



MANOELA CARRERA MARTINEZ CAVALCANTE PEREIRA

**“AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DO GENE HOMEBOX *HOXA10* EM
CARCINOMAS ESPINOCELULARES ORAIS”**

PIRACICABA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MANOELA CARRERA MARTINEZ CAVALCANTE PEREIRA

**“AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DO GENE HOMEBOX *HOXA10* EM
CARCINOMAS ESPINOCELULARES ORAIS”**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta
Co-Orientadora: Prof. Dra. Tuula Anneli Salo**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTORA EM
ESTOMATOPATOLOGIA NA ÁREA DE
PATOLOGIA.**

**Este exemplar corresponde à
versão final da Tese defendida
pelo aluno e orientada pelo
Prof. Dr. Ricardo Della Coletta.**

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

P414a Pereira, Manoela Carrera Martinez Cavalcante, 1982-
Avaliação do Papel Biológico do Gene Homeobox HOXA10
em Carcinomas Espinocelulares Orais / Manoela Carrera
Martinez Cavalcante Pereira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Ricardo Della Coletta.

Coorientador: Tuula Anneli Salo.

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

1. Neoplasias bucais. I. Della Coletta, Ricardo, 1972- II.
Salo, Tuula. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: **Biological role of HOXA10 homeobox gene
in oral squamous cell carcinoma**

Palavras-chave em Inglês:

Mouth Neoplasms

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Ana Carolina Prado Ribeiro

Sílvia Regina de Almeida Reis

Marcelo Rocha Marques

Márcio Ajudarte Lopes

Data da defesa: 14-12-2012

Programa de Pós-Graduação: 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 14 de Dezembro de 2012, considerou a candidata MANOELA CARRERA MARTINEZ CAVALCANTE PEREIRA aprovada.

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Profa. Dra. ANA CAROLINA PRADO RIBEIRO

Profa. Dra. SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

Dedicatória

Aos meus pais, Gilberto e Vera, por serem meus maiores incentivadores. É através da força e da fé de vocês em mim que hoje posso celebrar qualquer conquista. Obrigada pelo incentivo eterno.

À minha irmã, Mariana. Obrigada por abrir mão da minha presença ao seu lado para que pudesse realizar meu sonho. Você é e sempre será o meu porto-seguro.

À minha avó, Aldete, pelo exemplo de força e garra. Sua coragem é admirável e é um exemplo a ser seguido.

Aos meus amigos, Alan Roger e Ana Carolina, por me acolherem em sua casa e em suas vidas, preenchendo todos os vazios e ausências sempre com muito carinho e sabedoria.

Agradecimentos Especiais

À Ana, Regina, Nestor, Esther, Victor, Felipe e Ester Luísa por sempre acreditarem nas minhas escolhas e me impulsionarem a buscar sempre a excelência. Obrigada por serem minha família.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Della Coletta por ter acreditado em mim e cobrado todo o meu potencial. Por todas as oportunidades oferecidas, eternamente lembradas e agradecidas. Se hoje eu acredito em mim, o crédito é todo seu. Sou e serei eternamente grata.

À Professora Doutora Tuula Salo por me receber em seu país, em sua casa, com tanto carinho e atenção. Agradeço também pela amizade, confiança, pelo apoio e por todas as oportunidades. (To Professor Tuula Salo, PhD, for having me in her country, in her home, with lots of attention and care. I also thank for the friendship, trust, support and all the opportunities that you gave me.)

Ao Doutor Aki Manninen pela confiança e ensinamentos. (To Aki Manninen, PhD, for the trust and teaching.)

Ao meu cunhado Neuzivaldo, pelo carinho e cuidado à mim dispensados.

Ao amigo Daniel Bernabé, por ter sido um dos maiores incentivadores na busca da realização dos meus sonhos.

Aos meus amigos, Gabriela Martins, Igor Bittencourt, Diana Cunha, Daniel Ralin, Juliana e Cláudia Orrico, Êmeli Rodrigues, Gutto Carvalho, Jackson Júnior, Elisângela Santos, Ana Carolina Ribeiro e Silva, Alan Roger dos Santos Silva, Adriele e Jonatas Vasconcelos, Camilla Borges, Marianne Carvalho, Carolina Bitu, Cristina Vidal, Rose Ortega, Daniel Berreta, David Falcão, Maíra Tavares, Renata Tanure, Juliana Patury, Geovânia Almeida.

Agradecimentos

À Deus, uma vez que sem SUA força, nada disso seria possível.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Professor Doutor Jacks Jorge Júnior.

À Professora Doutora Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor Doutor Alan Roger dos Santos Silva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela atenção e cordialidade sempre à mim dispensadas.

Ao Professor Doutor Márcio Ajudarte Lopes, muito obrigada pela atenção, cuidado e compreensão, além dos conselhos sempre muito sábios.

Aos Professores Doutores Pablo Vargas, Edgard Graner, Oslei Paes de Almeida e Jacks Jorge Júnior por todos os ensinamentos, agradável convivência e exemplos de profissionalismo e excelência.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Geovânia Almeida, Adriano Luis Martins, Luana Ganhor, Fabiana Facco Casarotti e João Carlos da Silva Júnior, pelo suporte, atenção e carinho.

Às minhas amigas Ana Carolina Ribeiro e Silva e Adriele Vasconcelos. Vocês deram as boas-vindas à Piracicaba e estarão presentes na despedida. As risadas, as conversas, os jantares, as compras, os passeios e, não menos importante ou frequente, a ciência que compartilhamos, irão estar sempre guardadas com muito carinho na minha memória e no meu coração. Obrigada! Vocês são especiais!

Ao melhor vizinho que alguém pode ter, Alan Roger. Sua segurança, carinho e acolhida foram muito importantes durante todo esse tempo. Você cuidou e ainda cuida de mim como alguém da sua família e por isso me sinto à vontade em dizer que hoje me sinto parte dela. Assim como você e Ana Carolina Ribeiro são parte da minha. Obrigada por terem me ajudado a ser uma pessoa melhor.

Às minhas queridas amigas Camilla Borges e Marianne Carvalho, por todos os momentos vividos juntas. Vocês foram cruciais durante esses anos e os momentos, as lágrimas enxugadas, as risadas compartilhadas formaram um vínculo especial entre nós. Cada uma diferente da outra, mas sempre nos respeitando e cuidando uma da outra. Obrigada, vocês terão sempre um lugar no meu coração.

À Carolina Bitu, minha querida amiga. Segurou minha mão em um dos momentos mais difíceis da minha vida e sempre acreditou em mim. Você é uma pessoa muito especial à quem devo muito. Um exemplo de profissional, um exemplo de ser humano.

À minha amiga Cristina Vidal, a quem tive o imenso prazer de conhecer durante a minha estadia na Finlândia. Sem você, Oulu seria impossível de sobreviver. Obrigada por me apoiar quando precisei, por embarcar em todas as minhas idéias, por compartilhar auroras boreais em madrugadas geladas, por saunas quentes e dias frios. Por ser minha amiga.

Ao amigo Frederico Sampaio Neves pelo carinho, atenção, suporte e amizade, além de muitas risadas e ciência. Você é muito especial!

Aos colegas e amigos do Programa de Pós Graduação em Estomatopatologia: Alicia Rumayor Piña, Ana Camila Messetti, Ana Lucia Francisco, Andréia Bufalino, Andréia Silva, Bruno de Andrade, Camilla Borges, Daniel Berreta, Débora Bastos, Elizabete Bagordakis, Fabiana Seguin, Felipe Paiva Fonseca, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Fernanda Moreira, Harim dos Santos, Isadora Flores, José Ribamar Sabino Júnior, Karina Morais, Katya Díaz, Lara Ramos Innocentini, Lays Martin Sobral, Lívia Maris Paranaíba, Luciana Yamamoto de Almeida, Marianne Carvalho, Marco Antônio

Carvalho, Marco Aurélio Andrade, Marcondes Sena Filho, Mário Romãach, Marisol Martinez, Michelle Agostini, Patrícia Feio, Priscila Campioni, Renato Hopp, Rodrigo Neves, Rogério Gondak, Rose Ortega, Sabrina Nogueira, Sibebe Aquino, Tânia Benetti Soares, Victor Hugo Toral Rizo, Wilfredo Gonzalez Arriagada.

À Ana Paula Martins e Iza Peixoto, amigas queridas que tive o prazer de reencontrar em Piracicaba. Viemos buscar o conhecimento e nos encontraremos em breve novamente em casa.

À Débora Távora, Manuella Belém e Saulo Melo por muitos momentos vividos juntos, muitas risadas e apoio constante.

À Flávia Mariano, Natália Vizoto, Érika Hart Chù, Gustavo Narvaes Guimarães e Marcelo Rocha Marques pelo apoio técnico, científico e emocional!

À Professora Doutora Sílvia Reis, quem me iniciou na Patologia Oral, por todos os ensinamentos, carinho, conselhos e amizade. Serei eternamente grata!

Aos amigos do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Professor Doutor Urbino da Rocha Tunes, Professor Doutor Miguel Gustavo Setúbal Andrade, Professor Doutor Antônio Márcio Marchionni, Professora Doutora Alena Medrado e Professora Roberta Naves pelo apoio, crença e incentivo.

À equipe sensacional de profissionais e amigos que me recebeu carinhosamente na Oulu University, Oulun Yliopisto: Professora Doutora Tuula Salo, Professor Doutor Leo Tjäderhane, Doutor Aki Manninen, Maija-Leena Lehtonen, Meeri Sutinen, Pia Nyberg, Pirjo Åmströn, Sirpa Salo, Virve Pääkkonen, Emma Pirila, Sini Nurmenniemi, Carolina Bitu, Eeva-Maija Kiljander, Henna Niskala, Jaana Träskelin e Tapio Leinonen. Obrigada pela acolhida, confiança e carinho. (To the amazing team of professionals and friends which kindly welcomed me at Oulu University: Professor Tuula Salo, PhD; Professor Leo Tjäderhane, PhD; Aki Manninen, PhD; Maija-Leena Lehtonen, Meeri Sutinen, PhD; Professor Pia Nyberg, PhD; Pirjo Åmströn; Sirpa Salo, PhD; Virve Pääkkonen, Emma Pirila, PhD; Sini Nurmenniemi, PhD; Carolina Bitu, PhD; Eeva-Maija

Kiljander, Henna Niskala, Jaana Träskelin e Tapio Leinonen. Thank you for the warm welcome, trust and kindness).

Aos queridos amigos do Biomedicum Helsinki, Helsinkin Yliopisto: Professor Doutor Timo Sorsa, Profesor Doutor Jorma Keski-Oja, Doutor Marko Hyytiäinen, Professora Doutora Taina Tervahartiala, Anne Remmes, Olga Tatti, Liisa Murray e Irene Ylivinkka. (To my friends at Biomedicum Helsinki, Helsinkin Yliopisto: Professor Timo Sorsa, PhD; Profesor Jorma Keski-Oja, PhD; Marko Hyytiäinen, PhD; Professor Taina Tervahartiala, PhD; Anne Remmes, Olga Tatti, PhD; Liisa Murray, PhD e Irene Ylivinkka, PhD).

Ao querido Eddie Didier, amigo e anjo da guarda a quem serei eternamente grata.

Ao amigo Teemu Kyllönen. Seu apoio incondicional e crença na minha capacidade foram essenciais. Não existem palavras suficientes para agradecer. (To my dear friend Teemu Kyllönen. Your unconditional support and belief on me were essencial. There aren't enough words to thank you and express what it really meant.)

Ao amigo David Moreira pela admiração e amizade. Sua vibração é contagiante e agradeço pelo apoio e confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 473238/2009-8 e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2006/00966-9 pela concessão dos Auxílios Científicos que custearam o desenvolvimento deste estudo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido na forma de Bolsa de Doutorado (Processo: 2009/53870-7).

À todos que direta ou indiretamente participaram de alguma forma no desenvolvimento dessa pesquisa.

Epígrafe

“Tudo acontece na hora certa. Tudo acontece, exatamente quando deve acontecer.”

Albert Einstein

RESUMO

Embora os genes HOX sejam conhecidos por atuarem na regulação de eventos importantes para o desenvolvimento embrionário, incluindo proliferação, diferenciação e migração celular, alterações no padrão de expressão têm sido frequentemente associadas ao desenvolvimento de neoplasias malignas. Estudos em nosso laboratório caracterizaram o perfil de expressão dos 39 membros da família HOX de genes homeobox em amostras orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular (CEC), identificando genes diferencialmente expressos. Dentre estes genes destacou-se *HOXA10*, que tem a sua expressão associada a fenótipos importantes para o desenvolvimento tumoral e ao prognóstico. O objetivo deste estudo foi confirmar os níveis elevados de expressão de *HOXA10* em CECs orais em comparação a mucosa oral normal e analisar o efeito da superexpressão e neutralização do gene *HOXA10* na modulação dos principais eventos biológicos associados ao fenótipo tumoral. Os níveis de *HOXA10* foram avaliados por imunohistoquímica e qRT-PCR e os efeitos de *HOXA10* sobre a proliferação, apoptose, adesão, transição epitélio-mesenquima (TEM), migração e invasão celular foram avaliados em clones celulares de queratinócitos normais HaCaT superexpressando *HOXA10* e em clones da linhagem de carcinoma de língua HSC-3 expressando uma sequência de shRNA (short harpin RNA) para neutralizar a expressão de *HOXA10*. A expressão de *HOXA10* foi significativamente maior nas amostras de CEC oral quando comparado com as amostras de tecido normal. A superexpressão de *HOXA10* nas células HaCaT significativamente aumentou os níveis de expressão de N-caderina e β -catenina, sem alteração no perfil proteico. Enquanto a adesão das células HaCaT com superexpressão de *HOXA10* foi reduzida na superfície sem tratamento (plástico), na superfície tratada com colágeno tipo I foi significativamente aumentada, condizendo com o maior potencial migratório adquirido por estas células. A neutralização de *HOXA10* significativamente reduziu a capacidade proliferativa das células HSC-3. Em adição, o silenciamento de *HOXA10* induziu significativamente a expressão de marcadores da TEM, a adesão celular e os potenciais de migração e invasão das células HSC-

3. Tanto a superexpressão quanto a neutralização de HOXA10 não modularam as taxas de apoptose. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que a expressão de HOXA10 modula eventos importantes para o desenvolvimento e progressão dos CECs orais.

PALAVRAS-CHAVE: HOXA10; gene homeobox; câncer oral; eventos biológicos.

ABSTRACT

Although HOX genes are known for acting in the regulation of important events during embryogenesis, such as cellular proliferation, differentiation and migration, alterations in their expression patterns have been frequently associated to the development of cancers. Studies in our laboratory characterized the expression profile of the 39 members of the HOX family of homeobox genes in oral samples of normal mucosa and squamous cell carcinoma (SCC), identifying differently expressed genes. Among those genes are *HOXA10*, which has its expression related to tumor development and prognosis. The aim of the study was to validate the elevated levels of HOXA10 on oral SCCs comparing to the normal oral mucosa, and to analyze the effects of the overexpression and neutralization of HOXA10 in modulating the main biological events associated to tumorigenesis. The levels of HOXA10 were evaluated by immunohistochemistry and qRT-PCR, and the HOXA10 effects on proliferation, apoptosis, adhesion, epithelial-mesenchymal transition (EMT), migration and invasion were evaluated on HaCaT normal keratinocytes cells overexpressing HOXA10 and on HSC-3 tongue carcinoma cells expressing a shRNA sequence to neutralize HOXA10 expression. The expression of HOXA10 was significantly higher on oral SCC samples when compared to the normal tissue controls. HaCaT cells overexpressing HOXA10 showed higher expression of N-cadherin and β -catenin mRNA levels, and adhesion and migration were coordinately regulated on those cells. The neutralization of HOXA10 reduced significantly the proliferation capacity of HSC-3 cells, while induced significantly the expression of EMT markers, cell adhesion as well as the migration and invasion of HSC-3 cells. Overexpression and neutralization of HOXA10 did not modulate apoptosis rates. In conclusion, the results of this study suggest that the HOXA10 expression modulates important events associated with development and progression of oral SCCs.

KEY-WORDS: HOXA10; homeobox gene; oral cancer; biological events.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Carcinoma Espinocelular	5
2.2	Genes Homeobox	9
2.3	Família de Genes <i>HOX</i>	11
2.4	Genes <i>HOX</i> em Tecidos Adultos	16
2.5	Participação de Genes <i>HOX</i> em Alterações do Desenvolvimento	18
2.6	Genes <i>HOX</i> e Oncogênese	19
2.7	<i>HOXA10</i>	26
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Aprovação do Comitê de Ética	33
4.2	Amostras	33
4.3	Análise Imuno-Histoquímica	34
4.4	Culturas Celulares	35
4.5	Plasmídeos, Transfecção e Seleção de Células Superexpressando <i>HOXA10</i>	36
4.6	Transdução Viral e Seleção de Células Neutralizadas para o Gene <i>HOXA10</i>	36
4.7	qRT-PCR	37
4.7.1	Isolamento do RNA Total	37
4.7.2	Análise da Concentração e Integridade do RNA	38
4.7.3	Síntese de cDNA	38
4.7.4	Reações de qRT-PCR	39
4.7.5	Análise da Expressão Gênica	40
4.8	Western Blot	40
4.9	Análise da Proliferação Celular	41
4.10	Ensaio de Apoptose	41

4.11	Análise da Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) -----	42
4.12	Ensaio de Adesão Celular-----	42
4.13	Ensaio de Migração Celular -----	43
4.14	Ensaio de Invasão Celular com Matrigel-----	44
4.15	Análise Estatística -----	44
5	RESULTADOS -----	45
5.1	Expressão de HOXA10 em Amostras de Mucosa Oral Normal e CECs Orais 45	
5.2.	Efeitos da Superexpressão do Gene <i>HOXA10</i> na Linhagem de Queratinócitos HaCaT -----	48
5.3	Efeitos da Neutralização de HOXA10 na Linhagem Celular HSC-3-----	57
6	DISCUSSÃO-----	67
7	CONCLUSÃO -----	75
	REFERÊNCIAS -----	77
	ANEXO -----	95

1 INTRODUÇÃO

Fortes evidências demonstram que as vias que estimulam a oncogênese constituem anomalias dos processos normais que controlam a embriogênese. Diversos são os genes que regulam o crescimento e desenvolvimento celular e tecidual que estão implicados na oncogênese. Os mais comumente estudados são os genes da família homeobox, que codificam fatores de transcrição responsáveis pelo controle do desenvolvimento tecidual embrionário normal, regulando aspectos celulares e morfogênicos em praticamente todas as espécies (Cillo *et al.*, 2001). A expressão dos genes homeobox em cânceres costuma estar alterada (Abate-Shen, 2002), o que os torna bons modelos de estudo da interação entre a embriogênese e a oncogênese.

Os genes homeobox foram descobertos na década de 80 em *Drosófilas* (moscas-da-fruta) e identificados como genes cujas mutações são capazes de causar alterações em segmentos corporais, conhecidas como alterações homeóticas. Posteriormente, estes genes foram identificados em todos os seres eucariontes (Yoshida *et al.*, 2006). Desde então, mais de 200 sequências gênicas similares foram identificadas, apresentando em comum uma região altamente conservada de 183 nucleotídeos que codifica uma sequência de 61 aminoácidos conhecida como homeodomínio (Ford, 1998). O homeodomínio é responsável pelo reconhecimento e ligação a sequências específicas de DNA (Cillo *et al.*, 2001). Devido as semelhanças nas sequências dos homeodomínios e nas regiões flangeadoras, diversas classes de genes homeobox são reconhecidas. Dentre estas famílias encontram-se a *Drosophila Antennapedia* (ANTP), bicoid (BCD), caudal (CAD), engrailed (EN), even-skipped (EVE), paired (PAX), Pit-Oct-Unc (POU) e orthodenticle (OTX) (Duboule & Morata, 1994). Contudo, a família mais estudada e melhor caracterizada é a família HOX.

Os genes da família HOX apresentam uma distribuição genômica única, subdivididos em 4 clusters, cada qual localizado em um cromossomo diferente

(Scott, 1992). Os genes *HOX* possuem alta homologia aos genes *HOM-C* das Drosófilas, com os grupos 1-8 intimamente relacionados ao *Drosophila antennapedia* (*ANTP*) e os grupos 9-13 assemelhando-se mais aos genes do grupo das *Drosophila abdominal-B* (*ABD-B*) (Owens & Hawley, 2002). A expressão dos membros da família *HOX* de genes homeobox tem início durante o período de gastrulação e controla a identidade de vários tecidos partindo da região anterior (área branquial) até a região mais distal (Graham *et al.*, 1989). Cada órgão é caracterizado por sua forma, estrutura e posicionamento específicos e seu funcionamento é dependente da interação com diferentes fenótipos celulares. Ainda que a grande maioria dos estudos sobre esta família de genes seja sobre sua participação durante o processo de desenvolvimento embrionário e que os mesmos tenham demonstrado o quão precisa e importante é a regulação tempo-espacial durante esta fase, muitos estudos vêm demonstrando que a presença de alguns genes *HOX* é importante para garantir o padrão de diferenciação dos tecidos adultos normais (Antó *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Bahrami, 2011). A expressão dos genes *HOX* em diferentes tecidos adultos normais, incluindo rins, cólon, fígado e pulmões, é única e a combinação de genes ativos e inativos define o perfil molecular de cada órgão (Cillo *et al.*, 2001). Logo, quando da ocorrência de uma alteração no padrão de expressão destes genes, a probabilidade de desenvolvimento e progressão tumoral se faz presente. Um bom exemplo pode ser dado pelo gene *HOXA1*. Este gene não é expresso em tecido mamário normal, todavia sua presença foi detectada em tecido de mama neoplásico (Friedman *et al.*, 1994). A indução da expressão de *HOXA1* em uma linhagem de células epiteliais de mama imortalizada induziu a transformação maligna e promoveu a sobrevivência de células tumorais por meio da sobreexpressão de *BCL-2* (Zhang *et al.*, 2003).

Embora diversos estudos tenham avaliado a expressão dos genes da família *HOX* em uma grande variedade de tumores sólidos, poucos são os manuscritos na literatura envolvendo neoplasias orais (Hassan *et al.*, 2006; De Souza Setubal Destro *et al.*, 2009; Yamatoji *et al.*, 2010; Liborio *et al.*, 2011; Tucci

et al., 2011; Bitu *et al.*, 2012a; Bitu *et al.*, 2012b; Moon *et al.*, 2012). Devido à escassez de estudos de genes homeobox em cânceres orais, nosso grupo iniciou um estudo para caracterizar 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 *et al.*, 2008; Destro *et al.*, 2008). As expressões dos membros HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXB7, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC10, HOXC11, HOXD9, HOXD10, HOXD11, HOXD13 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral comparado com as amostras de mucosa oral normal, independente da associação com fatores de risco. Estes resultados sugerem que a expressão alterada de alguns membros da família HOX de genes homeobox pode estar vinculada ao desenvolvimento e/ou progressão do CEC oral.

As primeiras observações da relação do gene *HOXA10* em neoplasias ocorreram em leucemias (Lawrence & Largman, 1992). A reconstituição da medula óssea de camundongos com células progenitoras que superexpressavam *HOXA10* induziu distúrbios mieloproliferativos com acúmulo de células fagocitárias maduras no sangue periférico e tecidos, que posteriormente, resultavam em leucemias mielóides agudas (Thorsteinsdottir *et al.*, 1997). Além do seu papel no desenvolvimento de leucemias, a expressão desregulada de *HOXA10* é comumente observada em tumores ginecológicos (Lane *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006). Em esôfago, a expressão de *HOXA10* foi observada em carcinomas, mas não em tecido normal (Chen *et al.*, 2005). Como *HOXA10* é expresso em níveis elevados em CECs orais comparado com mucosa oral normal e alguns estudos demonstraram um papel importante do gene *HOXA10* na tumorigênese, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel biológico do gene homeobox *HOXA10* sobre a transição epitélio-mesênquima, proliferação, adesão, migração e invasão celular em CECs orais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Espinocelular

O carcinoma espinocelular (CEC), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, tem sua origem nos queratinócitos orais. É o tipo de tumor maligno mais frequente em boca e representa aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas que acometem a região de cabeça e pescoço e boca (Scully & Bagan, 2009).

Como todos os cânceres, os CECs orais são oriundos de uma mutação no DNA celular normalmente induzida por exposição à fatores de risco mutagênicos, dentre os quais o fumo do tabaco e o consumo de bebidas alcóolicas são os mais importantes (Hunter *et al.*, 2005; Scully & Petti, 2010). A fumaça do tabaco é uma mistura composta por mais de 5 mil elementos diferentes e muitos destes são carcinógenos, capazes de induzir mutações no material genético celular, ou pró-carcinógenos, que durante o seu metabolismo induzem a formação de substâncias nocivas (Burns *et al.*, 1993; Brennan *et al.*, 1995). Os carcinógenos produzidos pelo tabaco, tais como nitrosaminas e benzopirenos, são conhecidos por causarem uma transversão em nucleotídeos guanina comumente encontradas em genes envolvidos na carcinogênese oral como, por exemplo, o *TP53* (Burns *et al.*, 1993; Brennan *et al.*, 1995). O álcool parece atuar como um co-carcinógeno por meio da sua metabolização em acetaldeído, que pode danificar o DNA e encarcerar o glutatião, peptídeo importante na desintoxicação de carcinógenos (Seitz *et al.*, 2001; Pöschl & Seitz, 2004). O fumo aumenta a carga de acetaldeído produzida pelo consumo de álcool enquanto este aumenta a ativação de pró-carcinógenos presentes no tabaco (Scully & Peti, 2010). O álcool induz a enzima CYP2E1 envolvida na ativação de diversas substâncias encontradas nas bebidas alcóolicas e também no tabaco (Hunter *et al.*, 2005).

O ato de mascar betel é um hábito de aproximadamente 20% da população mundial, prevalente em comunidades como a Índia e Indonésia e também reconhecido como carcinogênico (Cogliano *et al.*, 2004; Fasanmade *et*

al., 2007). Dietas nutricionalmente pobres também parecem ser um fator que contribui com o desenvolvimento de CEC oral, particularmente aquelas pobres em frutas e vegetais (Macfarlane *et al.*, 1995; Petersen, 2009). O papiloma vírus humano (HPV) tem sido descrito como agente causal na patogênese do CEC oral, ainda que esse papel seja muito controverso (Kansy *et al.*, 2012).

O CEC de boca pode se manifestar na mucosa jugal, gengiva, no palato duro ou mole, língua e assoalho da boca e acomete principalmente homens com mais de 50 anos de idade, tabagistas e etilistas de longa duração (Scully, Felix, 2006; Kent *et al.*, 2008; Scully, Bagan, 2009; Warnakulasuriya 2009; Ribeiro *et al.*, 2009; Santos-Silva *et al.*, 2011). A borda lateral da língua é a localização anatômica intra-bucal mais acometida pelos CECs, onde aproximadamente 50% dos tumores diagnosticados em boca ocorrem (Scully & Felix, 2006; Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009).

Histologicamente, os carcinomas bem diferenciados representam a maior parte dos CECs orais. Estes tumores apresentam frequentemente um padrão sólido, com proporções variadas de células escamosas e basais, evidente queratinização e poucas figuras de mitoses (Anneroth *et al.*, 1987). Geralmente estes carcinomas possuem crescimento lento, margens bem definidas sem invasão vascular e com evidente resposta inflamatória linfomonoplasmocitária, tornando-os menos invasivos quando comparados aos carcinomas indiferenciados (Anneroth *et al.*, 1987). Os carcinomas moderadamente diferenciados exibem células neoplásicas bem evidentes com acentuado pleomorfismo nuclear, grande número de mitoses, hipercromatismo, nucléolos bem evidentes e poucas pérolas de queratina, embora possa ocorrer queratinização de células individuais (Bryne *et al.*, 1989). Geralmente são mais invasivos e mostram crescimento mais rápido que os carcinomas bem diferenciados (Anneroth *et al.*, 1987). Os carcinomas indiferenciados apresentam pouca ou nenhuma evidência de queratinização e as células neoplásicas mostram alto grau de pleomorfismo e hipercromasia. Apresentam um crescimento difuso com as células demonstrando elevado potencial mitótico. Os CECs indiferenciados apresentam um comportamento

bastante agressivo, caracterizado pela alta capacidade de invasão e de causar metástases (Anneroth *et al.*, 1987; Bryne *et al.*, 1989).

O câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas capazes de induzir a expressão e função aberrante de moléculas responsáveis por regular o crescimento, a sobrevivência, a motilidade e a sinalização celular (Scully & Bagan, 2009). No entanto, o conceito fundamental e simplificado por trás da genética do câncer é a superexpressão de oncogenes e o silenciamento de genes supressores de tumor (Scully & Bagan, 2009). Estes últimos são genes normalmente envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, adesão celular e reparo do DNA (Scully & Bagan, 2009). Existem vários supostos genes supressores de tumor envolvidos com a oncogênese do CEC oral, porém, *TP53* e *CDKN2A* parecem ser os mais importantes (Angiero *et al.*, 2008). *TP53*, envolvido com a regulação da apoptose e do ciclo celular, normalmente encontra-se silenciado por mutações pontuais, o que desencadearia as lesões potencialmente malignas e por fim o câncer (Angiero *et al.*, 2008). Ainda, há um alto índice de perda de heterozigotidade no cromossomo 9p21, aonde se encontra *CDKN2A*, que codifica p16, responsável por regular o ciclo celular e por estabilizar p53 através de MDM2 (Hunter *et al.*, 2005; Mithani *et al.*, 2007).

Em relação à apoptose, sendo Bcl-2 e Bcl-XL proteínas anti-apoptóticas, espera-se que atuem como oncogenes em células tumorais, enquanto Bax, considerada uma proteína pró-apoptótica, teria ação de supressor de tumor (Bose *et al.*, 2012). Logo, tumores expressando Bcl-2 ou Bcl-XL deveriam ter um pior prognóstico, enquanto aqueles que expressassem Bax estariam associados a um melhor prognóstico (Bose *et al.*, 2012). Camisaca e colaboradores (2009) relataram que as expressões elevadas de Bax, Bcl-2 e Bcl-XL estavam associadas com uma melhor sobrevivência global e menor recorrência em CECs orais. Yuen *et al.* (2002) não observaram uma associação entre a expressão de Bcl-2 e a sobrevivência em casos de CECs de mucosa oral. Ainda, a alta expressão de Bcl-2 foi associada a metástase linfonodal e a um menor período de sobrevivência, sem atribuir nenhum significado prognóstico para a

expressão de Bax (de Vicente *et al.*, 2006). No entanto, Bose *et al* (2012) verificaram que Bax possui um valor prognóstico independente após avaliar a expressão deste gene em 69 casos de CECs orais.

A capacidade das células tumorais de se espalhar por meio da invasão dos tecidos adjacentes ou mesmo distantes é um marco importante na carcinogênese (Yamaguchi *et al.*, 2005; Friedl *et al.*, 2012). Células tumorais invasivas adquirem fenótipos migratórios associados à expressão de diversos genes envolvidos com a motilidade celular. Isso permite que estas células respondam aos sinais do microambiente tumoral que desencatilharam a invasão tumoral (Yamaguchi *et al.*, 2005; Friedl *et al.*, 2012). A expressão “transição epitélio-mesênquima” (TEM) descreve um processo no qual as células epiteliais perdem sua polaridade, desfazem suas junções intercelulares e adquirem um perfil mais migratório (Wheelock *et al.*, 2008). A TEM é um fenômeno que ocorre em diversos momentos do desenvolvimento embrionário, bem como durante a metástase tumoral (Boukamp & Fusenig, 1993). As caderinas são componentes transmembrânicos das junções aderentes e responsáveis por mediar a adesão célula-célula e conectar ao citoesqueleto por meio da associação às cateninas. Células epiteliais normalmente expressam E-caderina, enquanto as células mesenquimais tendem a expressar diversas caderinas, dentre as quais N-caderina (Wheelock *et al.*, 2008). O evento conhecido como “cadherin switching” descreve o processo no qual as células epiteliais tumorais mudam o perfil de expressão das isoformas de caderinas, reprimindo E-caderina e adquirindo a expressão de N-caderina (Wheelock *et al.*, 2008). Este fenômeno já foi descrito em CECs orais (Kantak & Kramer, 1998; Diniz-Freitas *et al.*, 2006) e está associado a um comportamento tumoral mais invasivo e agressivo e com pior prognóstico. Em CECs de mucosa oral, a metilação das ilhas CpG na região promotora de E-caderina resultou na expressão recíproca de N-Caderina (Chen *et al.*, 2004), e em linhagens de CEC oral, a metilação de E-caderina mostrou induzir a invasão celular por perda da adesão célula-célula (Nakayama *et al.*, 2001; Alvarado *et al.*, 2011). Em adição, E-caderina parece estar associada à β -catenina (Alvarado *et*

al., 2011). Esta última tem sido considerada uma das moléculas de adesão que, na membrana subcelular, liga E-caderina à filamentos de actina por meio de α -catenina, além de ser um fator de transcrição da via de sinalização Wnt, envolvida no controle de fenômenos associados à tumorigênese (Bhatia & Spiegelman, 2005; Fevr *et al.*, 2007).

2.2 Genes Homeobox

Os genes homeobox foram descobertos em 1980 após a constatação de duas mutações significantes na mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster* (Abate-Shen, 2002). Observou-se que essas mutações eram capazes de causar alterações em segmentos corporais, como a presença de antenas no lugar de pernas e um haltere (órgão responsável pelo equilíbrio no terceiro segmento torácico) transformado em parte de uma asa. Essas mudanças foram então chamadas de transformações homeóticas, que consistem na transformação de uma parte do corpo em outra completamente distinta (Cillo *et al.*, 2001; Lappin *et al.*, 2006). Posteriormente, experimentos utilizando-se da técnica de FISH (fluorescent in situ hybridization) foram essenciais na identificação de genes homeobox em todos os metazoários, desde as esponjas aos vertebrados, e também em plantas e fungos (Lawrence & Morata, 1994). Desde então, uma grande quantidade de informação tem surgido sobre o papel dos genes homeobox e mais de 200 sequências gênicas similares foram identificadas, todas apresentando uma região altamente conservada de 183 nucleotídeos que codifica uma sequência de 61 aminoácidos conhecida como homeodomínio (Gehring *et al.*, 1990; Holland *et al.*, 2007). O homeodomínio está normalmente localizado em uma posição terminal ou subterminal da homeoproteína e é responsável pelo reconhecimento e ligação à sequências específicas de DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos proteicos dos genes homeobox (Nunes *et al.*, 2003). Este domínio consiste de três α -hélices que formam um motivo proteico hélice-volta-hélice e um domínio adicional também conhecido como braço N-terminal, adjacente a primeira hélice

(Gehring, 1993). Geneticamente, uma sequência conservada TAAT foi identificada como um sítio de ligação de alta afinidade para homeodomínios (Abate-Shen, 2002). Alguns estudos demonstraram que o motivo hélice-volta-hélice do homeodomínio entra em contato com o sulco maior do DNA com uma interação adicional ao sulco menor através do braço N-terminal (Svingen & Tonissen, 2006).

Inúmeras pesquisas têm tentado elucidar o mecanismo exato pelo qual as homeoproteínas adquirem sua especificidade funcional e aonde na hierarquia regulatória exercem seus efeitos. Contudo, existem poucos relatos de genes que são especificamente regulados por estas proteínas *in vivo*. Atribui-se a essa questão, a grande inespecificidade de ligação das mesmas ao DNA *in vitro* quando comparada à alta especificidade *in vivo*. Acredita-se que as homeoproteínas sofrem diversos tipos de regulação, incluindo controles pós-transcricionais e interações com outras proteínas (co-fatores) (Abate-Shen, 2002; Lelli *et al.*, 2011; Papadopoulos *et al.*, 2011). O papel dos genes homeobox no desenvolvimento embrionário tem sido extensivamente estudado desde sua descoberta (Lowney *et al.*, 1991; Gehring, 1993; Capellini *et al.*, 2011). As funções destes genes, no entanto, vão além de sua participação na embriogênese. A participação dos genes homeobox já foi implicada em processos biológicos de grande importância, tais como controle da identidade celular (Bei *et al.*, 2007), crescimento e diferenciação de células (Magli *et al.*, 1991), interação célula-célula e célula-matriz extracelular (Yoshida *et al.*, 2006).

A superclasse de genes homeobox foi subdividida em duas classes. A classe I consta dos genes homeobox que apresentam-se organizados em grupos (clusters) e são reconhecidos por seu papel no posicionamento ântero-posterior durante a embriogênese (genes *HOX* e *Rhox*). A classe II é de genes homeobox não agrupados e divergentes e que apresentam-se dispersos pelo genoma (Owens & Hawley, 2002; Holland *et al.*, 2007). A maioria dos genes homeobox encontra-se desagrupada e não está envolvida em transformações homeóticas (Grier *et al.*, 2005). Devido às semelhanças observadas nas sequências dos homeodomínios e nas regiões flangeadoras os genes homeobox são divididos

em famílias, dentre as quais encontram-se a *Drosophila Antennapedia* (*ANTP*), *bicoid* (*BCD*), *caudal* (*CAD*), *engrailed* (*EN*), *even-skipped* (*EVE*), *paired* (*PAX*), *Pit-Oct-Unc* (*POU*) e *orthodenticle* (*OTX*)(Duboule & Morata, 1994). Contudo, a família mais estudada e melhor caracterizada é a família *HOX*.

2.3 Família de Genes HOX

Os genes *HOX* são uma família da classe I de genes *homeobox* e são a contraparte nos vertebrados dos genes do complexo *HOM-C* da *Drosophila melanogaster*. Em mamíferos, existem 39 genes *HOX* organizados em 4 clusters (A, B, C e D). Estes genes estão localizados em 4 diferentes cromossomos (7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31) e numerados de 1 a 13, embora nenhum dos grupos possua um conjunto completo de genes (Figura 1). Aqueles genes que possuem sequências similares entre si encontram-se em posições correspondentes entre os grupos, e são chamados de genes parálogos (Grier *et al.*, 2005; Mallo *et al.*, 2010). Acredita-se que estes genes tenham surgido por meio da combinação de eventos de *cis*-amplificação e *trans*-duplicação dos complexos *bithorax* e *antennapedia* de *Drosophilas* durante episódios evolucionários distintos. Como consequência os *trans*-parálogos (aqueles que ocupam a mesma posição relativa ao longo do eixo 5'-3' e cuja numeração é a mesma) compartilham um alto grau de homologia em suas sequências quando comparados aos *cis*-parálogos (genes que ocupam posições adjacentes ao longo do eixo 5'-3') (Svingen & Tonissen, 2006). Os genes *HOX* foram identificados como reguladores da padronização tecidual durante o desenvolvimento embrionário, principalmente no eixo anteroposterior. Atualmente o que se busca é o papel que estes genes exercem no metabolismo celular de células adultas e diferenciadas (Dekker *et al.*, 1992; Owens & Hawley, 2002; Svingen & Tonissen, 2006).

Assim como os genes *homeobox* não agrupados, os genes *HOX* possuem um homeodomínio localizado no exon 2, responsável pela ligação ao DNA (Svingen & Tonissen, 2006). Proteínas *HOX* podem atuar como monômeros ou homodímeros dirigindo diretamente a transcrição gênica, assim como assumir

a formação de heterodímeros ou heterotrímeros por meio da associação a co-fatores (Shah & Sukumar, 2010). Um grupo de homeoproteínas, não pertencente à classe I de genes homeobox, possui função de co-fatores para proteínas HOX. As proteínas das famílias TALE (**T**hree **A**mino acid **L**oop **E**xtension), PBX e MEIS são altamente expressas tanto em tecidos fetais como em adultos. PBX se liga preferencialmente à proteínas HOX mais próximas da porção 3', em especial àquelas dos grupos 1-8. Esta ligação depende da presença de um hexapeptídeo que flanqueia o homeodomínio, na posição N-terminal, e possui 4 aminoácidos (YPWM) como sequência principal de ligação (Svingen & Tonissen, 2006). As proteínas dos grupos 9-10 não possuem este hexapeptídeo, contudo, se ligam a PBX, por meio de um resíduo de triptofano (Trp) altamente conservado (Shen *et al.*, 1997). MEIS1 relaciona-se com aquelas proteínas mais próximas da porção 5', com destaque para as proteínas dos grupos 11-13 (Shen *et al.*, 1997; Abate-Shen, 2002; Grier *et al.*, 2005).

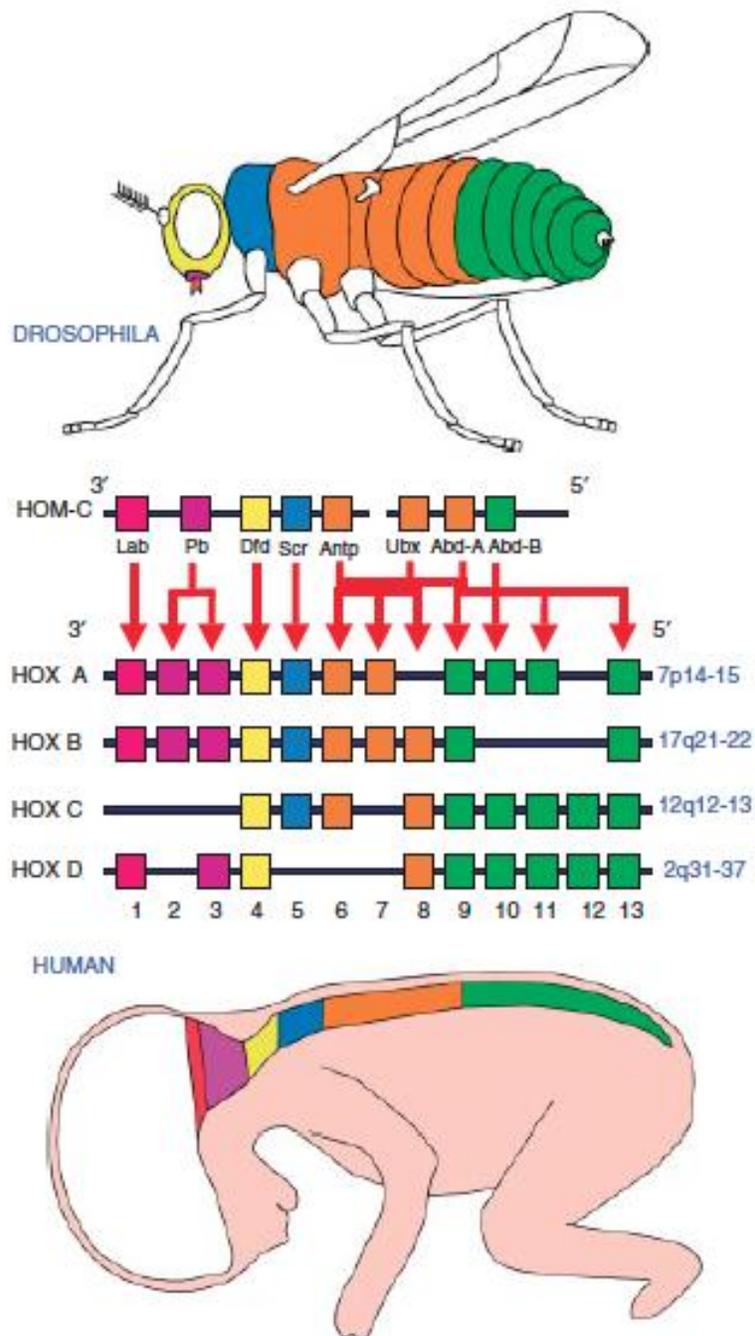


Figura 1. Representação esquemática do alto grau de conservação entre as famílias HOM-C da *Drosophila melanogaster* e os genes *HOX* em humanos. A figura ressalta a distribuição dos genes em clusters, bem como sua localização cromossômica e o padrão de expressão gênica ao longo do desenvolvimento embrionário. (Grier *et al.* 2005).

Durante o processo de morfogênese as células requerem informações precisas sobre posicionamento tempoespacial no intuito de certificar que se diferenciem no tecido apropriado para determinado local no embrião. Essa certeza é assegurada pelo princípio de colinearidade. Este descreve a sequência de expressão de um cluster de genes *HOX* ao longo do eixo embrionário (Durston *et al.*, 2012). Existem 3 regras que são baseadas neste evento e que orquestram a ação dos genes *HOX*, garantindo o preciso desenvolvimento embrionário. A primeira delas é a colinearidade espacial. De acordo com essa propriedade, a posição relativa do gene ao longo do eixo 3'-5' no cromossomo determina sua expressão ao longo do eixo anteroposterior do embrião. O padrão de expressão dos genes *HOX* dentro do cluster é coordenado de forma que aqueles que se localizam mais próximos à extremidade 3' são expressos em regiões mais anteriores do embrião, enquanto que os genes mais próximos de 5' são expressos em regiões mais caudais (Duboule & Morata, 1994; Lappin *et al.*, 2006; Durston *et al.*, 2011). Dessa forma, os genes localizados nos grupos 1 a 4 são responsáveis pelo desenvolvimento das regiões branquial e do romboencéfalo, enquanto aqueles que compõem os grupos 5 a 8 controlam a região torácica (Grier *et al.*, 2005). Por fim, os genes que formam os clusters 9 a 13 são encarregados pela regulação da região lombossacral, trato urinário e genitália do embrião (Grier *et al.*, 2005). Toda a família de genes *HOX* está expressa no sistema nervoso central embrionário (Cillo *et al.*, 2001; Morgan, 2006).

A segunda regra é a da colinearidade temporal: os genes *HOX* são transcritos de uma forma temporal, em uma sequência que corresponde ao seu posicionamento 3'-5' dentro de cada cluster. Assim, aqueles genes que se encontram próximos à extremidade 3' dos cluster são expressos primariamente, e, então, à medida que o embrião se desenvolve os genes próximos à extremidade 5' vão progressivamente sendo transcritos (Samuel & Naora; 2005; Lappin *et al.*, 2006; Shah & Sukumar 2010). De acordo com a terceira regra, os genes *HOX* que se encontram posicionados mais próximos à extremidade 5' do cluster possuem um fenótipo dominante em relação aos mais próximos de 3'. Essa propriedade é

conhecida como dominância posterior. Observou-se, no entanto, que o que ocorria em mamíferos diferia daquilo observado nos demais vertebrados (Condie & Capecchi, 1994). Estudos utilizando animais knockout mostraram que a atividade gênica nos níveis axiais estudados era resultado da combinação da expressão de diversos genes *HOX*, ao invés de sobreposição da ação de um único gene dominante (Condie & Capecchi, 1994). A teoria da redundância funcional passou então a substituir a propriedade da dominância posterior em mamíferos (Papageoriou, 2006). Tem-se como exemplo os membros do parálogo 9 (*HOXA9*, *HOXB9* e *HOXD9*) no tecido mamário durante a gestação. 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 três membros (knockout triplo) apresentam uma intensa hipoplasia durante a gravidez e lactação (Chen e Capecchi, 1999).

Recentemente a evolução da colinearidade dos genes *HOX* tem sido questionada, baseando-se no fato de que essa propriedade poderia explicar a sua relação com a estrutura desta família de genes (Durston *et al.*, 2012). Alguns autores atribuem a essa relação uma teoria baseada no modelo de abertura da cromatina. De acordo com esse modelo, a colinearidade é baseada na regulação transcricional e especificamente limitada pela abertura progressiva no sentido 3'-5' da cromatina em cada cluster (Durston *et al.*, 2012). Isso justificaria a colinearidade espacial. Observa-se, no entanto, que genes *HOX* que não se encontram agrupados, mas sim espalhados no genoma de diversos organismos, também seguem a regra da colinearidade espacial. Diante disso, foi proposto que os genes *HOX* agem como metagenes ou unidades funcionais, ou seja, um gene não pode executar toda a função sozinho, mas todo o cluster executa uma função única (Duboule, 2007; Manguy *et al.*, 2007; Durston *et al.*, 2012).

2.4 Genes HOX em Tecidos Adultos

A atuação dos genes da família HOX foi inicialmente identificada nos processos de regulação do desenvolvimento embrionário, mais especificamente no que diz respeito ao padrão de formação anteroposterior do embrião (Gehring, 2011). Contudo, alguns estudos foram capazes de demonstrar uma função dos genes *HOX* em determinados tecidos adultos diferenciados. Takahashi e colaboradores (2004) demonstraram por meio de qRT-PCR o perfil de expressão dos 39 genes *HOX* em 20 diferentes tipos de tecidos humanos normais. Na hematopoiese, a atuação dos genes *HOX* é largamente estudada. Sauvageau *et al.* (1994) observaram que 4 dos 11 genes do cluster A (*HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10*) e 7 dos 9 genes cluster B (*HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB8* e *HOXB9*) estavam presente em 5 subpopulações de células CD34⁺. A superexpressão de *HOXA5* em células CD34⁺ e CD34⁺/CD38⁻ resulta em uma tendência à diferenciação mielóide que ocorre à custa da eritróide, o que indica que esse gene possui importante função na determinação do perfil desta linhagem celular (Crooks *et al.*, 1999). Os genes do locus B possuem participação na linhagem de células linfóide com *HOXB7* sendo identificado em linfócitos normais no sangue periférico (Magli *et al.*, 1997). Ainda, Quaranta *et al.* (1996) descreveram a ativação sequencial 3'-5' dos genes *HOX* do locus B em linfócitos natural killer após estimulação com interleucina 1 β e interleucina 2. *HOXC4* e *HOXC6* são expressos durante a diferenciação de células B e T (Bijl *et al.*, 1996). Enquanto o mRNA de *HOXC4* está presente em células tronco e ao longo do processo de maturação linfóide, *HOXC6* apresenta-se em células equivalentes a pró-timócitos e células pré-B e mantém sua expressão em durante todo o processo de maturação (Bijl *et al.* 1996).

A participação de genes da família HOX tem sido descrita em processos de reparação tecidual de feridas cutâneas. Recentemente, Mahdipour *et al.* (2011) propuseram que a superexpressão de *Hoxa3* promove a diferenciação de células tronco hematopoiéticas progenitoras em células granulocíticas Gr-1⁺CD11b⁺, estimulando a neovascularização e produzindo

citocinas pró-angiogênicas tais como VEGF e MMP9. *Hoxa3* foi também descrito como tendo participação na supressão da inflamação e recrutamento de leucócitos CD45⁺, após terapia gênica com plasmídeos contendo cDNA para esse gene em animais diabéticos submetidos à feridas cirúrgicas (Mace *et al.*, 2009). Observou-se, também, um aumento na mobilização e recrutamento de células endoteliais progenitoras derivadas de medula óssea CD34⁺/CD45⁻ (Mace *et al.*, 2009). Experimentos utilizando-se de camundongos transgênicos para *Hoxb13* mostraram que quando este gene encontra-se superexpresso, ocorre aumento da inflamação da ferida e persistência do coágulo de fibrina e de macrófagos e neutrófilos em comparação aos animais controles (Mack & Maytin, 2009). VEGF e TNF- α apresentavam-se super-regulados nos animais transgênicos superexpressando *Hoxb13* (Mack & Maytin, 2009). Esses dados sugerem que as células hematopoiéticas expressam um repertório de genes *HOX* de formas específicas a cada linhagem celular e de acordo com o determinado período do desenvolvimento.

Sanlioglu *et al.* (1998) identificaram membros da família de genes *Hox* em células de Purkinje de prosencéfalos e cerebelos de camundongos. De acordo com os autores, os genes encontrados em ambos os sítios anatômicos (*Hoxa4*, *Hoxb3* e *Hoxd3*) normalmente são expressos em regiões mais anteriores durante a embriogênese. Aqueles identificados apenas no cerebelo (*Hoxa5*, *Hoxb5* e *Hoxb7*) não tiveram sua expressão de mRNA identificada no 15^o dia de desenvolvimento embrionário. Ainda, uma vez que o cDNA foi sintetizado a partir de RNA isolado do tecido cerebelar no dia 0 pós-natal, acredita-se que a expressão desses genes seja ativada em um período perinatal e que persista até a fase adulta.

Em pulmões de adultos observa-se a presença de 11 componentes da família *HOX*. Foram identificados 5 membros do lócus A (*HOXA2* a *HOXA6*), 5 membros do lócus B (*HOXB2* a *HOXB6*) e *HOXD1* (Tibério *et al.*, 1994). A presença de uma grande variedade de genes *HOX* que se encontram altamente

expressos em pulmões de fetos reduz a medida que ocorre o avanço da gestação, em especial a do gene *HOXA5* (Volpe *et al.*, 2003).

A família de genes *HOX* parece estar ativamente presente também em germes dentários entre 18 e 24 semanas de desenvolvimento, sendo 18 dos 39 genes expressos em incisivos inferiores, 23 em incisivos superiores, 24 em molares inferiores e 25 em molares superiores (Antó *et al.*, 2006). Essa alta atividade não pôde ser observada em amostras de mucosa retromolar submetidas à qRT-PCR onde apenas *HOXA9*, *HOXB8*, *HOXB13*, *HOXD3* e *HOXD4* foram expressos. Marcação imuno-histoquímica para *HOXD9* e *HOXB6* indicou que a expressão durante a fase de campânula basicamente restringe-se ao compartimento epitelial do germe dental. Ainda, a rede de genes *HOX* parece estar silenciada em sua maior parte em células de cultura primária de polpa dentária de molar de adultos com exceção de *HOXD3*, *HOXD6* e *HOXC8* que se mostraram ativamente expressos (Antó *et al.*, 2006).

2.5 Participação de Genes HOX em Alterações do Desenvolvimento

O primeiro gene da família *HOX* a ter sua participação descrita em distúrbios do desenvolvimento foi *HOXD13*. Seu envolvimento foi relatado na simpolidactilia, uma rara condição que combina sindactilia e polidactilia (Grier *et al.*, 2005). Em indivíduos não afetados o exon 1 de *HOXD13* contém uma sequência de 15 resíduos de polialanina, enquanto os indivíduos afetados apresentam inserção 7 a 10 novas sequências, representando uma mutação com ganho de função (Goodman *et al.*, 1997). A associação de *HOXA13* com a síndrome mão-pé-genital foi descrita por Mortlock & Innis (1997). Esta síndrome é caracterizada por falanges curtas, fusão e calcificação dos ossos do pulso, além de bifurcações parciais ou completas do útero e hipospadias (Mortlock & Innis, 1997).

A expressão anormal de genes *HOX* também se encontra associada a diversas anomalias pulmonares congênitas. Volpe e colaboradores (2000) descreveram a associação da superexpressão de *HOXB5* na patogênese do sequestro broncopulmonar. Esta condição é causada pelo desenvolvimento

anormal de um divertículo acessório a partir do pré-intestino. A presença de HOXB5 foi identificada por hibridização *in situ* no septo alveolar e também em células epiteliais pulmonares tanto em tecido sadio quanto em tecido pulmonar alterado. Observou-se, no entanto, que a expressão de HOXB5 foi 2,5 vezes maior em casos de hipertensão pulmonar primária em comparação ao tecido pulmonar sadio (Golpon *et al.*, 2001).

2.6 Genes HOX e Oncogênese

Muito progresso tem sido feito nas últimas décadas no que diz respeito ao delineamento do perfil molecular da transformação oncogênica. Uma abordagem que vem sendo largamente estudada é o compartilhamento de características entre a embriogênese e a oncogênese. Importantes vias de sinalização normalmente responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da diferenciação tecidual como, por exemplo, as vias de sinalização Wnt e Hedgehog, foram descritas como desreguladas em diversos tumores (Taipale & Beachy, 2001). Nesse contexto, a participação dos genes *HOX* no desenvolvimento tumoral não poderia ser excluída. Um número crescente de genes *HOX* tem sido descrito como tendo expressão aberrante em uma grande variedade de tumores. Não se sabe, no entanto, qual seria o exato mecanismo pelo qual muito destes genes exercem sua função na tumorigênese.

Estudos iniciais apontaram um papel para os genes *HOX* na oncogênese por meio de superexpressão aberrante. Contudo, a complexidade deste processo é maior, uma vez que a expressão dos genes *HOX* em tumores pode ser classificada em 3 categorias (Abate-Shen, 2002). A primeira seria baseada numa desregulação tempo-espacial, ocorrendo a expressão destes genes nas células tumorais derivadas de tecidos onde os mesmos não são frequentemente expressos (Sha & Sukumar, 2010). O gene *Hoxa1* foi estudado em tecidos normais, pré-neoplásicos e em adenocarcinomas de mama de camundongos fêmeas (Friedmann *et al.*, 1994). Por meio da análise por northern blot os autores observaram que este gene estava presente nas amostras de

tumores e não era expresso nos tecidos normal e pré-neoplásico (Friedmann *et al.*, 1994). Ainda, utilizando-se da expressão forçada de HOXA1 em linhagem de célula oriunda de tumor de mama (MCF-7), Zhang e colaboradores (2003) constataram que a abundância desse gene é capaz de promover a sobrevivência celular por prevenir apoptose por meio da super-regulação da expressão de *BCL-2*. 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). HOXA7 foi identificado por qRT-PCR em amostras de tumores de ovário benignos e malignos, mas a sua expressão é ausente no epitélio ovariano sadio (Naora *et al.*, 2001). Na região cervical, os genes *HOXA1*, *HOXB2*, *HOXB4*, *HOXC5*, *HOXC10* e *HOXD13* foram encontrados apenas em tumores (Hung *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2006). Zhao e colaboradores (2005), ao estudarem linhagens de carcinoma de endométrio, verificaram que HOXB13 e HOXC13 estavam expressos na maior parte das linhagens. Os autores ainda perceberam que a inibição de HOXB13 utilizando-se de oligonucleotídeos antisense reduz em 90% o potencial invasivo das células tumorais. Genes do cluster C da família HOX foram identificados em linhagens celulares e linfonodos metastáticos de câncer de próstata. As superexpressões de HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8 foram confirmadas por meio de reações de RT-PCR para estas células. Ainda, a microdissecação a laser de amostras de tumores primários de próstata confirmou a presença destes genes nas células tumorais mas não nas células normais (Miller *et al.*, 2003). Comparando os níveis de expressão de todos os genes *HOX* em amostras de carcinoma esofágico com amostras de tecido normal por meio de qRT-PCR, Takahashi *et al.* (2007) verificaram que o padrão de expressão destes genes nos tecidos normais condizia com os genes localizados na porção 3', enquanto as amostras de tecido neoplásico apresentaram um padrão de expressão mais 5'. Ainda, os autores mostraram que HOXA5, normalmente expresso por células basais do epitélio normal, apresentava-se superexpresso nas células tumorais. Em adição, por meio da análise dos níveis de expressão de genes *HOX* em amostras

de carcinoma de esôfago e mucosa esofágica normal, 13 genes *HOX* (*HOXA10*, *HOXA13*, *HOXB9*, *HOXC4*, *HOXC8*, *HOXD9*, *HOXD10* e *HOXD13*) estavam presentes apenas em amostras de carcinoma, o que indica um possível envolvimento destes genes no desenvolvimento tumoral (Chen *et al.*, 2005).

A segunda categoria é caracterizada por genes homeobox expressos nas células normais e tumorais, estando estes, no entanto, com níveis de expressão elevados em comparação às primeiras. Um bom exemplo pode ser dado pela expressão de *HOXA9* em leucemia mielóide aguda (Golub *et al.*, 1999). Estes autores, por meio da análise por micro-arranjo de expressão, demonstraram que este gene encontrava-se superexpresso em células da linhagem tumoral quando comparado com as células mielóides normais. Essa superexpressão foi correlacionada a um pior prognóstico e falha na resposta ao tratamento com quimioterápicos. Maulbecker & Gruss (1993) induziram a expressão de 5 genes da família *HOX* (*Hoxa1*, *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxb7* e *Hoxc8*) em duas linhagens celulares distintas (NIH3T3 e 208). Os autores verificaram que as células transfectadas adquiriram uma capacidade transformante, como revelado pelo crescimento independente de ancoragem (crescimento em ensaios de soft Agar) e indução de tumores em animais imunossuprimidos nude. A expressão de *HOXD13* em 79 diferentes tipos de tumores e seus respectivos tecidos normais foi estudada por meio de ensaios de microarray de tecido. A validação dos dados por qRT-PCR em alguns tecidos (cérebro, endométrio, glândulas submandibular, mama, pulmão e tecido adiposo) mostrou que a contraparte normal apresentava expressão reduzida ou mesmo ausente de *HOXD13*, enquanto os diferentes tipos de tumores utilizados para cada tecido possuíam uma superexpressão deste gene (Cantille *et al.*, 2009). Os genes *HOXB6*, *HOXB8*, *HOXC8* e *HOXC9* foram mais expressos em linhagens celulares derivadas de pólipos intestinais e de carcinoma colo-retais quando comparado à linhagens de células normais (Vider *et al.*, 2000).

Por fim, a terceira classe é caracterizada por genes homeobox que apresentam uma expressão reduzida ou silenciada em células tumorais quando os mesmos são normalmente expressos nos tecidos normais. Essa regulação pode

ocorrer por metilação de ilhas CpG nas regiões promotoras dos genes *HOX*, silenciamento gênico por meio de microRNAs ou mesmo por RNAs não codificantes longos (lincRNAs) (Sha & Sukumar, 2010). Em qualquer uma destas situações, os genes da família *HOX* que deveriam estar expressos em tecidos adultos diferenciados encontram-se sub-regulados. A perda da expressão de *HOXA5* em tumores de mama está relacionada à perda de expressão de p53. Na análise de linhagens celulares de diferentes tipos de tumor de mama e de amostras de tecido de tumores de pacientes, Raman e colaboradores (2000) demonstraram que a expressão de p53 é coordenada por *HOXA5* e que a região promotora de *HOXA5* encontrava-se metilada em 16 das 20 amostras de tecido tumoral negativo para p53. Enquanto *HOXB13* é expresso pela próstata, cólon e reto normais, sua expressão foi perdida ou reduzida em 26 dos 42 (62%) tumores analisados (Jung *et al.*, 2005). Em adição, a superexpressão de *HOXB13* em células tumorais de próstata (LNCaP) e câncer coloretal (CRC) contribuiu para uma redução no crescimento tumoral (Jung *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2005). Diante dos mecanismos acima descritos, conclui-se que a expressão desregulada dos genes *HOX* é capaz de interferir em diversas vias promotoras da tumorigênese. A transformação e manutenção neoplásica requerem uma alteração do estado celular normal para uma situação onde haja proliferação anormal, inadequada diferenciação, resposta imprópria à estímulos de morte ou mesmo perda das propriedades normais de adesão. Uma vez que os genes *HOX* aparentam ter um papel no estado celular basal, alterações nos seus padrões de expressão poderão afetar o controle dos eventos biológicos associados à oncogênese (Cillo *et al.*, 2001; Abate-Shen, 2002; Grier *et al.*, 2005).

Em tecidos normais a participação dos genes *HOX* na diferenciação celular pode ser classificada em dois tipos. No primeiro, a expressão destes genes é necessária para a indução da maturação terminal e diferenciação, funcionando como um gene supressor de tumor (Myers *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2002). O segundo é caracterizado pelo silenciamento desses genes (Trivedi *et al.*, 2007; Trivedi *et al.*, 2008). Em tumores de próstata, a presença de altos níveis de

HOXC8 mRNA foi detectada em todos os tumores pobremente diferenciados, com alto índice de Gleason (Waltregny *et al.*, 2002). A expressão forçada de HOXD10, o qual não é normalmente expresso em cânceres de mama, em uma linhagem celular tumoral altamente agressiva (MDA-MB-231) induz diferenciação com formação de estruturas similares a ductos de glândulas mamárias (Carrio *et al.*, 2005). A expressão gênica de HOXB13 em câncer de próstata está associada à supressão da transativação do receptor de andrógeno na linhagem LNCaP prevenindo o crescimento tumoral (Jung *et al.*, 2004). Em células progenitoras hematopoiéticas, a expressão de HOXB3 é capaz de induzir o desenvolvimento de leucemia mieloide e impedir a diferenciação linfóide normal (Lawrence *et al.*, 1996), enquanto HOXC4 direciona especificamente a diferenciação linfoblástica (Bijl *et al.*, 1996).

Recentes evidências demonstram que genes *HOX* possuem um papel fundamental na proliferação de diversos tipos celulares. Expressão de HOXB7 em células tumorais derivadas de melanoma e câncer de ovário induz a expressão do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e a proliferação celular (Caré *et al.*, 1996; Naora *et al.*, 2001). Ao contrário dos tumores sólidos, nos quais a expressão desregulada de genes *HOX* está associada à perda ou ganho de função, a superexpressão de HOX em leucemias está associada à mutações por translocação, resultando em expressão constitucional do gene translocado ou regulação alterada pelo homólogo MLL (Calvo *et al.*, 2002). Alguns genes dos loci A e B, quando superexpressos, são capazes de aumentar a proliferação de determinados clones celulares e seus progenitores em leucemias (Lawrence & Largman, 1992). Dentre eles, destaca-se *HOXA9*, capaz de induzir a proliferação de células da medula óssea (Calvo *et al.*, 2002). *HOXB4* induz proliferação de células da medula óssea via estimulação dos níveis protéicos de c-Jun, Fra-1 e ciclina D1 (Schmittwolf *et al.*, 2005). É importante ressaltar que os efeitos proliferativos dos genes *HOX* em tumores é específico para cada tecido. *HOXD10*, em mama (Carrio *et al.*, 2005) e *HOXB13* em cólon e reto (Jung *et al.*, 2005) atuam induzindo a proliferação celular quando estão silenciados nos tumores. No

entanto, *HOXC9* e *HOXD10* aumentam a proliferação celular de tumores de pulmão via superexpressão dos produtos proteicos (Plowright *et al.*, 2009).

Uma vez que o equilíbrio entre proliferação e apoptose se encontra frequentemente alterado na tumorigênese, a expressão aberrante de genes *HOX* pode contribuir com a oncogênese permitindo a ativação de vias anti-apoptóticas. Raman e colaboradores (2000) demonstraram que a regulação de *TP53* por *HOXA5* resulta em um aumento nas taxas de apoptose. O envolvimento de *HOXA5* com a apoptose foi também relatado por Chen e colaboradores (2004) ao verificarem que este gene é capaz de induzir a expressão de caspase 2 e caspase 8 em células de câncer de mama. O tratamento de linhagens celulares de tumor de pulmão de grandes células e de melanoma com HXR9, um peptídeo que interfere especificamente na ligação entre proteínas *HOX* e seus cofatores *Pbx*, demonstrou que ocorre uma sobre-regulação de diversos genes alvo de *HOX*, inclusive de *FOS*, previamente descrito como sendo um iniciador da apoptose (Kasibhatia *et al.*, 1998).

A implicação dos genes *HOX* como fatores causais de características invasivas em alguns tumores também tem sido discutida. Estudos em linhagens celulares de mama normal (Ma *et al.*, 2003) e de células de tumores de ovário (Miao *et al.*, 2007) demonstraram que *HOXB13*, quando superexpresso, aumenta a invasividade celular, bem como a proliferação e formação de colônias em ensaios de soft ágar. *HOXB7* mostrou-se especificamente sobre-regulado em metástases ósseas e tumores primários de mama em comparação ao tecido mamário normal (Wu *et al.*, 2006). A superexpressão deste gene em linhagens celulares de mama e rim induziu características de transição epitélio-mesenquima (TEM) com perda da expressão de claudina 1 e claudina 7, localização inadequada de claudina 4 e E-caderina e expressão de vimentina e actina- α de músculo liso (Wu *et al.*, 2006). A expressão de *HOXD3* induziu a expressão de integrina $\alpha 5\beta 3$ e dos ativadores de plasminogênio em células endoteliais que participam da degradação da matriz extracelular, indicando a participação de *HOXD3* em estágios invasivos da angiogênese (Boudreau *et al.*, 1997). Uma

inibição na expressão de HOXA7 é requerida para o bloqueio da migração e invasão de monócitos durante o processo de diferenciação celular (Leroy *et al.*, 2004).

Poucos são os relatos sobre o envolvimento dos genes *HOX* no desenvolvimento dos CECs orais. O primeiro estudo mostrou, por meio de RT-PCR semi-quantitativo, os diferentes níveis de expressão dos 39 genes da família *HOX* em mucosa oral normal, displásica e em CECs (Hassan *et al.*, 2006). Em displasias, a expressão de HOXA2, HOXA3, HOXB3 e HOXD10 foi maior do que em tecidos normais, enquanto que HOXA1, HOXB7, HOXB9 e HOXC8 encontravam-se superexpressos em CECs quando comparados ao tecido displásico. Metástases linfonodais indicaram uma maior expressão de HOXC6 em comparação aos CECs primários (Hassan *et al.*, 2006). Destro e colaboradores (2009) demonstraram que a expressão de HOXB7 foi significativamente maior em CECs quando comparado à mucosa oral normal. Quando da superexpressão deste gene em linhagem de queratinócitos HaCaT, notou-se aumento na proliferação celular. O efeito de HOXB7 na proliferação pode ser confirmado após silenciamento deste gene em linhagem SCC9 de carcinoma de língua, onde houve marcada redução da proliferação celular. Em 35 amostras de carcinomas orais, a presença de HOXB7 foi significativamente correlacionada ao potencial proliferativo do tumor, como revelado pela marcação imuno-histoquímica para Ki67 (Destro *et al.*, 2009). A expressão de HOXB7 ainda foi correlacionada ao tamanho do tumor (T), comprometimento linfonodal (N), estágio da doença, menor sobrevida global e menor período livre de doença após tratamento. Posteriormente, em uma amostra independente de 115 CECs orais, Bitu *et al.* (2012a) demonstraram que a expressão de HOXB7 é um marcador independente do prognóstico do câncer oral. Em modelo de carcinogênese quimio-induzida em ratos, os níveis de expressão e produção de HOXC5 foram progressivamente aumentando na displasia em comparação ao tecido normal e hiperplásico (Moon *et al.*, 2012). Por meio de hibridização *in situ*, Libório e colaboradores (2011) identificaram uma redução no padrão de expressão de HOXA7 em amostras de CEC oral em comparação ao

tecido oral não-neoplásico, sugerindo um envolvimento deste gene na carcinogênese oral. A superexpressão de HOXB5 em CECs orais foi verificada por Tucci e colaboradores (2011), após analisarem 15 pares de amostras de mucosa oral normal e CEC, sem que no entanto houvesse quaisquer correlação com o estadiamento tumoral ou grau de diferenciação histológica. Após verificar que HOXA1 encontrou-se superexpresso em CECs orais em comparação com a mucosa oral normal, Bitu *et al* (2012b) verificaram que a presença deste gene foi significativamente associada ao estádios T e N e ao potencial proliferativo tumoral, além de ser um fator preditivo de pior sobrevida dos pacientes portadores de CEC. Após análise multivariada, HOXA1 se mostrou como um fator prognóstico independente para CECs orais. Ainda, os autores verificaram que a expressão forçada de HOXA1 em linhagem de queratinócitos HaCaT foi capaz de induzir a proliferação destas células, enquanto que o silenciamento deste gene em células SCC9 de CEC de língua reduziu significativamente o potencial proliferativo.

2.7 HOXA10

Durante a embriogênese, devido à sua localização mais próxima a porção 5', o gene *HOXA10* costuma ser expresso em regiões mais caudais do embrião (Grier *et al.*, 2005; Lappin *et al.*, 2006), e sua participação no desenvolvimento uterino tem sido amplamente estudada (Benson *et al.*, 1995; Satokata *et al.*, 1995). Em tecidos adultos, HOXA10 está presente em endométrio, além de estar envolvido ativamente durante o ciclo menstrual com expressão elevada durante as fases secretórias intermediária e tardia (Taylor *et al.*, 1998; Daftary & Taylor, 2006). Interessantemente, a expressão desregulada de *HOXA10* tem sido frequentemente associada à infertilidade (Matsuzaki *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009). Lu *et al.* (2008) demonstraram que a infertilidade associada com níveis reduzidos de HOXA10 é resultado da perda de indução da proliferação celular promovida pelo gene. Em adição, estes autores demonstraram por meio de uma análise global que inúmeros genes com papel na proliferação celular são controlados por HOXA10, incluindo CDC2 e CCNB2. HOXA10 também possui

participação crucial na diferenciação de células da linhagem mielomonocítica (Lowney *et al.*, 1991). *HOXA10* atua regulando a transcrição de *CYBB* e *NCF2*, normalmente expressos em células mielóides após a fase promielocítica de diferenciação e são ativamente transcritos até a morte celular (Newburger *et al.*, 1988). *HOXA10* é responsável pela regulação de *ITGB3*, gene responsável pela codificação da integrina $\alpha\beta3$, associada à adesão à fibronectina e regulação de diversos aspectos da resposta inflamatória em fagócitos maduros (Bei *et al.*, 2007).

A expressão de *HOXA10* em cânceres parece ser dúbia e dependente do tecido de origem do tumor, visto que tanto indução como inibição da expressão desempenha papel importante em diferentes tipos de câncer. As primeiras observações da relação do gene *HOXA10* em neoplasias ocorreram em leucemias. A reconstituição da medula óssea de camundongos com células progenitoras que superexpressavam *HOXA10* induziu distúrbios mieloproliferativos com acúmulo de células fagocitárias maduras no sangue periférico e tecidos, que posteriormente, resultavam em leucemias mielóides agudas (Thorsteinsdottir *et al.*, 1997). Wang e colaboradores mostraram que a ativação do produto do gene *SHP2*, que é freqüentemente mutado em leucemias, coopera com *HOXA10* na progressão das desordens mieloproliferativas para leucemias mielóides crônicas, e que a fosforilação de *HOXA10* reduz a ligação ao DNA durante a diferenciação mielóide induzida por interferon γ em linhagens de células leucêmicas (Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). A expressão estável de *HOXA10* na linhagem celular leucêmica U937 induziu a expressão do gene *CDKN1A*, bloqueando o ciclo celular e promovendo a diferenciação celular (Bromleigh & Freedman, 2000). Estes autores demonstraram que a direta ativação de p21 por *HOXA10* é dependente da formação do tetrâmero *HOXA10*-*PBX1*-*MEIS1*, sugerindo que os efeitos de *HOXA10* na proliferação celular podem ser distintos dependendo da disponibilidade de co-fatores.

Além do seu papel no desenvolvimento de leucemias, a expressão desregulada de *HOXA10* é comumente observada em tumores ginecológicos

(Lane *et al.*, 2004). Por meio de análise imuno-histoquímica, a expressão de *HOXA10* foi identificada em carcinomas de endométrio, cuja metilação das ilhas CpG na região promotora está associada a uma redução no grau de diferenciação celular (Yoshida *et al.*, 2006). Os mesmos autores verificaram que a expressão forçada de *HOXA10* em linhagem de células de carcinoma de endométrio inibiu o comportamento invasivo (Yoshida *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram verificados por Andikyan & Taylor (2009). Os autores ainda verificaram que *WT-1* reprime a expressão de *HOXA10* associada aos diversos graus histológicos de diferenciação tumoral. A expressão de *HOXA10* foi ainda identificada em tecidos mamários normal e tumoral, bem como em linhagem celular MCF-7 de câncer de mama, mas este gene mostrou-se ausente na linhagem tumoral BT20 (Chu *et al.*, 2004). Quando da superexpressão de *HOXA10* em células BT20, notou-se um aumento na expressão proteica de p53, além de uma redução do potencial invasivo destas células em matrigel (Chu *et al.*, 2004). *HOXA10* também foi associado a tumores do sistema nervoso central. Estudos com 63 amostras de gliomas mostraram uma correlação entre os níveis de metilação de *HOXA10* e grau de diferenciação tumoral de acordo com a classificação da OMS (Di Vinci *et al.*, 2012). Em glioblastomas, hipermetilação de *HOXA10* estava significativamente associada com aumento na sobrevida (Di Vinci *et al.*, 2012). Em esôfago, a expressão de *HOXA10* foi observada em carcinomas, mas não em tecido normal (Chen *et al.*, 2005).

Hassan e colaboradores (2006), em estudo que avaliou todos os membros da família *HOX* em tecidos orais, encontraram uma expressão similar de *HOXA10* entre os tecidos normal, displásico e tumoral. Yamatoji e colaboradores (2010), em reações de qRT-PCR para amostras de mucosa normal e de CEC oral, verificaram que *HOXA10* encontrava-se expresso em tumores, ao contrário do tecido sadio. Esses autores também verificaram o nível de expressão de *HOXA10* em diversas linhagens celulares de CEC oral e compararam aos níveis de linhagem de queratinócitos orais normais. Observou-se que as linhagens tumorais apresentavam diferentes níveis de expressão de *HOXA10*, sempre mais altos em

comparação à linhagem não tumoral. Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (Bitu *et al.*, 2008; Destro *et al.*, 2008), nós verificamos o perfil de expressão de todos os membros da família HOX de genes homeobox em pares de amostras de tecido oral normal e CEC, e ainda em amostras de mucosa oral normal de indivíduos sem histórico de alcoolismo ou tabagismo. Dentre os genes diferencialmente expressos estava *HOXA10*, que não foi detectado em amostras de mucosa oral normal de pacientes sem exposição aos principais fatores de risco para o câncer oral, mas foi observado em 72% das amostras de câncer (Bitu *et al.*, 2012a), sugerindo que a expressão de *HOXA10* pode contribuir para a tumorigênese oral.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Confirmar a superexpressão do gene homeobox *HOXA10* em amostras de CEC oral;

3.2 Estudar o efeito da superexpressão do gene *HOXA10* sobre a proliferação, apoptose, adesão, TEM, migração e invasão em linhagem celular HaCaT de queratinócitos imortalizados mas não transformados;

3.3 Estudar o efeito da inibição do gene *HOXA10* em linhagem celular de CEC oral HSC-3.

4 MATERIAL 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 12 indivíduos saudáveis sem história de tabagismo e etilismo submetidos à tratamento cirúrgico para remoção de leões benignas comuns no Orocentro da FOP-UNICAMP. As amostras de CEC foram coletadas no interior da lesão, evitando áreas de necrose, de 12 pacientes atendidos no Orocentro. A idade destes pacientes variou de 45 a 65 anos, com uma média de 55,25 anos ($\pm 6,94$). A caracterização clínico-patológica dos pacientes está descrita na tabela 1. Os fragmentos foram armazenados em freezer -80°C até posterior isolamento do RNA e síntese de cDNA. Para análise imuno-histoquímica, foram utilizados 10 amostras de mucosa oral normal e 14 amostras de CEC oral dos arquivos do Laboratório de Histopatologia da FOP-UNICAMP.

Tabela 1. Caracterização clínico-patológica das amostras dos pacientes com CEC oral

Parâmetro	Número de Pacientes	
	n	%
Gênero		
<i>Masculino</i>	11	91,6
<i>Feminino</i>	1	8,4
Hábito de Fumar		
<i>Sim</i>	8	66,6
<i>Não</i>	1	8,4
<i>Ex-fumante</i>	3	25
Hábito de beber		
<i>Sim</i>	5	41,6
<i>Não</i>	4	33,3
<i>Ex-etilista</i>	3	25,1
Localização		
<i>Língua</i>	6	50
<i>Assoalho bucal</i>	3	25
<i>Rebordo alveolar</i>	2	16,6
<i>Palato mole</i>	1	8,4
Diferenciação		
histopatológica (OMS)		
<i>Bem diferenciado</i>	4	33,3
<i>Moderadamente diferenciado</i>	7	58,3
<i>Pobremente diferenciado</i>	1	8,4
Total	12	100

4.3 Análise Imuno-Histoquímica

O protocolo utilizado foi o da técnica estreptoavidina-biotina-peroxidase. Cortes com 3 µm foram tratados com solução aquosa de 3% H₂O₂ para inativar a peroxidase endógena e em seguida submetidos a recuperação antigênica em solução de 10 mM ácido cítrico pH 6.0 em panela de pressão elétrica por 15 min.

Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS), os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA, Sigma) por 1 h e então incubados com os anticorpos primários por 16 h a 4°C. Foram utilizados 3 dos 9 anticorpos anti-HOXA10 disponíveis no mercado: anti-HOXA10 (clone A20) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) e anti-HOXA10 (ab48021 e ab23392) da Abcam (Cambridge, USA). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o sistema LSAB como recomendado pelo fabricante (LSAB+ System-HRP kit, Dako). As reações foram reveladas em solução contendo 0,6 mg/ml de 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (Sigma-Aldrich, USA), 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de H₂O₂. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer. Controles negativos e positivos foram sempre realizados. Os controles positivos representaram tecido de endométrio normal, com marcação imuno-histoquímica sabidamente positiva para HOXA10 (Matsuzaki *et al.*, 2009; Langendonck *et al.*, 2010), e os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário.

4.4 Culturas Celulares

Este estudo utilizou as linhagens celulares humanas HaCaT e HSC-3. A linhagem comercial HaCaT de queratinócitos normais imortalizados mas não transformados (Boukamp *et al.*, 1988) foi gentilmente cedida pelo Dr. André Vettore (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo-SP). As células HaCaT foram cultivadas em DMEM (Invitrogen, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab Ltda, Brasil) e antibióticos (Invitrogen, USA). A linhagem celular comercial HSC-3 de origem em tumor de língua (Japan Health Science Research Resources Bank, JRCB 0623) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Tuula Salo (Universidade de Oulu, Oulun Yliopisto, Oulu-Finlândia) e foi cultivada em DMEM/F-12 (Invitrogen, USA), suplementado com 10% de FBS, 100 IU/ml penicilina (Invitrogen, USA), 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen, USA), 50 IU/ml nistatina (Invitrogen, USA), 25 µg/ml anfotericina-B (Invitrogen, USA) e 0,4 µg/ml hidrocortisona (Sigma-Aldrich, USA).

4.5 Plasmídeos, Transfecção e Seleção de Células Superexpressando HOXA10

O plasmídeo de expressão pSR α contendo a sequência normal e completa do cDNA do gene *HOXA10* foi gentilmente doado pela Dr. Elizabeth A. Eklund, Jesse Brown Veterans Affairs Medical Center (Chicago-IL, USA). A transfecção dos vetores foi realizada por meio do método de lipossomos, utilizando Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, USA). Em essência, células cultivadas a uma confluência de 50-60% foram tratadas por 24 h com 3 ml de Opti-MEM (Invitrogen, USA), contendo 6 μ l de Lipofectamine 2000™ (1 μ g/ μ l) e 4 μ g do plasmídeo de interesse. Após o período de transfecção, as células foram lavadas e cultivadas em DMEM contendo 10% de FBS até a confluência, e foram, então, expandidas 1:10 e cultivadas em meio de cultura seletivo contendo o antibiótico Geneticina G418 (400 μ g/ml) (Invitrogen, USA). Para a seleção dos clones as células foram plaqueadas em baixa densidade e cresceram formando colônias, ou seja, clones de uma única célula. Estas colônias foram isoladas e propagadas por tripsinização com o auxílio de anéis de clonagem de 8x8 mm (Millipore, Billerica, MA, USA). As células de cada colônia foram transferidas para uma placa de cultura de 24 wells, cultivadas, expandidas e congeladas em nitrogênio líquido. A confirmação da super-expressão estável do gene *HOXA10* foi realizada por ensaios de qRT-PCR e western blot (anti-HOXA10, clone A20, Santa Cruz, USA).

4.6 Transdução Viral e Seleção de Células Neutralizadas para o Gene HOXA10

Células Phoenix foram plaqueadas a uma confluência de 70-80% em placas de cultura de 6 poços e transfectadas com o vetor retroviral carreando a sequência de short harpin RNA (shRNA) para *HOXA10*. Resumidamente, preparou-se uma solução contendo 250 μ l de meio OptiMEM® e 8 μ l de Lipofectamine 2000® (por cada transfecção), a qual foi incubada por 5 min em temperatura ambiente. Em outro tubo, 4 μ g do vetor retroviral para silenciamento

do gene *HOXA10* (Sistema HuSH-29; OriGene Technologies, USA) foi adicionado a uma solução contendo 0,4 µg de pVSV-G (plasmídeo responsável pelo envelopamento viral) e 1 ml de OptiMEM®. As duas soluções foram então misturadas e incubadas por 20 min à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi gotejada sobre as células empacotadoras cultivadas em OptiMEM por 24 h. Passado esse período, o meio de cultura das células foi trocado por DMEM contendo 1 g/l de glicose e 10% de FBS. Após 24 h esse meio contendo partículas virais foi coletado e novo meio foi adicionado às células Phoenix. O meio coletado foi centrifugado por 5 min a 1000 rpm e adicionado às células alvo, HSC-3. O mesmo procedimento foi repetido por 4 vezes, quando as células Phoenix entraram em confluência e foram descartadas. As células alvo transfectadas foram então submetidas à seleção com antibiótico seletivo (Puomicina, USA) por 15 dias. A confirmação da neutralização da expressão do gene *HOXA10* foi realizada por ensaios de qRT-PCR e western blot.

4.7 qRT-PCR

4.7.1 Isolamento do RNA Total

RNA total foi isolado com o reagente TRIzol (Invitrogen, USA). Células e tecidos foram lavados com PBS gelado e 4 ml de TRIzol foi adicionado e mantido por 5 min à temperatura ambiente. Para as amostras teciduais, no intuito de aumentar a eficácia na extração do RNA dos tecidos, as amostras foram trituradas com o auxílio do homogenizador de tecido. Após a transferência da solução para tubos de 15 ml, adicionou-se 1,6 ml de clorofórmio à cada tubo, seguido de agitação vigorosa por 15 s. Em seguida os tubos foram incubados por 3 min em temperatura ambiente e imediatamente centrifugados por 15 min a 12.000 g a 4°C. A fase aquosa da solução foi, então, transferida para novos tubos e 4 ml de álcool isopropílico foi adicionado para precipitação do RNA. Após homogeneização suave e incubação por 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados novamente por 10 min a 12.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA lavado com 8 ml de 75% etanol. Nova

centrifugação a 7.500 g foi realizada a 4°C por 5 min. O precipitado foi seco e ressuspenso em água livre de DNases e RNases e estocado em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

4.7.2 Análise da Concentração e Integridade do RNA

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria com comprimento de onda de 260 e 280 nm (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). 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. Um µg de RNA foi misturado à 5x tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) e aplicados no gel. Após eletroforese a 100 V, o gel foi documentado com o sistema Kodak Digital Science™ equipado com câmera digital DC40 (Eastman Kodak Co., USA).

4.7.3 Síntese de cDNA

Dois µg de RNA total foram incubados com enzima a DNase I AmpGrade, (Invitrogen, USA) por 15 min à temperatura ambiente para eliminação de contaminação por DNA genômico. A enzima foi então inibida por meio da adição de 1 µl de EDTA a 25 mM pH 8 (Invitrogen, USA) e levada ao termociclador para aquecimento a 65°C por 10 min. Seguiu-se com a adição de 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen, USA) e 1 µl da mistura de dNTPs a 10 mM (Invitrogen, USA). Após incubação por 5 min a 65°C, e posterior resfriamento das amostras em gelo por 1 min, adicionou-se 4 µl de 5x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 µl DTT a 0,1 mM e 1 µl da enzima RNaseOUT (Invitrogen, USA), e a amostra voltou ao termociclador por mais 2 min, a 42°C. Por fim, 1 µl da enzima SuperScript II RT (Invitrogen, USA) foi adicionada aos tubos e os mesmo, então, incubados em termociclador por 50 min a 42°C e 15 min a 70°C.

4.7.4 Reações de qRT-PCR

Todos os experimentos foram realizados no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc., USA) em um volume final de 25 μ l. Para os genes estudados (*HOXA10*, *GAPDH*, *PPIA*, N-caderina, E-caderina e β -catenina; Tabela 2) foram realizados cinética de amplificação numa reação de qRT-PCR usando diferentes concentrações de primers e diferentes diluições de uma mesma amostra. As concentrações dos primers foram padronizadas considerando a utilização das menores concentrações possíveis, a fim de evitar a formação de dímeros, e a obtenção dos menores valores de CTs. Obtidas as condições ideais, cada reação foi realizada na presença de 12,5 μ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., USA), 2 μ l de uma solução 10 nM de cada primer, 1 μ l de cada amostra de cDNA e H₂O DNase/RNase free q.s.p. 25 μ l. As reações foram realizadas em triplicatas em placas de 96 wells MicroAmp® Optical (Applied Biosystems Inc., USA). As condições de amplificação consistiram em 2 min a 50°C para a ativação da enzima AmpErase (Applied Biosystems Inc., USA), 10 min a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq gold DNA polymerase (Applied Biosystems Inc., USA), seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s e 1 min a 57°C para o pareamento dos primers e extensão. Ao final da amplificação foi adicionado uma etapa de 20 min de duração, na qual a temperatura aumentou gradualmente de 57°C para 95°C a 0,2°C por s com a contínua aquisição da fluorescência (Morrison *et al.*, 1998). Para determinar a eficiência de amplificação dos primers específicos para o transcrito de interesse e normalizadores (*GAPDH* ou *PPIA*) foi construída uma curva padrão utilizando 4 diferentes concentrações de cDNA em triplicata (1; 0,5; 0,25 e 0,125 ng) obtidas por meio de diluição seriada de cDNA das respectivas linhagens celulares estudadas (HaCaT e HSC-3).

Tabela 2. Pares de primers usados nas reações de qRT-PCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
<i>HOXA10</i>	GGTACGGACAGACAAGTGAAAATCTT	GGAAGTGAAAAACCGCGTCGCCTGG
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTGCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
<i>PPIA</i>	GCTTTGGGTCCAGGAATGG	GTTGTCCACAGTCAGCAATGGT
<i>N-caderina</i>	TGGGAATCCGACGAATGG	GCAGATCGGACCGGATACTG
<i>E-caderina</i>	ACAGCCCCGCCTTATGATT	TCGGAACCGCTTCCTTCA
<i>B-catenina</i>	TGCCATTCCACGACTAGTTTCA	CGTACGGCGCTGGGTATC

4.7.5 Análise da Expressão Gênica

A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método de quantificação relativa a um gene normalizador (*GAPDH* ou *PPIA*). Calculou-se a expressão gênica pela equação matemática proposta por Pfaffl (2001), que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (E). Para a linhagem celular HaCaT utilizou-se como gene normalizador o *GAPDH*, enquanto *PPIA* foi utilizado para as reações com a linhagem celular HSC-3.

4.8 Western Blot

Culturas celulares foram coletadas, lavadas em PBS e incubadas com tampão de lise ANITA (20 mM Tris pH 8, 137 mM NaCl, 10% Glicerol, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0,5% sódio dodecil sulfato (SDS), 1 mM fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSP), 1 mM N-etilmaleimida, 1 mM ditioneitol (DTT), 10 mg/ml inibidor de tripsina, 1 mg/ml leupeptina e 1 mg/ml aprotinina). Após centrifugação e determinação da dosagem proteica, misturou-se 80 µg de proteína total de cada amostra com tampão de amostra redutor (2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 8, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 20% DTT), fervida por 10 min e separada eletroforéticamente em gel 12% SDS-PAGE. O material eletroforizado foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 µm; Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). As membranas foram bloqueadas por 16 h a 4°C com TBST acrescido de 10% leite desnatado e

incubadas com anticorpos primários anti-HOXA10 (clone A20, Santa Cruz, USA) e anti-p21 (clone C-19, Santa Cruz, USA) por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase e reveladas com o kit de quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amershan Pharmacia Biotech, USA). A membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico.

4.9 Análise da Proliferação Celular

A análise da proliferação celular foi realizada pelo método de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) ao DNA. Para isso, células foram plaqueadas na concentração de 3×10^3 células por poço placas de 96 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 48 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. Transcorridas 24 h de indução da proliferação celular, adicionou-se BrdU (Cell Proliferation ELISA BrdU Colorimetric, Roche Applied Science, Germany) na diluição de 1:10. Após 2 h de incorporação, o meio de cultura foi removido e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante. A placa foi então levada para leitura da absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 370 nm com correção em 492 nm.

4.10 Ensaio de Apoptose

A marcação com anexina V-FITC com posterior análise por citometria de fluxo foi utilizada no intuito de determinar o índice de apoptose celular. 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 e 1,8 mM CaCl₂) contendo anexina V-FITC na concentração de 1:500. Após marcação por 20 min no escuro, à temperatura ambiente, as células foram lavadas com tampão de ligação, centrifugadas à 3000 rpm por 3 min e o pellet foi ressuspensão em tampão de ligação contendo 0,1% de paraformaldeído. As células foram mantidas em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo

FACScalibur, equipado com um laser de argônio (Beckton-Dickinson, USA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra.

4.11 Análise da Transição Epitélio-Mesênquima (TEM)

O papel do gene *HOXA10* na TEM foi verificada por western blot e qRT-PCR avaliando os marcadores N-caderina, E-caderina e β -catenina. As reações foram realizadas como descrito previamente. Tabela 3 descreve os anticorpos primários específicos contra as proteínas de interesse, enquanto que a tabela 2 descreve as sequencias dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados nos experimentos de Western Blot para avaliação das proteínas associadas à TEM.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
N-caderina	32/N-cadherin	BD Biosciences	1:2500
E-caderina	36/E-cadherin	BD Biosciences	1:2000
β -catenina	14/ β -catenin	BD Biosciences	1:1000

4.12 Ensaio de Adesão Celular

A influência de *HOXA10* na adesão celular foi verificada em superfícies tratadas com proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina) ou na superfície sem tratamento (plástico). No dia anterior ao experimento, poços de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com 100 μ l de PBS contendo 10 μ g/cm² de colágeno tipo I e 5 μ g/cm² de fibronectina (BD Biosciences, EUA) por 16 h a 4°C, em câmara úmida. No dia do experimento, os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ l 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, ressuspendidas em meio de cultura contendo 10% de FBS e diluídas a uma concentração final de 1×10^4 células por 100 μ l de meio de cultura. Após a lavagem dos poços, 100 μ l da solução

contendo células foram adicionados e incubados por 1 h, à 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 aderidas foi determinado pela coloração com azul de toluidina (Humphries, 2001). Resumidamente, as 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 de solução aquosa de 1% SDS foi adicionado e incubado por 5 min. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de ELISA e absorvância foi medida no comprimento de onda de 655 nm.

4.13 Ensaio de Migração Celular

Ensaio de migração foram realizados no sistema Transwell (Coletta *et al.*, 2008), utilizando-se de insertos de 6,5 mm de diâmetro com membrana de policarbonato contendo poros de 8 µm (Transwell®, Corning, USA). Células cultivadas na ausência de FBS por 48 h foram tripsinizadas e levadas a uma concentração de 8x10⁴ células/200 µl de meio de cultura sem FBS. A câmara inferior do sistema recebeu 500 µl de meio de cultura acrescido de 10% de FBS (fator quimiotático), enquanto a câmara superior recebeu 200 µl da solução de células. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ durante 24 h. Os insertos foram inseridos em poços contendo 500 µl de solução de formalina 10% por 15 min no intuito de fixar as células. Os mesmos foram, então, lavados e corados com 1% azul de toluidina em solução aquosa de 1% bórax por 5 min. Após exaustiva lavagem para remoção do excesso de corante, os insertos foram limpos com hastes flexíveis contendo algodões nas extremidades no intuito de remover resíduos de corante e, também, as células que não migraram através da membrana. Imergiram-se os insertos em 250 µl de solução aquosa de 1% SDS e incubou-se por 10 min. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de ELISA e absorvância foi medida no comprimento de onda de 655 nm.

4.14 Ensaio de Invasão Celular com Matrigel

Ensaio de invasão foram realizados no sistema Transwell/Matrigel. Os insertos de 6,5 mm de diâmetro com membrana de policarbonato contendo poros de 8 μm (Transwell®, Corning, USA) receberam uma fina camada de Matrigel diluído 1:4 em meio de cultura (50 μl , BD Biosciences, USA) e foram incubados a 37°C por 2 h. Durante este período, células cultivadas na ausência de FBS por 48 h foram tripsinizadas e levadas a uma concentração de 8×10^4 células/200 μl de meio de cultura sem FBS. A câmara inferior do sistema recebeu 500 μl de meio de cultura acrescido de 10% FBS (fator quimiotático), enquanto a câmara superior recebeu 200 μl da solução de células. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 durante 72 h. Os insertos foram inseridos em poços contendo 500 μl de solução de formalina 10% por 15 min no intuito de fixar as células. Os insertos foram lavados e corados com 1% azul de toluidina em solução aquosa de 1% bórax por 5 min. Após exaustiva lavagem para remoção do excesso de corante, os mesmos foram limpos com hastes flexíveis contendo algodões nas extremidades no intuito de remover o excesso de matrigel e também as células que não o invadiram. Imergiram-se os insertos em 250 μl de solução aquosa de 1% SDS e incubou-se por 10 minutos. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de ELISA e absorvância foi medida no comprimento de onda de 655 nm.

4.15 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e repetidos, pelo menos, 3 vezes. Os dados são apresentados como porcentagem relativa da média \pm desvio padrão de experimentos independentes em relação ao controle. Mann-Whitney foi o teste de escolha e o nível de significância empregado foi de 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o programa GraphPad Prism®, versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão de HOXA10 em Amostras de Mucosa Oral Normal e CECs Oraís

Para confirmar a superexpressão do gene *HOXA10* na oncogênese oral, reações de qRT-PCR foram realizadas para comparar os níveis transcricionais de HOXA10 em amostras de mucosa oral normal e CEC. Como esperado, a expressão de HOXA10 foi significativamente mais elevada em amostras de CEC oral quando comparado com amostras de tecido normal ($p=0,0023$; Fig. 2). Para as reações imuno-histoquímicas foi possível detectar imunoreatividade no tecido de endométrio normal utilizado como controle positivo. Não houve, no entanto, marcação positiva para nenhum dos casos de mucosa oral normal e CEC analisados (Fig. 3).

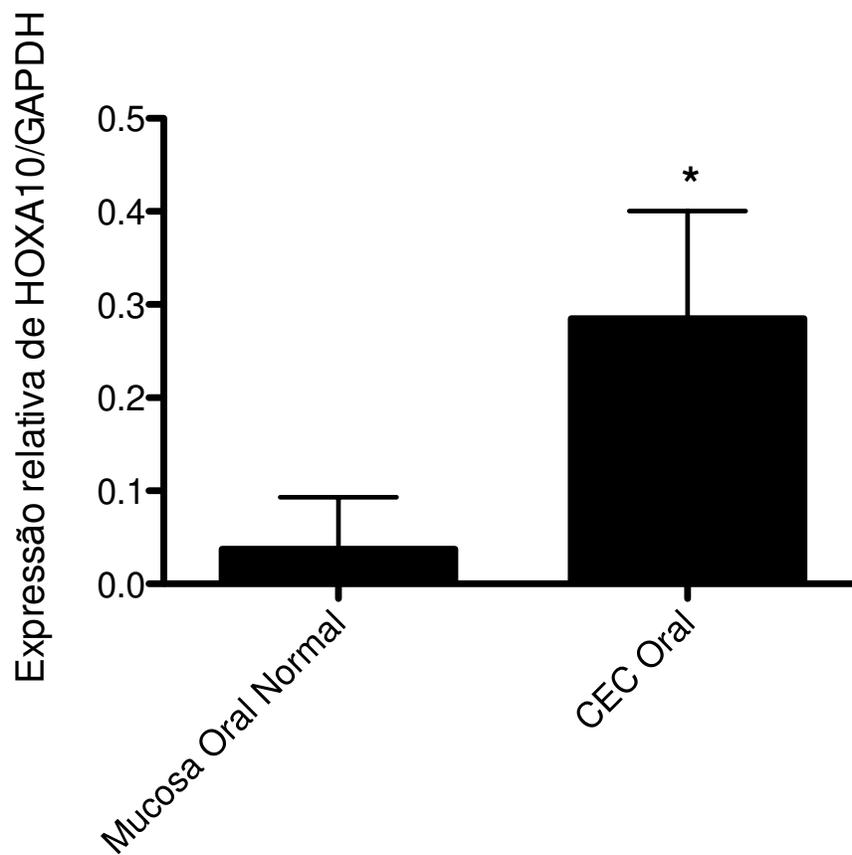


Figura 2. HOXA10 é significativamente mais expresso em amostras de CEC oral comparado com mucosa oral normal. Doze amostras de mucosa oral normal e 12 de CEC oral foram submetidas a análise por qRT-PCR para HOXA10 e GAPDH, usado como normalizador da reação. * $p=0,0023$

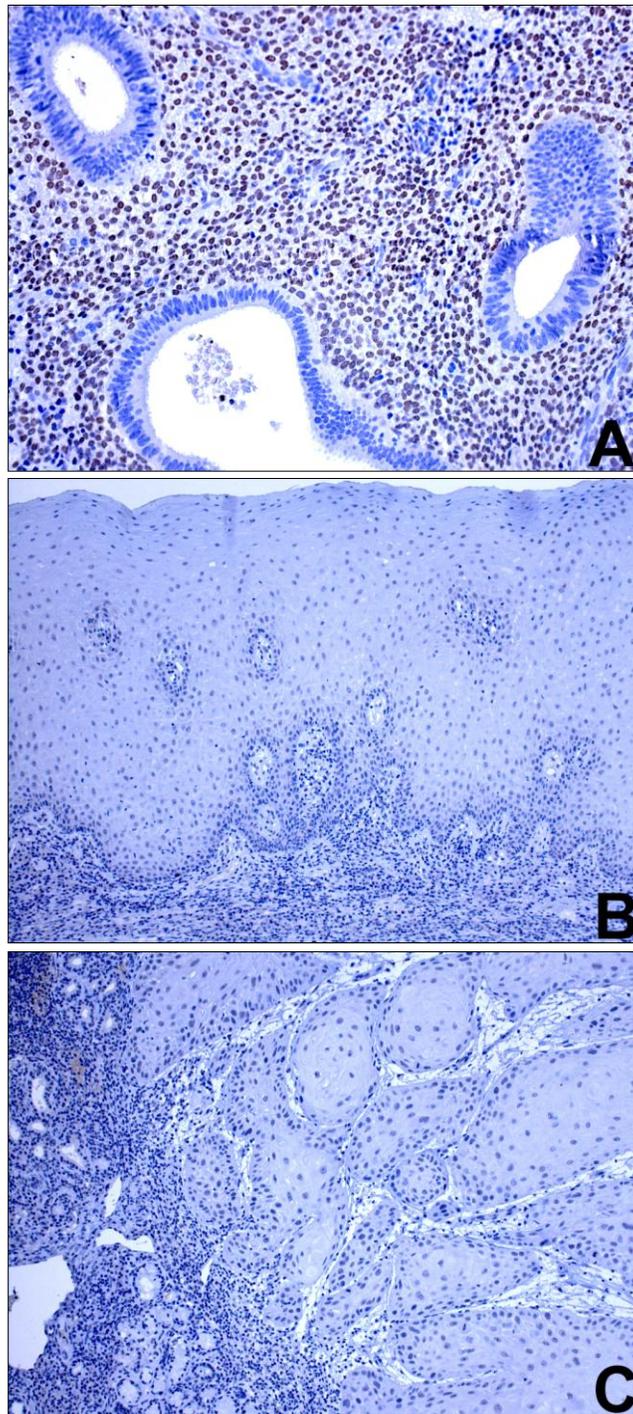


Figura 3. Análise imuno-histoquímica de HOXA10. Note a intensa e específica marcação nuclear para HOXA10 nas células estromais na amostra de endométrio normal usada como controle positivo **(A)**. Nenhuma das amostras de mucosa oral com epitélio normal **(B)** e CEC **(C)** demonstrou positivamente para HOXA10.

5.2 Efeitos da Superexpressão do Gene *HOXA10* na Linhagem de Queratinócitos HaCaT

No intuito de verificar os efeitos da superexpressão de *HOXA10* na oncogênese oral, optou-se por superexpressar este gene em uma linhagem de queratinócitos imortalizados mas não transformados com pequenos níveis endógenos de expressão de *HOXA10*. Um clone com expressão estável foi estabelecido após transfecção das células HaCaT com plasmídeo pSR α *HOXA10* e consequente aquisição da resistência ao antibiótico seletivo G418. As figuras 4 e 5 ilustram por ensaios de qRT-PCR e western blot, respectivamente, o sucesso da superexpressão de *HOXA10*.

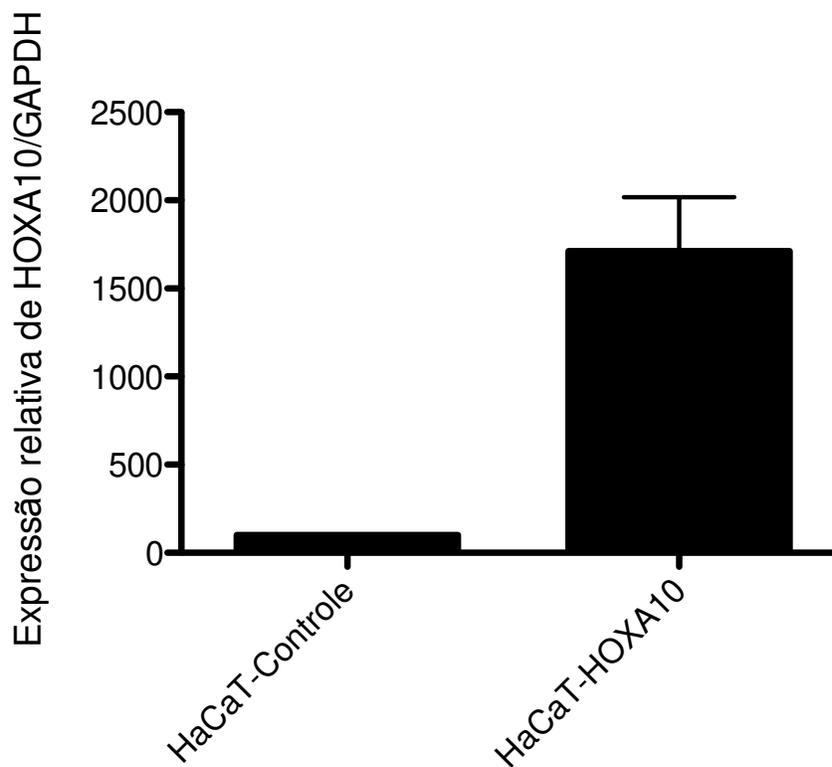


Figura 4. Caracterização do clone celular superexpressando *HOXA10*. Após seleção dos clones celulares, ensaios de qRT-PCR foram realizados para verificar os níveis de expressão de *HOXA10*. Note a superexpressão de *HOXA10* no clone transfectados com o plasmídeo específico.

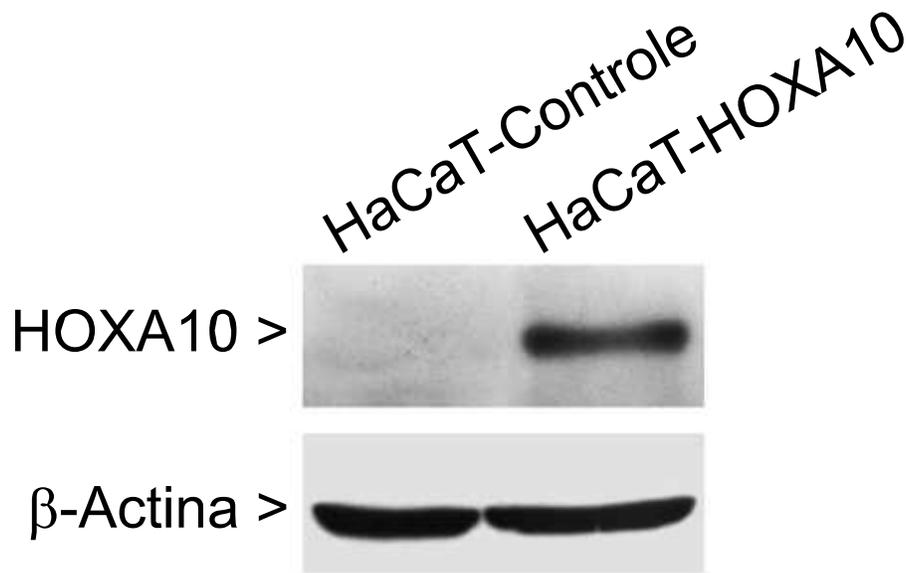


Figura 5. Caracterização dos clones celulares de células HaCaT por ensaios de western blot. Os níveis proteicos de HOXA10 não foram detectados por ensaios de western blot nas células HaCaT-Controle, enquanto que a superexpressão foi evidente na linhagem HaCaT-HOXA10.

O primeiro fenótipo avaliado nos clones celulares foi o índice de proliferação celular, que foi determinado por meio da incorporação de BrDU ao DNA celular. Não existiu diferença estatisticamente significativa entre o potencial proliferativo do clone HaCaT-HOXA10 quando comparado com o clone HaCaT-Controle (Fig. 6). A influência da superexpressão de HOXA10 sobre a taxa de apoptose celular foi verificada pela marcação com Anexina V-FITC e posterior detecção por citometria de fluxo. A superexpressão de HOXA10 também não exerceu nenhum efeito significativo sobre a taxa de morte celular programada das células HaCaT (Fig. 7).

Para a análise da perda de características epiteliais no clone que superexpressa HOXA10, nós investigamos inicialmente os níveis de expressão dos marcadores N-caderina, E-caderina e β -catenina por meio de reações de qRT-PCR. A expressão de N-caderina foi significativamente maior no clone HaCaT-HOXA10 em comparação ao clone HaCaT-Controle ($p=0,028$, Fig. 8). Embora a

expressão de E-caderina não tenha sofrido influência da superexpressão de HOXA10, os níveis de β -catenina foram significativamente maiores no clone HaCaT-HOXA10 ($p=0,039$; Fig. 8). A análise por western blot indicou que embora a superexpressão do mRNA de N-Caderina e β -catenina tenham sido moduladas pela superexpressão de HOXA10, os níveis proteicos de nenhum dos marcadores de TEM foi alterado (Fig. 9).

A influência de *HOXA10* na adesão celular foi testada em superfícies tratadas com colágeno tipo I e fibronectina. Como controle, a adesão diretamente ao plástico (superfície sem tratamento) foi utilizada. Notou-se que o clone HaCaT-HOXA10 apresentou diferença significativamente menor ($p=0,0310$) na adesão ao plástico, enquanto que a adesão do clone HaCaT-HOXA10 ao colágeno tipo I foi significativamente maior ($p=0,049$) quando comparados ao clone HaCaT-Controle. Não houve diferença significativa entre os clones no que diz respeito ao tratamento de superfície com fibronectina ($p=0.93$; Fig. 10).

A capacidade de migração celular foi verificada no sistema Transwell®. A superexpressão de HOXA10 significativamente induziu a mobilidade das células HaCaT quando comparado com as células controle ($p=0,008$; Fig. 11).

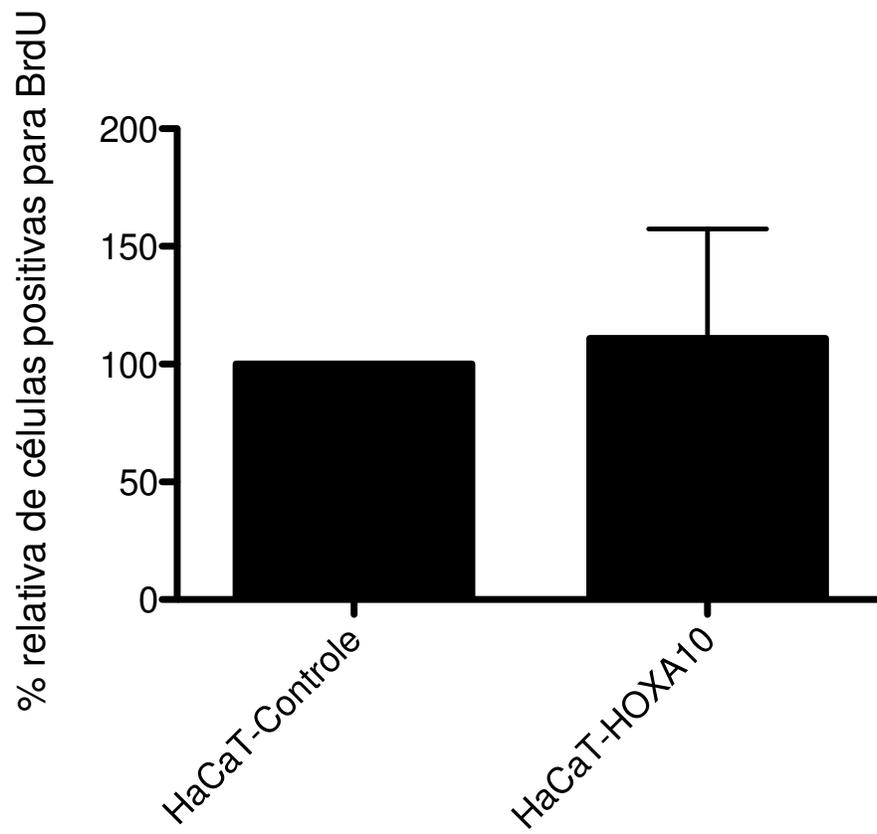


Figura 6. A superexpressão de HOXA10 não foi capaz de modular a proliferação das células HaCaT. Após quantificação da incorporação de BrdU não foi possível detectar diferença entre o clone superexpressando HOXA10 e os clones controle ($p=0,53$).

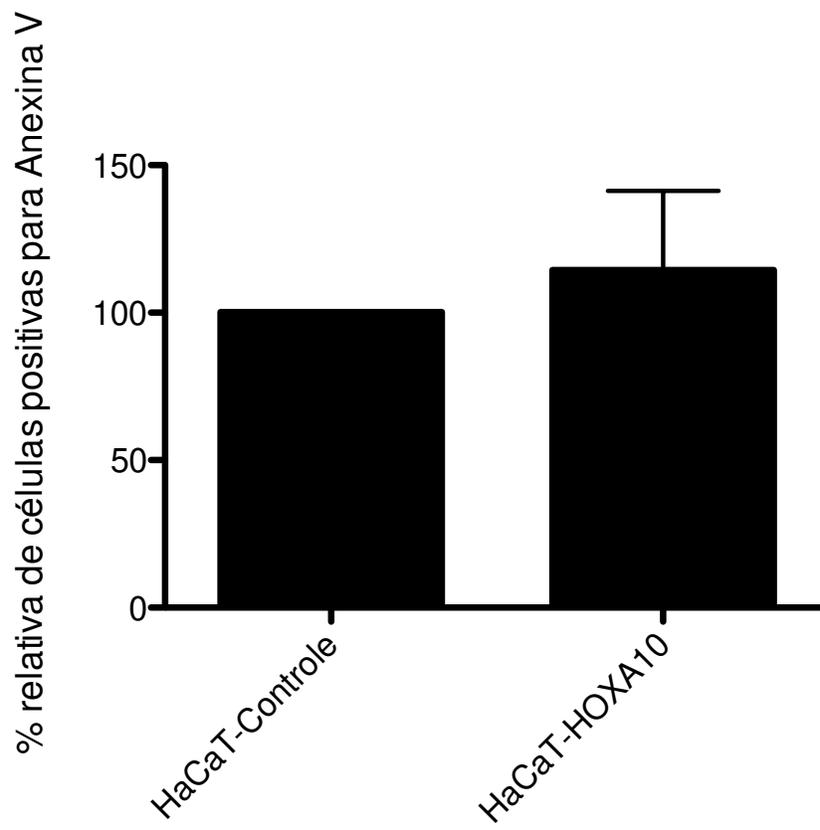


Figura 7. Avaliação da taxa de morte celular programada nos clones celulares. Após tripsinização, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e submetidas a análise por citometria de fluxo. Não houve diferença significativa entre os clones HaCaT-Control e HaCaT-HOXA10 ($p=0.70$).

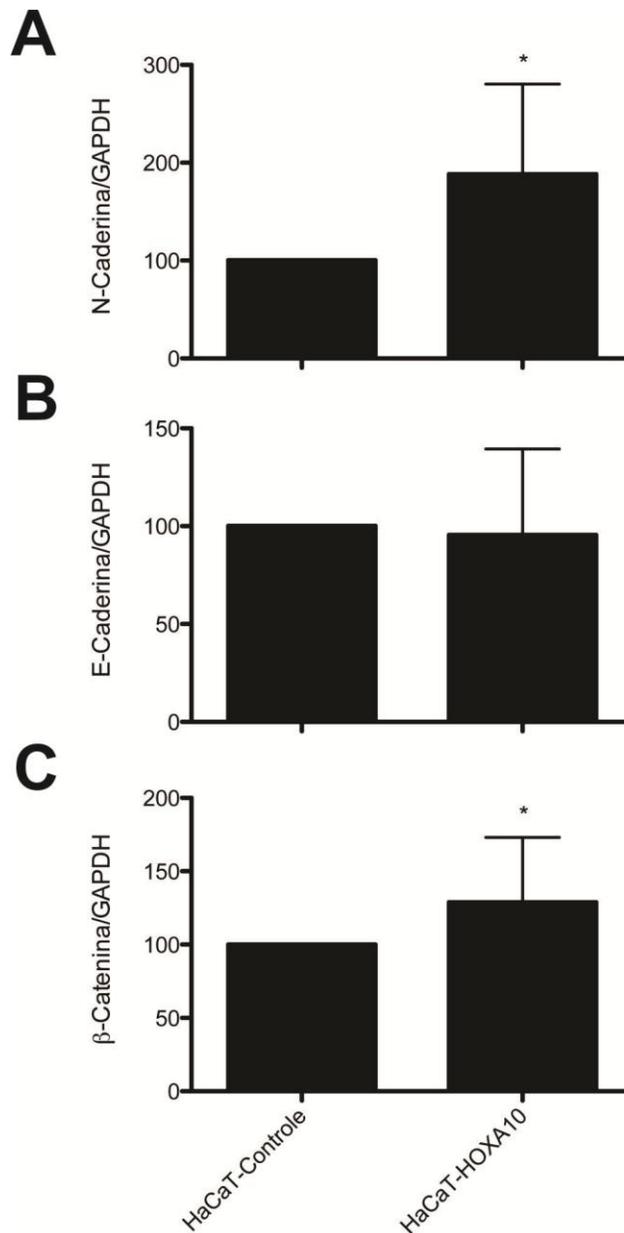


Figura 8. Análise da expressão relativa dos marcadores de TEM nos clones celulares controle e superexpressando HOXA10. Ensaio de qRT-PCR foram realizados para verificar a quantidade de transcritos de N-caderina (**A**), E-caderina (**B**) e β -catenina (**C**). A expressão de N-caderina e de β -catenina foram significativamente maiores no clone HaCaT-HOXA10 em comparação ao clone controle ($p=0,028$ e $p=0,038$). A expressão de E-caderina não foi diferente entre os clones HaCaT-Control e HaCaT-HOXA10 ($p=0,97$).

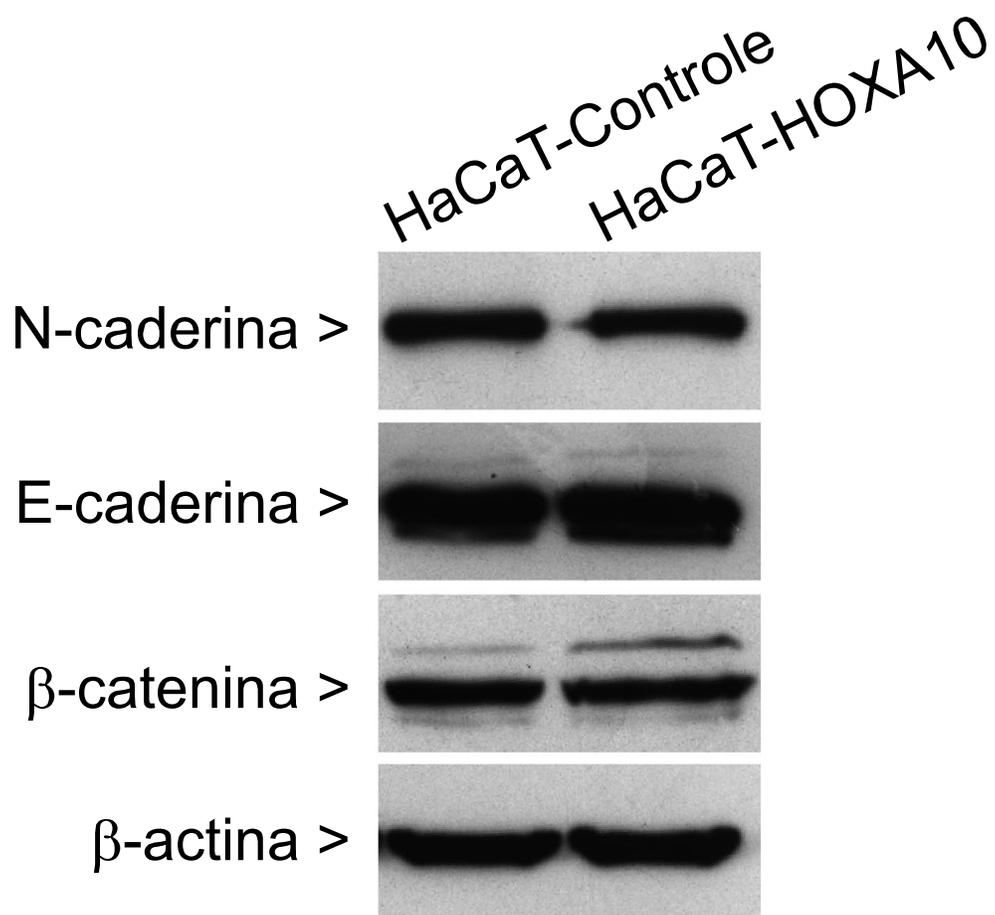


Figura 9. A superexpressão de *HOXA10* não modula a TEM na linhagem celular de queratinócitos HaCaT. Ilustração representativa da reação de western blot para os marcadores N-caderina, E-caderina e β -catenina da TEM. Não foi possível detectar diferenças na abundância de N-caderina, E-caderina e β -catenina entre os clones HaCaT-Controle e HaCaT-HOXA10. A reação de β -actina foi utilizada como normalizador.

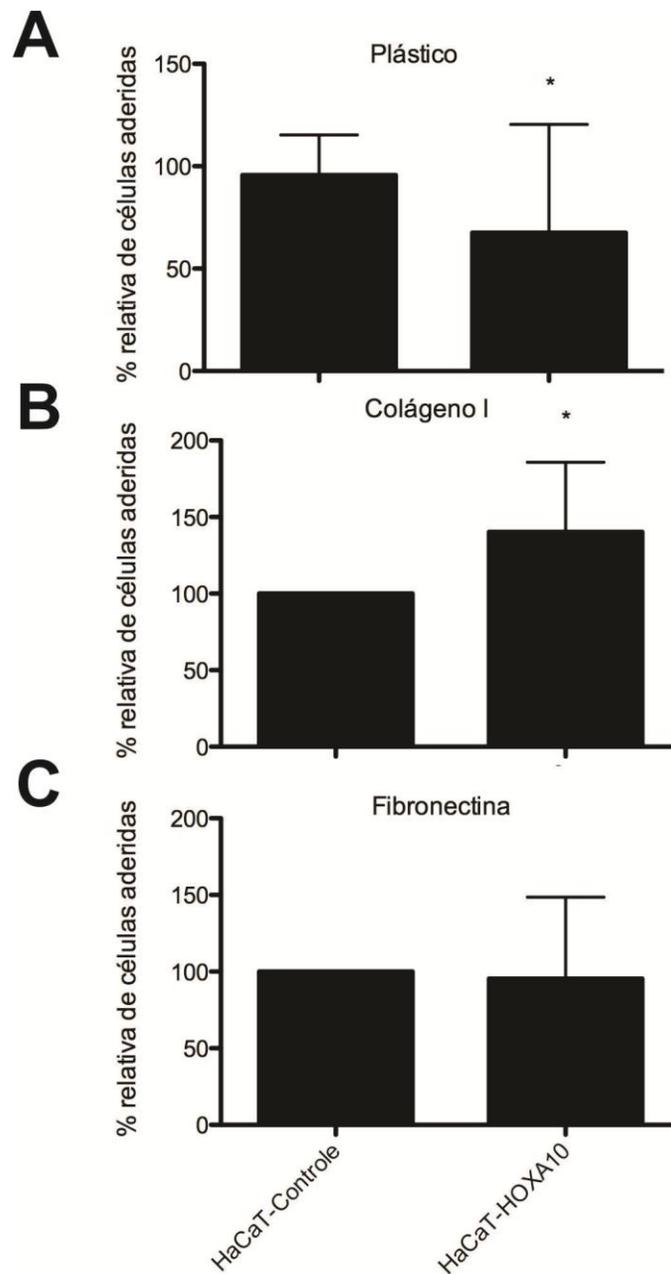


Figura 10. A superexpressão de HOXA10 influencia a adesão das células HaCaT. Os clones celulares foram submetidos a ensaios de adesão em superfícies tratadas com colágeno tipo I e fibronectina. O clone HaCaT-HOXA10 demonstrou uma adesão significativamente menor ao plástico ($p=0.0310$) e maior na superfície tratada com colágeno I ($p=0,049$) que as células HaCaT-Controle. Não houve diferença na adesão à superfície tratada com fibronectina ($p=0,93$).

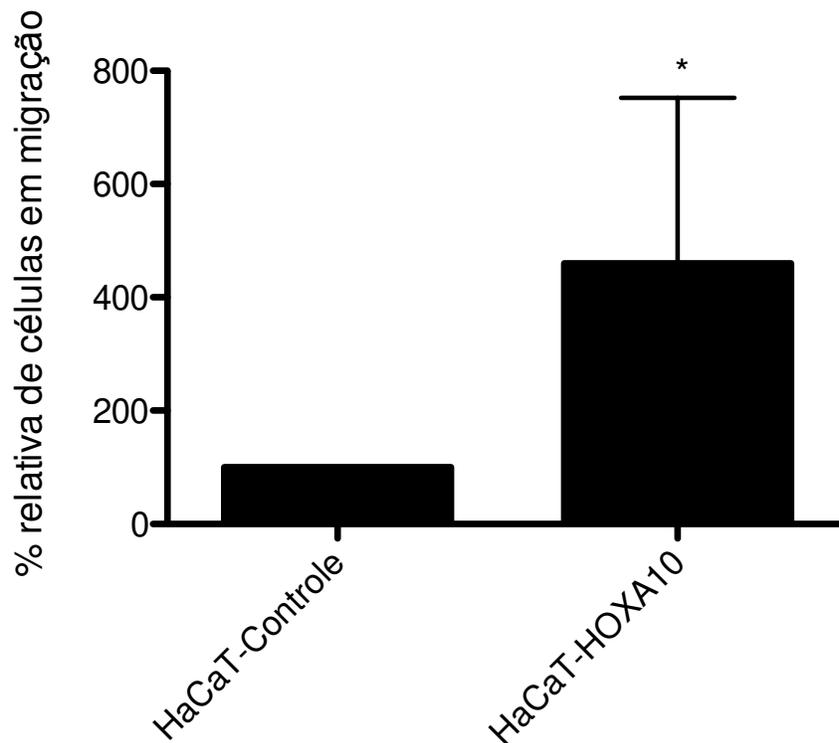


Figura 11. Superexpressão de HOXA10 induziu a migração das células HaCaT. Após carenciamento de 48 h, as células foram submetidas à presença de fatores quimiotáticos presentes no soro fetal bovino no intuito de verificar a capacidade de migração no sistema Transwell®. Note que o clone HaCaT-HOXA10 mostrou-se com capacidade de migrar através dos poros das membranas quando comparado as células HaCaT-Controle ($p=0,008$).

5.3 Efeitos da Neutralização de HOXA10 na Linhagem Celular HSC-3

No intuito de verificar os efeitos do silenciamento do gene *HOXA10* no comportamento biológico do câncer oral, optou-se por neutraliza-lo na linhagem celular HSC-3 de tumor de língua, a qual expressava endogenamente altos níveis de *HOXA10*. Após transdução de um retrovírus expressando uma sequencia de shRNA específica contra os transcritos de *HOXA10*, os clones celulares estáveis foram selecionados pelos tratamento com puromicina. Figuras 12 e 13 ilustram os ensaios de qRT-PCR e western blot para confirmação do silenciamento deste gene. Embora a inibição da transcrição tenha sido de aproximadamente 48%, os ensaios de western blot revelaram ausência do produto proteico do gene *HOXA10* na linhagem estavelmente expressando a sequência específica de shRNA contra *HOXA10*.

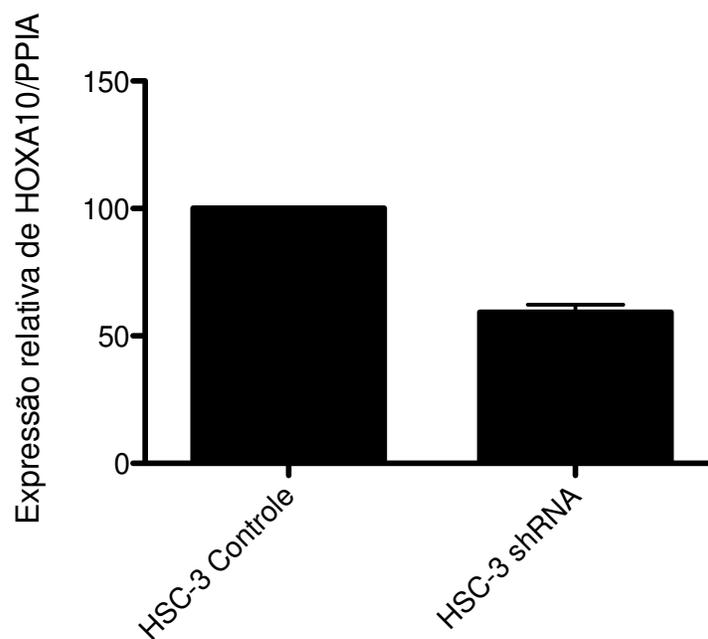


Figura 12. Ensaio de qRT-PCR para verificação da expressão relativa de *HOXA10* nas células HSC-3-Controle e HSC-3-shRNA, a qual expressa a sequencia de

shRNA específica contra HOXA10. A neutralização foi de aproximadamente 50% quando comparada com a linhagem controle.

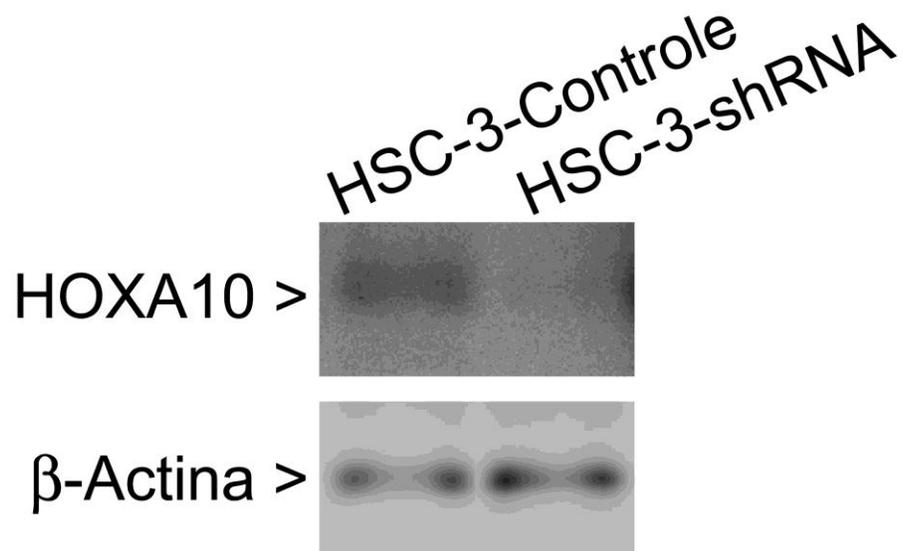


Figura 13. Caracterização das linhagens celulares HSC-3-Control e HSC-3-shRNA por western blot. Nota-se ausência de expressão de HOXA10 na linhagem HSC-3-shRNA em comparação à linhagem HSC-3-Control.

A inibição de HOXA10 significativamente reduziu a proliferação celular das células de CEC oral. Células HSC-3-shRNA demonstraram taxas significativamente menores de incorporação de BrDU ao DNA quando comparado às células HSC-3-Control (Fig. 14; $p < 0,0001$). Para melhor entender o efeito da neutralização de HOXA10 sobre a proliferação das células HSC-3, ensaios de western blot contra a proteína p21 foram realizados. Como esperado, as células HSC-3-shRNA demonstraram níveis marcadamente maiores de p21 quando comparado as células HSC-3-Control (Fig. 15). O silenciamento de HOXA10 não alterou as taxas de morte celular por apoptose na linhagem HSC-3 (Fig. 16).

No que diz respeito à expressão de marcadores de TEM, os ensaios de qRT-PCR evidenciaram uma significativa diferença na expressão dos marcadores N-caderina, E-caderina e β-catenina entre as linhagens controle e silenciada para HOXA10 (Fig. 17). Notou-se significativo aumento dos níveis de N-caderina

($p=0,0002$), o qual foi acompanhado pela redução nas expressões de E-caderina ($p=0,0002$) e β -catenina ($p=0,0002$). Os ensaios de western blot para verificação do produto proteico dos marcadores de TEM revelaram resultados semelhantes, como ilustrado na Figura 18. O silenciamento de HOXA10 facilitou a adesão das células de modo significativo tanto ao colágeno tipo I ($p=0,0493$) quanto à superfície tratada com fibronectina ($p=0,0493$). A superfície que não recebeu tratamento (plástico) não indicou diferença entre as duas linhagens ($p=0,1282$; Figura 19).

Os ensaios de migração revelaram uma diferença significativa entre as linhagens HSC-3-Controle e HSC-3-shRNA ($p<0,0001$; Fig. 20), assim como capacidade de invasão das células HSC-3-shRNA foi significativamente maior em comparação a linhagem HSC-3-Controle (Fig. 21; $p=0,0021$).

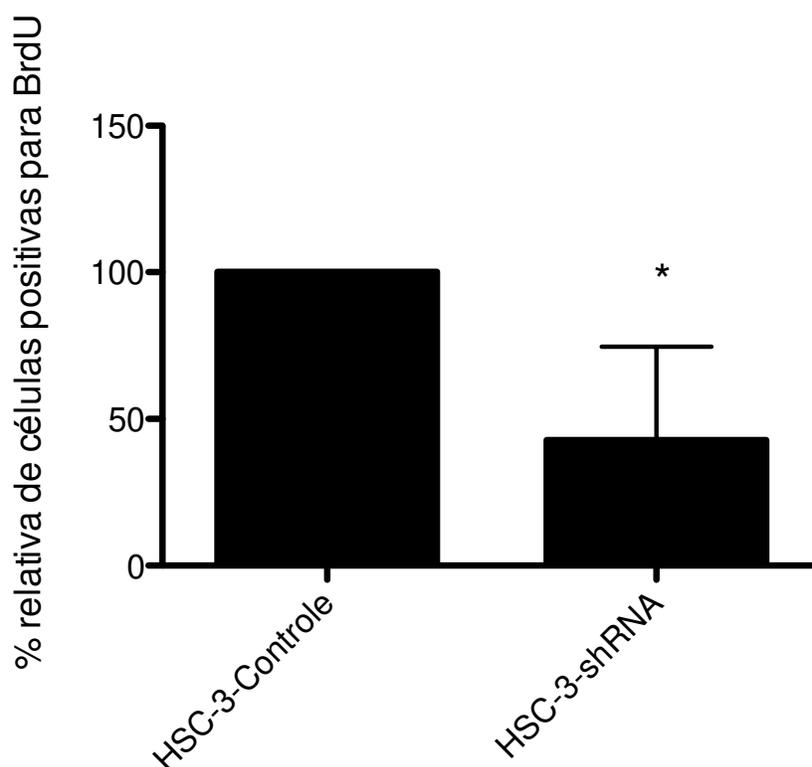


Figura 14. *HOXA10* controla a proliferação celular das células de CEC de língua HSC-3. A proliferação celular foi determinada pelo índice de incorporação de BrDU

ao DNA celular. Nota-se inibição do potencial proliferativo das células após silenciamento do gene *HOXA10* (* $p < 0,0001$).

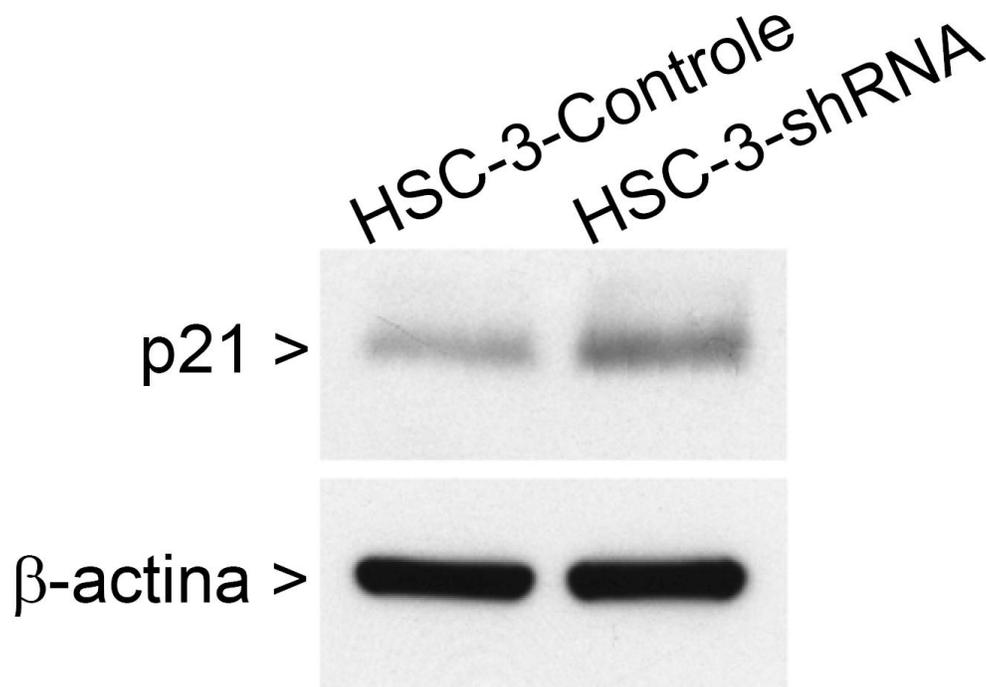


Figura 15. Expressão de p21 é modulada por HOXA10. Células HSC-3-Controle e HSC-3-shRNA foram coletadas e submetidas a ensaio de western blot para detecção de p21. Os níveis de p21 foram marcadamente maiores nas células HSC-3-shRNA quando comparado com as células HSC-3-Controle, suportando o efeito de HOXA10 no controle da proliferação celular.

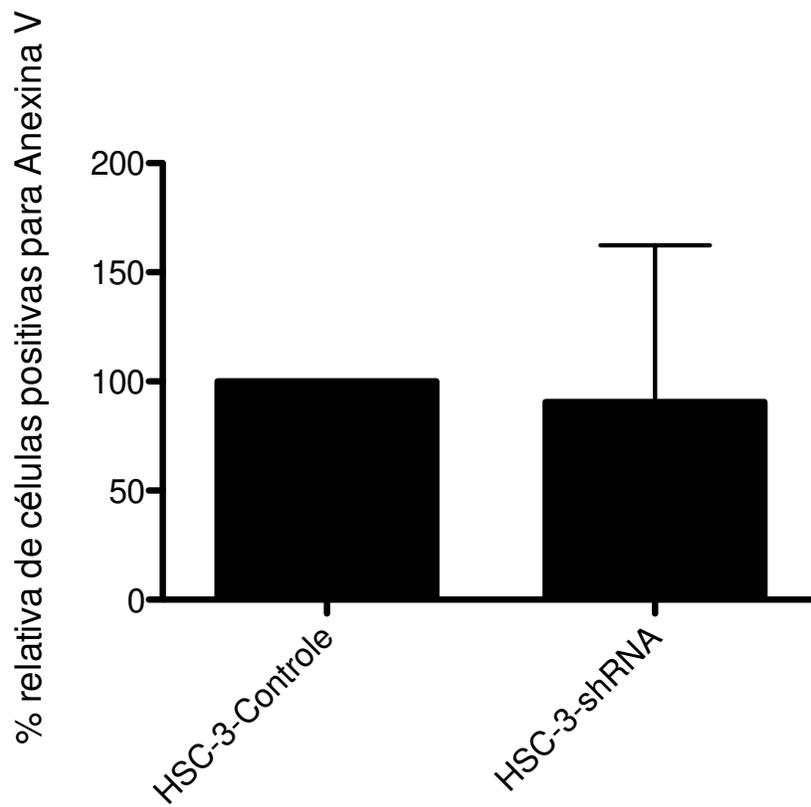


Figura 16. Determinação do índice de apoptose nas linhagens HSC-3-Control e HSC-3-shRNA. Não houve diferença no nível de marcação para Anexina V entre ambas as linhagens celulares após análise por citometria de fluxo ($p=0,6823$).

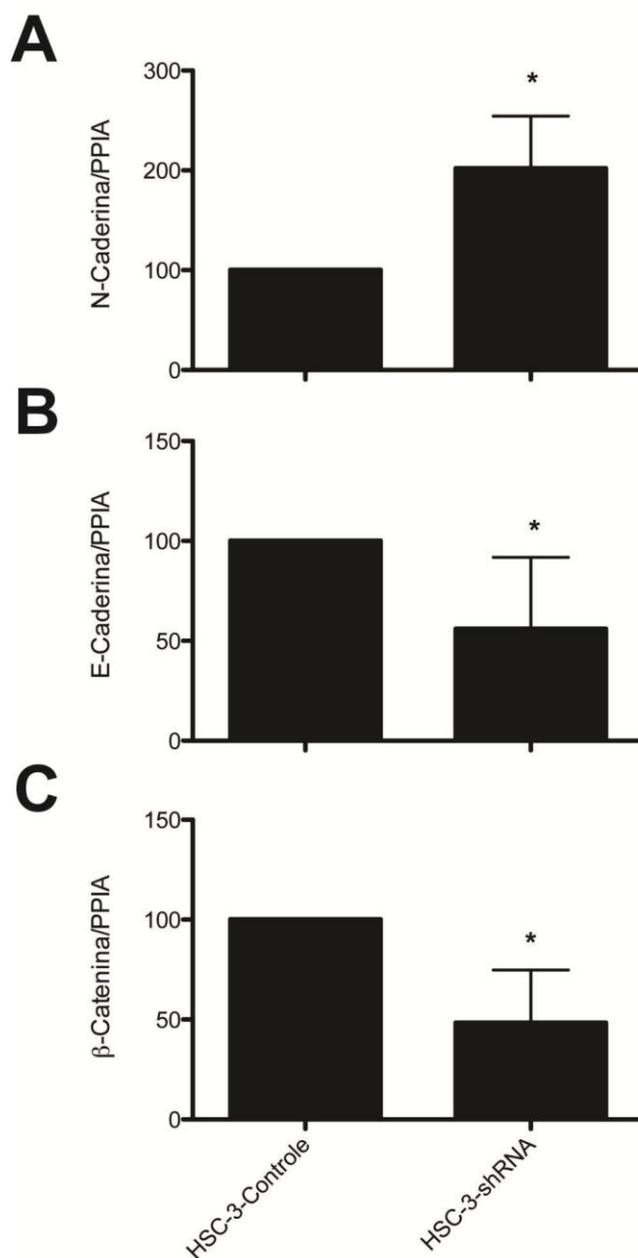


Figura 17. Análise da expressão dos marcadores de TEM nas linhagens HSC-3-Controle e HSC-3-shRNA. O silenciamento de *HOXA10* modulou a quantidade dos transcritos de N-caderina **(A)**, E-caderina **(B)** e β -catenina **(C)**. Expressão de N-Caderina foi acentuadamente maior nas células neutralizadas em comparação à linhagem controle, enquanto que a expressão de E-Caderina e β -Catenina foram significativamente menores nas células silenciadas com gene *HOXA10* (* $p=0,0002$).

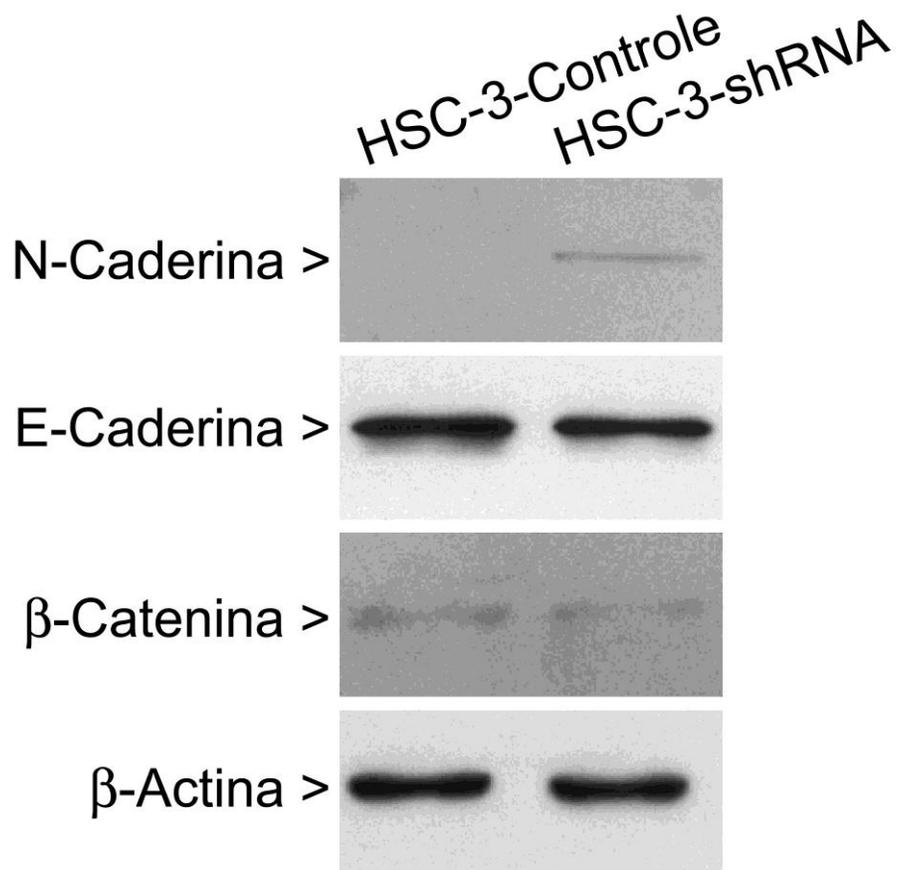


Figura 18. A expressão de HOXA10 modula os níveis proteicos dos marcadores de TEM. Os achados dos ensaios de qRT-PCR foram confirmados nas reações de western blot. A expressão proteica de N-caderina, E-caderina e β-Catenina foi reduzida nas células HSC-3-shRNA.

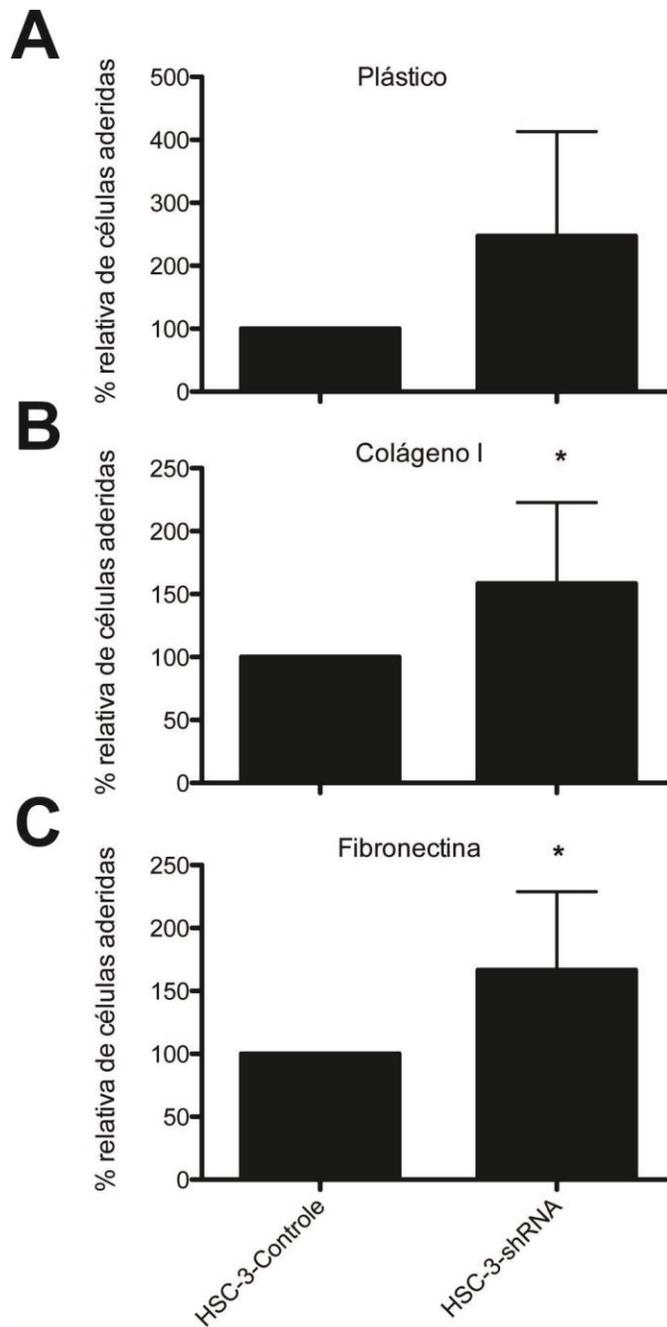


Figura 19. Ensaio de adesão celular para os clones HSC-3-Control e HSC-3-shRNA. A neutralização de HOXA10 modulou a adesão das células HSC-3-shRNA ao colágeno tipo I e à fibronectina ($p=0,049$). Não houve diferença na adesão ao plástico entre as linhagens HSC-3-Control e HSC-3-shRNA ($p=0,12$).

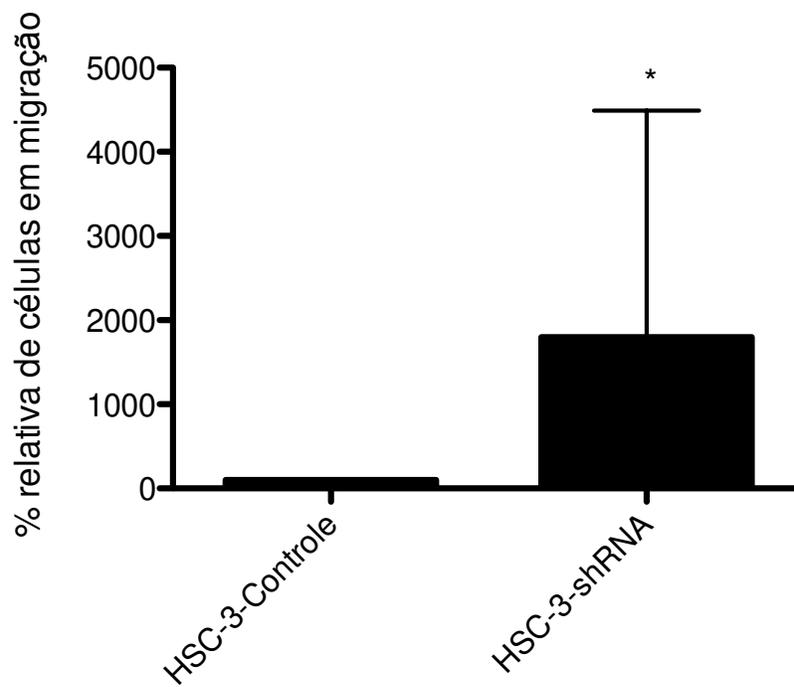


Figura 20. Efeito da neutralização de HOXA10 sobre a migração celular. Ensaio de migração celular no sistema Transwell® indicou uma maior migração nas células HSC-3-shRNA em relação à HSC-3-Control (p<0,0001).

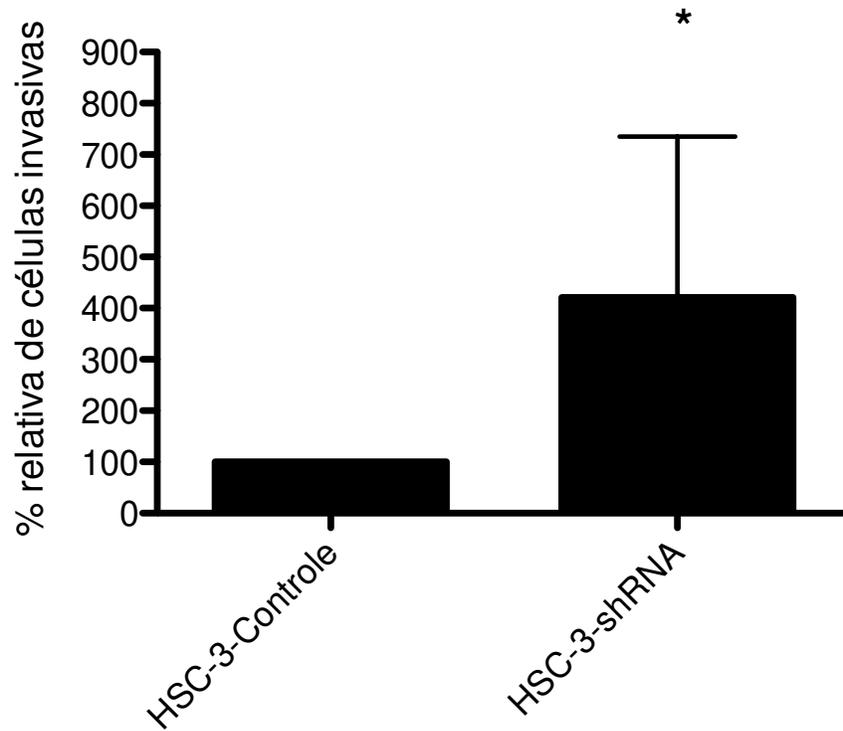


Figura 21. A neutralização de HOXA10 promoveu um fenótipo mais invasivo das células HSC-3. O ensaio de invasão celular no sistema Transwell®/Matrigel evidenciou um aumento significativo na invasão das células HSC-3-shRNA em comparação as células HSC-3-Control (p=0,0021).

6 DISCUSSÃO

Os genes *HOX* codificam fatores de transcrição que controlam uma grande quantidade de eventos celulares tais como proliferação, diferenciação, apoptose e estabelecimento do padrão axial do embrião (Ford, 1998). O envolvimento dos genes *HOX* na oncogênese está amplamente aceito e estabelecido, embora não se saiba o mecanismo exato pelo qual muitos membros desta família de genes homeobox exercem sua função durante o desenvolvimento tumoral (Abate-Shen, 2002; Samuel & Naora; 2005).

A relação de *HOXA10* com a oncogênese oral foi inicialmente descrita por Hassan e colaboradores (2006) em um estudo que verificou o padrão de expressão dos transcritos de todos os genes da família *HOX* em amostras orais de tecido normal, displásico e tumoral. Posteriormente, Yamatoji *et al.* (2010) detectaram a expressão aberrante deste gene em amostras de tecido tumoral bem como em linhagens celulares oriundas de CECs orais. Similarmente, nosso grupo demonstrou que *HOXA10* é expresso em níveis significativamente maiores em amostras de carcinoma oral comparado com mucosas orais normais (Bitu *et al.*, 2008), motivando uma análise mais profunda sobre a participação deste gene na tumorigênese oral. Em adição, nenhum dos trabalhos prévios realizou estudos funcionais *in vitro* que determinassem o papel deste gene nos eventos celulares envolvidos com a oncogênese oral. Inicialmente nós validamos a expressão de *HOXA10* em amostras orais de mucosa normal e CEC por qRT-PCR e imuno-histoquímica. Enquanto os ensaios de qRT-PCR confirmaram que os níveis de mRNA para *HOXA10* são significativamente maiores em câncer comparado com mucosa normal, a marcação imuno-histoquímica não demonstrou nenhuma positividade nas amostras orais. A mais razoável explicação para tal ausência de marcação reside na pequena abundância da proteína associada a menor sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica comparada com qRT-PCR. É importante destacar que a amostra utilizada como controle positivo revelou uma distinta e intensa marcação nuclear, demonstrando a funcionalidade e

especificidade do anticorpo. Interessantemente, o estudo de Yamatoji e colaboradores (2010) obteve sucesso na marcação imuno-histoquímica com o mesmo anticorpo utilizado por nós em amostras de CEC oral, mas a figura ilustrativa contida no manuscrito não permite uma identificação clara das células positivas e do compartimento celular marcado (núcleo vs. citoplasma), permitindo questionamentos quanto à marcação.

O papel de HOXA10 como indicador de prognóstico foi avaliado em poucos estudos. Ao relacionar os dados clínicos de 134 pacientes com tumores gástricos com a expressão de HOXA10, Sentani *et al.* (2012) demonstraram uma correlação inversa entre o número de células positivas e o padrão de invasão tumoral, e o prognóstico foi significativamente mais favorável para os tumores positivos para HOXA10 comparado com os casos negativos. Estudos com amostras de gliomas mostraram uma correlação entre os níveis de metilação da região promotora de *HOXA10* e o grau de diferenciação tumoral de acordo com a classificação da OMS (Di Vinci *et al.*, 2012). Em adição, a expressão de HOXA10 em tumores de endométrio e ovário foi progressivamente reduzida à medida que ocorreu uma perda do padrão de diferenciação tumoral, revelando que a expressão reduzida de HOXA10 piora o prognóstico do paciente (Yoshida *et al.*, 2006; Andikian & Taylor, 2009). Em contraste, Li e colaboradores (2009) avaliaram o valor prognóstico da expressão de HOXA10 em 29 amostras de adenocarcinomas de células claras de ovários e verificaram que a presença deste gene correlacionou negativamente com a sobrevida em 5 anos das pacientes estudadas. Em uma análise de 119 casos de leucemia mielóide aguda, a sobrevida global e a resistência à terapia apresentaram uma correlação negativa com a expressão de HOXA10 (Andreef *et al.*, 2008). Drabkin *et al.* (2002) demonstraram que *HOXA10* está entre os genes *HOX* mais abundantemente expressos em leucemias mielóides agudas com prognóstico classificado como ruim, indicando que as características citogenéticas favoráveis estão associadas a uma menor expressão deste gene. Ainda, o estudo de Yamatoji e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão deste gene no carcinoma oral

correlacionou positivamente com um pior estadiamento tumoral, induzindo um menor período livre de doença e sobrevida global. Em conjunto, os resultados destes estudos revelam uma clara participação do gene *HOXA10* no desenvolvimento tumoral, contudo, existem significante diferenças no valor prognóstico da marcação entre os tecidos acometidos pelo tumor, ou, ainda, entre o mesmo tipo tumoral. No presente estudo, no entanto, não foi possível verificar a correlação entre os níveis de expressão de *HOXA10* e os dados clínicos dos pacientes, uma vez que a marcação imunohistoquímica não foi bem-sucedida.

A metilação das ilhas CpG na região promotora é um dos principais mecanismos para o silenciamento gênico com papel importante na oncogênese (Chen *et al.*, 2004). A metilação de *HOXA10* foi descrita em diversos tipos de neoplasias e foi associado a diferentes graus de classificação histológica, bem como ao prognóstico e características clínicas dos pacientes (Chen *et al.*, 2004; Fiegl *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Di Vinci *et al.*, 2012). Em glioblastomas, hipermetilação de *HOXA10* está significativamente associada ao aumento na sobrevida dos pacientes (Di Vinci *et al.*, 2012). Em tumores de mama, os níveis de metilação de *HOXA10* nas ilhas CpG de carcinomas ductais invasivos foram significativamente maiores do que em carcinomas ductais in situ (Park *et al.*, 2011). Em neoplasias de ovário os níveis de metilação de *HOXA10* foram maiores em tumores pobremente diferenciados (Fiegl *et al.*, 2008). Yoshida e colaboradores (2006) verificaram que o grau de metilação de *HOXA10* em tumores de endométrio foi crescente à medida que havia perda de diferenciação tumoral, enquanto amostras de endométrio normal não apresentaram metilação deste gene. Portanto, especula-se se a perda da metilação de *HOXA10* possui um papel significativo na oncogênese, regulando a presença ou não do produto gênico.

Zhou e colaboradores (2011) relataram uma associação entre o cigarro e a expressão de *HOXA10* em tecido uterino. Os autores mostraram que camundongos expostos à fumaça do cigarro tiveram os níveis de mRNA e proteína de *HOXA10* aumentados. Os autores também verificaram um aumento da

expressão de HOXA10 após exposição de células de endométrio ao extrato da fumaça do cigarro. Com base nesses dados, especula-se se a expressão aberrante de HOXA10 em CECs orais estaria relacionada ao tabagismo, uma vez que o fumo está diretamente associado ao desenvolvimento desta doença.

No presente estudo foi possível verificar que o gene *HOXA10* possui ativa participação durante o processo de oncogênese oral. Os ensaios funcionais com inibição da expressão na linhagem de CEC de língua indicaram que *HOXA10* contribuiu significativamente para a redução do padrão de proliferação celular, modulação de p21, bem como no aumento da capacidade invasiva e adesiva destas células. Em adição, a neutralização deste gene nas células tumorais foi capaz de alterar o perfil de expressão de proteínas associadas a TEM, induzindo a expressão de N-caderina e suprimindo as expressões de E-caderina e β -catenina. Evidências prévias em linhagem tumoral de células de mama indicam que o papel de *HOXA10* na capacidade proliferativa pode ser atribuído à ação reguladora deste gene sobre p21, por meio da ligação à região promotora de *CDKN1A* (Bromleigh & Freedman, 2000), promovendo parada do ciclo celular e, assim, reduzindo a proliferação celular. Animais submetidos a transplante de medula óssea com células silenciadas para HOXA10 tiveram seu potencial proliferativo reduzido em comparação aos controles. Como esperado, a análise destas células *in vitro* indicou uma mudança no ciclo celular, com reduzido número de células na fase S e uma multiplicação reduzida (Orlovsky *et al.*, 2011). Chu e colaboradores (2004) relataram que HOXA10, quando expresso em linhagem celular de câncer de mama, foi capaz de reduzir o fenótipo invasivo destas células, bem como modular a expressão de p53. Mishra *et al.* (2009) descreveram a relação entre MLL1, uma metiltransferase de histona, histona H3K4 e RNA polimerase II (RNAPII) com a regulação de HOXA10 durante o ciclo celular. Em células HeLa, altos níveis de RNAPII, recrutamento de MLL1 e trimetilação de H3K4 foram observados no início da fase S, e atenuados ao longo do ciclo celular, correlacionando com os níveis de expressão gênica de HOXA10, indicando que HOXA10 possui um papel na regulação do ciclo celular. Em adição, HOXA10 foi

implicado na regulação da expressão de E-caderina em células de carcinoma de endométrio (Yoshida *et al.*, 2006) por meio do papel regulatório deste gene sobre a proteína Snail, cuja capacidade de induzir TEM e reprimir a transcrição de E-caderina foram previamente descritas (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2012). A expressão de HOXA10 tem sido vinculada à adesão celular por meio da regulação de *ITGB3*, gene que codifica a integrina $\alpha\beta3$, em linhagem de células endometriais (Daftary *et al.*, 2002) e linhagem de células mielóides (Bei *et al.*, 2007).

Contrastando com os efeitos encontrados com a neutralização de HOXA10 nas células HSC-3, a superexpressão na linhagem de queratinócitos normais imortalizados porém não transformados HaCaT afetou poucos dos fenótipos celulares estudados. Foi possível observar elevados níveis de mRNA de N-caderina e β -catenina no clone superexpressando HOXA10 sem que houvesse, no entanto, qualquer alteração no perfil proteico dos mesmos. Em adição, a superexpressão de HOXA10 foi capaz de induzir uma menor adesão das células ao plástico e uma maior adesão a superfície tratada com colágeno tipo I, condizente com o fenótipo migratório desenvolvido por estas células. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados após silenciamento de HOXA10 na linhagem celular HSC-3. É importante ressaltar que por se tratarem de linhagens celulares distintas, o perfil molecular de cada célula é único. Logo, este efeito contraditório possivelmente está associado ao fato de que a grande maioria dos genes da família HOX necessita de cofatores para efetuar suas funções (Svingen & Tonissen, 2006). Os membros da família de proteínas TALE, Pbx e Meis foram descritos como sendo cofatores de HOXA10, promovendo especificidade na ligação com o gene alvo (Mann & Chan, 1996). Esses complexos de ligação ao DNA podem ativar ou reprimir genes alvo, dependendo da expressão temporal ou espacial (Bromleigh & Freedman, 2000; Eklund *et al.*, 2000; Sarno *et al.*, 2005). No sistema hematológico, esses complexos podem exercer função dúbia, comportando-se como agentes promotores da proliferação e da diferenciação celular (Bromleigh & Freedman, 2000; Eklund *et al.*, 2000; Sarno

et al., 2005). A ausência de ligação entre HOX e seu suposto co-fator poderia induzir a ligação à outros sítios intimamente relacionados resultando em uma regulação anormal e um direcionamento equivocado a genes alvos específicos (Svingen & Tonissen, 2006). A coexpressão com seu cofator irá guiar a ligação das proteínas HOX aos seus alvos específicos, ditando o perfil de genes ativados ou reprimidos por HOX em diferentes tipos celulares (Daftary & Taylor, 2006; Svingen & Tonissen, 2006).

A participação de *HOXA10* no controle da apoptose ainda é discutível. No presente estudo, o silenciamento de *HOXA10* não foi capaz de influenciar os níveis de apoptose. A ação de *HOXA10* sobre a apoptose em células de endométrio humano (HESC) também foi inexpressiva após seu silenciamento (Lu *et al.*, 2008). A neutralização de *HOXA10* em linhagem celular de leucemia mielóide aguda também não influenciou os índices apoptóticos destas células (Orlovsky *et al.*, 2011). No entanto, o tratamento de células de leucemia mielóide crônica com inibidor de Abl quinase para indução de uma superexpressão de *HOXA10* promoveu um aumento significativo nas taxas de apoptose (Sugimoto *et al.*, 2008).

Em essência, os resultados do presente estudo, em concordância com os achados da literatura, sugerem que a expressão de *HOXA10* parece ser dúbia e dependente do tecido de origem. Embora os resultados de indução de TEM e migração celular tenham sido semelhantes entre as linhagens superexpressando e silenciada para *HOXA10*, o conjunto dos efeitos da neutralização de *HOXA10* em linhagem celular de CEC oral indicam que a expressão de *HOXA10* modula eventos importantes para o desenvolvimento e progressão dos CECs orais. Os resultados dos ensaios de proliferação, transição epitélio-mesenquima, adesão, migração e invasão celular indicaram que a expressão de *HOXA10* no CEC oral corresponde a um fenótipo tumoral menos agressivo. No intuito de consolidar a expressão deste gene como um possível biomarcador tumoral, se faz necessário o desenvolvimento de estudos de correlação clínico-patológicos com uma casuística ampla, bem como uma análise mais profunda dos eventos moleculares envolvidos

na regulação deste gene e de seus alvos.

7 CONCLUSÃO

7.1 HOXA10 está superexpresso em CECs orais.

7.2 A superexpressão de HOXA10 na linhagem de queratinócitos HaCaT aumentou os níveis de mRNA de N-caderina e β -catenina, mas não alterou o produto proteico.

7.3 A superexpressão de HOXA10 em queratinócitos HaCaT reduziu a adesão celular ao plástico e aumentou a adesão a superfície tratada com colágeno tipo I, além de induzir um potencial migratório nas células.

7.4 A neutralização de HOXA10 reduziu a proliferação celular em células HSC-3, mas não alterou o índice apoptótico destas células.

7.5 O silenciamento de HOXA10 foi capaz de modular o potencial migratório, invasivo e adesivo das células HSC-3, bem como a expressão de proteínas associadas a TEM.

REFERÊNCIAS*

- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2002; 2:777-85.
- 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: 1437-1444.
- Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M *et al.* Nuclear translocation of β -catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology* 2011; 59: 283-91.
- Andikyan V, Taylor HS. WT1 represses HOX gene expression in the regulation of gynaecologic tumour histologic type. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 4522-31.
- Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen W *et al.* HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 2008; 22: 2041-7.
- Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A *et al.* Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res* 2008; 28: 2535-9.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 229-49.
- Bahrami SB, Veisheh M, Dunn AA, Boudreau NJ. Temporal changes in *HOX* gene expression accompany endothelial cell differentiation of embryonic stem cells. *Cell Adh Migr* 2011; 5: 133-141.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-9.
- Bei L, Lu YF, Bellis SL, Zhou W, Horvath E, Eklund EA. Identification of a HOXA10 activation domain necessary for transcription of the gene encoding β 3 integrin during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282: 16846-59.
- 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; 87: 1737-1745.
- 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. Tese de Mestrado 2008.
- Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP *et al.* HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer* 2012; 12: 146.
- Bitu CC, Carrera M, Lopes MA, Kowalski LP, Soares FA, Coletta RD. HOXB7 expression is a prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2012; 60:662-5.
- Benson GV, Nguyen TH, Maas RL. The expression pattern of the murine Hoxa-10 gene and the sequence recognition of its homeodomain reveal specific properties of Abdominal B-like genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1591-601.
- Bhatia N, Spiegelman VS. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2005; 42: 213-21.
- Bose P, Klimowicz AC, Kornaga E, Petrillo SK, Matthews TW, Chandarana S *et al.* Bax expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12:332.
- Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresch DA. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* 1997; 139: 257-64.

- Boukamp P, Fusenig NE. "Trans-differentiation" from epidermal to mesenchymal/myogenic phenotype is associated with a drastic change in cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *J Cell Biol* 1993; 120: 981-93.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761-71.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ *et al.* Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712-7.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-7.
- Bromleigh VC, Freedman LP. p21 is a transcriptional target of *HOXA10* in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev* 2000; 14: 2581-6.
- Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C *et al.* Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67: 1274-84.
- 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; 21: 4247-56.
- Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, da Silva LE, da Fonseca EC, de Faria PA *et al.* Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009; 45: 225-33.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76-83.

- Cantile M, Franco R, Tschan A, Baumhoer D, Zlobec I, Schiavo G *et al.* HOX D13 expression across 79 tumor tissue types. *Int J Cancer* 2009; 125: 1532-41.
- Capellini TD, Zappavigna V, Selleri L. Pbx homeodomain proteins: TALEnted regulators of limb patterning and outgrowth. *Dev Dyn* 2011; 240: 1063–1086.
- Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. *HOXB7* constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4842-51.
- 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; 65: 7177-85.
- 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: 924-35.
- Chen Q, Lipkina G, Song Q, Kramer RH. Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 850-6.
- 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; 11:1044-9.
- Chu MC, Selam FB, Taylor HS. *HOXA10* regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3:568-72.
- Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 2001; 188: 161-9.
- Cogliano V, Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncol* 2004; 5: 708.
- Coletta RD, Christensen KL, Micalizzi DS, Jedlicka P, Varella-Garcia M, Ford HL. Six1 overexpression in mammary cells induces genomic instability and is sufficient for malignant transformation. *Cancer Res* 2008; 68: 2204-13.
- Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* 1994; 370: 304-7.

- Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK *et al.* Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 1999; 94: 519-28.
- Daftary GS, Troy PJ, Bagot CN, Young SL, Taylor HS. Direct regulation of beta3-integrin subunit gene expression by *HOXA10* in endometrial cells. *Mol Endocrinol* 2002;16: 571-9.
- Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 2006; 27: 331-55.
- D'Antó V, Cantile M, D'Armiento M, Schiavo G, Spagnuolo G, Terraciano L *et al.* The *HOX* genes are expressed, in vivo, in human tooth germs: in vitro cAMP exposure of dental pulp cells results in parallel HOX network activation and neuronal differentiation. *J Cell Biochem* 2006; 97: 836–848.
- Dekker EJ, Pannese M, Houtzager E, Timmermans A, Boncinelli E, Durston A. *Xenopus Hox-2* genes are expressed sequentially after the onset of gastrulation and are differentially inducible by retinoic acid. *Dev Suppl* 1992: 195-202.
- Destro M. Análise dos níveis de expressão dos membros da família *HOX* de genes homeobox localizados nos loci B e C em mucosa oral normal e carcinoma espinocelular oral. Tese de Mestrado 2008.
- De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP *et al.* Overexpression of *HOXB7* homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol* 2010; 36: 141-9.
- de Vicente JC, Olay S, Lequerica-Fernandez P, Sánchez-Mayoral J, Junquera LM, Fresno MF. Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 140-5.
- Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42: 190-200.

- Di Vinci A, Casciano I, Marasco E, Banelli B, Ravetti GL, Borzì L *et al.* Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 35-47.
- Duboule D, Morata G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 1994; 10: 358-64.
- Duboule D. The rise and fall of *HOX* gene cluster. *Development* 2007; 134: 2549-60.
- Durston AJ, Jansen HJ, In Der Rieden P, Hooiveld Michiel HW. *Hox* collinearity – a new perspective. *Int J Dev Biol* 2012; 55: 899-908.
- Eklund EA, Jalava A, Kakar R. Tyrosine phosphorylation of HoxA10 decreases DNA binding and transcriptional repression during interferon gamma -induced differentiation of myeloid leukemia cell lines. *J Biol Chem* 2000; 275: 20117-26.
- Fasanmade A, Kwok E, Newman L. Oral squamous cell carcinoma associated with khat chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104: 53-5.
- Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 7551-9.
- Fiegl H, Windbichler G, Mueller-Holzner E, Goebel G, Lechner M, Jacobs IJ *et al.* HOXA11 DNA methylation--a novel prognostic biomarker in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2008; 123: 725-9.
- Ford HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol Int* 1998; 22: 397-400.
- Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 777-83
- Friedmann Y, Daniel CA, Strickland P, Daniela CW. *HOX* genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Res* 1994; 54: 5981-5985.

- Gehring WJ, Müller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Qian YQ *et al.* The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet* 1990; 6: 323-9.
- Gehring WJ. Exploring the homeobox. *Gene* 1993; 135: 215-221.
- Gehring WJ. How do Hox transcription factors find their target genes in the nucleus of living cells? *Biol Aujourdhui* 2011; 205: 75-85.
- Golpon HA, Geraci MW, Moore MD, Miller HL, Miller GJ, Tuder RM *et al.* *HOX* genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Pathol* 2001; 158: 955-66.
- 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 U S A* 1997; 94: 7458-63.
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 1989; 57: 367-78.
- 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: 154–171.
- Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1184-97.
- Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, Zhang X, Kashiwazaki H, Yamazaki Y, Inoue N, Moriuchi T. Aberrant expression of *HOX* genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res* 2006; 16: 217-24.
- Holland PWH, Booth HAF, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology* 2007; 5: 47.

- 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: 1235–1245.
- 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: 437-41.
- Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 127-35.
- 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; 64: 9185-92.
- Jung C, Kim RS, Zhang H, Lee SJ, Sheng H, Loehrer PJ *et al.* HOXB13 is downregulated in colorectal cancer to confer TCF4-mediated transactivation. *Br J Cancer* 2005; 92: 2233-9.
- Kantak SS, Kramer RH. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 16953-61.
- 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: 543-51.
- Kent LM, Brennan MT, Noll JL, Fox PC, Burri SH, Hunter JC, Lockhart PB. Radiation-induced trismus in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer* 2008; 16: 305-9.
- Lane DB, Rutherford TJ, Taylor HS. *HOXA10* expression in endometrial adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2004; 25:264-9.
- Lappin TRJ, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. *HOX* Genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J* 2006; 75: 23-31.
- Lawrence HJ, Largman C. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood* 1992; 80: 2445-53.

- Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The Role of HOX genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:281-291.
- Lawrence PA, Morata G. Homeobox genes: their function in drosophila segmentation and pattern formation. *Cell* 1994; 78: 181-189.
- Lelli KM, Norob B, Mannb RS. Variable motif utilization in homeotic selector (Hox)-cofactor complex formation controls specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 21122-7.
- 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; 75:680-8.
- Li B, Jin H, Yu Y, Gu C, Zhou X, Zhao N *et al.* HOXA10 is overexpressed in human ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with poor survival. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 1347-52.
- Libório TN, Acquafreda T, Matizonkas-Antonio LF, Silva-Valenzuela MG, Ferraz AR *et al.* *In situ* hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 2011; 58: 225–233.
- 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: 329-35.
- Lowney P, Corral J, Detmer K, LeBeaul MM, Deaven L, Lawrence HJ *et al.* A human Hox 1 homeobox gene exhibits myeloid-specific expression of alternative transcripts in human hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3443-9.
- Lu Z, Hardt J, Kim JJ. Global analysis of genes regulated by *HOXA10* in decidualization reveals a role in cell proliferation. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:357-66
- Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P *et al.* Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5974–5979.

- Mace KA, Restivo TE, Rinn JL, Paquet AC, Chang HY, Young David M *et al.* HOXA3 modulates injury-induced mobilization and recruitment of bone marrow-derived cells. *Stem Cells* 2009; 27: 1654–1665.
- Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J *et al.* Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B: 181-7.
- Mack JA, Maytin EV. Persistent inflammation and angiogenesis during wound healing in K14-directed *hoxb13* transgenic mice. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 856-65.
- Magli MC, Barba P, Celetti A, Vita GD, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of *HOX* genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6348-6352.
- Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX Homeobox Genes in Blood Cell Differentiation. *J Cell Physiol* 1997; 173: 168-77.
- Mahdipour E, Charnock JC, Mace KA. *Hoxa3* promotes the differentiation of hematopoietic progenitor cells into proangiogenic Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Blood* 2011; 117: 815-26.
- Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. *Hox* Genes and Regional Patterning of the Vertebrate Body Plan. *Dev Biol* 2010; 344: 7–15.
- Mann RS, Chan SK. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* 1996; 12: 258-62.
- Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Pouly JL, Mage G. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility. *Hum Reprod* 2009; 24: 3180-7.
- Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 431-41.
- Miao J, Wang Z, Provencher H, Muir B, Dahiya S, Carney E *et al.* HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17093-8.

- Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O *et al.* Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res* 2003; 63: 5879-88.
- Mishra BP, Ansari KI, Mandal SS. Dynamic association of MLL1, H3K4 trimethylation with chromatin and Hox gene expression during the cell cycle. *FEBS J* 2009; 276: 1629-40.
- Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis* 2007; 13: 126-33.
- Moon SM, Ahn MY, Kwon SM, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH. Homeobox C5 expression is associated with the progression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 470-6.
- Morgan R. HOX genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet* 2006; 22: 67-9.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: 954-8.
- Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet* 1997; 15: 179-80.
- Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox b3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J Cell Biol* 2000; 148: 343–351.
- Myers C, Charboneau A, Cheung I, Hanks D, Boudreau N. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161: 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; 98: 4060-5.
- Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 667-73.

- Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5215-9.
- Nunes FD, Almeida FCS, Tucci R, Sousa SCOM . Homeobox genes: a molecular link between development and câncer. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17: 94-8.
- Orlovsky K, Kalinkovich A, Rozovskaia T, Shezen E, Itkin T, Alder H *et al.* Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7956-61.
- Owens BM, Hawley RG. HOX and Non-HOX Homeobox Genes in Leukemic Hematopoiesis. *Stem Cells* 2002; 20: 364-379.
- Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA *et al.* Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 11959-64.
- Papageorgiou S. Pulling forces acting on HOX gene clusters cause expression collinearity. *Int J Dev Biol* 2006; 50: 301-308.
- Park SY, Kwon HJ, Lee HE, Ryu HS, Kim SW, Kim JH *et al.* Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. *Virchows Arch* 201; 458: 73-84.
- Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol* 2009; 45: 454-60.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e4.
- Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004; 39: 155-65.
- Quaranta MT, Petrini M, Tritarelli E, Samoggia P, Carè A, Bottero L *et al.* HOXB cluster genes in activated natural killer lymphocytes: expression from 3'-->5' cluster side and proliferative function. *J Immunol* 1996; 157: 2462-9.

- Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E *et al.* Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 2000; 405: 974-8.
- Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009; 47: 95-8.
- Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2428-37.
- Sanlioglu S, Zhang X, Baader SL, Oberdick J. Regulation of a Purkinje cell-specific promoter by homeodomain proteins: repression by engrailed-2 vs. synergistic activation by Hoxa5 and Hoxb7. *J Neurobiol* 1998; 36: 559-71.
- Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology* 2011; 58: 1127-35.
- Sarno JL, Kliman HJ, Taylor HS. HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 522-8.
- Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995; 374: 460-3.
- 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: 12223-7.
- Schmittwolf C, Porsch M, Greiner A, Avots A, Muller AM. HOXB4 confers a constant rate of in vitro proliferation to transduced bone marrow cells. *Oncogene* 2005; 24: 561-72.
- Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 1992; 71: 551-3.

- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol* 2000; 36: 404-13.
- Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J* 2006; 200: 13-7.
- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 2009; 15: 388-99.
- Scully C, Petti S. Overview of cancer for the healthcare team: aetiopathogenesis and early diagnosis. *Oral Oncol* 2010; 46: 402-6.
- Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:137-143.
- Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ *et al.* Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1081-8.
- Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 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: 6448–6458.
- Sugimoto Y, Nakamura S, Okinaka K, Hirano I, Ono T, Shigeno K *et al.* HOXA10 expression induced by Abl kinase inhibitors enhanced apoptosis through PI3K pathway in CML cells. *Leuk Res* 2008; 32: 962-71.
- Svingen T, Tonissen KF. Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 518-23.
- Svingen T, Tonissen KF. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 2006; 97: 88–96.

- Sun H, Chen L, Yan G, Wang R, Diao Z, Hu Y *et al.* HOXA10 suppresses p/CAF promoter activity via three consecutive TTAT units in human endometrial stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 16-21.
- Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349-54.
- 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: 144-53.
- Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y *et al.* Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007; 17: 753-60.
- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998; 101: 1379-84.
- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 495-505.
- 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: 608-15.
- Trivedi CM, Patel RC, Patel CV. Homeobox gene HOXA9 inhibits nuclear factor-kappa B dependent activation of endothelium. *Atherosclerosis* 2007; 195: 50-60.
- Trivedi CM, Patel RC, Patel CV. Differential regulation of HOXA9 expression by nuclear factor kappa B (NF-kappaB) and HOXA9. *Gene* 2008; 408: 187-95.
- Tucci R, Campos MS, Matizonkas-Antonio LF, Durazzo M, Pinto Junior DS, Nunes FD. HOXB5 expression in oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci* 2011; 19: 125-9.

- Van Langendonckt A, Luyckx M, Gonzalez MD, Defrère S, Donnez J, Squifflet J. Differential expression of genes from the homeobox A cluster in deep endometriotic nodules and peritoneal lesions. *Fertil Steril* 2010; 94: 1995-2000.
- Vider BZ, Zimber 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: 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: 550-6.
- Waltregny D, Alami Y, Clause 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: 162-9.
- Wang H, Lu Y, Huang W, Papoutsakis ET, Fuhrken P, Eklund EA. HOXA10 activates transcription of the gene encoding mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 (Mkp2) in myeloid cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 16164-76.
- Wang H, Lindsey S, Konieczna I, Bei L, Horvath E, Huang W, Saberwal G, Eklund EA. Constitutively active SHP2 cooperates with HOXA10 overexpression to induce acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 2009; 284: 2549-67.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-16.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121: 727-35.
- Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS *et al.* HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006; 66: 9527-34.
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 559-64.

- 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: 61-67.
- Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie SS, Naora H. Deregulation of the HOX A10 homeobox gene in endometrial Carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006; 66: 889-897.
- Yuen AP, Lam KY, Choy JT, Ho WK, Wong LY, Wei WI. Clinicopathologic significance of bcl-2 expression in the surgical treatment of oral tongue carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 667-72.
- Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee K, Lobie PE. Human growth hormone regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Biol Chem* 2003; 278: 7580–7590.
- Zhao Y, Yamashita T, Ishikawa M. Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 721-6.
- Zhou Y, Jorgensen EM, Gan Y, Taylor HS. Cigarette smoke increases progesterone receptor and homeobox A10 expression in human endometrium and endometrial cells: a potential role in the decreased prevalence of endometrial pathology in smokers. *Biol Reprod* 2011; 84: 1242-7.

ANEXO



**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

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.