada de HOXB7 adquiriram a capacidade de crescer em ambiente independente de ancoragem e apresentaram maior resistência a apoptose induzida por radiação ionizante, sugerindo que HOXB7 funciona como um fator de reparo ao DNA e promove sobrevivência tumoral. Anteriormente, HOXB7 induziu TEM com ganho de mobilidade e invasibilidade

celular (Wu *et al.*, 2006). Neste estudo, a superexpressão de HOXB7 em células renais caninas Madin-Darby (MDCK) resultou na redução de E-caderina e na promoção da expressão de proteínas mesenquimais, incluindo isoforma α da actina de músculo liso e vimentina. Além disso, a superexpressão de HOXB7 causou a transformação oncogênica de células MDCK. Quando enxertadas em camundongos, as células MDCK-HOXB7 formaram tumores proliferativos e bem vascularizados. No entanto, nossos resultados mostram que as células HaCAT-HOXB7 não apresentaram alterações nas taxas de adesão e invasão, nos níveis de apoptose e na perda de expressão de E-caderina, revelando que a superexpressão de HOXB7 não foi capaz de transformar a linhagem HaCAT. Explicações para a ausência de tais fenótipos podem residir na especificidade da expressão e função dos genes HOX em tecidos embrionários e adultos, na dependência de alterações adicionais não observadas em nosso tipo celular, níveis muito altos de expressão que podem sequestrar co-fatores necessários para o fenótipo ou níveis insuficientes de expressão para o desenvolvimento destes fenótipos.

A maior expressão imuno-histoquímica de HOXB7 foi correlacionada ao consumo de álcool, estágio N, presença de invasão vascular e maior positividade para Ki-67. Embora moderada, uma associação causal entre a ingestão de bebidas alcoólicas e o câncer oral é bem aceita, e evidências apontam para uma influência do álcool no metabolismo de reparo do DNA (Boffetta & Hashibe, 2006). A associação de HOXB7 com consumidores de bebidas alcoólicas pode ser importante, visto que metabólitos do álcool podem alterar a expressão de HOXB7, que por sua vez altera a função das enzimas do sistema de reparo do DNA, favorecendo a instabilidade genômica. Pacientes com tumores apresentando marcação para HOXB7 maior que 31% apresentaram um período de sobrevida em 5 anos significativamente menor que pacientes com fraca positividade para HOXB7. A positividade para HOXB7 não influenciou significativamente o período de sobrevida livre de doença dos pacientes, porém pacientes com maior número de células positivas para HOXB7 tenderam a ter uma sobrevida pior. Em ensaios com microarranjo de expressão,

HOXB7 foi mais expresso em cânceres invasivos de mama, estabelecendo uma significativa associação com pior prognóstico (Hyman *et al.*, 2002). Em CECs orais, nosso relato foi o primeiro a sugerir um prognóstico ruim para pacientes que apresentam elevada expressão de HOXB7 (Destro *et al.*, 2010). Os nossos resultados relatados aqui representam uma série maior de casos de CEC oral (35 casos em Destro *et al.*, 2010 e 115 casos no presente estudo), o que sugere que a superexpressão de HOXB7 possa ser mais um evento ligado à oncogênese oral. No entanto, devido à complexidade da tumorigênese oral que requer diversas ações coordenadas de múltiplas alterações genéticas, o impacto de um único marcador merece estudos mais amplos.

Durante o desenvolvimento, interações por compartilhamento e complementação de funções são constantes entre os membros da família HOX (Cheng *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). Contudo, interações entre genes HOX, se existentes, não são conhecidas em tumores. Nossos resultados demonstraram uma similaridade muito grande entre os fenótipos relacionados à HOXA1 e HOXB7, sugerindo uma interação entre estes genes no câncer oral. Em suporte a tal observação, o estudo de Mohankumar *et al.* (2007) revelou que HOXA1 ativa as proteínas p44/42 da via de sinalização celular de MAP quinase, e o produto do gene HOXB7 também parece ativa esta via (Wu *et al.*, 2006). Portanto, os papéis de HOXA1 e HOXB7 em conjunto podem ser importantes para o desenvolvimento dos CECs orais.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que os genes HOXA1 e HOXB7 contribuem para o desenvolvimento dos CECs orais. As altas expressões de HOXA1 e HOXB7 em amostras de CEC estão correlacionadas com características clínico-patológicas importantes, como estágio N mais avançado, e um pior prognóstico. Porém, serão necessários ainda mais estudos para estabelecer o real valor de HOXA1 e HOXB7 como biomarcadores para os CECs orais.

7. Conclusões

1. As expressões imuno-histoquímicas de HOXA1 e HOXB7 foram significativamente maiores em CECs orais comparado com mucosas normais.
2. HOXA1 e HOXB7 controlam a proliferação celular, visto que as superexpressões foram capazes de induzir a proliferação de células HaCAT, enquanto que as inibições em células SCC-9 foram associadas com uma redução na proliferação.
3. As expressões forçadas de HOXA1 ou HOXB7 não foram capazes de transformar a linhagem HaCAT e nem de modular as taxas de apoptose, adesão, invasão e expressão de marcadores de TEM.
4. A positividade para HOXA1 foi correlacionada com o estágio clínico T, estágio clínico N, padrão diferenciação celular dos tumores, capacidade proliferativa do tumor e recorrência. HOXA1 também revelou ser um marcador independente do período de sobrevida global em 5 anos de pacientes com CEC oral.
5. A positividade de HOXB7 foi correlacionada com consumo de álcool, estágio N, presença de invasão vascular e expressão de Ki-67 pelas células tumorais. HOXB7 correlacionou independentemente com sobrevida global em 5 anos e uma tendência em correlacionar com sobrevida livre de doença foi observada.
6. As expressões imuno-histoquímicas de HOXA1 e HOXB7 foram correlacionadas entre si nas amostras de CECs orais.
7. Nossos resultados sugerem que HOXA1 e HOXB7 podem ser determinantes importantes do prognóstico de pacientes com CEC oral.

Referências

- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):777-85.
- Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, *et al.* Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer *Oncol Rep.* 2006;15(4):797-802.
- Aberdam D, Negreanu V, Sachs L, Blatt C. The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1991;11(1):554-7.
- Acquafreda T, Nunes FD, Soprano DR, Soprano KJ. Expression of homeobox genes in oral squamous cell carcinoma cell lines treated with all-trans retinoic acid. *J Cell Biochem.* 2010;111(6):1437-44.
- Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *BT iochem Biophys Res Commun.* 1999;257(3):738-45.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula.* ATRTMED – BOOKMAN, 2004.
- Arellano-Garcia ME, Li R, Liu X, Xie Y, Yan X, Loo JA, Hu S. Identification of tetranectin as a potential biomarker for metastatic oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2010;11(9):3106-21.
- Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene.* 2007;26(47):6766-76.
- Bach C, Buhl S, Mueller D, García-Cuellar MP, Maethner E, Slany RK. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood.* 2010 8;115(14):2910-8.
- Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol,* 2008 ; 44(2):103-8

- Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther.* 2000;7(16):1378-84.
- Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat.* 2010 20;192(5):261-74.
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* 1995 15;14(24):6107-15.
- Bijl J, van Oostveen JW, Kreike M, Rieger E, van der Raaij-Helmer LM, Walboomers JM, *et al.* Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1737-45.
- Bitu CC. Expressão dos membros da família HOX de genes Homeobox dos Loci A e D em linhagens celulares e tecidos orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP:2008.
- Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7(2): 149-56.
- Boukamp P, Dzarlieva-Petrusevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771, 1988.
- Boulet AM, Capecchi MR. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development.* 2004;131(2):299-309.
- Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci.* 2010 ;67(20):3535-48.

- Bridges CB, Morgan TH. Current maps of the localization of the mutant genes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1921 ; 7(4): 127–132.
- Bromleigh VC, Freedman LP. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells *Genes Dev*. 2000;14(20):2581-6.
- Calvo KR, Sykes DB, Pasillas MP, Kamps MP. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene*. 2002; 20; 21(27): 4247-56.
- Cardoso, W. V. Transcription factors and pattern formation in the developing lung. *Am. J. Physiol*. 1995; 269, 429-42.
- Carè A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A, Peschle C, Colombo MP. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res*. 2001;61(17):6532-9.
- Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Peschle C, Colombo MP. Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. *Oncogene*. 1998;16(25):3285-9.
- 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.
- Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res*. 2005; 15;65(16):7177-85.
- Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev*. 1995 15;9(6):663-74.
- Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 Expression in Human Breast Cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 15;222(2):292-7.

- Chen F, Capecchi MR. Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(2):541-6.
- Chen H, Chung S, Sukumar S. HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8. Mol Cell Biol. 2004 ;24(2):924-35.
- Chen H, Lee JS, Liang X, Zhang H, Zhu T, Zhang Z, Taylor ME, Zahnow C, Feigenbaum L, Rein A, Sukumar S. Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis. Cancer Res. 2008 15;68(10):3637-44.
- Chen KN, Gu, ZD Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX Genes Is Deregulated in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res. 2005; 11(3):1044-9.
- Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. Nat Med. 2005 ;11(5):531-7.
- Chirnomas D, Taniguchi T, de la Vega M, Vaidya AP, Vasserman M, Hartman AR, Kennedy R, Foster R, Mahoney J, Seiden MV, D'Andrea AD. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. Mol Cancer Ther. 2006 ;5(4):952-61.
- Chopra, V. S. & Mishra, R. K. "Mir"acles in hox gene regulation. Bioessays. 2006; 28, 445–448.
- Chu MC, Selam FB, Taylor HS. HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2004;3(6):568-72.
- Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. J Cell Physiol. 2001;188(2):161-9.
- Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes hoxa-3 and hoxd-3 reveal synergistic interactions.

Nature. 1994; 370(6487): 304- 07.

- Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev.* 2006;27(4):331-55.
- Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16(3):449-60.
- Destro, MFSS. Expressão dos membros da família HOX de genes Homeobox dos Loci B e C em linhagens celulares e tecidos orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP:2008.
- Dolle, P., Izpisua-Belmonte, J. C., Brown, J., Tickle, C. & Duboule, D. Hox genes and the morphogenesis of the vertebrate limb. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1993; 383A, 11–20.
- Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, *et al.* Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations *J Clin Invest.* 2006;116(10):2707-16.
- Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche J. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002; 16:186-95.
- Economides, K. D. & Capecchi, M. R. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development.* 2003; 130, 2061–2069.
- Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, *et al.* A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum Mol Genet.* 2000;22;9(2):227- 36.
- Fanti L, Perrini B, Piacentini L, Berloco M, Marchetti E, Palumbo G, Pimpinelli S. The trithorax group and Pc group proteins are differentially involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Chromosoma.* 2008;117(1):25-39.

- Freschi G, Taddei A, Bechi P, Faiella A, Gulisano M, Cillo C, *et al.* Expression of HOX homeobox genes in the adult human colonic mucosa (and colorectal cancer?) *Int J Mol Med.* 2005; 16(4): 581-7.
- Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 ;13(5):555-62.
- Frohman MA, Martin GR. Isolation and analysis of embryonic expression of Hox-4.9, a member of the murine labial-like gene family. *Mech Dev.* 1992 ;38(1):55-67.
- Fuller JF, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, Fraser JK, Gasson JC. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. *Blood.* 1999;93(10):3391-400.
- Garcia-Barceló MM, Miao X, Lui VCH, So MT, Ngan ESW, Leon TYY, *et al.* Correlation Between Genetic Variations in Hox Clusters and Hirschsprung's Disease. *Ann Hum Genet.* 2007;71(Pt 4):526-36.
- Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:487-526.
- Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 1986;20:147-73.
- Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, Yaseen NR. The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem.* 2004 9;279(2):866-75.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999 15;286(5439):531-7.
- Goodman FR, Mundlos S, Muragaki Y, Donnai D, Giovannucci-Uzielli ML, Lapi E, *et al.* Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(14):7458-63.
- Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, *et al.*

- Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2004;36(10):1084-9.
- Greer JM, Puetz J, Thomas KR, Capecchi MR. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature*, 2000; 403(6770):661- 65.
 - Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.* 2005;205(2):154-71.
 - Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.* 2002 ;7(3):247-60.
 - Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther.* 2007 ;6(8):1284-8.
 - Hansen SL, Dosanjh A, Young DM, Boudreau N, Hoffman WY. Hemangiomas and homeobox gene expression. *J Craniofac Surg.* 2006;17(4):767-71.
 - Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 7;96(25):14372-7.
 - Hart CP, Awgulewitsch A, Fainsod A, McGinnis W, Ruddle FH. Homeo box gene complex on mouse chromosome 11: molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeo box locus. *Cell.* 1985 ;43(1):9-18.
 - Hart, C. P., Awgulewitsch, A., Fainsod, A., McGinnis, W. & Ruddle, F. H. Homeo box gene complex on mouse chromosome 11: molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeo box locus. *Cell* 1985; 43, 9–18.
 - Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, *et al.* Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell

- carcinoma tissues. *Oncol Res.* 2006;16(5):217-24.
- Hershko AY, Kafri T, Fainsod A, Razin A. Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. *Gene.* 2003 2; 302(1-2): 65-72.
 - Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* 2007;5(1):47.
 - Hu YL, Fong S, Ferrell C, Largman C, Shen WF. HOXA9 modulates its oncogenic partner Meis1 to influence normal hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2009 ;29(18):5181-92.
 - Hu, Y. L., Fong, S., Ferrell, C., Largman, C. & Shen, W. F. HOXA9 modulates its oncogenic partner Meis1 to influence normal hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29, 5181–5192.
 - Huang L, Pu Y, Hepps D, Danielpour D, Prins GS. Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology.* 2007 ;148(3):1235-45.
 - Humphries MJ. Cell adhesion assays. *Mol Biotechnol.* 2001 ;18(1):57-61.
 - Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, *et al.* Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2003;94(5):437- 41.
 - Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringnér M, Sauter G, Monni O, Elkhouloun A, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 1;62(21):6240-5.
 - Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010 20;2:9.
 - Jung C, Kim RS, Zhang H, Lee SJ, Sheng H, Loehrer PJ, Gardner TA, Jeng MH, Kao C. HOXB13 is downregulated in colorectal cancer to confer

TCF4-mediated transactivation. *Br J Cancer*. 2005 20;92(12):2233-9.

- Jung C, Kim RS, Zhang HJ, Lee SJ, Jeng MH. HOXB13 induces growth suppression of prostate cancer cells as a repressor of hormone-activated androgen receptor signaling. *Cancer Res*. 2004 15;64 (24):9185-92. (a)
- Jung, C., Kim, R. S., Lee, S. J., Wang, C. & Jeng, M. H. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. *Cancer Res*. 2004; 64, 3046–3051. (b)
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*. 1998 ;1(4):543-51.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*. 1998 ;1(4):543-51.
- Kikugawa T, Kinugasa Y, Shiraishi K, Nanba D, Nakashiro K, Tanji N, Yokoyama M, Higashiyama S. PLZF regulates Pbx1 transcription and Pbx1-HoxC8 complex leads to androgen-independent prostate cancer proliferation. *Prostate*. 2006 1;66(10):1092-9.
- Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002;26(5):463-76.
- Kim YR, Oh KJ, Park RY, Xuan NT, Kang TW, Kwon DD, Choi C, Kim MS, Nam KI, Ahn KY, Jung C. HOXB13 promotes androgen independent growth of LNCaP prostate cancer cells by the activation of E2F signaling. *Mol Cancer*. 2010 27;9:124.
- Kondo S, Oakes MG, Sorenson CM Rescue of renal hypoplasia and cystic dysplasia in Bcl-2 -/- mice expressing Bcl-2 in ureteric bud derived epithelia. *Dev Dyn*. 2008 ;237(9):2450-9.

- Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS. Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1989;3(2):243-58.
- Kulkarni ML, Zaheeruddin M, Shenoy N, Vani HN. Fetal valproate syndrome. *Indian J Pediatr.* 2006;73(10):937-939.
- LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior genes. *Dev.* 2003;17(16):2060-72.
- Laurent A, Bihan R, Omilli F, Deschamps S, Pellerin I. PBX proteins: much more than Hox cofactors. *Int J Dev Biol.* 2008;52(1):9-20.
- Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, Largman C. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood.* 1997 15;89(6):1922-30.
- Lawrence HJ, Largman C. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 1992 15;80(10):2445-53.
- Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells.* 1996 ;14(3):281-91.
- Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science.* 2006;313(5795):1918-22.
- Leroy P, Berto F, Bourget I, Rossi B. Down-regulation of Hox A7 is required for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. *J Leukoc Biol.* 2004;75(4):680-8.
- Libório TN, Acquafreda T, Matizonkas-Antonio LF, Silva-Valenzuela MG, Ferraz AR, Nunes FD. In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology.* 2011 ;58(2):225-33.
- Lill MC, Fuller JF, Herzig R, Crooks GM, Gasson JC. The role of the

homeobox gene, HOXB7, in human myelomonocytic differentiation. *Blood* 1995;85:692–7.

- Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, Lallemand F, Conus NM, Piccart MJ, Speed TP, McArthur GA. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2009 24;2:37.
- López R, Garrido E, Piña P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, *et al*. HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(1):329-35.
- Lord RVN, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, *et al*. Increased CDX2 and decreases PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's associated adenocarcinoma. *Surgery*, 2005; 138(5):924-31.
- Lorenti Garcia C, Mechilli M, Proietti De Santis L, Schinoppi A, Kobos K, Palitti F. Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde. *Mutat Res*. 2009 9;662(1-2):3-9.
- Lu Q, Kamps MP. Heterodimerization of Hox proteins with Pbx1 and oncoprotein E2a-Pbx1 generates unique DNA-binding specificities at nucleotides predicted to contact the N-terminal arm of the Hox homeodomain--demonstration of Hox-dependent targeting of E2a-Pbx1 in vivo. *Oncogene*. 1997; 9;14(1):75-83.
- Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Wang W, Enright E, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004 ;5(6):607-16.
- Maconochie M, Nonchev S, Morrison A, Krumlauf R. Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annu Rev Genet*. 1996;30:529-56.

- Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, *et al.* Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2005;114(3):436-41.
- Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6348-52.
- Makiyama K, Hamada J, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, *et al.* Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep*. 2005 ;13(4):673-9.
- Mandeville I, Aubin J, LeBlanc M, Lalancette-Hébert M, Janelle MF, Tremblay GM, *et al.* Impact of the loss of Hoxa5 function on lung alveogenesis. *Am J Pathol*. 2006;169(4):1312-27.
- Mann RS, Chan SK. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet*. 1996;12(7):258-62.
- Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res*. 2003;23(3A):2101-10.
- Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res*. 2003;23(3A):2101-10.
- Martinez P, Amemiya CT. Genomics of the HOX gene cluster. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002;133(4):571-80.
- Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ*. 1993 ;4(5):431-41.
- McMullin RP, Mutton LN, Bieberich CJ. Hoxb13 regulatory elements mediate transgene expression during prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn*. 2009 ;238 (3):664-72.
- Miano JM, Firulli AB, Olson EN, Hara P, Giachelli CM, Schwartz SM. Restricted expression of homeobox genes distinguishes fetal from

- adult human smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 23;93(2):900-5.
- Miao J, Wang Z, Provencher H, Muir B, Dahiya S, Carney E, Leong CO, Sgroi DC, Orsulic S. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 23;104(43):17093-8.
 - Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res*. 2003 15;63(18):5879-88.
 - Mohankumar KM, Xu XQ, Zhu T, Kannan N, Miller LD, Liu ET, Gluckman PD, Sukumar S, Emerald BS, Lobie PE. HOXA1-stimulated oncogenicity is mediated by selective upregulation of components of the p44/42 MAP kinase pathway in human mammary carcinoma cells. *Oncogene*. 2007 7;26(27):3998-4008.
 - Morgan R, Pirard PM, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha HS. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer Res*. 2007 15;67(12):5806-13.
 - Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet*. 2006; 22(2):67-9.
 - Morrison AD. 1 + 1 = r4 and much much more. *Bioessays*. 1998 ;20(10):794-7.
 - Mortlock, D. P. & Innis, J.W. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nature Genet*. 1997;15, 179–180.
 - Myers C, Charboneau A, Cheung I, Hanks D, Boudreau N. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *Am J Pathol*. 2002 ;161(6):2099-109.
 - Naora H, Yang YQ, Montz FJ, Seidman JD, Kurman RJ, Roden RB. A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 27;98(7):4060-5.

- Natarajan AT, Palitti F. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res.* 2008 17;657(1):3-7.
- Neville SE, Baigent SM, Bicknell AB, Lowry PJ, Gladwell RT. Hox gene expression in adult tissues with particular reference to the adrenal gland. *Endocr Res.* 2002 ;28(4):669-73.
- Ota T, Choi KB, Gilks CB, Leung PC, Auersperg N. Cell type- and stage-specific changes in HOXA7 protein expression in human ovarian folliculogenesis: possible role of GDF-9. *Differentiation.* 2006;74(1):1-10.
- Owens BM, Hawley RG. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells.* 2002;20(5):364-79.
- Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:49-70.
- Papageorgiou S. Pulling forces acting on HOX gene clusters cause expression collinearity. *Int J Dev Biol.* 2006;50(2-3):301-8.
- Park SY, Kwon HJ, Lee HE, Ryu HS, Kim SW, Kim JH, Kim IA, Jung N, Cho NY, Kang GH. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. *Virchows Arch.* 2011 ;458(1):73-84.
- Patel CV, Sharangpani R, Bandyopadhyay S, DiCorleto PE. Endothelial cells express a novel, tumor necrosis factor-alpha-regulated variant of HOXA9. *J Biol Chem.* 1999 15;274(3):1415-22.
- Perez-Cabrera, A., Kofman-Alfaro, S. & Zenteno, J. C. Mutational analysis of HOXD13 and HOXA13 genes in the triphalangeal thumb-brachyectrodactyly syndrome. *J. Orthop. Res.* 2002; 20, 899–901.
- Petruk S, Sedkov Y, Brock HW, Mazo A. A model for initiation of mosaic HOX gene expression patterns by non-coding RNAs in early embryos. *RNA Biol.* 2007 -;4(1):1-6.
- Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol.* 1995;15(8):3989-97.

- Pich A, Margaria E, Chiusa L, Bortolin P, Palestro G. Relationship between AgNORs, MIB-1 and oncogene expression in male breast carcinoma and papillary superficial bladder neoplasm. *Oncol Rep.* 2003 ;10(5):1329-35.
- Piper DE, Batchelor AH, Chang CP, Cleary ML, Wolberger C. Structure of a HoxB1–Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell.* 1999;96(4):587-97.
- Plowright L, Harrington KJ, Pandha HS, Morgan R. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). *Br J Cancer.* 2009 10;100(3):470-5.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, *et al.* 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 357:2552–61
- Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, Erfurth FE, Eaton K, Lu J, Grimes HL, Chen J, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* . 2009; 113, 3314–3322.
- Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature.* 2000 22;405(6789):974-8.
- Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 27; 104(13): 5527-32.
- Rhoads K, Arderiu G, Charboneau A, Hansen SL, Hoffman W, Boudreau N. A Role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. *Lymphat Res Biol.* 2005;3(4):240-52.
- Ringrose L, Paro R. Remembering silence. *Bioessays.* 2001;23(7):566-70.

- Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, Pandita RK, Sharma GG, Ha HC, Gasson J, Hanakahi LA, Pandita TK, Sukumar S. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res.* 2007 15;67(4):1527-35.
- Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer.* 2005; 41(16): 2428-37.
- Sasaki YT, Sano M, Kin T, Asai K, Hirose T. Coordinated expression of ncRNAs and HOX mRNAs in the human HOXA locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 8;357(3):724-30.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994;6(4):348-56.
- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, *et al.* Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):12223-7.
- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009 ;15(6):388-99.
- Sessa L, Breiling A, Lavorgna G, Silvestri L, Casari G, Orlando V. Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *RNA.* 2007; 13, 223–239.
- Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature reviews. Cancer.* 2010 ;10(5):361-71.
- Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, *et al.* AbdB-Like HOX proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol.* 1997;17(11):6448-58. (a)

- Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C. The Abd-B-like Hox Homeodomain Proteins Can Be Subdivided by the Ability to Form Complexes with Pbx1a on a Novel DNA Target. *J Biol Chem.* 1997 28;272(13):8198-206. (b)
- Shen, W. F., Krishnan, K., Lawrence, H. J. & Largman, C. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21, 7509–7522.
- Shrimpton AE, Levinsohn EM, Yozawitz JM, Packard DS Jr, Cady RB, Middleton FA, *et al.* A HOX Gene Mutation in a Family with Isolated Congenital Vertical Talus and Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):92-6.
- Silva SD, Cunha IW, Younes RN, Soares FA, Kowalski LP, Graner E. ErbB receptors and fatty acid synthase expression in aggressive head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* 2010 Nov;16(8):774-80.
- Simpson, J. L. Genetics of the female reproductive ducts. *Am. J. Med. Genet.* 1999;89, 224–239
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 ;68(6):1270-5.
- Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):846-56.
- Stark A, Bushati N, Jan CH, Kheradpour P, Hodges E, Brennecke J, Bartel DP, Cohen SM, Kellis M. A single Hox locus in *Drosophila* produces functional microRNAs from opposite DNA strands. *Genes Dev.* 2008;22, 8–13.
- Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev.* 1996;55(1):91-108.
- Storti P, Donofrio G, Colla S, Airoidi I, Bolzoni M, Agnelli L, Abeltino M, Todoerti K, Lazzaretti M, Mancini C, Ribatti D, Bonomini S, Franceschi V,

- Pistoia V, Lisignoli G, Pedrazzini A, Cavicchi O, Neri A, Rizzoli V, Giuliani N. HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2010 25(3):527-37.
- Strathdee G, Sim A, Soutar R, Holyoake TL, Brown R. HOXA5 is targeted by cell type specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia. *Carcinogenesis*. 2007;28(2):299-309.(a)
 - Svingen T, Tonissen KF. Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2003 ;2(5):518-23.
 - Svingen T, Tonissen KF. HOX transcription factors and their elusive mammalian gene targets *Heredity*. 2006;97(2):88-96.
 - Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2007 ;17(4):753-60.
 - Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, 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(1):144-53.
 - Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 ;2(6):442-54.
 - Tiberio C, Barba P, Magli MC, Arvelo F, Le Chevalier T, Poupon MF, *et al*. HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int J Cancer*. 1994;58(4):608-15.
 - Tischfield MA, Bosley TM, Salih MA, Alorainy IA, Sener EC, Nester MJ, *et al*. Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nat Genet*. 2005 ;37(10):1035-7.
 - Trivedi CM, Patel RC, Patel CV. Homeobox gene HOXA9 inhibits nuclear factor-kappa B dependent activation of endothelium. *Atherosclerosis*.

2007 ;195(2):50-60.

- van den Akker WM, Brox A, Puelles L, Durston AJ, Medina L. Comparative Functional Analysis Provides Evidence for a Crucial Role for the Homeobox Gene Nkx2.1/Titf-1 in Forebrain Evolution J Comp Neurol. 2008;506(2):211-23.
- Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Gespach C, Halperin M, Mashiah P, *et al.* Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2000;272(2):513-8.
- Volpe MV, Pham L, Lessin M, Ralston SJ, Bhan I, Cutz E, *et al.* Expression of Hoxb-5 during human lung development and in congenital lung malformations. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003;67(8):550-6.
- Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castronovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. Prostate. 2002;50(3):162-9.
- Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. Clin. Cancer Res. 2007;13, 6327–34.
- Warnakulasuriya S. Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. Evid Based Dent. 2009;10(1):4-5.
- Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. Gene dosage- dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. Development. 1997;124(23):4781-91.
- Warren ST. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. Science. 1997;275(5298):408-9.

- Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, Heidecke CD, Lerch MM, Bagowski CP. Retinoic acid receptor (RAR) antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behaviour of pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2009; 137, 2136–2145.
- Wellik, D.M. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr. Top. Dev. Biol*. 2009; 88, 257–278.
- Whelan JT, Ludwig DL, Bertrand FE. HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008 ;22(6):1161-9.
- Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, Argani P, Sukumar S. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006 1;66(19):9527-34.
- Yamamoto M, Takai D, Yamamoto F, Yamamoto F. Comprehensive expression profiling of highly homologous 39 hox genes in 26 different human adult tissues by the modified systematic multiplex RT-pCR method reveals tissue-specific expression pattern that suggests an important role of chromosomal structure in the regulation of hox gene expression in adult tissues. *Gene Expr*. 2003;11(3-4):199-210.
- Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano Y, Sakuma K, Ogoshi K, Iyoda M, *et al*. State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2010 ;23(1):61-7.
- Yekta, S., Tabin, C. J. & Bartel, D. P. MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nature Rev. Genet*. 2008; 9, 789–796.
- Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006; 66(2): 889-97.
- Zacchetti, G., Duboule, D. & Zakany, J. Hox gene function in vertebrate gut morphogenesis: the case of the caecum. *Development*. 2007; 134,

3967–3973.

- Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss SJ, Trimble CL, *et al.* Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res.* 2007 1;67(21):10163-72.
- Zhang X, Emerald BS, Mukhina S, Mohankumar KM, Kraemer A, Yap AS, Gluckman PD, Lee KO, Lobie PE. HOXA1 is required for E-cadherin-dependent anchorage-independent survival of human mammary carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2006 10;281(10):6471-81.
- Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Biol Chem.* 2003 28;278(9):7580-90.
- Zhao Y, Yamashita T, Ishikawa M. Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2005; 13(4): 721-6.
- Zhu T, Starling-Emerald B, Zhang X, Lee KO, Gluckman PD, Mertani HC, Lobie PE. Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer Res.* 2005 1;65(1):317-24.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Expressão e função dos membros da família hox de genes homeobox em carcinomas espinocelulares bucais**", protocolo nº 060/2006, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Carolina Cavalcante Bitu, Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro e Tamires Cristina Papetti, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 26/10/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Hox homeobox gene expression and role in squamous cell carcinomas**", register number 060/2006, of Ricardo Della Coletta, Carolina Cavalcante Bitu, Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro and Tamires Cristina Papetti, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 10/26/2009.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP