UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

> CAROLINA CAVALCANTE BITU Cirurgiã-Dentista

### EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA FAMÍLIA HOX DE GENES HOMEOBOX DOS LOCI A E D EM LINHAGENS CELULARES E TECIDOS ORAIS DE MUCOSA NORMAL E CARCINOMA ESPINOCELULAR

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

PIRACICABA 2008

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

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Г

B549e	Bitu, Carolina Cavalcante. 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. / Carolina Cavalcante Bitu Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.
	Orientador: Ricardo Della Coletta. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
	<ol> <li>Reação em cadeia da polimerase.</li> <li>Boca – Câncer.</li> <li>Della Coletta, Ricardo.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas.</li> <li>Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</li> <li>Título.</li> </ol>
	(mg/fop)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata CAROLINA CAVALCANTI BITU aprovada.

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

PROF. DR. FÁBIO DE ABREU ALVES

PROF OR. HERCILIO MARTELLI JUNIOR

Aos meus pais Francisco e Hilacira pelo apoio incondicional em todas as horas.

Ao meu irmão Felipe por todo o amor e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, excelente orientador, que teve a serenidade e sabedoria necessárias para guiar meus primeiros passos na pesquisa científica. Agradeço de todo meu coração. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr.Francisco Haiter Neto;** 

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Oswaldo Di Hipólito Júnior, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela excelência e dedicação ao ensino;

Agradeço especialmente à extensa colaboração de **Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro** sem a qual esse trabalho não seria possível;

Aos grandes amigos Fernanda Villar, Débora, Naíla, Gustavo, Fernanda Capuano, Renata e Maíra pela amizade e companheirismo;

À amiga **Adriele**, grande companheira e por vezes a voz da minha consciência;

Aos colegas **Mário, Luiz, Alan, Ademar**, **Lucielma e Rebeca** pela amizade, companheirismo e colaboração na obtenção de muitas amostras;

À turma do laboratório de biologia molecular **Ana Lúcia, Débora, Fabiana, Lívia, Michelle, Lays, Marco** pelos momentos de trabalho e diversão compartilhados; Aos amigos e colegas da Patologia Andréia, Ana Terezinha, Lília, Jorge, Guillermo, Fernanda, Michelle Kellermann, Patrícia e Victor pela amizade e boas risadas;

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, Sr. Adriano Luís Martins, Sra. Ana Cristina do Amaral Godoy, Sr. João Carlos Gomes da Silva Júnior, Sra. Rosa Maria Fornasiari, Sra. Valéria Alessandra Prado Defávari Franco e à funcionária do Orocentro Sra. Aparecida Conceição Campion pelo auxílio, colaboração e generosidade;

A todos os voluntários que se dispuseram com tanto desprendimento a participar desta pesquisa;

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

A ignorância inspira mais confiança do que a verdade. Aqueles que sabem pouco, e não os que sabem muito, afirmam com toda a certeza que este ou aquele problema nunca será resolvido pela Ciência.

**Charles Darwin** 

## Resumo

Genes homeobox, especialmente os da família HOX, exercem um papel importante no desenvolvimento por meio de um intenso controle da proliferação, diferenciação e morte celular. Os genes HOX também estão relacionados com o surgimento de diferentes tipos de neoplasias, incluindo os cânceres de próstata, ovário, rim, pulmão, pele e leucemias, sendo pouco estudados em câncer oral. O objetivo deste estudo foi quantificar os genes da família HOX, especificamente dos loci A e D, que são expressos em amostras orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular (CEC) por meio de ensaios semi-quantitativos de transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) "duplex". Pares de amostras orais de mucosa normal e CEC do mesmo paciente e amostras de mucosa oral normal de indivíduos sem história de tabagismo ou alcoolismo foram utilizadas para este propósito. Adicionalmente, nós avaliamos o perfil de expressão destes genes em linhagens celulares de queratinócitos normais e CEC oral. Nossos resultados demonstraram que os membros HOXA1, HOXA3, HOXA4, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD1 e HOXD13 foram expressos em níveis elevados nas linhagens de CEC oral quando comparado com a linhagem de queratinócito normal. Os membros HOXA3, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD3, HOXD4 e HOXD12 não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal provenientes de pacientes não associados a fatores de risco para o CEC oral, enquanto que apenas o membro HOXD12 não foi expresso pelas amostras de mucosa morfologicamente normal proveniente de pacientes portadores de CEC. Comparado às amostras de mucosa normal proveniente de pacientes com e sem fator de risco para CEC oral, nós observamos que as expressões de HOXA1, HOXA2 e HOXD8 foram estatisticamente maiores nas amostras oriundas de indivíduos com história de tabagismo e etilismo. A expressão dos genes HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXD9, HOXD10, HOXD11 e HOXD13 foi significantemente maior nas amostras de CEC oral

comparado com mucosa normal, independente da associação com fatores de risco. Interessantemente, os membros HOXA6 e HOXA9 não foram expressos por nenhuma das amostras deste estudo. Estes resultados sugerem que uma expressão desregulada dos membros da família HOX de genes homeobox dos loci A e D foi identificada no desenvolvimento e/ou progressão do CEC oral.

Palavras chave: PCR duplex, câncer oral.

## Abstract

Homeobox genes, specifically the HOX family, play an important role in the development by controlling cellular proliferation, differentiation and apoptosis. Expression of HOX genes is associated with many cancers including those of the prostate, ovary, kidney, lung, skin and leukemia, but still there is little understanding of their roles in oral cancer. The aim of this study was to quantify the HOX genes from loci A and D expressed in oral samples from normal mucosa and squamous cell carcinoma (SCC) by semi-quantitative reverse transcriptasepolymerase chain reaction (RT-PCR) duplex method. Normal oral mucosa and oral SCC obtained from the same patient, and normal oral mucosa from patients without history of exposition to risk factors related to oral SCC (smoking habit and alcohol consumption) were included in this study. Additionally, we analyzed the expression profile of those genes in normal keratinocyte and oral SCC cell lines. Our results demonstrated that HOXA1, HOXA3, HOXA4, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD1 and HOXD13 were expressed in higher levels in oral SCC cell lines compared with normal keratinocyte cell line. None of the normal oral mucosa samples from patients without risk factors related to oral SCC expressed HOXA3, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD3, HOXD4 and HOXD12, whereas only HOXD12 was not expressed by the normal mucosa samples from patients with oral SCC. Comparing the two groups of normal oral mucosa, we found that HOXA1, HOXA2 and HOXD8 had statistically significant higher expression levels in samples from patients with history of smoking habit and alcohol consumption. The expression of HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXD9, HOXD10, HOXD11 e HOXD13 was statistically higher in oral SCC samples when compared with those from normal oral mucosa, regardless of the risk factor association. Interestingly, HOXA6 and HOXA9 were not expressed by either the cell lines or tissue samples. The results of our study suggest that a dysregulated expression of specific members of the loci A and D of the HOX family

of homeobox genes may be related to the tumorigenesis and/or tumor progression of oral SCCs.

Key Words: duplex PCR, oral cancer.

- <sup>o</sup>C- Graus Celsius
- bFGF "basic fibroblast growth factor" Fator de crescimento de fibroblastos

básico

- cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar
- CEC Carcinoma Espinocelular
- DEMEM/F-12- "Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's Nutrient Mixture F-12,

1:1"

- DNA Ácido desoxirribonucléico
- dNTPs Desoxinucleotídeo trifosfato
- DTT Ditiotreitol
- EDTA "Ethylenediamine tetraacetic acid" Ácido etilenodiamino tetra-acético
- GAPDH "Gliceraldehyde -3-Phosphate Dehydrogenase" Gliceraldeído -3-

fosfato desidrogenase

- µg microgramas
- ml mililitros
- MLL gene mixed lineage leukemia
- mM milimolar
- nM nanomolar
- nm nanômetro
- OD "optical density" densidade óptica
- PBS "Phosphate Buffered Saline" Salina tamponada com fosfato

RNA - Ácido Ribonucléico

RT-PCR - "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction" - Reação de

polimerase em cadeia por transcriptase reversa

- SCC Squamous Cell Carcinoma
- TBE "Tris Borate EDTA buffer" Tampão Tris, ácido bórico e EDTA
- TGF- $\beta$  "Transforming Growth Factor  $\beta$ " Fator de Crescimento Transformante  $\beta$
- U unidade

# SUMÁRIO

1. Introdução1
2. Revisão de Literatura5
2.1 Genes Homeobox5
<b>2.2</b> Família HOX de Genes Homeobox6
2.3 Genes da Família HOX em Câncer13
<b>3. Proposição</b>
4. Materiais e Métodos25
4.1. Aprovação do Comitê de Ética23
4.2. Cultura de Células
4.3. Subcultivo e Plaqueamento Celular23
4.4. Amostras de tecido24
4.5. Isolamento de RNA total
4.6. Análise da Concentração e Integridade do RNA26
4.7. Síntese de cDNA (DNA complementar)27
4.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) "Duplex"27
4.9. Análise Densitométrica
4.10. Análise Estatística28
5. Resultados
5.1. Expressão dos Membros dos Loci A e D da Família HOX de Genes
Homeobox nas Linhagens Celulares de Epitélio Normal e CEC Oral33
5.2. Expressão dos genes dos loci A e D em amostras de mucosa oral normal de
pacientes sem fatores de risco para o desenvolvimento de CEC e amostras de
mucosa normal e CEC do mesmo paciente
6. Discussão
7. Conclusões71
Referências73
<b>Anexo</b>

#### 1. Introdução

É amplamente aceito que muitas das vias que estimulam a oncogênese representam aberrações de processos normais que controlam a embriogênese. Existem vários exemplos no qual genes que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular e tecidual estão implicados em oncogênese. Entre os principais exemplos estão os genes homeobox, que codificam fatores de transcrição utilizados intensamente durante as diferentes etapas da embriogênese e apresentam uma expressão alterada em cânceres. Baseado na significância global destes genes para o desenvolvimento e diferenciação celular e na freqüente expressão desregulada em cânceres, genes homeobox providenciam um excelente modelo para explorar a íntima relação entre embriogênese e oncogênese.

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

Entre as diversas famílias de genes homeobox, os membros da família HOX são considerados os protótipos desta classe, e representam os genes homólogos do complexo HOM-C em humanos e camundongos (Abate-Shen, 2002). Durante a embriogênese, a expressão dos membros da família HOX de genes homeobox inicia-se durante o período de gastrulação e controla a identidade de vários tecidos partindo da região anterior (área branquial) até a região mais posterior (Cillo *et al.*, 2001). Embora genes homeobox sejam definidos como genes do desenvolvimento, alguns estudos demonstraram a

expressão de membros da família HOX em tecidos normais adultos (Neville *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2004; Morgan, 2006). A manutenção da homeostasia dos tecidos adultos é fundamental e deve ser intimamente controlada para a adequada função dos órgãos. O padrão de expressão dos genes HOX em cada órgão é distinto e suas funções variam de acordo com as interações com os diferentes tipos celulares que compõem o tecido (Yamamoto *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Portanto, alterações na expressão dos membros da família HOX de genes homeobox, que são capazes de controlar a proliferação e a identidade (diferenciação) celular, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral (Abate-Shen, 2002; Waltregny *et al.*, 2002; Freschi *et al.*, 2005).

Após os estudos iniciais que demonstraram a expressão dos membros da família HOX de genes homeobox em linhagens celulares neoplásicas e nos correspondentes tecidos embrionários, a expressão desregulada destes genes tem sido descrita em muitos tumores (Ford, 1998; Hudlebusch et al., 2004). Embora exista um grande número de estudos que demonstraram a expressão desregulada de genes homeobox em cânceres, nosso conhecimento neste campo está distante de completo. Assumindo que a expressão gênica alterada pode promover fenótipos importantes para a oncogênese, uma análise mais ampla e profunda pode colaborar com o conhecimento da função destes genes nos estágios específicos da oncogênese e do papel destes genes nos diferentes tipos de tumores. Em suporte a um papel causal dos genes homeobox em promover oncogênese, a superexpressão com ganho de função do produto protéico destes genes tem promovido fenótipos associados à carcinogênese. Por exemplo, a superexpressão de membros da família HOX de genes homeobox transforma linhagens celulares de fibroblastos normais, com indução de proliferação e crescimento tumoral quando injetados em camundongos nude (Aberdam et al., 1991, Maulbecker et al., 1993). HOXA10 diretamente liga-se a região promotora do gene p21, induzindo uma paralisação no ciclo celular e, a subseqüente, diferenciação celular (Del Bene & Wittbrodt, 2005). Similarmente, a expressão forçada de HOXD10, o qual não é normalmente expresso em cânceres de mama em uma linhagem celular altamente agressiva deste tipo de tumor (linhagem MDA-MB-231) reduz a proliferação e bloqueia a migração celular, induzindo diferenciação com

formação de estruturas similares a ductos de glândulas mamárias (Carrio *et al.*, 2005). Estes exemplos e outros indicam que a expressão desregulada dos genes homeobox em cânceres pode ser causal.

Apesar de muitos estudos terem avaliado a expressão dos genes HOX em tumores sólidos de diferentes origens, nós encontramos apenas um recente manuscrito na literatura analisando a expressão destes genes em CECs orais (Hassan *et al.*, 2006). No presente estudo, o padrão de expressão dos membros dos loci A e D da família HOX de genes homeobox foi determinado em amostras de mucosa oral normal provenientes de pacientes sem fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal, especificamente hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas, e amostras de tecido oral morfologicamente normal e CEC do mesmo paciente. Adicionalmente, nós analisamos o padrão de expressão destes genes em linhagens celulares de queratinócito normal e CEC oral.

#### 2. Revisão da Literatura

#### 2.1. Genes Homeobox

Genes homeobox codificam fatores de transcrição que atuam durante a embriogênese e o desenvolvimento tecidual por meio de um sistemático controle da proliferação e diferenciação celular (Yoshida et al., 2006). Estes genes foram inicialmente descobertos em moscas da fruta (Drosophila melanogaster) como genes onde mutações causavam transformações homeóticas, ou seja, substituição de uma parte ou segmento do corpo por outro não encontrado normalmente naquele lugar (Lord et al., 2005; Samuel & Naora, 2005). Em Drosófilas, esta família de genes recebeu o nome de complexo HOM-C. Posteriormente, os genes homeobox foram encontrados em todas as espécies que tiveram seu genoma mapeado, indicando que sua origem é antiga e precede a divergência filogenética (Lemons & McGinnis, 2006). Desde sua descoberta na década de 80, mais de 200 membros diferentes, formando uma superfamília, já foram descritos (Holland et al., 2007). A característica comum de todos estes genes é a presença de uma següência altamente conservada, das moscas de fruta aos humanos (Svingen & Tonissen, 2006), de 183 nucleotídeos, codificando um domínio de 61 aminoácidos, chamado homeodomínio (Stein, et al., 1996; Chen et al., 2005; Freschi et al., 2005). O homeodomínio está usualmente localizado na posição terminal ou subterminal da proteína correspondente, sendo responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox (Samuel & Naora, 2005; Svingen & Tonissen, 2006). Este domínio consiste de três  $\alpha$ -hélices que formam um núcleo de repetição (motif) hélice-volta-hélice e um domínio adicional conhecido como braço N-terminal, adjacente a primeira hélice (Svingen & Tonissen, 2006). Classicamente a seqüência TAAT box é a região reconhecida pelo homeodomínio para a ligação ao DNA (Abate-Shen, 2002). O homeodomínio reconhece as seqüências específicas do DNA através dos resíduos de aminoácidos adjacentes ao braço N-terminal e a terceira hélice. Os aminoácidos 3 e 5 do braço N-terminal medeiam o contato com o sulco menor e os aminoácidos 47 e 51 da terceira hélice medeiam contato com o sulco maior da molécula de DNA (Piper et al., 1999; LaRonde-LeBlanc & Wolberger, 2003; Svingen & Tonissen, 2006).

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

A função dos genes homeobox é seletiva, sobreposta e, muitas vezes, combinada, resultado em um processo altamente complexo (Greer et al., 2000). Inúmeros estudos demonstraram o envolvimento de diferentes genes homeobox em processos cruciais das células eucariontes, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular, interação célula-célula e célulamatriz extracelular (Bromleigh & Freedman, 2000; Raman et al., 2000; Leroy et al., 2004; Hansen et al., 2006). Além disso, sabe-se que estes genes têm efeitos divergentes no ciclo celular, de um lado, estimulando a proliferação de células progenitoras, e por outro, induzindo a diferenciação celular (Leroy et al., 2004; Argiropoulos & Humphries, 2007). Os genes homeobox regulam um amplo espectro de funções biológicas durante o desenvolvimento embrionário, incluindo a formação dos membros, o padrão do esqueleto axial, a morfogênese craniofacial, o desenvolvimento do sistema nervoso central, trato gastrintestinal e órgãos reprodutivos, entre outros (Satokata & Maas, 1994; Mortlock & Innis, 1997; Garcia-Barceló et al., 2007; van den Akker et al., 2008). Interessantemente, alguns genes homeobox específicos regulam funções importantes no adulto, incluindo gametogênese (Ota et al., 2006), angiogênese (Rhoads et al., 2005; Hansen et al., 2006) e hematopoiese (Sauvageau et al., 1994; Leroy et al., 2004).

Os genes homeobox são divididos em duas grandes classes: classe I que contêm os genes agrupados (genes da família HOX) e a classe II que inclui os genes homeobox divergentes e dispersos pelo genoma (Owens & Hawley *et al.*, 2002). A maioria dos genes homeobox está dispersa e não agrupada em

complexos (Alberts *et al.*, 2004). Com base na similaridade da seqüência de nucleotídeos, posição dos íntrons, organização em clusters e associação dos produtos protéicos com co-fatores, os genes homeobox são divididos em, pelo menos, 20 famílias distintas, incluindo as famílias bicoid (BCD), caudal (CAD), engrailed (EN), even-skipped (EVE), muscle segment homeobox genes (MSX), paired (PAX), pit-oct-unc (POU), empty spiracles (EMX), ortodenticle (OTX) e sinus oculus (SIX) (Gehring *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 2007). A família mais estudada e melhor caracterizada é a família HOX (Svingen & Tonissen, 2006).

#### 2.2. Família HOX de Genes Homeobox

Dentre os genes homeobox em vertebrados, os pertencentes à família HOX se destacam como os homólogos aos genes homeóticos do complexo HOM-C de Drosófilas (Lappin *et al.*, 2006). Esta família de genes homeobox tem sido extremamente estudada durante a evolução das espécies, sendo sugerido que a família HOX representa um microcosmo de mudanças genômicas evolucionárias, acompanhando a evolução dos cordados, visto que a complexidade do plano corporal parece estar correlacionada ao aumento do número de clusters de genes (Martinez & Amemiya, 2002). Os genes da família HOX são encontrados em praticamente todos os animais, com a exceção das esponjas, e se apresentam em números de 4 a 48 genes por genoma, dependendo da espécie (Lemons & McGinnis, 2006). Por exemplo, em Drosófilas, o complexo HOM-C é formado por apenas 8 genes, cada um codificando um fator de transcrição especifico (Martinez & Amemiya, 2002).

Mamíferos apresentam 39 genes HOX organizados em 4 clusters, denominados A, B, C e D, localizados respectivamente em 4 cromossomos diferentes (7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31)(Chen *et al.*, 2005) (Fig. 1). Existem 13 grupos de parálogos, numerados de 1 a 13 começando a partir da extremidade 3' de seus loci (Freschi *et al.*, 2005). Estima-se que os genes HOX nos mamíferos tenham surgido através da combinação de dois eventos evolucionários diferentes, a cis-amplificação e a transduplicação, a partir de complexos ancestrais (Abate-Shen, 2002). Os genes HOX que se originaram por transduplicação, também chamados de parálogos, compartilham uma similaridade maior entre si quando comparado com os genes localizados nas posições adjacentes do mesmo cromossomo (Svingen & Tonissen, 2006).

Apesar do fato que durante o processo de duplicação alguns parálogos terem sido perdidos, as estruturas dos seus clusters foram mantidas intactas, mantendo-os em suas posições cromossomais (Martinez & Amemiya, 2002).





Em vertebrados, a seqüência de expressão dos genes HOX durante o desenvolvimento é bastante semelhante aos genes do complexo HOM-C de Drosófilas e reflete a posição de cada gene dentro do cluster (Martinez & Amemiya, 2002). Isto quer dizer que os genes localizados nas extremidades 3' são transcritos primeiramente e na região anterior do embrião, enquanto que os genes localizados nas extremidades 5' são transcritos subseqüentemente e em regiões caudais, sendo esta uma propriedade conhecida como regra da colinearidade (Zhao *et al.*, 2005; Morgan, 2006; Lemons & McGinnis, 2006). O desenvolvimento das regiões branquial e do romboencéfalo é controlado pelos genes dos grupos 1 a 4, o desenvolvimento da porção toráxica é regulado pelos genes HOX centrais, correspondentes aos grupos 5-8, enquanto os genes dos grupos 9-13 regulam a região lombo-sacral do embrião, trato

urinário e genitália (Morgan, 2006). Contudo, o fenômeno de dominância posterior que ocorre em Drosófilas, onde o programa morfogenético do embrião é especificado pelo membro da família HOX com localização mais posterior momento (Papageorgiou, 2006), em camundongos expresso no e. provavelmente humanos, é substituído pela teoria da redundância. Esta teoria afirma que o padrão de desenvolvimento de uma célula ou tecido é resultado da expressão combinada de vários membros da família HOX, e não da atividade específica ou dominante de um membro individual (Maconochie, 1996; Greer et al., 2000). O melhor exemplo desta teoria é demonstrado pelos membros do parálogo 9 (HOXA9, HOXB9 e HOXD9) durante o desenvolvimento da glândula mamária. As glândulas mamárias em animais sem a expressão individual ou em pares (knockout simples ou duplo) destes genes são normais, enquanto que glândulas sem a expressão dos 3 membros (knockout triplo) apresentam uma intensa hipoplasia durante a gravidez e lactação (Chen & Capecchi, 1999), indicando que a morfogênese das glândulas mamarias é dependente de uma regulação quantitativa dos genes HOX ao invés da regulação qualitativa encontrada em Drosófilas.

A expressão dos produtos dos genes HOX é seletiva e pode ser controlada em diversos níveis, incluindo os estágios transcricionais e póstranscricionais (Mann & Chan, 1996). Dentro deste contexto pouco conhecido, as proteínas dos grupos polycomb e trithorax parecem ter papel importante (Sparmann & Lohuizen, 2006). Os membros do grupo polycomb operam em complexos que modificam as propriedades locais da cromatina, levando ao silenciamento gênico (Ringrose & Paro, 2000). Especificamente no caso dos genes da família HOX, os membros do grupo polycomb inibem a expressão por meio de alterações epigenéticas, incluindo a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) e a dimetilação da lisina 9 também da histona 3 (H3K9me2) (Kiefer, 2007). Em contraste, as proteínas da família trithorax induzem a formação de eucromatina, favorecendo a transcrição de genes da família HOX (Ringrose & Paro, 2000; Beisel et al., 2002). Além da participação das proteínas dos grupos polycomb e trithorax no controle transcricional dos genes HOX, o efeito do ácido retinóico no desenvolvimento do sistema nervoso central foi demonstrado (Daftary & Taylor, 2006). Nos estágios iniciais da

embriogênese, o ácido retinóico regula a expressão dos parálogos localizados na porção 3' da família HOX de genes homeobox (Daftary & Taylor, 2006).

Dentre os diferentes mecanismos pós-transcricionais de controle da função do produto gênico, o único mecanismo bem caracterizado envolvendo as proteínas do grupo HOX é o de associação com co-fatores (Mann & Chan, 1996; Saleh, 2000). Pbx1 foi o primeiro co-fator das proteínas HOX a ser identificado (Abate-Shen, 2002). As interações entre HOX e Pbx1 nos parálogos 1-8 são dependentes de um hexapeptídeo, do qual 4 aminoácidos representam a seqüência (núcleo) principal de ligação (YPWM), localizado na porção N-terminal das proteínas HOX (Chang et al., 1995; Phelan et al., 1995). Já nos parálogos 9 e 10, onde a següência YPWM não está presente, a ligação com Pbx1 é dependente de um resíduo de triptofano na região N-terminal próxima ao homeodomínio (Shen et al., 1997b), enquanto que nos parálogos 11-13 a função de Pbx1 é substituída por Meis1, visto que Pbx1 não interage com as proteínas destes parálogos (Shen et al., 1997a). Outros mecanismos de regulação gênica, incluindo splicing alternativo, parecem participar do controle dos genes da família HOX (Kornfeld et al., 1989), mas estes mecanismos não estão ainda bem caracterizados. Ainda, a regulação endócrina de genes HOX foi descrita no ciclo menstrual, onde os níveis de expressão de HOXA10 e HOXA11 acompanham as mudanças cíclicas de estrógeno e progesterona (Daftary & Taylor, 2006). Para uma completa compreensão da função dos genes HOX no desenvolvimento celular e tecidual, um melhor conhecimento dos sistemas regulatórios destes genes se faz necessário.

O uso de animais transgênicos com ganho ou perda de função gênica tem contribuído no entendimento da função de alguns genes da família HOX. Camundongos knockout para os genes HOXA11 e HOXD11 apresentam um desenvolvimento ósseo incompleto, revelando um papel importante destes genes na formação óssea (Boulet & Capecchi, 2003). Especificamente, embriões mutantes apresentam membros menores comparado com animais normais, uma vez que o programa de maturação do tecido ósseo é alterado. Nestes animais a produção do tecido cartilaginoso é normal, mas a sua ossificação é retardada, sugerindo que estes genes têm papel importante na indução da diferenciação dos osteoblastos (Boulet & Capecchi, 2003).

Camundongos mutantes para os genes HOXA3 ou HOXD3 não apresentam anormalidades no eixo corporal, mas mutantes duplos para estes genes demonstram uma perda da vértebra atlas e remodelação da coluna vertebral (Condie & Capecchi, 1994). Camundongos knockout para os genes HOXA13 e HOXD13 apresentaram ausência da bexiga e estenose prematura do cordão umbilical (Warot *et al.*, 1997). Interessantemente, animais haploinsuficientes para HOXA13 sobrevivem até a idade adulta, mas apresentavam anormalidades importantes dos órgãos reprodutores e reto, demonstrando sua importância na formação das porções posteriores dos aparelhos digestivo e genital (Warot *et al.*, 1997).

Os membros da família HOX foram primeiramente identificados como reguladores do padrão de formação ântero-posterior durante a embriogênese, mas inúmeros estudos têm demonstrado a participação destes genes em células adultas diferenciadas (Bagot et al., 2000; Cillo et al., 2001; Daftary & Taylor, 2006). Contudo, pouco se conhece sobre a função destes genes nos tecidos adultos. No pulmão adulto, 11 membros da família HOX são expressos, incluindo 5 membros do lócus A (HOXA2 ao HOXA6), 5 membros do lócus B (HOXB2 ao HOXB6) e o gene HOXD1 (Tiberio *et al.*, 1994). O gene HOXA5 se mantém altamente expresso durante a formação pulmonar e em pulmões de recém-nascidos, mostrando que os genes HOX possuem diferentes papéis na regulação da maturação pulmonar (Mandeville et al., 2006). A expressão dos vários genes HOX que se encontram altamente expressos no pulmão fetal diminui com o avanço da gestação, principalmente o gene HOXB5 (Volpe et al., 2003). Níveis elevados da proteína HOXB5 têm sido encontrados em casos de malformação adenomatóide cística congênita em seqüestrações е bronquiopulmonares quando comparado com o tecido pulmonar normal, sugerindo um papel importante deste gene no processo de formação de anormalidades pulmonares (Volpe et al., 2003). A expressão dos membros da família HOX em tecidos humanos normais, incluindo rim, mama, cólon, cérvix uterino e fígado, é similar aos encontrados na análise pulmonar, contudo, cada órgão adulto demonstra uma combinação específica de expressão de genes HOX. Nos órgãos citados, a expressão envolve um número muito superior de membros da família HOX, sendo 30 expressos no rim e 29 na mucosa intestinal (Cillo et al., 2001). Em cérvix uterino, a maioria dos genes do lócus B foi

detectada (7/10) na camada basal do epitélio, indicando seu papel na proliferação e/ou diferenciação do epitélio cervical (López *et al.*, 2006). O gene HOXA10 está ligado à diferenciação funcional do útero adulto e parece ser regulado por hormônios como estrógeno, progesterona e testosterona (Daftary & Taylor, 2006). Mulheres com a síndrome do ovário policístico apresentam níveis elevados de testosterona e uma redução nos níveis de expressão de HOXA10, o que correlaciona com a dificuldade de implantação dos embriões e, portanto, infertilidade destas mulheres (Daftary & Taylor, 2006). Coletivamente, estes estudos indicam que a plasticidade dos órgãos adultos, onde proliferação, diferenciação e regeneração de muitos tipos celulares são intensas, pode estar associada com a expressão de genes da família HOX.

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

Estes estudos sugerem que os genes da família HOX são importantes para a hematopoiese e que diferentes combinações de expressão destes genes estão envolvidas na diferenciação e maturação de linhagens celulares específicas.

As únicas mutações naturais em humanos descritas em genes da família HOX ocorrem nos membros HOXA13, HOXD10 e HOXD13 (Grier et al., 2005; Shrimpton et al., 2004; Mortlock & Innis, 1997) Mutações em HOXD13 promovem simpolidactilia, uma combinação de sindactilia e polidactilia (Grier et al., 2005). Indivíduos afetados por esta alteração apresentam mutação por inserção de uma seqüência de polialaninas no exon 1 do gene HOXD13, resultando em um ganho de função (Goodman et al., 1997). Crossing-over desigual é provavelmente o mecanismo pelo qual esta mutação ocorre, visto que as expansões nas següências de polialaninas são freqüentemente derivadas da recombinação entre 2 alelos normais, porém incorretamente pareados (Warren, 1997). Mutações em HOXA13 induzem a síndrome da mãopé-genital (Mortlock & Innis, 1997). Esta síndrome apresenta anormalidades nos membros, incluindo falanges curtas e fusão e calcificação dos ossos do pulso, e nos genitais, como bifurcações parcial ou completa do útero e hipospadias (Mortlock & Innis, 1997). Recentemente uma mutação no gene HOXD10 foi encontrada em uma família segregando simultaneamente, de forma autossômica dominante com penetrância incompleta, as doenças de Charcot-Marie-Tooth e tálus vertical congênita (Shrimpton et al., 2004). Estas doenças são caracterizadas por deformidades nas porções distais dos membros inferiores. Nesta família foi identificado uma transversão de uma timina para uma adenina na posição 956 do exon 2 do gene HOXD10, resultando em uma mutação de sentido trocado (missense) no códon 319, com a substituição de uma metionina (ATG) por uma lisina (AAG) (Shrimpton et al., 2004).

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

induz uma significante alteração do padrão de expressão dos genes HOXD1, HOXD8, HOXD10, HOXD11 e HOXD12, sugerindo uma explicação para as alterações homeóticas (Faiella *et al.*, 2000).

#### 2.3. Genes da Família HOX em Câncer

As descobertas das últimas décadas demonstram que muitas das vias moleculares que fundamentam o desenvolvimento e a progressão tumoral são aberrações de processos que controlam a embriogênese. Dentro deste contexto, os genes homeobox são considerados os maestros que controlam a íntima relação entre embriogênese e tumorigênese (Yoshida et al., 2006). O potencial oncogênico dos genes HOX tem sido claramente demonstrado em leucemias e seu papel no desenvolvimento de neoplasias sólidas está sendo atualmente muito estudado (Chen et al., 2005). Muitos estudos registraram diferenças na expressão dos genes da família HOX entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno ainda permanece obscura na maioria dos casos. É de consenso geral que a expressão aberrante de genes da família HOX possa contribuir para a desregulação dos principais processos associados com o desenvolvimento e/ou progressão tumoral, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular, neovascularização e migração e invasão dos tecidos adjacentes (Grier et al., 2005; Rhoads et al., 2005; Zhao et al., 2005; Yoshida et al., 2006).

De maneira geral, o padrão de expressão dos genes homeobox em tumores pode ser categorizado em 3 níveis (Abate-Shen, 2002). A primeira categoria diz respeito aos genes homeobox que são re-expressos em células tumorais derivadas de tecidos nos quais os genes são normalmente expressos durante a embriogênese. Esta classe inclui a maioria dos membros da família HOX. Por exemplo, a expressão de HOXA9 é importante na indução da proliferação e diferenciação de linhagens mielocíticas durante a hematopoiese, mas não é detectado em células adultas (Zeisig *et al.*, 2004), contudo, a expressão deste gene em leucemias mielóides agudas é associada com um prognóstico desfavorável dos pacientes (Popovic *et al.*, 2007). A segunda categoria inclui genes homeobox que são expressos em células tumorais, mas não são normalmente expressos nas células em que o tumor se originou durante a embriogênese (nova expressão). Por exemplo, o gene PAX5 está

envolvido com o desenvolvimento de meduloblastomas, onde foi encontrado em áreas contendo células indiferenciadas, porém não é detectado no cerebelo durante o desenvolvimento, indicando seu papel na desdiferenciação celular nesta neoplasia (Kozmik *et al.*, 1995). A terceira categoria inclui os genes homeobox que têm sua expressão reduzida em células tumorais quando comparado com o tecido normal. Estes genes são freqüentemente expressos em tecidos adultos diferenciados e têm uma expressão reduzida ou silenciada em cânceres (Abate-Shen, 2002). Podemos citar como exemplo desta categoria a expressão do gene homeobox Nkx3.1, que é importante para a manutenção e função das células epiteliais prostáticas diferenciadas (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999). A perda de expressão deste gene induz proliferação celular, resultando em neoplasias prostáticas intra-epiteliais (Abdulkadir *et al.*, 2002).

Os primeiros estudos sobre genes HOX e câncer procuraram identificar a expressão destes genes em tumores de diversos órgãos, visto que o padrão de expressão para cada órgão parece ser específico. Na análise dos níveis de expressão dos genes HOX em amostras de tecido de CEC esofágico e de mucosa esofágica normal, Chen et al. (2005) identificaram 13 genes da família HOX com expressão alterada. Os genes HOXA10, HOXA13, HOXB7, HOXC4, HOXC4, HOXC8, HOXD9, HOXD10 e HOXD13 foram expressos somente pelas amostras de CEC, sugerindo uma possível participação destes membros no desenvolvimento e progressão tumoral. Os genes HOXA2, HOXA7, HOXA9, HOXC6 e HOXC9 foram expressos pelas amostras de mucosa normal e CEC, mas os membros HOXA7, HOXA9 e HOXC6 apresentaram níveis de expressão consideravelmente mais altos no CEC quando comparado com os de mucosa normal. Os genes HOX também foram encontrados com expressão aberrante em cânceres de cólon. Os genes HOXB6, HOXB8, HOXC8 e HOXC9 foram mais expressos em linhagens celulares derivadas de pólipos intestinais e de carcinoma colorretal do que em linhagens normais (Vider et al., 2000). Na mucosa de cólon, todos os membros da família HOX estão expressos, porém no adenocarcinoma o gene HOXA9 foi significantemente mais expresso quando comparado à mucosa normal (Freschi et al., 2005). HOXC6 foi expresso em áreas diferenciadas do epitélio intestinal, mas foi silenciado na maioria das amostras de câncer (Freschi et al., 2005).

A análise comparativa da expressão dos genes HOX em tecidos mamários normais e tumorais demonstrou expressão diferenciada dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXC11, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9 e HOXD10 (Makiyama *et al.*, 2005). Todos estes genes HOX, exceto HOXC11, apresentaram maiores níveis de expressão nas amostras de tecido normal em relação aos tecidos neoplásicos (Makiyama *et al.*, 2005). Em outro estudo foi demonstrado que os genes HOXD3 e HOXD4 são expressos apenas por linhagens celulares de mama normais, enquanto que os genes HOXA3, HOXA5, HOXA3, HOXA1 e HOXC13 são expressos nas linhagens celulares tumorais (Svingen & Tonissen, 2003). O gene HOXA1 também foi detectado em linhagens celulares de carcinoma de mama, sendo que sua expressão foi positivamente regulada pelo tratamento destas células com progestina, um hormônio esteróide ligado à diferenciação celular (Chariot & Castronovo, 1996).

Os genes HOXA1, HOXB2, HOXB4, HOXC5, HOXC10 e HOXD13 foram encontrados somente em cânceres de colo de útero, não sendo expressos em tecidos normais (Hung et al., 2003). HOXC10 foi analisado quanto ao seu papel na indução da capacidade invasiva de células de câncer de colo de útero, visto que uma expressão elevada de HOXC10 foi encontrada em queratinócitos cervicais imortalizados por papilomavírus humano e células de carcinoma cervical (Zhai et al., 2007). Neste estudo os autores demonstraram que linhagens celulares que tiveram a expressão de HOXC10 bloqueada apresentaram uma significante redução na capacidade invasiva (Zhai et al., 2007). A comparação entre o padrão de expressão dos genes HOX entre uma linhagem de queratinócito cervical normal e linhagens celulares derivadas de carcinoma cervical foi similar, com exceção dos genes HOXC5 e HOXC8 que foram expressos somente em linhagens celulares derivadas de carcinoma cervical, sugerindo uma possível associação destes genes com o processo de transformação maligna (Alami et al., 1999). Em outro estudo, somente os genes HOXA2, HOXA7, HOXC5, HOXC8 e HOXD12 não foram expressos em amostras de tecido cervical normal e o gene HOXC5 foi expresso em 9 das 11 linhagens celulares de carcinoma cervical avaliadas, sugerindo que além do gene HOXC5, os genes HOXB2, HOXB4, HOXC10 e HOXD13 também podem estar envolvidos no processo de transformação de células cervicais normais em células malignas (Magli et al., 1991). A análise da expressão dos genes

HOX em carcinomas de ovário demonstrou uma correlação entre a expressão dos genes HOXA7, HOXA9, HOXA10 e HOXA11 com a diferenciação dos ductos de Müller (Cheng *et al.*, 2005). Em um estudo com linhagens celulares de carcinoma de endométrio, os autores demonstraram que os parálogos HOXB13 e HOXC13 foram expressos pela grande maioria das linhagens celulares, e que a inibição de HOXB13 por oligonucleotídeos antisense diminuiu em 90% a capacidade de invasão das células tumorais (Zhao *et al.*, 2005).

Os níveis de expressão dos genes HOXA11, HOXA13, HOXB9, HOXD12 e HOXD13 estão aumentados em melanomas em comparação com os níveis encontrados em nevos pigmentados (Maeda et al., 2005). Além disso, os níveis de expressão de HOXA1, HOXA2, HOXC4 e HOXB13 são maiores em melanomas com metástases à distante comparado com tumores não metastáticos (Maeda et al., 2005). Ainda neste trabalho, a expressão dos genes HOX foi distinta quando se comparou melanomas de diferentes espessuras. Os membros HOXA11 e HOXB2 apresentaram níveis elevados de expressão em amostras de melanoma no estágio pT4 e o gene HOXC13 foi mais expresso nos tumores pT1-pT3 quando comparado com os tumores pT4, revelando que a expressão alteradas destes 3 genes HOX pode estar associada com a fase de crescimento vertical do melanoma. HOXB7 foi o único gene do lócus B expresso constitutivamente em 25 diferentes linhagens celulares e em 5 amostras cirúrgicas de melanoma humano (Caré et al., 1996). Em culturas de melanócitos normais e em nevos melanocíticos, o gene HOXB7 é expresso somente em células em proliferação (Maeda et al., 2005). Coletivamente, estes estudos demonstram que diferentes genes homeobox da família HOX podem estar associados ao desenvolvimento e/ou comportamento biológico dos melanomas cutâneos.

Em amostras de tecido pulmonar, os níveis de expressão de HOXA1, HOXA5, HOXA10 e HOXC6 foram maiores em carcinomas comparado com os níveis encontrados em tecido normal (Abe *et al.*, 2006). Já amostras de adenocarcinoma pulmonar, os genes HOXA5 e HOXA10 foram mais expressos do que no tecido normal. Além disso, quando comparadas às duas neoplasias, os níveis de expressão de HOXA1, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 foram maiores nas amostras de carcinoma comparado com amostras de

adenocarcinoma, mostrando o papel da expressão aberrante dos genes HOX também na diversidade histológica das neoplasias (Abe *et al.*, 2006). A expressão anormal de um número variado de genes HOX dos 4 clusters tem sido identificada em cânceres de pulmão, em particular os membros do lócus C, os quais são expressos nos tecidos tumorais e ausentes no tecido pulmonar normal adulto (Abate-Shen, 2002). Acredita-se que a expressão alterada do gene HOXC5 em linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão humano pode estar associada com os eventos tardios envolvidos no desenvolvimento do câncer pulmonar (Abate-Shen, 2002).

Em próstata, os genes HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8 apresentaram pouca ou nenhuma expressão em amostras de tecido prostático normal e em amostras de hiperplasia prostática benigna (Miller et al., 2003). Por sua vez, estes genes foram fortemente expressos em carcinomas com metástases linfonodais (Miller et al., 2003). Resultados similares foram observados em linhagens celulares derivadas de tecido prostático normal e tumoral (Miller et al., 2003). HOXC8 apresentou níveis significantemente elevados de RNA mensageiro em 12 das 16 amostras de cânceres de próstata avaliadas por Waltregny et al. (2002) quando comparado com as amostras do tecido normal correspondente. HOXC8 foi também expresso por 2 das 3 linhagens celulares de câncer de próstata humano estudadas (LNCaP, DU-145 e PC-3). Este estudo também revelou que os níveis do gene HOXC8 são significantemente e diretamente correlacionados com a perda de diferenciação celular dos tumores prostáticos e desempenham papel importante na aquisição do fenótipo metastático e invasivo das células tumorais (Waltregny et al., 2002). Desta forma, estes autores sugeriram que a superexpressão dos membros do clúster C da família HOX de genes homeobox desempenhe papel importante na patogênese do câncer de próstata (Miller et al., 2000; Waltregny et al., 2002).

A presença dos genes HOX tem sido freqüentemente observada em leucemias, principalmente nas leucemias mielóides agudas (Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Grier *et al.*, 2005). Por exemplo, HOXA7 é superexpresso em leucemias mielóides agudas, e células superexpressando HOXA7 apresentam suas capacidades de adesão e migração perturbadas nas primeiras etapas de diferenciação celular (Leroy *et al.*, 2004). Os mecanismos

que induzem uma expressão alterada dos genes da família HOX em cânceres são variados, mas em leucemias, as mudanças na expressão destes genes estão associadas às translocações e rearranjos cromossômicos (Dimartino *et al.*, 1999). Em camundongos transgênicos com uma duplicação seqüencial do gene MLL (mixed-lineage leukemia), um homólogo do gene trithorax de Drosófilas, os genes HOXA7, HOXA9 e HOXA10 apresentam um padrão alterado de expressão, resultando em defeitos no esqueleto e na hematopoiese (Dorrance *et al.*, 2006). A superexpressão de HOXA9 em leucemias mielóides agudas esta associada à translocação deste gene e a fusão com gene NUP98 (Nakamura *et al.*, 1996). Em leucemias, é comum encontrar a região promotora do gene HOXA5 hipermetilada, sugerindo o mecanismo que induz o silenciamento deste gene em leucemias (Strathdee *et al.*, 2007a).

A expressão desregulada dos genes HOX pode induzir efeitos variados nas células, contribuindo no desenvolvimento ou progressão do tumor. O gene HOXA10 é um regulador positivo do gene supressor de tumor p53, que apresenta papel importante no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (Prives & Hall, 1999). A expressão forçada do gene HOXA10 em células humanas derivadas de câncer de mama resulta na re-expressão de p53, o que é associado a uma redução na capacidade invasiva e no potencial oncogênico das células (Chu et al., 2004). Baseado nestes resultados, estes autores sugeriram que a ausência de expressão de HOXA10 pode ser importante para o desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que a perda de expressão deste gene provoca um silenciamento gênico de p53. Em adição, Del Bene & Wittbrodt (2005) demonstraram que a proteína HOXA10 pode ligar diretamente à região promotora do gene p21, juntamente com seus co-fatores Pbx1 e Meis1, ativando a transcrição gênica e induzindo uma parada do ciclo celular na fase G1. Além do gene HOXA10, o gene HOXA5 também atua como um regulador transcricional de p53 (Raman et al., 2000). Em cânceres de mama, acredita-se que a perda de expressão do gene HOXA5 ocorra devido à metilação de sua região promotora, com conseqüente perda na expressão de p53, favorecendo assim a tumorigênese do câncer de mama (Raman et al., 2000). Em cânceres de pulmão, hipermetilação da região promotora também parece ser o mecanismo de silenciamento de HOXA5 (Shiraishi et al., 2002). Interessantemente, apesar dos 4 clusters de genes HOX residirem em

cromossomos diferentes, todos parecem ser "hot-spots" para metilação em cânceres de pulmão (Shiraishi *et al.*, 2002).

Em linhagens celulares de melanoma, HOXD3 é expresso pela maioria das amostras e a transfecção de oligonucleotídeos antisense específicos contra este gene inibe significantemente a invasão celular in vitro (Okubo et al., 2000). Neste mesmo estudo a análise por microarray destas células mostrou maior expressão de genes ligados ao citoesqueleto da célula, o que poderia estar ligado à redução da invasão e motilidade destas células (Okubo et al., 2002). Em células de câncer de pulmão da linhagem A549 transfectadas com o gene HOXD3, a expressão de E-caderina foi perdida e a expressão de placoglobina ( $\gamma$ -catenina) foi intensamente reprimida, enquanto que as integrinas α3 e β3 tiveram sua expressão aumentada e N-caderina e integrina α4 foram expressas de novo (Miyazaki et al., 2002). Comparadas com células controle, as células transfectadas com HOXD3 demonstraram elevada motilidade, capacidade invasiva e um maior número de focos pulmonares metástaticos, os quais foram associados com uma maior expressão das enzimas metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) e ativador de plasminogênio uroquinase (Hamada et al., 2001). Por meio de tecnologia antisense foi demonstrado que o gene HOXD3 também controla a migração e invasão de células do melanoma humano (Okubo et al., 2002). O gene HOXD3 também media a conversão do endotélio do estado de repouso para o estado angiogênico/invasivo (Boudreau et al., 1997). Estimulação das células endoteliais com fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) resultou na expressão aumentada de HOXD3, integrina αvβ3 e ativador plasminogênio uroquinase (Boudreau et al., 1997). Por outro lado, uso de oligonucleotídeos antisense específicos para o gene HOXD3 bloqueou a habilidade de bFGF induzir a expressão destes genes, mas expressão de HOXD3 na ausência de bFGF resultou na expressão de integrina avß3 e ativador plasminogênio uroquinase (Boudreau et al., 1997). De fato, a expressão prolongada de HOXD3 na membrana coriônica de embriões de galinha reteve as células endoteliais em seu estado invasivo e impediu a maturação dos vasos, levando a deformações nos vasos e a endoteliomas (Boudreau et al., 1997).

HOXA1 estimula a ativação transcricional de algumas moléculas próoncogênicas, incluindo ciclina D1 e Bcl-2, induzindo a proliferação e

sobrevivência de células de carcinoma mamário humano (Zhang *et al.*, 2003). A expressão forçada de HOXA1 é suficiente para promover a transformação oncogênica de células epiteliais mamária humanas imortalizadas, com conseqüente formação de colônias em ensaios de "soft agar" (crescimento independente de ancoragem) e formação tumoral agressiva *in vivo* (Zhang *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que E-caderina, uma molécula envolvida na adesão celular e capaz de estimular a sinalização intracelular e potencializar a sobrevivência das células neoplásicas (Zhang *et al.*, 2006), estimula a expressão de HOXA1 (Zhang *et al.*, 2006). Neste contexto, HOXA1 induz a sobrevivência celular e permite que E-caderina estimule a proliferação independente de ancoragem das células tumorais.

HOXB7 desempenha papel importante na progressão maligna do câncer de mama através da liberação de bFGF (Waltregny et al., 2002). A associação entre HOXB7 e bFGF foi confirmada em ensaios de transativação direta, no qual HOXB7 foi capaz de se ligar à região promotora de bFGF e desencadear sua transcrição gênica (Waltregny et al., 2002). A inibição da atividade de HOXB7 com oligonucleotíeos antisense demonstrou uma redução na capacidade invasiva das linhagens celulares derivadas do câncer de ovário (Yamashita et al., 2006). Recentemente, Rubin et al. (2007) demonstraram que células superexpressando o gene HOXB7 apresentam aumento de sobrevida e da taxa de reparo do DNA guando comparado com seus respectivos controles. Além disso, observou-se que o gene HOXB7 não age somente como um ativador transcricional, mas também atua como um oncogene, interagindo com membros da proteína-quinase dependente de DNA e desempenhando papel importante no reparo do DNA. Assim, acredita-se que o gene HOXB7 se liga a proteínas importantes envolvidas no processo de reparo de DNA e manutenção da estabilidade genômica (Rubin et al., 2007).

No único estudo que avaliou a expressão dos genes HOX em CEC orais, os autores demonstraram que os níveis de expressão dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXB3, HOXB6, HOXB7, HOXB9, HOXC4, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC11, HOXC13, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 são aumentados quando comparados com amostras de tecido normal e tecidos com displasia (Hassan *et al.*, 2006). Tecidos orais com displasia, independente do grau, apresentaram níveis elevados dos genes HOXA2, HOXA3, HOXB3 e

HOXD10 comparados com mucosa normal e níveis reduzidos dos genes HOXA1, HOXB7, HOXB9 e HOXC8 quando comparados com as amostras de CEC, sugerindo uma importância dos genes HOX nos eventos de desenvolvimento e progressão tumoral (Hassan *et al.*, 2006). Este estudo também revelou que a expressão dos genes HOX em amostras de CEC oral com e sem metástases para linfonodos. A expressão dos genes HOXC4-HOXC8 foi maior nas amostras de CEC oral com metástases, sugerindo que a expressão destes genes pode desempenhar papel fundamental na metástase do CEC oral.

Coletivamente, os inúmeros estudos na literatura demonstram que a expressão inapropriada de genes da família HOX pode estar associada ao desenvolvimento e/ou progressão de tumores. Em adição, a expressão dos genes HOX varia de acordo com as células e tecidos dos quais as células tumorais são provenientes.
## 3. Proposição

1. Comparar o padrão de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox dos loci A e D em linhagens celulares humanas de CEC oral e de queratinócitos normais;

2. Estudar o padrão de expressão destes genes em amostras de tecido oral morfologicamente normal de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o desenvolvimento dos CECs orais;

3. Analisar o padrão de expressão destes genes em amostras orais de CEC e mucosa morfologicamente normal do mesmo paciente.

#### 4. Materiais e Métodos

## 4.1. Aprovação do Comitê de Ética

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

#### 4.2. Cultura de Células

Este estudo utilizou linhagens celulares comerciais de CECs orais de língua humanos (SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25, ATCC, Manassas, VA, EUA) e uma linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada, mas não transformada denominada HaCAT. As linhagens de CEC oral encontravam-se armazenadas em nosso Laboratório de Cultivo Celular, enquanto que a linhagem HaCAT foi gentilmente doada pelo Dr. André Vetori (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo-SP).

As linhagens de CEC oral foram descongeladas e cultivadas como recomendado pela ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), em uma mistura 1:1 de DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas-SP), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e solução antibiótica/antimicótica (Invitrogen) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>. A linhagem HaCAT foi cultivada em DMEM (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina (Invitrogen), 100 µg/ml de penicilina e 120 µg/ml de sulfato de kanamicina a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.3. Subcultivo e Plaqueamento Celular

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e quanto as células atingiram confluência foram subcultivadas. No subcultivo, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com tripsina (Invitrogen) a 2% por um período de tempo que variou de 5 a 20 min, dependendo da linhagem celular. As células separadas do frasco de cultura foram ressuspendidas em meio de cultura contendo soro fetal

25

bovino, inibindo a ação da tripsina, e transferidas para tubos de cultura com capacidade de 15 ml. O precipitado de células obtido pela centrifugação a 400 xg por 3 min foi ressuspendido em 5 ml de meio de cultura e o número de células determinado por contagem em hemocitômetro. Para o plaqueamento,  $5x10^5$  células em 10 ml de meio de cultura foram semeadas em placas de cultura com 100 mm de diâmetro (Corning Inc, Corning, NY, EUA), cultivadas por 24 h e utilizadas para isolamento de RNA. Todos os experimentos foram repetidos sempre utilizando passagens próximas, não havendo diferença de mais de 5 passagens.

### 4.4. Amostras de Tecido

Todos os fragmentos de tecido utilizados neste estudo foram coletados durante o diagnóstico de pacientes com lesões orais no Orocentro da FOP-UNICAMP. Tabela 1 descreve as principais características clínicas e histopatológicas das amostras utilizadas neste estudo. Os fragmentos de mucosa oral normal foram coletados de 14 indivíduos clinicamente saudáveis sem história de tabagismo e etilismo que foram submetidos ao tratamento cirúrgico para remoção de lesões benignas comuns no Orocentro. A margem do leito cirúrgico foi realizada uma biopsia com "punch" para obtenção de um fragmento de 0,5 cm de diâmetro. Os pares de amostras orais de tecido de CEC e de tecido morfologicamente normal foram coletados da mesma maneira, através de biópsias por "punch" no interior da lesão, evitando áreas de nescrose, e à margem da lesão, respectivamente. Uma porção de cada fragmento de tecido foi fixada em 10% formalina e processado para análise histológica em coloração de hematoxilina e eosina. O restante dos fragmentos de tecido foi imediatamente colocado em tubos de polipropileno estéril e livres de DNases e RNases e congelado a temperatura de -80ºC até o momento de sua utilização.

**Tabela 1.** Características clínico-patológicas das amostras deste estudo. Os tumores foram histologicamente graduados como descrito previamente por Anneroth *et al.* (1987), levando em consideração o grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses por campo, padrão de invasão (profundidade do tumor), estágio de invasão e presença de infiltrado inflamatório linfomonoplasmocitário.

Paciente	Gênero	Idade	Localização	TNM	Graduação		
					Histológica		
Com lesões benignas							
1	F	50	Língua	NA	Tecido normal		
2	F	39	Mucosa jugal	NA	Tecido normal		
3	М	75	Palato duro	NA	Tecido normal		
4	F	64	Mucosa jugal	NA	Tecido normal		
5	F	28	Palato duro	NA	Tecido normal		
6	F	23	Mucosa jugal	NA	Tecido normal		
7	F	47	Língua	NA	Tecido normal		
8	F	60	Rebordo alveolar	NA	Tecido normal		
9	М	40	Lábio inferior	NA	Tecido normal		
10	F	35	Rebordo alveolar	NA	Tecido normal		
CEC Oral							
1	М	38	Lábio inferior	T2N0M0	BD		
2	М	60	Língua	T2N0M0	MD		
3	М	51	Retromolar	T2N1M0	BD		
4	М	68	Palato mole	T2N0M0	MD		
5	М	54	Palato mole	T1N0M0	MD		
6	М	62	Palato mole	T2N2M0	MD		
7	М	49	Palato mole	T2N1M0	MD		
8	F	77	Mucosa jugal	T2N1M0	BD		
9	F	65	Lábio inferior	T1N0M0	MD		
10	F	75	Assoalho bucal	T1N1M0	MD		
11	М	72	Assoalho	T1N0M0	BD		
12	М	54	Língua	T3N1M0	BD		
13	М	69	Língua	T3N0M0	MD		
14	М	70	Língua	T1N0M0	BD		

NA: não aplicável. Graduação histológica: BD: bem diferenciado e MD: moderadamente diferenciado.

#### 4.5. Isolamento de RNA Total

A técnica de isotiocianato de guanidina foi usada para a extração do RNA total das linhagens celulares e das amostras de tecido (Chomczinski & Sacchi, 1987). As linhagens celulares foram lavadas com PBS gelado e 1,5 ml do reagente TRIzol (Invitrogen) foi adicionado e mantidos por 5 min em ambiente. As amostras de tecido foram fragmentadas temperatura manualmente com um bisturi, colocadas em tubos de polipropileno contendo 1,5 ml de TRIzol e trituradas com um homogeneizador de tecidos. As etapas seguintes foram semelhantes para todas as amostras. Após adição de 0,3 ml de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 9.000 xg a temperatura de 4ºC. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 0,75 ml de álcool isopropano foi adicionado para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 9.000 xg a 4ºC por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de 75% etanol. Após nova centrifugação a 6.000 xg a 4ºC por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspendido em água livre de DNases e de RNases e estocados a temperatura de -80°C até o momento de sua utilização.

#### 4.6. Análise da Concentração e Integridade do RNA

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

#### 4.7. Síntese de cDNA

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

#### 4.8. Reação de PCR "Duplex"

A reação de PCR "duplex" foi desenvolvida utilizando pares de primers específicos para cada membro dos lóci A e D da família HOX de genes homeobox e o gene controle GAPDH (Tabelas 2 e 3). Para cada reação de PCR "duplex", 2 µl do cDNA foram amplificados em um termociclador (Modelo 9600, Applied Biositems, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta pelos pares de primers específicos para cada membro da família HOX, pares de primers específicos para o gene GAPDH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPs e 0,05 U/µl Platinum Tag DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram iniciadas por desnaturação a 94ºC por 2 min, seguidas por 32 ciclos de 94ºC por 30 s, 57°C por 30 s e 68°C por 1,5 min. Ao final destes ciclos, a reação foi incubada a 68°C por 10 min para garantir uma extensão completa de todos os produtos amplificados. Os produtos de PCR foram misturados com tampão de aplicação (Gel loading solution, Sigma) e separados eletroforicamente a uma corrente de 150 V por 1 h em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% em tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA). Os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,2 µg de brometo de etídeo durante 15 min e documentados no sistema de fotodocumentação Kodak Digital science<sup>™</sup> equipado com a câmera digital DC120.

## 4.9. Análise Densitométrica

A quantificação das bandas dos ensaios de RT-PCR foi realizada no programa 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA). O valor da densidade óptica foi calculado levado em consideração à área e a intensidade de cada banda. A normalização foi realizada dividindo o valor da densidade óptica da banda de interesse pelo valor de GAPDH.

## 4.10. Análise Estatística

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a expressão dos genes HOX entre os diferentes grupos de tecidos. Em todas as análises, p≤0,05 foi considerado como indicativo de diferença estatisticamente significante.

**Tabela 2.** Descrição dos primers dos membros do lócus A da família HOX de genes homeobox utilizados nos ensaios de RT-PCR"duplex".

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	Concentração dos	Tamanho do
	(5'-3')	(5'-3')	Primers (nM)	Produto (pb)
HOXA1	GAGACCCAAGTGAAGATCTGGTT	CCTTCTCGTCGTTTCCTGGCG	45	112
HOXA2	GAGAGACAAGTGAAAGTGTGGTT	AGAAGGGCCCCAGAGACGCTAAG	91	182
HOXA3	GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT	CTTGGAGACTGGCCCCCGAT	45	101
HOXA4	GAGCGCCAGGTCAAGATCTGGTT	CTTTCCCTGGTGGGCCGGCAGAGGC	45	124
HOXA5	TTGCCTCTCCGAGAGACAAATTAAAATCTGGTT	ACTGACACTACGCGGGATCCGCTAATA	159	173
HOXA6	GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT	CTCCCCTGAAGCTGCGGAAGCCCC	45	240
HOXA7	GAGCGCCAGATTAAGATCTGGTT	GGCCCCGGATCGGCCCCTCATTC	227	200
HOXA9	GAGAGGCAGGTCAAGATCTGGTT	GAGGTTTAGAGCCGCTTTGTGCG	45	217
HOXA10	GGTACGGACAGACAAGTGAAAATCTT	GGAAGTGAAAAAACCGCGTCGCCTGG	45	141
HOXA11	GATCGTCAAGTCAAAATCTGGTT	TGGATTTGCTGAGTAGTACTGTAAACG	159	90
HOXA13	GAGCGGCAGGTCACAATCTGGTT	TCTGAAGCGTTTCTTCAAGTTGCCTTCTTGC	45	128

**Tabela 3.** Descrição dos primers dos membros do lócus D da família HOX de genes homeobox e do gene controle GAPDHutilizados nos ensaios de RT-PCR "duplex".

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	Concentração dos	Tamanho do
	(5'-3')	(5'-3')	Primers (nM)	Produto (pb)
HOXD1	GACACGGAAGTCAAAATCTGGTT	GAAGTTGGAGGGGAGCCACAG	111	106
HOXD3	GAACGCCAGATCAAGATCTGGTT	ACTGGCTAGCCGGCGAGTGCAGGATG	278	94
HOXD4	GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT	CCAGGGTCCCCACTTCTATAAGGTCG	83	201
HOXD8	GAGAGACAGGTAAAAATCTGGTT	CTGGAGAGTTTCTGGAAATCAAGCACCAAACA	278	140
HOXD9	GAGAGACAGGTCAAAATCTGGTT	CTGGAGAGTTTCTGGAAATCAAGCACCAAACA	278	185
HOXD10	GACAGGCAGGTCAAGATTTGGTT	TCAGACCGGCCTCAGACCTAAGA	111	122
HOXD11	GACCGGCAAGTCAAAATCTGGTT	GAGCAGGCTGGTGGGAAGG	194	162
HOXD12	GACCAGCAAGTCAAAATCTGGTT	CACGCGCGCGGCTAGTAG	194	98
HOXD13	GAGAGACAAGTGACCATTTGGTT	GACAACCGAATGGCTTCTAAGCTGTC	111	130
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC	80	285

#### 5. Resultados

## 5.1. Expressão dos Membros dos Loci A e D da Família HOX de Genes Homeobox nas Linhagens Celulares de Queratinócito Normal e CEC Oral

A linhagem de queratinócito normal imortalizada, mas não transformada HaCAT expressou 6 dos 11 (54,5%) genes do lócus A (Fig. 2). Os membros HOXA1, HOXA3, HOXA6, HOXA9 e HOXA13 não foram expressos pela linhagem HACAT. As linhagens de CEC oral demonstraram um padrão de expressão semelhante para os genes do lócus A, com 9 membros expressos (81%) (Fig. 2). Apenas os membros HOXA6 e HOXA9 não foram expressos pelas linhagens celulares de CEC oral (Fig. 2). Os genes HOXA1, HOXA3, HOXA4, HOXA10, HOXA11 e HOXA13 foram expressos em níveis elevados nas linhagens de CEC oral quando comparado com a linhagem HaCAT (Fig. 3). Os membros HOXA2, HOXA5 e HOXA7 apresentaram aproximadamente o mesmo padrão de expressão em todas as linhagens celulares estudadas.

Para o lócus D, a linhagem HaCAT expressou 4 dos 9 (44,4%) membros deste lócus (Fig. 4). Os genes HOXD1, HOXD3, HOXD4, HOXD12 e HOXD13 não foram expressos (Fig. 4). O padrão de expressão entre as linhagens de CEC foi variado, com a linhagem SCC-4 expressando 5 membros (55,5%), as linhagens SCC-9 e SCC-25 expressando 6 membros (66,6%) e a linhagem 15 expressando 7 membros (77,7%) (Fig. 4). Os genes HOXD3 e HOXD12 não foram expressos por nenhuma das linhagens de CEC oral, enquanto que o gene HOXD4 não foi expresso por 3 das linhagens (SCC-4, SCC-9 e SCC-25). Os genes HOXD1 e HOXD13 apresentaram níveis maiores de expressão nas linhagens celulares de CEC oral quando comparado com a linhagem celular HaCAT (Fig. 5). Os membros HOXD9, HOXD10 e HOXD11 demonstraram o mesmo padrão de expressão em todas as linhagens celulares estudadas (Fig. 5).



**Figura 2**. Padrão de expressão dos membros do lócus A da família HOX de genes homeobox nas linhagens celulares de queratinócitos normais (HaCAT) e de CEC oral (linhagens SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25). Os resultados demonstraram a ausência da expressão dos genes HOXA6 e HOXA9 para todas as linhagens. Em adição, a linhagem HaCAT também não expressou os membros HOXA1, HOXA3 e HOXA13.



**Figura 3.** Análise densitométrica dos níveis de expressão dos membros do lócus A da família HOX nas linhagens celulares de queratinócitos normais (HaCAT) e de CEC oral (linhagens SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25). O valor da expressão de cada gene foi normalizado pelo valor de expressão do gene controle GAPDH. Os genes HOXA1, HOXA4, HOXA10 e HOXA11 foram expressos em maior intensidade nas linhagens de CEC oral comparado com a linhagem HaCAT. Os membros HOXA3 e HOXA13 não foram expressos na linhagem HaCAT.



**Figura 4**. Padrão de expressão dos membros do lócus D da família HOX de genes homeobox nas linhagens celulares de queratinócitos normais (HaCAT) e de CEC oral (linhagens SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25). HOXD3 e HOXD12 não foram expressos por nenhuma das linhagens celulares deste estudo, enquanto que HOXD8 foi expresso por 3 linhagens de CEC oral (SCC-9, SCC-15 3 SCC-25) e o membro HOXD4 foi expresso apenas pela linhagem SCC-15. O gene HOXD13 não foi expresso somente pela linhagem HaCAT.





# 5.2. Expressão dos Genes dos Loci A e D em Amostras de Mucosa Oral Normal de Pacientes sem Fatores de Risco para o Desenvolvimento de CEC e Pares de Amostras de Mucosa Normal e CEC do Mesmo Paciente

A maioria dos genes analisados neste estudo (18/20) foi expressa em, pelo menos, alguma das amostras. Apenas os membros HOXA6 (Fig. 13) e HOXA9 (Fig. 15) não foram expressos por nenhuma das amostras. Interessantemente, estes mesmos genes também não foram expressos pelas linhagens celulares estudadas.

As amostras de tecido oral normal obtidas de pacientes livres de fatores associados ao CEC oral expressaram poucos transcritos do lócus A (Fig. 6). Os membros HOXA3 (Fig. 10), HOXA5 (Fig. 12), HOXA7 (Fig. 14), HOXA10 (Fig. 16), HOXA11 (Fig. 17) e HOXA13 (Fig. 18) não foram expressos por nenhuma das amostras pertencentes a este grupo. O gene HOXA1 foi expresso, em níveis reduzidos, por 3 amostras deste grupo (30%), HOXA2 foi expresso por 4 amostras (40%) e HOXA4 foi expresso por 3 das amostras do grupo de mucosa oral normal de pacientes livres dos principais fatores de risco para o CEC oral.

Por outro lado, os membros do lócus D foram mais expressos nas amostras de tecido oral normal de pacientes livres de fatores associados à oncogênese oral que os membros do lócus A (Fig. 7). Todas as amostras deste grupo expressaram os membros HOXD1, HOXD8 e HOXD9 e algumas amostras expressaram os transcritos dos genes HOXD10, HOXD11 e HOXD13 (Fig. 7). Apenas os genes HOXD3 (Fig.20), HOXD4 (Fig. 21) e HOXD12 (Fig. 26) não foram expressos por nenhuma das amostras deste grupo.

As amostras de tecido normal provenientes dos pacientes com CEC oral demonstraram um padrão de expressão mais abundante comparando com as amostras dos pacientes sem fatores de risco para o câncer. Todos os genes do lócus A, com exceção de HOXA6 e HOXA9, foram expressos por, pelo menos, algumas das amostras deste grupo (Fig. 6). Os membros HOXA3, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXA11 e HOXA13 não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral, mas foram expressos por 28,6%, 28,6%, 14,3%, 28,6%, 35,7% e 21,4% das

38

amostras de mucosa oral histologicamente normal de pacientes com CEC oral, respectivamente (Fig. 6). Os níveis de expressão dos genes HOXA1 (p<0,05; Fig. 8) e HOXA2 (p<0,01; Fig. 9) foram significantemente maiores nas amostras de tecido normal proveniente de pacientes com CEC oral comparado com as amostras de tecido normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer oral.

O membro HOXD12 foi o único gene silenciado em todas as amostras de mucosa oral obtidas das margens das lesões de CEC (Fig. 7). Os genes HOXD8, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 foram expressos por praticamente todas as amostras de mucosa oral normal obtidas das margens das lesões de CEC (Fig. 7). Os genes HOXD3 e HOXD4 não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral, mas foram expressos em baixos níveis por 10% e 40% das amostras de mucosa oral histologicamente normal de pacientes com CEC oral, respectivamente (Fig. 7). A expressão do gene HOXD8 foi a única significantemente maior nas amostras de tecido normal proveniente de pacientes com CEC oral comparado com as amostras de tecido normal de pacientes sem fatores de risco para câncer bucal (p<0,05; Fig.22).

Os membros HOXA5, HOXA7 e HOXA10 foram expressos por um número marcadamente maior de amostras de CEC oral comparado com amostras de tecido oral normal de pacientes sem fatores de risco e do próprio paciente com CEC (Fig. 6). O número de amostras de CEC oral que expressaram o gene HOXA1 foi similar ao número de amostras de tecido normal obtidas às margens da lesão, enquanto que o número de amostras que expressaram os genes HOXA2, HOXA4 foram maiores no grupo de tecido normal (Fig. 6). Os níveis de expressão dos membros HOXA4 (Fig. 11), HOXA5 (Fig. 12), HOXA7 (Fig. 14) e HOXA10 (Fig. 16) foram significantemente maiores nas amostras de CEC oral comparado com as amostras de tecido oral normal de pacientes sem fatores de risco e do próprio paciente com CEC. A expressão de HOXA1 (p<0,001; Fig.8), HOXA2 (p<0,05; Fig. 9) e HOXA13 (p<0,05; Fig. 18) foram significantemente maiores nas amostras de pacientes livres de fatores de risco para a oncogênese oral, mas não foram diferentes das amostras

39

de mucosa normal de pacientes com CEC. Não existiu nenhuma diferença estatística entre os grupos analisados para os genes HOXA3 e HOXA11.

Todos os membros do lócus D, com exceção dos genes HOXD3 e HOXD12, foram expressos por um grande número de amostras de CEC oral (Fig. 7). HOXD3 e HOXD12 foram expressos por apenas 10% e 20% das amostras de CEC oral respectivamente. O gene HOXD4 foi mais expresso por amostras de CEC oral comparado com as amostras de mucosa oral normal independente da origem (Fig. 7). Independente da origem das amostras de mucosa oral normal, a expressão dos membros HOXD9 (Fig. 23), HOXD10 (Fig. 24), HOXD11 (Fig. 25) e HOXD13 (Fig. 27) foram significantemente maiores nas amostras de CEC oral. A expressão dos membros HOXD4 (p<0,001; Fig. 21) e HOXD8 (p<0,001; Fig. 22) foram significantemente maiores nas amostras de CEC oral comparado com amostras normais de pacientes livres de fatores de risco para a oncogênese oral, mas não foram diferentes das amostras de mucosa normal de pacientes com CEC. As expressões dos membros HOXD1 (Fig.19), HOXD3 (Fig. 20) e HOXD12 (Fig. 26) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados.



Figura 6. Os membros do lócus A foram pouco expressos pelas amostras de mucosa oral normal de pacientes livres de fatores associados à oncogênese oral. Porcentagem de expressão dos genes do lócus A nas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem hábito de fumar ou consumir bebidas alcoólicas (□), amostras de mucosa oral normal de pacientes com CEC oral (□) e amostras de CEC oral (□). Apenas os membros HOXA1, HOXA2 e HOXA4 foram expressos pelas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral. Comparando as amostras orais de mucosa normal e CEC do mesmo paciente, observamos que os genes HOXA5, HOXA7 e HOXA10 foram expressos em maior número nas amostras de CEC, enquanto que o membro HOXA2, HOXA4 e HOXA11 foram expressos em maior número nas amostras de cEC, enquanto que o membro HOXA2, HOXA4 e HOXA11 foram expressos em maior número nas amostras de cEC, enquanto nas amostras de mucosa oral normal.



**Figura 7.** Membros do lócus D da família HOX de genes homeobox foram expressos por um grande número de amostras deste estudo. Porcentagem de expressão dos genes do lócus D nas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem hábito de fumar ou consumir bebidas alcoólicas (□), amostras de mucosa oral normal de pacientes com CEC (□) e amostras de CEC oral (■). Os genes HOXD1, HOXD8 e HOXD9 foram expressos por todas as amostras de mucosa oral normal proveniente de pacientes sem hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas, enquanto que os genes HOXD3, HOXD4 e HOXD12 não foram expressos por nenhuma das amostras deste grupo. O gene HOXD12 também não foi expresso por nenhuma das amostras de mucosa oral normal proveniente de paciente com CEC oral. Apenas os genes HOXD4 e HOXD12 foram expressos por um número marcadamente maior de amostras de CEC oral comparado com mucosa oral normal, independente da origem.



**Figura 8**. Expressão do gene HOXA1 em amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA1 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXA1 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC (p<0,001). Os níveis de HOXA1 mRNA também foram maiores na mucosa normal de pacientes com CEC comparado com mucosa normal de pacientes sem fatores de risco (p<0,05).



**Figura 9**. Análise dos níveis de expressão do gene HOXA2 em amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras orais de mucosa normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA2 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXA2 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,05).



**Figura 10**. A expressão do gene HOXA3 foi limitada a um pequeno número de amostras deste estudo. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA3 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. Não houve diferença nos níveis de expressão do HOXA3 entre os grupos de amostras deste estudo.



**Figura 11**. Expressão de HOXA4 foi significativamente maior nas amostras de CEC oral comparado com as amostras de mucosa oral normal. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA4 após normalização pelos níveis de expressão do gene GAPDH. Os níveis de expressão de HOXA4 mRNA foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral quando comparado com as amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer oral (p<0,001) e amostras de mucosa histologicamente normal do mesmo paciente (p<0,05).



**Figura 12.** A expressão do gene HOXA5 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA5 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. Os níveis expressão de HOXA5 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral quando comparado com as amostras de mucosa oral normal do mesmo paciente (p<0,01) e amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer oral (p<0,001).



**Figura 13**. O gene HOXA6 não foi expresso em nenhuma das amostras de tecido oral. (A) Reação de PCR "duplex" para 7 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente.



**Figura 14**. A expressão de HOXA7 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras orais de mucosa normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA7 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXA7 na mucosa de pacientes com CEC é maior quando comparado com amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,001) e com amostras de mucosa oral normal do mesmo paciente (p<0,01).



**Figura 15**. O gene HOXA9 não foi expresso em nenhuma das amostras de tecido. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente.



**Figura 16**. Análise da expressão do gene HOXA10. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA10 após a normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXA10 foi significativamente maior nas amostras de CEC oral quando comparado com amostras orais de mucosa normal do mesmo paciente (p<0,05) e com amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer oral (p<0,001).



**Figura 17.** A expressão do gene HOXA11 não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de amostras. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA11 após a normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH.



**Figura 18**. A expressão do gene HOXA13 foi restrita a poucas amostras. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXA13 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXA13 foi significativamente maior nas amostras de CEC oral quando comparado com amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,05).



**Figura 19**. O gene HOXD1 foi expresso em quase todas as amostras deste estudo. (A) Reação de PCR "duplex" para 7 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD1 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. Os níveis de expressão de HOXD1 não foram significativamente diferentes entre as amostras orais de CEC e de mucosa normal.



**Figura 20**. O gene HOXD3 não foi expresso pela grande maioria das amostras deste estudo. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD3 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD3 não foi significativamente diferente entre amostras orais de CEC e de mucosa normal.



**Figura 21**. O gene HOXD4 foi expresso pela maioria das amostras de CEC oral, mas foi expresso por poucas amostras de mucosa oral normal. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer oral. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD4 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD4 foi significativamente maior nas amostras de CEC oral do que nas amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco (p<0,001).



**Figura 22**. O gene HOXD8 foi expresso por todas as amostras deste estudo. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica normalizaDA pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD8 foi significativamente maior em amostras orais de CEC quando comparado com amostras de mucosa de pacientes sem fatores de risco (p<0,001). A expressão em mucosa oral normal proveniente de pacientes com CEC oral também foi significativamente maior quando comparado com amostras de mucosa oral pacientes sem fatores de risco (p<0,001).



**Figura 23**. O gene HOXD9 foi bastante expresso por todas as amostras. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD9 após a normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD9 foi significativamente maior em amostras de CEC do que em amostras de mucosa normal do mesmo paciente (p<0,01) e de mucosa de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,005).



**Figura 24**. Análise dos níveis da expressão do gene HOXD10 em amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD10 após a normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD10 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa normal do mesmo paciente (p<0,05) e de mucosa de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,001).


**Figura 25**. O gene HOXD11 foi mais expresso em amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD11 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. Os níveis de mRNA do gene HOXD11 foram significativamente maiores em amostras de CEC oral quando comparado com amostras de mucosa normal do mesmo paciente (p<0,05) e com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,001).



**Figura 26**. O gene HOXD12 foi expresso por apenas 3 amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD12 após normalização pelos níveis de expressão do gene controle GAPDH. A expressão de HOXD12 não foi significativamente diferente entre as amostras orais de CEC e de mucosa normal.



**Figura 27**. Análise dos níveis de expressão do gene HOXD13 em amostras orais de CEC e mucosa oral. (A) Reação de PCR "duplex" para 10 amostras de mucosa oral de pacientes se fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR "duplex" para 10 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXD13. A expressão de HOXD13 foi significativamente maior em amostras de CEC quando comparado com amostras de mucosa normal do mesmo paciente (p<0,005) e com amostras de mucosa de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal (p<0,001)

## 6. Discussão

A expressão desregulada de uma variedade de membros da família HOX de genes homeobox tem sido demonstrada em diversos cânceres, incluindo os tumores de mama (Raman *et al.*, 2000), útero (Hung *et al.*, 2003), próstata (Waltregny *et al.*, 2002), pulmão (Flagiello *et al.*, 1997), melanomas (Maeda *et al.*, 2005) e leucemias (Leroy *et al.*, 2004). Na região de cabeça e pescoço existem alguns estudos demonstrando a expressão alterada destes genes em CECs de esôfago (Chen *et al.*, 2005) e boca (Hassan *et al.*, 2006). Os genes desregulados nestas neoplasias demonstram pouco consenso, sugerindo que os mecanismos que induzem estas alterações no padrão de expressão podem ser resultados de perturbações específicas, dependentes do tipo celular/tecidual, e não de um gene(s) em particular.

Na primeira parte deste estudo, nós utilizamos as linhagens celulares derivadas de CECs orais de língua SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 e a linhagem de queratinócitos normais imortalizada, mas não transformada HaCAT para determinar o padrão de expressão dos membros dos loci A e D da família HOX de genes homeobox. A técnica de RT-PCR "duplex" foi escolhida por admitir que em uma mesma reação seja amplificado o gene de interesse e o gene controle (neste estudo nós optamos pelo gene "housekeeping" GAPDH), permitindo a normalização da expressão e indicando o sucesso do experimento. O padrão de expressão dos genes do lócus A para as 4 linhagens de CEC oral foi bastante homogêneo e diferente da linhagem HaCAT. Dentre as diferenças observadas estão os níveis de expressão aumentados para os genes HOXA1, HOXA3, HOXA4, HOXA10, HOXA11 e HOXA13 nas linhagens de CEC oral. Dois destes genes, HOXA1 e HOXA11, estão associados à indução da proliferação celular e agressividade tumoral em neoplasias de mama e melanomas (Zhang et al., 2003; Maeda et al., 2005), enguanto que a expressão elevada do gene HOXA10 bloqueia a diferenciação celular em linhagens celulares de leucemia (Magnusson *et al.*, 2007).

Outra diferença notável entre as linhagens de CEC oral e HaCAT foi a ausência de expressão dos membros HOXA3 e HOXA13 na linhagem HaCAT. Em

outras neoplasias como melanoma (Maeda *et al.*, 2005) e carcinoma esofageal (Chen *et al.*, 2005), HOXA13 foi mais expresso comparado com sua contraparte normal e HOXA3 foi um dos genes que se encontrava superexpresso em CECs orais (Hassan *et al.*, 2006). Uma semelhança interessante, mas não esperada entre as linhagens celulares foi a não expressão dos genes HOXA6 e HOXA9, uma vez que estes genes foram apontados em outras neoplasias, incluindo carcinoma esofageal (Chen *et al.*, 2005), adenocarcinoma de cólon (Freschi *et al.*, 2005) e leucemias, como importantes moduladores da proliferação (Zeisig *et al.*, 2004) e diferenciação celular (Sauvageau *et al.*, 1994). Em adição, a expressão de HOXA9 foi apontada como o principal indicador de prognóstico desfavorável para pacientes com leucemia mielóide aguda (Golub *et al.*, 1999). Em CECs orais, Hassan *et al.* (2006) identificaram transcritos de HOXA6 e HOXA9 e a expressão de HOXA9 foi significantemente maior em CECs comparado com mucosa oral normal.

Diferente do observado para os membros do lócus A, o padrão de expressão dos genes do lócus D entre as linhagens de CEC foi distinto. HOXD4 não foi expresso nas linhagens SCC-9 e SCC-25, HOXD8 não foi expresso pela linhagem SCC-4 e HOXD12 foi expresso apenas pela linhagem SCC-9. Por outro lado, todos estes genes foram expressos pela linhagem HaCAT. Similarmente, transcritos do gene HOXD4 foram detectados em linhagens celulares de glândula mamária normal, mas não em linhagens de câncer de mama (Svingen & Tonissen, 2003). O gene HOXD8, quando expresso, apresentou níveis elevados nas linhagens de CEC oral comparado com a linhagem HaCAT, fato que foi também observado em melanomas cutâneos (Maeda et al., 2005). O gene HOXD8 foi associado a mutações homeóticas guando ausente juntamente com outros genes parálogos (van den Akker et al., 2001). Os membros do lócus D não expressos pela linhagem HaCAT foram HOXD3 e HOXD13, sendo que HOXD3 também não foi expresso por nenhuma das linhagens de CEC oral. HOXD3 foi observado em cânceres de pulmão e mama como regulador de eventos importantes para a progressão tumoral como motilidade e invasividade (Hamada et al., 2001; Okubo et al., 2002). Em linhagens celulares de câncer de pulmão, a superexpressão de

HOXD3 elevou a expressão de genes regulados por TGF-β, incluindo metaloproteinase de matriz-2 e desmogleína, favorecendo o desenvolvimento de metástases (Miyazaki *et al.*, 2002).

Um resultado interessante foi a observação que os membros do parálogo 13 (HOXA13 e HOXD13) não foram expressos pela linhagem HaCAT mas foram expressos por todas as linhagens de CEC oral. A participação dos parálogos em cânceres não é compreendida, embora esta participação seja bem caracterizada durante a embriogênese. Particularmente, alterações neste parálogo (knockout duplo para os genes HOXA13 e HOXD13) resultaram em anomalias do desenvolvimento da porção terminal do aparelho digestivo e reprodutor de camundongos (Warot et al., 1997). É sugerido que estes membros participem na indução da proliferação celular necessária para a diferenciação terminal destes órgãos (Warot et al., 1997). Então, a expressão destes genes nas linhagens celulares de CEC oral sugere uma reativação de genes associados à embriogênese. Os genes do parálogo 1 (HOXA1 e HOXD1) também demonstraram uma semelhança no padrão de expressão, visto que ambos foram mais expressos nas linhagens de CEC oral comparado com a linhagem HaCAT. Visto que os genes HOX parálogos interagem durante o desenvolvimento, compartilhando e complementando suas funções (Maeda et al., 2005), é interessante determinar esta relação em tecidos adultos completamente diferenciados e em cânceres.

Na segunda parte deste estudo nós partimos para analisar a expressão dos genes da família HOX em amostras orais de CEC e mucosa morfologicamente normal do mesmo paciente. Em adição, nós incluímos um terceiro grupo formado por amostras de mucosa oral normal de pacientes que não apresentavam história de fumar ou consumir bebidas alcoólicas, os dois principais fatores de risco para o CEC oral. A inclusão deste terceiro grupo se baseou na hipótese de que toda a mucosa oral é susceptível a transformação maligna com a exposição crônica aos principais fatores indutores do câncer oral (Slaughter *et al.*, 1953). Então, embora a mucosa obtida de pacientes com CEC oral mostre características

morfologicamente normais, seu padrão genético pode estar alterado, incluindo alterações no padrão de expressão dos genes da família HOX.

As amostras de mucosa oral de pacientes sem história de exposição aos principais fatores de risco para CEC oral apresentaram um padrão de expressão diferente do encontrados na linhagem normal HaCAT, com poucas semelhanças individuais. Contudo, similarmente ao observado para a linhagem HaCAT, os genes do lócus D foram mais expressos que os genes do lócus A no grupo de amostras de mucosa oral normal provenientes de pacientes sem fatores de risco. Os genes HOXA3, HOXA6, HOXA9, HOXA13 e HOXD3 não foram expressos pela linhagem HaCAT e pelas amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco. Por outro lado, genes HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXA11, HOXD4 e HOXD12 foram expressos na linhagem HaCAT mas não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal. Os genes localizados na extremidade 3', HOXA1, HOXA2 e HOXA4, foram expressos com pouca intensidade e em menos de 50% das amostras de mucosa oral normal. O padrão de silenciamento da expressão gênica também foi bastante particular, visto que envolveu genes contíguos, lembrando a ativação seqüencial dos genes HOX durante o desenvolvimento (Papageorgiou, 2006). O silenciamento dos genes adjacentes como HOXA5 a HOXA13 e HOXD3 e HOXD4 reforçam a idéia que a proximidade dos genes HOX permite que muitos deles compartilhem semelhanças nas seqüências promotoras e ativação gênica por fatores de transcrição únicos (Maconochie et al., 1996). As diferenças no padrão de expressão entre HaCAT e o tecido normal podem ser creditadas ao processo de imortalização da linhagem celular por transfecção de gene viral ou pela aquisição de mutações, fato este comum em culturas celulares mantidas por longos períodos de tempo. Então, a linhagem celular HaCAT reproduz, até certo ponto, o padrão de expressão dos genes HOX em mucosa oral normal.

Ao contrário do observado nas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral, as amostras de mucosa morfologicamente normal de pacientes com CEC expressaram mais genes, repetindo apenas o silenciamento dos genes HOXA6 e HOXA9. Além disso, a

maioria dos genes foi expressa pela maioria das amostras, com exceção de HOXA3 e HOXA11 que foram expressos por 40% das amostras. O padrão de expressão dos genes do lócus D apresentou uma menor mudança, visto que os genes mais expressos permaneceram desta maneira e os genes ausentes ou pouco expressos foram expressos em poucas amostras. No entanto, quando comparado à diferença nos níveis de expressão das amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para câncer bucal e amostras de mucosa morfologicamente normal de pacientes com CEC, apenas os genes HOXA1, HOXA2 e HOXD8 foram considerados estatisticamente significantes. Os genes HOXA1 e HOXA2 foram expressos por poucas amostras de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco, mas foram expressos pela maioria das amostras de mucosa normal de pacientes com CEC. Apesar de ter sido expresso pelo mesmo número de amostras, os níveis de mRNA de HOXD8 foram significantemente maiores nas amostras de mucosa morfologicamente normal de pacientes com CEC. Estes resultados confirmam nossa hipótese que as mudanças no padrão de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox podem ser anteriores às mudanças morfológicas do tecido, e que a expressão dos genes HOXA1, HOXA2 e HOXD8 podem servir como indicadores da progressão tumoral. Interessantemente, a expressão do gene HOXA2 foi significantemente maior em amostras de displasia oral comparada com mucosa normal (Hassan et al., 2006). Contudo, mais estudos, avaliando lesões com diferentes graus de displasia, são necessários.

Os níveis transcricionais de 8 genes (HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXD9, HOXD10, HOXD11 e HOXD13) foram estatisticamente maiores nas amostras de CEC comparado com amostras de mucosa normal de pacientes sem história de fatores de risco e mucosa morfologicamente normal do mesmo paciente. Os genes HOXA5, HOXA7 e HOXA10 não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal, sugerindo que a reativação destes genes em CECs orais possa ter um papel importante no desenvolvimento e/ou progressão do tumor. As expressões de HOXA1, HOXA2, HOXA13, HOXD4 e HOXD8 foram significantemente maiores nas amostras de CEC oral comparado

com amostras normais de pacientes livres de fatores de risco para a oncogênese oral, mas não foram diferentes das amostras de mucosa normal de pacientes com CEC, sugerindo que uma elevação na expressão destes genes possa ser requerida nas etapas iniciais do desenvolvimento do CEC oral. Dos 8 genes significantemente superexpressos nas nossas amostras de CEC oral, 4 deles (HOXA5, HOXD9, HOXD10 e HOXD11) haviam sido descritos como mais expressos em CECs orais comparado com tecidos displásicos e mucosas orais normais (Hassan *et al.*, 2006).

Um resultado não esperado por nós foi a superexpressão dos genes HOXA5 e HOXA10 em CECs orais comparado com mucosas orais normais. Estes genes têm sido considerados importantes reguladores da expressão do gene supressor de tumor p53, que apresenta papel importante no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (Prives & Hall, 1999). A restauração da expressão do gene HOXA10 em células humanas derivadas de câncer de mama resulta na reexpressão de p53, o que é associado a uma redução na capacidade invasiva e no potencial oncogênico das células (Chu et al., 2004). Raman et al., (2000) demonstraram que o silenciamento do gene p53 em cânceres de mama é resultado principalmente da perda de expressão do gene HOXA5 devido à metilação de sua região promotora, e não devido a mutações na seqüência gênica, sugerindo que o silenciamento dos genes HOXA5 e HOXA10 é importante para o desenvolvimento tumoral, uma vez que a perda de expressão deste gene provoca um silenciamento gênico de p53. Baseado nestes resultados, nós esperávamos que estes genes fossem silenciados em CECs orais, onde alterações na expressão de p53 são freqüentes.

Como nas linhagens celulares, nenhuma amostra de CEC oral expressou os membros HOXA6 e HOXA9 e os parálogos HOXA4 e HOXD4, HOXA10 e HOXD10 e HOXA13 e HOXD13 foram mais expressos nas amostras de CEC oral comparado com mucosa normal, sugerindo o papel destes parálogos na carcinogênese oral. A re-expressão dos genes HOX no CEC oral pode estar associada à falha nos mecanismos de regulação da expressão, como os realizados pelas proteínas dos grupos polycomb e trithorax por meio de metilação

seletiva (Sparmann & Lohuizen, 2006). Perda do padrão de metilação dos genes HOX já foi descrita em várias neoplasias, incluindo as de pulmão (Shiraishi *et al.*, 2002) e leucemias (Strathdee *et al.*, 2007a; Strathdee *et al.*, 2007b). Os genes HOX também podem ser regulados pós-transcricionalmente através de sua associação com proteínas como Pbx1 e Meis1 (Zeisig *et al.*, 2004). As desregulações dos genes HOX podem também ser secundárias, como demonstradas em experimentos que associaram mudanças na expressão dos genes HOX e fenótipo celular após alterações em FGF e ácido retinóico (Diez del Corral & Storey, 2004). Estudos demonstraram que a expressão de alguns genes da família HOX, incluindo HOXD9, que foi superexpresso pelas amostras de CEC oral, é modulada após o tratamento com FGF (Cohn *et al.*, 1997). Em adição, as expressões de FGF-1 e FGF-2 são elevadas em CECs orais (Myoken *et al.*, 1994) e uma superexpressão dos receptores de FGFs (FGFR2 e FGFR3) pelas células de CEC oral é comum (Wakulich *et al.*, 2002). Então, FGFs podem contribuir para a oncogênese oral via indução de genes HOX.

Nossos resultados sugerem a idéia de que a expressão aberrante dos membros da família HOX de genes homeobox pode estar associada ao desenvolvimento e/ou progressão de CECs orais; contudo, mais estudos se fazem necessários para o entendimento do papel destes genes. Em adição, estes genes podem representar um alvo terapêutico inexplorado para o CEC oral, uma vez que podem ser expressos exclusivamente pelas células tumorais.

## 7. Conclusões

1. Os genes HOXA6 e HOXA9 não são expressos por tecidos orais normais ou tumorais.

2. Os genes HOXA1, HOXA3, HOXA4, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD1 e HOXD13 são expressos diferencialmente em linhagens celulares de queratinócitos normais e de CEC oral, sendo mais expressos nas linhagens de CEC oral;

3. Os membros HOXA3, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXD3, HOXD4 e HOXD12 não são expressos em mucosa oral normal provenientes de pacientes sem história de tabagismo ou etilismo.

4. Os genes HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXD9, HOXD10, HOXD11 e HOXD13 são superexpressos em CECs orais.

## **Referências\***

Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? Nat Rev Cancer 2002; 2(10):777-85.

Abdulkadir SA, Magee JA, Peters TJ, Kaleem Z, Naughton CK, Humphrey PA, *et al.* Conditional Loss of *Nkx3.1* in Adult Mice Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasia. Mol Cell Biol. 2002;22(5):1495-503.

Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, *et al.* Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer Oncol Rep. 2006;15(4):797-802.

Aberdam D, Negreanu V, Sachs L, Blatt C. The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. Mol Cell Biol. 1991 Jan;11(1):554-7.

Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257(3):738-45.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula. ARTMED – BOOKMAN, 2004.

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(3):229-49.

<sup>\*</sup>De acordo com a norma UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical **3**. Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. Gene Ther. 2000;7(16):1378-84.

Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F. Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1 Nature. 2002;419(6909):857-62.

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, *et al.* Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. Genes Dev. 1999;13(8):966-77.

Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresh DA.Induction of the Angiogenic Phenotype by Hox D3. J Cell Biol. 1997 Oct 6;139(1):257-64.

Boulet AM, Capecchi MR. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. Development. 2004;131(2):299-309.

Bromleigh VC, Freedman LP. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells Genes Dev. 2000;14(20):2581-6.

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

Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. Cancer Res. 2005;65(16):7177-85.

Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox Proteins Genes Dev. 1995;9(6):663-74.

Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 Expression in Human Breast Cancer. Biochem Biophys Res Commun. 1996 May 15;222(2):292-7.

Chen F, Capecchi MR. Paralogous mouse *Hox* genes, *Hoxa9, Hoxb9,* and *Hoxd9,* function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(2):541-6.

Chen KN, Gu, ZD Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX Genes Is Deregulated in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res. 2005; 11(3):1044-9.

Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by *HOX* genes that specify regional identity in the reproductive tract. Nat Med. 2005;11(5):531-7.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987162(1):156-9.

Chu MC, Selam FB, Taylor HS.. Taylor HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2004;3(6):568-72.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. J Cell Physiol. 2001;188(2):161-9.

Cohn MJ, Patel K, Krumlauf R, Wilkinson DG, Clarke JD, Tickle C. Hox9 genes and vertebrate limb specification. Nature. 1997;387(6628):97-101.

Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa*-3 and *hoxd*-3 reveal synergistic interactions. Nature.1994; 370(6487): 304-07.

Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. Endocr Rev. 2006;27(4):331-55.

Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. Semin Cell Dev Biol. 2005; 16(3):449-60.

Diez del Corral R, Storey KG. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. Bioessays. 2004;26(8):857-69.

Dimartino JF, Cleary ML. Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. Br J Haematol. 1999;106(3):614-26.

Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, *et al.* MII partial tandem duplication induces aberrant *Hox* expression in vivo via specific epigenetic alterations J Clin Invest. 2006;116(10):2707-16.

Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, *et al.* A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. Hum Mol Genet. 2000;22;9(2):227-36.

Flagiello D, Gibaud A, Dutrillaux B, Poupon MF, Malfoy B. Distinct patterns of alltrans retinoic acid dependent expression of HOXB and HOXC homeogenes in

human embryonal and small-cell lung carcinoma cell lines. FEBS Lett. 1997;415(3):263-7

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

Freschi G, Taddei A, Bechi P, Faiella A, Gulisano M, Cillo C, *et al.* Expression of HOX homeobox genes in the adult human colonic mucosa (and colorectal cancer?) Int J Mol Med. 2005; 16(4): 581-7.

Fuller JF, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, Fraser JK, Gasson JC. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. Blood. 1999;93(10):3391-400.

Garcia-Barceló MM, Miao X, Lui VCH, So MT, Ngan ESW, Leon TYY, *et al.* Correlation Between Genetic Variations in Hox Clusters and Hirschsprung's Disease. Ann Hum Genet. 2007;71(Pt 4):526-36.

Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins. Annu Rev Biochem. 1994;63:487-526

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science. 1999;286(5439):531-7.

Goodman FR, Mundlos S, Muragaki Y, Donnai D, Giovannucci-Uzielli ML, Lapi E, *et al.* Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract Proc Natl Acad Sci. 1997;94(14):7458-63.

Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2004;36(10):1084-9.

Greer JM, Puetz J, Thomas KR, Capecchi MR. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. Nature, 2000; 403(6770):661-65.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of *HOX* genes and their role in cancer. J Pathol. 2005;205(2):154-71.

Hamada J, Omatsu T, Okada F, Furuuchi K, Okubo Y, Takahashi Y *et al.* Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. Int J Cancer. 2001;93(4):516-25.

Hansen SL, Dosanjh A, Young DM, Boudreau N, Hoffman WY. Hemangiomas and Homeobox Gene Expression J Craniofac Surg. 2006;17(4):767-71.

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, *et al.* Aberrant expression of *HOX* genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. Oncol Res. 2006;16(5):217-24.

Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol. 2007;5(1):47.

Hudlebusch HR, Lodahl M, Johnsen HE, Rasmussen T. Expression of HOXA genes in patients with multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2004 Jun;45(6):1215-7.

Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, *et al.* Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. Cancer Sci. 2003;94(5):437-41.

Kiefer JC. Epigenetics in Development. Dev Dyn. 2007;236(4):1144-56.

Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS. Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in Drosophila. Genes Dev. 1989;3(2):243-58.

Kozmik Z, Sure U, Rüedi D, Busslinger M, Aguzzi A. Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(12):5709-13.

Kulkarni ML, Zaheeruddin M, Shenoy N, Vani HN. Fetal valproate syndrome. Indian J Pediatr. 2006;73(10):937-939.

Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. Ulster Med J. 2006;75(1):23-31.

LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior genes. Dev. 2003;17(16):2060-72.

Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. Science. 2006;313(5795):1918-22.

Leroy P, Berto F, Bourget I, Rossi B. Down-regulation of Hox A7 is required for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. J Leukoc Biol. 2004;75(4):680-8.

López R, Garrido E, Piña P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, *et al.* HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. Int J Gynecol Cancer. 2006;16(1):329-35.

Lord RVN, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, *et al.* Increased CDX2 and decreases PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barret's associated adenocarcinoma. Surgery, 2005; 138(5):924-31.

Maconochie M, Nonchev S, Morrison A, Krumlauf R. Paralogous HOX genes: function and regulation. Annu Rev Genet. 1996;30:529-56.

Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, *et al.* Altered expressions of *HOX* genes in human cutaneous malignant melanoma. Int J Cancer. 2005;114(3):436-41.

Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(14):6348-52.

Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, *et al.* HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte. Blood. 2007;109(9):3687-96.

Makiyama K, Hamada J, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, *et al.* Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. Oncol Rep. 2005 Apr;13(4):673-9.

Mandeville I, Aubin J, LeBlanc M, Lalancette-Hébert M, Janelle MF, Tremblay GM, *et al.* Impact of the loss of Hoxa5 function on lung alveogenesis. Am J Pathol. 2006;169(4):1312-27.

Mann RS, Chan SK. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. Trends Genet. 1996;12(7):258-62.

Martinez P, Amemiya CT. Genomics of the HOX gene cluster. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002;133(4):571-80.

Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. Anticancer Res. 2003;23(3A):2101-10.

Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. Cell Growth Differ. 1993;4(5):431-41.

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 Sep 15;63(18):5879-88.

Miyazaki YJ, Hamada J, Tada M, Feruuchi K, Takahashi Y *et al.* HOXD3 enhances motility and invasiveness through the TGF- $\beta$  - dependent and - independent pathways in A549 cells. Oncogene. 2002; 21: 798-808.

Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? Trends Genet. 2006; 22(2):67-9.

Mortlock DP, Innis JW. Mutation of *HOXA13* in hand-foot-genital syndrome. Nat Genet. 1997;15(2):179-80.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). J Oral Pathol Med. 1994;23(10):451-6.

Nakamura T, Largaespada D, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, et al. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 t HOX A9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia Nat Genet.1996;12(2):154-58.

Neville SE, Baigent SM, Bicknell AB, Lowry PJ, Gladwell RT. HOX gene expression in adult tissues with particular reference to the adrenal gland. Endocr Res. 2002;28(4):669-73.

Okubo Y, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Tsutsumida A, Furuuchi K, *et al.* Transduction of *HOXD3*-antisense into human melanoma cells results in decreased invasive and motile activities. Clin Exp Metastasis. 2002;19(6):503-11.

Ota T, Choi KB, Gilks CB, Leung PC, Auersperg N. Cell type- and stage-specific changes in HOXA7 protein expression in human ovarian folliculogenesis: possible role of GDF-9. Differentiation. 2006;74(1):1-10.

Owens BM, Hawley RG. *HOX* and *Non-HOX* Homeobox Genes in Leukemic Hematopoiesis. Stem Cells. 2002;20(5):364-79.

Papageorgiou S. Pulling forces acting on HOX gene clusters cause expression collinearity. Int J Dev Biol. 2006;50(2-3):301-8.

Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. Mol Cell Biol. 1995;15(8):3989-97.

Piper DE, Batchelor AH, Chang CP, Cleary ML, Wolberger C. Structure of a HoxB1–Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. Cell. 1999;96(4):587-97.

Popovic R, Erfurth F, Zeleznik-Le N. Transcriptional complexity of the HOXA9 locus. Blood Cells Mol Dis. 2007;40(2):156-9.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. J Pathol. 1999;187(1):112-26.

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(6789):974-8.

Rhoads K, Arderiu G, Charboneau A, Hansen SL, Hoffman W, Boudreau N. A Role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. Lymphat Res Biol. 2005;3(4):240-52.

Ringrose L, Paro R. Remembering silence. Bioessays. 2001;23(7):566-70.

Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, *et al.* A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. Cancer Res. 2007 Feb 15;67(4):1527-35.

Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. Mol Cell Biol. 2000;20(22):8623-33. Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. Eur J Cancer. 2005; 41(16): 2428-37.

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. Nat Genet. 1994;6(4):348-56.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, *et al.* Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(25):12223-7.

Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, *et al.* AbdB-Like HOX proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. Mol Cell Biol. 1997;17(11):6448-58. (a)

Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C. The Abd-B-like Hox Homeodomain Proteins Can Be Subdivided by the Ability to Form Complexes with Pbx1a on a Novel DNA Target. J Biol Chem. 1997 Mar 28;272(13):8198-206. (b)

Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, Terry MJ, Miyamoto Y. HOX gene clusters are hotspots of de novo methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas. Oncogene. 2002;21(22):3659-62.

Shrimpton AE, Levinsohn EM, Yozawitz JM, Packard DS Jr, Cady RB, Middleton FA, *et al.* A *HOX* Gene Mutation in a Family with Isolated Congenital Vertical Talus and Charcot-Marie-Tooth Disease. Am J Hum Genet. 2004;75(1):92-6.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer. 1953;6(5):963-8.

Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer Nat Rev Cancer. 2006;6(11):846-56.

Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. Mech Dev. 1996;55(1):91-108.

Strathdee G, Sim A, Soutar R, Holyoake TL, Brown R. HOXA5 is targeted by cell type specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia. Carcinogenesis. 2007;28(2):299-309. (a)

Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, *et a*l. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. Clin Cancer Res. 2007;13(17):5048-55. (b)

Svingen T, Tonissen KF. Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2003 Sep-Oct;2(5):518-23.

Svingen T, Tonissen KF. HOX transcription factors and their elusive mammalian gene targets Heredity. 2006;97(2):88-96.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, *et al.* Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system Exp Cell Res. 2004;293(1):144-53.

Tiberio C, Barba P, Magli MC, Arvelo F, Le Chevalier T, Poupon MF, *et al.* HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. Int J Cancer. 1994;58(4):608-15.

van den Akker WM, Brox A, Puelles L, Durston AJ, Medina L. Comparative Functional Analysis Provides Evidence for a Crucial Role for the Homeobox Gene *Nkx2.1/Titf-1* in Forebrain Evolution J Comp Neurol. 2008;506(2):211-23.

Vider BZ, 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(2):513-8.

Volpe MV, Pham L, Lessin M, Ralston SJ, Bhan I, Cutz E, *et al.* Expression of Hoxb-5 during human lung development and in congenital lung malformations. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003;67(8):550-6.

Wakulich C, Jackson-Boeters L, Daley TD, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93(5):573-9.

Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castronovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. Prostate. 2002;50(3):162-9.

Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. Gene dosagedependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. Development. 1997;124(23):4781-91.

Warren ST. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. Science. 1997;275(5298):408-9.

Yamamoto M, Takai D, Yamamoto F, Yamamoto F. Comprehensive expression profiling of highly homologous 39 HOX genes in 26 different human adult tissues by the modified systematic multiplex RT-PCR method reveals tissue-specific expression pattern that suggests an important role of chromosomal structure in the regulation of HOX gene expression in adult tissues. Gene Expr. 2003;11(3-4):199-210.

Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. Int J Oncol. 2006;28(4):931-8.

Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. Cancer Res. 2006; 66(2): 889-97.

Zeisig BB, Milne T, García-Cuéllar MP, Schreiner S, Martin ME, Fuchs U, *et al.* Hoxa9 and Meis1 Are Key Targets for MLL-ENL-Mediated Cellular Immortalization. Mol Cell Biol. 2004;24(2):617-28.

Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss SJ, Trimble CL, *et al.* Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. Cancer Res. 2007 Nov 1;67(21):10163-72.

Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertain HC, Lee KO, Lobie PE. Human growth hormoneregulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. The J Biol Chem. 2003; 278(9): 7580-90.

Zhang X, Emerald BS, Mukhina S, Mohankumar KM, Kraemer A, Yap AS *et al.* HOXA1 is required for E-cadherin-dependent anchorage-independent survival of human mammary carcinoma cells. J Biol Chem. 2006; 281(10): 6471-6481.

Zhao Y, Yamashita T, Ishikawa M. Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. Oncol Rep. 2005; 13(4): 721-6.



## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo