

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**MARIA FERNANDA DE SOUZA SETÚBAL DESTRO
Cirurgiã-Dentista**

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA FAMÍLIA HOX
DE GENES HOMEBOX LOCALIZADOS NOS LÓCIS B E C EM MUCOSA ORAL
NORMAL E CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

**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**

F I C H A C A T A L O G R Á F I C A E L A B O R A D A P E L A
B I B L I O T E C A D A F A C U L D A D E D E O D O N T O L O G I A D E P I R A C I C A B A

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

D476a	Destro, Maria Fernanda de Souza Setúbal. Análise dos níveis de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox, localizados nos loci B e C, em mucosa oral normal e carcinoma espinocelular oral. / Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008. Orientador: Ricardo Della Coletta. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Boca – Câncer. 2. Genética – Expressão. 3. RT-PCR. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Expression of HOX homeobox genes of the loci B and C in cell lines and oral tissues from normal mucosa and squamous cell carcinoma

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Mouth cancer. 2. Gene expression. 3. RT-PCR

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Mônica Fernandes Gomes, Márcio Ajudarte

Lopes

Data da Defesa: 25-04-2008

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



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 25 de Abril de 2008, considerou a candidata MARIA FERNANDA DE SOUZA SETÚBAL DESTRO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta", written over a horizontal line.

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mônica Fernandes Gomes", written over a horizontal line.

PROFa. DRa. MÔNICA FERNANDES GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcio Ajudarte Lopes", written over a horizontal line.

PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Armando e Suely**, por suas abnegações pessoais em detrimento da felicidade de seus filhos, pelo amor, dedicação, apoio e ajuda incondicional em todos os momentos. Meu eterno amor, gratidão e admiração;*

*Ao meu querido marido, **Fabio**, por estar sempre ao meu lado, por me incentivar e ajudar a não desistir de meus sonhos, por seu amor e companheirismo, por acreditar em mim e em nossa família. Minha gratidão e amor sincero.*

*À minha querida filha, **Melissa Destro Rodrigues**, por me mostrar a verdadeira razão da vida, todo o meu amor.*

*Ao meu orientador **Professor Livre Docente Ricardo Della Coletta**, pela sua compreensão, apoio e condução do meu aprendizado de uma forma tranqüila e serena. Pela sua dedicação, imenso conhecimento, humildade e capacidade, tornando-se para todos ao seu redor um exemplo. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo convívio e conhecimento adquirido.*

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com o apoio de muitas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

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 Junior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes, 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, por todos os ensinamentos transmitidos;

À **Prof. Dra. Mônica Fernandes Gomes**, do departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, pela sua amizade eterna, por despertar em mim o desejo do conhecimento e pesquisa e por contribuir de maneira brilhante para minha formação acadêmica;

Aos meus irmãos **Marcello Setúbal Destro** e **Andrey Setúbal Destro** e à minha irmã **Gabriela Setúbal Destro**, pela amizade, ajuda, compreensão e convívio durante todos estes anos;

Às minhas queridas amigas **Éfani Caroline de Freitas Banzi** e **Eloiza Helena da Silva Brandão** pela amizade verdadeira, companheirismo e momentos de descontração ao longo de tantos anos;

Às amigas **Lays Martin Sobral, Ana Lúcia Rangel, Michele Gassen Kellermann, Michelle Agostini e Lília Alves Rocha**, pela grande amizade construída, apoio e ajuda nos momentos de necessidade;

Ao querido amigo **Ademar Takahama Júnior** pela amizade sincera;

Aos colegas de Mestrado **Mário, Alan, Carol e Adriele** pelo companheirismo, momentos de estudo e diversão compartilhados;

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação **Lívia, Débora, Fabiana, Marco Antônio, Luiz, Rebeca, Lucielma, Andréia, Patrícia, Guilherme e Jorge** pelo agradável convívio;

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Ana Cristina, Rosa Maria Fornasier e Valéria** pelo auxílio, colaboração e generosidade;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa durante o período do mestrado, processo n° 06/01633-3;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e incentivaram esta jornada, guardarei sempre lembranças maravilhosas destes momentos.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve,
e a vida é muito bela para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

Genes homeobox transcrevem fatores de transcrição com participação importante na organogênese através do controle da proliferação e diferenciação celular. Dentre estes genes destacam-se os membros da família HOX de genes homeobox, os quais estão envolvidos em processos celulares cruciais como controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Os genes HOX estão relacionados com o surgimento de diferentes tipos de neoplasias, incluindo cânceres de mama, ovário, próstata, rins, pulmão, pele e leucemias. Na cavidade oral a participação destes genes é desconhecida. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox dos loci B e C entre amostras orais de mucosa normal e carcinoma espinocelular (CEC). Para a realização deste trabalho, amostras de mucosa oral normal de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o câncer oral (hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas) e amostras orais de mucosa normal e CEC provenientes do mesmo paciente foram submetidos a ensaios semi-quantitativos de transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) “duplex”, utilizando-se primers para o gene controle GAPDH e primers específicos para cada um dos membros dos loci B e C. Em adição, os níveis de expressão destes genes foram analisados em uma linhagem de queratinócito normal (HaCAT) e em 4 linhagens celulares derivadas de CEC oral. As linhagens celulares de CEC oral expressaram todos os membros do loci C, sendo que os genes HOXC4, HOXC5 e HOXC6 apresentaram maiores níveis de expressão quando comparado com a linhagem HaCAT. HOXB13 foi expresso por todas as linhagens celulares de CEC oral. Os genes HOXB1, HOXB3, HOXB5, HOXB8 e HOXC12 não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal, independente da origem, e de CEC oral. O padrão de expressão dos genes HOX foi muito similar entre os dois grupos de mucosa oral normal. As expressões dos membros HOXB7, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC10 e

HOXC11 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal. Os níveis de expressão dos membros HOXB2 e HOXC13 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral quando comparado com os níveis de expressão encontrados nas amostras de mucosa normal de pacientes livres de fatores de risco. Estes resultados sugerem que a expressão alterada de alguns membros da família HOX de genes homeobox pode estar associada com o desenvolvimento e/ou progressão do CEC oral.

Palavras-chave: Genes homeobox, Família HOX, Carcinoma espinocelular oral, Mucosa oral normal.

ABSTRACT

Homeobox genes encode transcription factors with an important role during normal development by controlling cellular proliferation and differentiation. Among those genes, the HOX family is involved in crucial biological processes such as the control of the cell cycle, differentiation and apoptosis. HOX genes are related to many cancers, including those of the breast, ovary, prostate, kidney, lung, skin and leukemias. In the oral cavity, the role of those genes is unclear. The aim of this study was to compare the expression levels of HOX genes from loci B and C between normal oral mucosa and oral squamous cell carcinoma (SCC). Samples of normal oral mucosa and oral SCC obtained from the same patient, and samples of normal oral mucosa from patients without history of exposition to risk factors related to oral SCC (smoking habit and alcohol consumption) were analyzed by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) duplex method with specific primers for the control gene GAPDH and for each of the HOXB and HOXC members. Additionally, we analyzed the expression profile of those genes in a normal keratinocyte cell line (HaCAT) and 4 oral SCC cell lines. Oral SCC cell lines expressed all members of the locus C, and the expression of HOXC4, HOXC5 and HOXC6 was higher in those cell lines compared with HaCAT. Only HOXB13 was expressed for all oral SCC cell lines. None of the normal oral mucosa and oral SCC samples expressed HOXB1, HOXB3, HOXB5, HOXB8 and HOXC12. The HOX expression profile of the 2 groups of normal oral mucosa was quite similar. Regardless of the oral normal mucosa source, the expression of HOXB7, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC10 and HOXC11 was statistically higher in oral SCC samples. HOXB2 and HOXC13 were significantly overexpressed in oral SCC when compared with normal oral mucosa from patients without risk factors related to oral SCC. These results suggest that a dysregulated expression of HOX genes from

clusters B and C may be related to the tumorigenesis and/or tumor progression of oral SCCs.

Key words: Homeobox genes, HOX family, Oral squamous cell carcinoma, Normal oral mucosa.

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	-	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEC	-	Carcinoma espinocelular oral
RT-PCR	-	“Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction” - Transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase
GAPDH	-	Gliceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase”- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
SCC	-	Squamous cell carcinoma
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
RNA	-	Ácido ribonucleico
bFGF	-	Fator de crescimento fibroblástico básico
MMP-2	-	Metaloproteinase de matriz-2
uPA	-	Fator ativador de plasminogênio
VEGF	-	Fator de crescimento do endotélio vascular
IL-8	-	Interleucina-8
Ang-2	-	Angiotensina-2
DEMEM/F-12	-	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/ Ham’s Nutrient Mixture F-12, 1:1
dNTPs	-	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	“Ethylenediamine tetraacetic acid” – Ácido etilenodiamino tetra-acético
µg	-	Microgramas
ml	-	Mililitros
mM	-	Milimolar
nM	-	Nanomolar
PBS	-	“Phosphate Buffered Saline” - Salina tamponada com fosfato
FBS	-	“Fetal Bovine Serum” – Soro fetal bovino

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Genes Homeobox	4
2.2. Família HOX de Genes Homeobox	7
2.3. Família HOX de Genes Homeobox no Câncer	14
3. PROPOSIÇÃO	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Aprovação do Comitê de Ética	27
4.2 Culturas Celulares	27
4.3 Amostras de Tecido Oral	28
4.4 Isolamento do RNA	30
4.5 Síntese do DNA Complementar (cDNA)	31
4.6 Reação de PCR “duplex”	31
4.7 Análise Densitométrica	32
4.8 Análise Estatística	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Expressão dos Membros dos Loci B e C da Família HOX de Genes Homeobox nas Linhagens Celulares de Queratinócitos Normais e de CEC Oral	34
5.2 Expressão dos Membros dos Loci B e C da Família HOX de Genes Homeobox em Amostras de Mucosa Normal de Pacientes Livres de Hábitos Associados à Oncogênese Oral e em Amostras Orais de Mucosa Normal e CEC Provenientes do Mesmo Paciente	40
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO	83
Certificado de Aprovação do Comitê de Ética	

1. INTRODUÇÃO

Os genes homeobox são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). Embora estes genes sejam classicamente conhecidos por controlar a proliferação e diferenciação celular necessários para a morfogênese celular e tecidual (Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Samuel & Naora, 2005), estudos recentes têm demonstrado a participação destes genes em eventos biológicos cruciais para a célula eucariótica adulta em condições normais e na oncogênese (Gehring & Hiromi, 1986; Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Del Bene & Wittbrodt, 2005; Grier *et al.*, 2005; Samuel & Naora, 2005). Os genes homeobox contêm uma sequência específica de DNA que codifica 61 aminoácidos, denominada de homeodomínio (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). O homeodomínio é a sequência responsável pela ligação específica das proteínas ao DNA, estimulando ou inibindo a expressão de genes alvos (Samuel & Naora, 2005). Existem várias famílias de genes homeobox, sendo a família HOX a melhor caracterizada e intensamente estudada atualmente (Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003).

A família HOX de genes homeobox é formada por 39 membros que se encontram agrupados em quatro clusters denominados A, B, C e D (Abate-Shen, 2002; Grier *et al.* 2005). Os genes HOX foram originalmente identificados como genes reguladores do padrão de formação ântero-posterior durante o desenvolvimento embrionário (De Vita *et al.*, 1993). Entretanto, sabe-se que estes

genes estão ativos em células adultas normais, controlando e regulando a identidade celular (diferenciação), divisão, adesão, migração e apoptose (Abate-Shen, 2002). Cada órgão adulto apresenta um padrão específico de expressão dos genes HOX, diferindo principalmente em relação aos genes que estão ativos e silenciados (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). Desta maneira, o padrão de expressão específico parece ser importante para função e especificidade do órgão, em relação à forma, estrutura e posicionamento correto dentro do eixo ântero-posterior (Maroulakou & Spyropoulos, 2003).

Estudos recentes revelaram o envolvimento dos genes HOX em leucemias e tumores sólidos, incluindo os cânceres de rim, pulmão, próstata, ovário, útero, pulmão e mama (Gehring & Hiromi, 1986; Miller *et al.*, 2000; Abate-Shen, 2002; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Del Bene & Wittbrodt, 2005; Samuel & Naora, 2005). As primeiras evidências surgiram através dos estudos que demonstraram diferenças no padrão de expressão dos genes HOX em tecidos tumorais quando comparados com o tecido normal correspondente (Tibério *et al.*, 1994; Bogue *et al.*, 1994; Sauvageau *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 2000; Abate-Shen, 2002; Volpe *et al.*, 2003; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Pineault *et al.*, 2004). Atualmente, o papel destes genes no desenvolvimento e progressão tumoral tem sido bastante estudado. Por exemplo, já foi demonstrado que células derivadas de câncer de mama superexpressando o gene HOXA1 são capazes de formar colônias em soft ágar e provocar a formação de tumores agressivos *in vivo* (Yap *et al.*, 2003). A desregulação na expressão de HOXB7 em linhagens celulares derivadas de melanoma humano contribui para a transformação neoplásica e

progressão tumoral por meio da liberação do fator bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico), o qual tem sido descrito como um dos principais fatores angiogênicos tanto para o câncer quanto para a embriogênese (Maeda *et al.*, 2005).

Apesar de muitos estudos terem avaliado a expressão dos genes HOX em diversos tipos de tumores sólidos, nós encontramos apenas um estudo na literatura analisando a expressão destes genes em CECs orais (Hassan *et al.*, 2006). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox dos loci B e C em amostras orais de mucosa normal e CEC provenientes do mesmo paciente e em amostras de mucosa oral normal de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o CEC oral (hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas). Nós também analisamos o padrão de expressão destes genes em linhagens celulares de queratinócitos normais e CEC oral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Genes Homeobox

Os genes homeobox foram inicialmente descobertos em *Drosófilas* como genes onde mutações causavam transformações homeóticas, assim definidas por promoverem alterações nos segmentos corporais das moscas (Lewis, 1978). Estes genes são também conhecidos em *Drosófilas* como complexo HOM-C. Em humanos os genes homeobox são divididos em dois grandes grupos: os genes agregados, também conhecidos como genes HOX ou classe I de genes homeobox, os quais têm grande homologia com os genes do complexo HOM-C de *Drosófilas*, e os genes não agregados, os quais não estão envolvidos em transformações homeóticas (Stein *et al.*, 1996). Mais de 200 genes homeobox já foram identificados no genoma humano, sendo divididos em famílias de acordo com a sua homologia e similaridade funcional (Stein *et al.*, 1996). Destacam-se as famílias HOX, paired (PAX), orthodenticle (OTX), muscle segment (MSX), distales (DLX) e caudal (CDX) (Stein *et al.*, 1996; Del Bene & Wittbrodt, 2005; Grier *et al.*, 2005).

Os genes homeobox controlam a organogênese e a formação corporal durante a embriogênese, tendo também papel significativo na regulação da hematopoiese (Samuel & Naora, 2005). Estes genes codificam proteínas nucleares específicas denominadas homeoproteínas, as quais atuam como fatores de transcrição e desempenham um papel fundamental na especificação da

identidade celular (Samuel & Naora, 2005). Os genes homeobox apresentam uma sequência comum e altamente conservada de 183 nucleotídeos que codificam 61 aminoácidos, conhecida como homeodomínio (Gehring & Hiromi, 1986; Ford *et al.*, 1998). O homeodomínio está usualmente localizado na posição terminal ou subterminal da homeoproteína 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 (McGinnis & Krumlauff, 1992; Abate-Shen, 2002). Os homeodomínios interagem com o DNA primariamente por meio de núcleos de repetição (motifs) caracterizados pela sequência TAAT (Manak & Scott, 1994). Apesar da comprovação de que as homeoproteínas atuam como fatores de transcrição, existem poucos exemplos de genes alvo que são especificamente regulados *in vivo* por estas proteínas. Além disso, supõe-se que a especificidade funcional das homeoproteínas é controlada em muitos níveis, incluindo modificações pós-transcricionais, transporte núcleo-citoplasma e interação com outras proteínas (Abate-Shen, 2002).

O papel destes genes no desenvolvimento embrionário tem sido amplamente investigado desde sua descoberta (Bendall & Abate-Shen, 2000). Muitos trabalhos sugerem o envolvimento de diferentes genes homeobox em processos cruciais das células eucariontes, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular (Magli *et al.*, 1991; Manak & Scott, 1994; Hung *et al.*, 2003), interação célula-célula e célula-matriz extracelular (Pattin *et al.*, 2000). Em adição, estes genes têm efeitos diferentes no ciclo celular, de um lado, estimulando a proliferação de células progenitoras, e por outro, induzindo a diferenciação celular

(Del Bene & Wittbrodt, 2005). 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, e o desenvolvimento do sistema nervoso central, trato gastrointestinal e órgãos reprodutivos (Samuel & Naora, 2005). Interessantemente, alguns genes homeobox específicos regulam funções importantes no adulto, incluindo gametogênese (Srebrow *et al.*, 1998), angiogênese (Daftary & Taylor, 2000) e hematopoiese (Samuel & Naora, 2005).

Os genes homeobox representam um exemplo clássico da íntima relação entre embriogênese e neoplasia. Muitos estudos demonstraram que tanto a perda quanto o ganho de função dos genes homeobox estão associadas com o desenvolvimento e progressão de várias neoplasias (Abate-Shen, 2002). Muitos dos genes homeobox que são normalmente expressos nos tecidos embrionários estão presentes de maneira aberrante no câncer (Myers *et al.*, 2000; Abate-Shen, 2002; Grier *et al.*, 2005). Esta expressão desregulada altera o fenótipo e o comportamento celular, levando à diminuição da diferenciação e a promoção da proliferação e sobrevivência celular e aumentando a predisposição para o desenvolvimento e/ou progressão tumoral (Samuel & Naora, 2005). Os membros da família HOX de genes homeobox são os mais estudados em cânceres e uma implicação destes genes na oncogênese tem sido relatada (Nyers *et al.*, 2000; Maroulakou & Spyropoulos, 2003).

2.2. Família HOX de Genes Homeobox

A família HOX de genes homeobox é estruturalmente e funcionalmente homóloga ao complexo HOM-C de *Drosófilas* (Cillo *et al.*, 2001). Em humanos, há 39 membros, os quais apresentam uma distribuição genômica única, com quatro diferentes clusters de aproximadamente 100 K bases de comprimento, cada um localizado em um cromossomo diferente: HOXA (loci 7p15.3), HOXB (loci 17p21.3), HOXC (loci 12q13.3) e HOXD (loci 2q31), os quais apresentam uma organização homóloga específica de 9-11 genes cada (Magli *et al.*, 1991; Krumlauf *et al.*, 1994). Baseado na homologia da seqüência e na posição no loci, os genes dos quatro clusters podem ser alinhados entre si e com os genes do complexo HOM-C em 13 grupos de genes parálogos (Maroulakou & Spyropoulos, 2003) (Figura 1).

Existe uma associação entre o arranjo dos genes HOX em cada cluster e sua ordem de expressão durante o desenvolvimento (Scott, 1992; Lumdsen & krumlauf, 1996). A expressão dos genes HOX inicia-se no período da gastrulação, no qual o embrião gera seu maior eixo corporal e controla a identidade de vários tecidos a partir da região anterior (área branquial) até a região mais distal (Lander *et al.*, 2001). Estes genes seguem uma regra de expressão temporal e espacial, sendo os genes da porção 3' expressos mais precocemente do que os genes da porção 5' e a medida que o embrião se desenvolve, uma maior quantidade de genes da porção 5' são progressivamente expressos. Desta maneira, os genes da porção 3' são responsáveis pelo controle do desenvolvimento da região anterior do embrião e os genes da porção 5' atuam durante o desenvolvimento da região

distal do embrião. Assim, o desenvolvimento da região branquial e romboencéfalo é controlado pelos genes dos grupos 1 a 4 (Scott, 1992), o desenvolvimento da porção torácica é regulado pelos genes HOX centrais, correspondentes aos grupos 5-8, enquanto os genes dos grupos 9-13 regulam a região lombo-sacral do embrião, trato urinário e genitália (Lumdsen & Krumlauf, 1996).

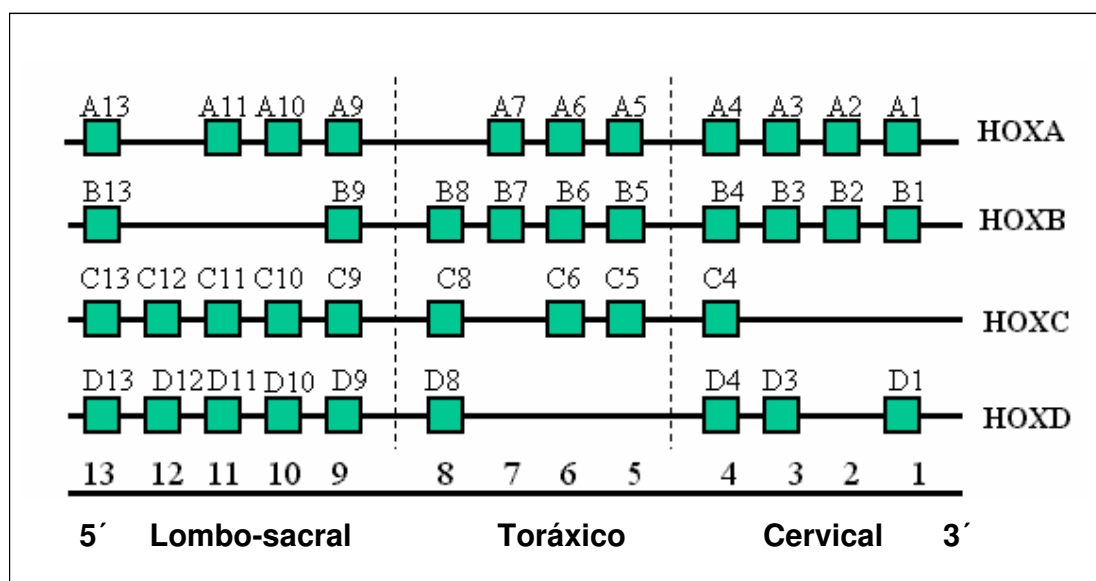


Figura 1. Representação esquemática da distribuição dos 39 membros humanos da família HOX de genes homeobox nos quatro clusters (Adaptado de Grier *et al.*, 2005).

O uso de animais transgênicos com ganho ou perda de função gênica tem auxiliado no conhecimento das funções dos membros da família HOX. Por exemplo, estes métodos demonstraram que o fenômeno de dominância posterior que ocorre em *Drosófilas*, no qual o programa morfogênético do embrião é especificado pelo membro da família HOX com localização mais posterior expresso no momento, em camundongos e, provavelmente em humanos, é

substituído pela teoria da redundância (Graham *et al.*, 2005). Nesta teoria, o padrão de desenvolvimento de uma célula ou tecido resulta da expressão combinada de vários membros da família HOX, e não da atividade específica ou dominante de um membro individual (Lander *et al.*, 2001). Esta teoria é mais bem demonstrada pelos membros do parágrafo 9 (HOXA9, HOXB9 e HOXC9) durante o desenvolvimento da glândula mamária (Condie & Capecchi, 1997). Estas glândulas em animais sem a expressão individual ou em pares (knock out simples ou duplo) destes genes são normais, enquanto que glândulas sem a expressão dos três membros apresentam intensa hipoplasia durante a gravidez e lactação (Condie & Capecchi, 1997). Outro exemplo corresponde aos membros do parágrafo 10 (HOXA10, HOXC10 e HOXD10), os quais atuam na morfogênese das vértebras torácicas (Chen & Capecchi, 1999). Estudos em animais demonstraram que mutações em quaisquer cinco alelos resultam na formação de um par de costelas a mais, originando-se a partir da primeira vértebra lombar, enquanto que mutações em quatro alelos resultam em uma morfologia torácica normal, indicando que a morfogênese vertebral é dependente de uma regulação quantitativa dos genes HOX ao invés da regulação qualitativa encontrada em *Drosófilas* (Chen & Capecchi, 1999).

Os genes HOX atuam na regulação do desenvolvimento e proliferação dos tecidos e definem os padrões de desenvolvimento dos órgãos e tecidos. No processo de maturação pulmonar, os membros da família HOX atuam de diferentes formas, apresentando papel importante durante a morfogênese

branquial que ocorre precocemente na vida fetal (Abate-Shen, 2002). No pulmão adulto, 11 membros da família HOX são expressos, incluindo 5 membros do loci A (HOXA2 ao HOXA6), 5 membros do loci B (HOXB2 ao HOXB6) e o gene HOXD1 (Pineault *et al.*, 2004). 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 (Tibério *et al.*, 1994). Na análise específica do loci B durante o desenvolvimento pulmonar de camundongos foi demonstrado que os genes HOXB3 e HOXB4 induzem a formação da região proximal (traquéia e brônquio principal), enquanto os genes HOXB2 e HOXB5 induzem a formação da região distal (Tibério *et al.*, 1994). A expressão dos vários genes HOX que se encontram altamente expressos no pulmão fetal diminui com o avanço da gestação, principalmente o gene HOXB5 (Bogue *et al.*, 1994). Níveis elevados da proteína HOXB5 foram encontrados em casos de malformação adenomatóide cística congênita e em sequestrações bronquiopulmonares quando comparado com o tecido pulmonar normal, sugerindo um papel importante deste gene no processo de formação de anormalidades pulmonares congênitas (Tibério *et al.*, 1994). 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 (Abate-Shen, 2002).

Os genes HOX também definem o padrão de desenvolvimento dos membros (Krumlauf *et al.*, 1994; Abate-Shen, 2002). Durante o desenvolvimento dos membros de galinhas, pelo menos, 23 genes HOX são expressos (Volpe *et al.*, 2003). O gene HOXA9 é expresso nas porções proximais, onde o úmero e fêmur se desenvolvem, e distais dos membros. Os genes HOXA10 e HOXA11 são expressos nas regiões ditas dos membros, no qual se formam os ossos rádio/ulna e tíbia/fíbula, enquanto os genes HOXA11-HOXA13 são expressos nos calcânhares e dedos (Volpe *et al.*, 2003). Um padrão de expressão semelhante foi encontrado para a família HOXD de genes homeobox. Entretanto, o cluster C demonstrou um padrão de expressão mais complexo: os genes da extremidade 3' (HOXC4 e HOXC5) foram expressos somente nas porções distais, enquanto os genes da extremidade 5' (HOXC9 e HOXC10) foram expressos apenas nas porções proximais dos membros (Volpe *et al.*, 2003).

Muitos dos progenitores hematopoéticos expressam os genes HOX em um padrão específico à linhagem celular e ao estágio de diferenciação celular (Samuel & Naora, 2005). Por exemplo, em células CD34⁺ de ratos, pelo menos, 22 dos 39 genes HOX são expressos. Os genes da porção 3' dos parálogos A e B são altamente expressos em células hematopoéticas primitivas e, à medida que estas células definem sua linhagem (mielóide ou linfóide), há uma redução na expressão destes genes, seguida por um aumento na expressão dos genes da extremidade 5' (Sauvageau *et al.*, 1994). A superexpressão individual de alguns membros da família HOX provoca uma perturbação no padrão de diferenciação

das células hematopoéticas indiferenciadas (Sauvageau *et al.*, 1994; Giampaolo *et al.*, 1994). 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 (Giampaolo *et al.*, 1994). Estudos utilizando oligonucleotídeos antisense contra HOXA5 demonstraram que este gene regula a proliferação dos eritrócitos e controla a hematopoiese granulocítica/monocítica (Giampaolo *et al.*, 1994). Estes achados demonstram que o gene HOXA5 tem um papel importante como regulador da diferenciação celular durante a hematopoiese (Giampaolo *et al.*, 1994; Crooks *et al.*, 1999). Juntamente com o gene HOXA5, a superexpressão de HOXA10 está associada com perturbações na diferenciação mielóide e de linfócitos B (Crooks *et al.*, 1999). O gene HOXA9 é expresso em células da medula óssea CD34⁺ e em linfócitos em desenvolvimento (Giampaolo *et al.*, 1994). Estudos em ratos demonstraram que a expressão alterada deste gene HOX provoca uma hematopoiese desregulada, resultando em defeitos na maturação dos linfócitos T e no aumento da morte de timócitos fetais (Amsellem *et al.*, 2003). Além dos membros do cluster A, alguns genes dos loci B e C também desempenham papel relevante na regulação da hematopoiese e no controle do ciclo celular (Crooks *et al.*, 1999; Amsellem *et al.*, 2003; Gabellini *et al.*, 2003).

As únicas mutações naturais em genes da família HOX já descritas em humanos ocorrem nos membros HOXA13 e HOXD13 (Mortlock *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 2002). Mutações específicas e a superexpressão destes genes

em ratos não resultam em transformações homeóticas, mas sim na redução do tamanho e na forma dos elementos ósseos associados com o retardo na ossificação e condrossificação (Favier & Dolle, 1997). Estes achados sugerem que os genes dos loci A e D controlam o recrutamento de células mesenquimais para a condensação pré-cartilaginosa que ocorre precocemente durante o desenvolvimento dos membros, assim como seu crescimento e maturação (Goodman *et al.*, 2002). Mutações no gene HOXD13 foram encontradas em pacientes com simpolodactilia, uma doença genética rara caracterizada pela combinação de sindactilia (dedos fusionados) e polidactilia (presença de dedos extras). A síndrome da mão-pé-genitália, a qual é caracterizada por anomalias nos membros e malformações do trato urogenital está associada com mutações nos genes HOXA13 (Mortlock *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 2002). 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. 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). Distúrbios epigenéticos podem promover a desregulação dos genes HOX, com conseqüências severas para o paciente (Abate-Shen, 2002). A síndrome valproato fetal ocorre devido ao uso prolongado do ácido valpróico (droga anticonvulsivante) pela mãe durante a

gravidez e, conseqüentemente, à exposição do feto a esta substância (Abate-Shen, 2002). Acredita-se que os efeitos teratogênicos do ácido valpróico ocorram devido à sua capacidade de alterar a expressão dos genes HOX e causar transformações homeóticas (Faiella *et al.*, 2002). As alterações congênitas mais freqüentes incluem defeitos no tubo neural, coração e membros, fissuras palatinas e anormalidades genitais. Outras anormalidades menos freqüentes correspondem à hérnia umbilical e inguinal, mamilos supranumerários, polidactilia e costelas bífidas (Clayton & Donnai, 1995).

2.3 Família HOX de Genes Homeobox no Câncer

O potencial oncogênico dos genes HOX tem sido claramente implicado em leucemias e seu papel no desenvolvimento de outras neoplasias está sendo atualmente muito estudado (Abate-Shen, 2002). Vários estudos registraram diferenças na expressão dos genes HOX entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno ainda permanece obscura em muitos casos. A expressão dos genes homeobox em tumores pode ser dividida em três categorias (Abate-Shen, 2002). A primeira categoria inclui os genes homeobox que são re-expressos nas 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 que são expressos durante o desenvolvimento no cérebro, glândula mamária e rins e em células tumorais derivadas destes órgãos (Abate-Shen, 2002). A segunda classe é caracterizada por genes homeobox que são expressos nas células tumorais, mas não são

normalmente expressos nas células em que o tumor se originou durante a embriogênese (“nova” expressão) (Abate-Shen, 2002). A terceira categoria é representada por genes que mostram uma expressão reduzida em células tumorais quando comparado com o tecido normal. Estes genes são freqüentemente expressos em tecidos adultos e têm uma expressão reduzida ou silenciada em cânceres (Abate-Shen, 2002).

Diferenças importantes têm sido detectadas na expressão entre os membros da família HOX de genes homeobox em neoplasias malignas quando comparado com os tecidos adultos normais correspondentes. 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) encontraram que 13 dos 39 genes HOX demonstravam uma expressão alterada. Os genes HOXA2, HOXA7, HOXA9, HOXC6 e HOXC9 foram expressos em ambas as amostras, sugerindo que estes genes podem desempenhar papel importante na manutenção da arquitetura tecidual e função do tecido esofágico adulto. Os membros HOXA7, HOXA9 e HOXC6 foram altamente expressos nas amostras de carcinoma quando comparado com as amostras de tecido normal, e ainda, os genes HOXA10, HOXA13, HOXB7, HOXC4, HOXC8, HOXD9, HOXD10 e HOXD13 foram expressos somente nas amostras de carcinoma, sugerindo uma possível associação destes membros com a progressão tumoral.

A análise da expressão dos genes HOX em tecidos mamários normais e em tecidos de câncer de mama demonstrou expressão diferenciada dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9 e

HOXD10 (Makiyama *et al.*, 2005). Todos os genes HOX, exceto o membro HOXC11, apresentaram maiores níveis de expressão nas amostras de tecido normal em relação aos tecidos neoplásicos. A expressão alterada destes genes HOX pode interferir na expressão de seus genes alvos diretos e promover o desenvolvimento tumoral (Makiyama *et al.*, 2005). Em linhagens celulares e em tecidos de cânceres de ovário, os genes HOXA3, HOXA4, HOXA7, HOXA10 e HOXA13 assim como todos os genes do loci B e os membros HOXC13 e HOXD13 foram superexpressos quando comparados com amostras de tecido normal (Yamashita *et al.*, 2006). HOXB13, HOXC11 e HOXC13 são superexpressos em linhagens celulares e amostras de câncer endometrial em relação ao tecido normal (Zhao *et al.*, 2005). 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). Na análise dos níveis de expressão dos membros do loci B, Lopez e colaboradores (2006) demonstraram que os membros HOXB2, HOXB4 e

HOXB13 foram expressos somente nas amostras de carcinoma cervical, enquanto os demais genes HOX foram expressos tanto no tecido cervical normal como no tecido neoplásico.

Os genes HOXA11, HOXA13, HOXB9, HOXD12 e HOXD13 apresentaram maiores níveis de expressão nas amostras de melanomas humanos quando comparados com amostras de nevos melanocíticos (Maeda *et al.*, 2005). Além disso, a expressão dos genes HOX foi distinta quando se comparou melanomas de diferentes espessuras. Os genes 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, mostrando que a expressão alterada destes 3 genes HOX pode estar associada com a fase de crescimento vertical do melanoma (Maeda *et al.*, 2001). Ainda neste trabalho, os autores encontraram que a expressão dos genes HOX também variou em relação à presença ou não de metástases. Os níveis de expressão dos genes HOXA1, HOXA2, HOXC4 e HOXB13 foram significativamente maiores nas amostras de melanoma com metástases à distância (Maeda *et al.*, 2005). HOXB7 foi o único gene do loci B expresso constitutivamente em 25 diferentes linhagens celulares e em 5 amostras cirúrgicas de melanoma humano (Makiyama *et al.*, 2005). Em culturas de melanócitos normais e em nevos melanocíticos, o gene HOXB7 é expresso somente em células em proliferação (Maeda *et al.*, 2005). Desta maneira, 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 cânceres de próstata, o gene HOXC8 apresentou níveis significativamente elevados de RNA mensageiro em 12 das 16 amostras 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 significativamente 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). Miller *et al.* (2000) encontraram maiores níveis de expressão dos genes HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8 no epitélio de amostras microdissecadas de câncer de próstata e em linfonodos metastáticos quando comparado com o tecido normal. Ainda neste estudo, estes mesmos genes foram altamente expressos em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata quando comparado com células do estroma, as quais apresentaram níveis indetectáveis de expressão. Assim, acredita-se que a superexpressão dos membros do loci C da família HOX de genes homeobox desempenhe papel importante na patogênese do câncer de próstata (Waltregny *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2000).

A expressão anormal de um número variado de genes HOX dos quatro clusters tem sido identificada em cânceres de pulmão, em particular os membros do loci 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).

Recentemente, Hassan *et al.* (2006) avaliaram a expressão dos membros da família HOX em displasias e CEC orais. Os genes HOXA2, HOXB2, HOXD3, HOXD4, HOXD8 e HOXD9 apresentaram maiores níveis de expressão quando comparado com os demais genes HOX em amostras de mucosa oral normal. As amostras de CEC oral demonstraram níveis elevados de expressão dos genes HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXB3, HOXB7, HOXB9, HOXC4, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC11, HOXC13, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 quando comparado com as amostras de mucosa normal, sugerindo que a superexpressão ou a re-expressão de alguns genes HOX podem estar associada com o aparecimento do tumor. Os tecidos displásicos demonstraram níveis reduzidos de expressão dos genes HOXA1, HOXB7, HOXB9 e HOXC8 em relação às amostras de CEC oral, podendo a superexpressão destes genes estar associada à transformação de condições malignizáveis da cavidade oral. Este estudo também analisou 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 progressão e metástase do CEC oral.

A presença dos genes HOX tem sido freqüentemente observada em leucemias, principalmente nas leucemias mielóides agudas (Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Grier *et al.*, 2005). Mudanças na expressão dos genes HOX estão associadas com translocações e rearranjos cromossômicos (Dimartino *et al.*, 2005). A fusão entre os genes nucleoprotein NUP98 e HOXA9 está presente em leucemias mielóides agudas (Wellik & Capecchi, 2003). A superexpressão do gene HOXA10 bloqueia o desenvolvimento de linfócitos B e promove o desenvolvimento de leucemias mielóides (Nakamura *et al.*, 1996; Maroulakou & Spyropoulos, 2003; Grier *et al.*, 2005). A cooperação entre os genes HOXB3, HOXB4 e PBX1 tem papel importante na proliferação e transformação das células sangüíneas (Krosl *et al.*, 1998).

Os genes HOX estão intimamente envolvidos em processos celulares importantes para a oncogênese, incluindo o controle do ciclo celular, angiogênese, proliferação, diferenciação e morte celular, síntese de moléculas de adesão e, indiretamente, no controle da migração e invasão celular via regulação na síntese de matriz (Abate-Shen, 2002). A expressão de HOXC10 é correlacionada e controlada pelo ciclo celular (Abate-Shen, 2002). HOXA1 estimula a ativação transcricional de algumas moléculas pró-oncogênicas, incluindo ciclina D1 e Bcl-2, induzindo a proliferação e sobrevivência de células de carcinoma mamário humano (Zhang *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005). A expressão forçada de HOXA1 é suficiente para promover a transformação oncogênica de células epiteliais mamárias humanas imortalizadas, com conseqüente formação de colônias em ensaios de soft ágar (crescimento independente de ancoragem) e formação

tumoral agressiva *in vivo* (Yap *et al.*, 2003). Ainda neste estudo foi demonstrado que E-caderina, uma molécula envolvida na adesão celular é capaz de estimular a sinalização intracelular, potencializar a sobrevivência das células neoplásicas (Zhang *et al.*, 2006) e estimular a expressão de HOXA1 (Yap *et al.*, 2003). Neste contexto, HOXA1 induz a sobrevivência celular e permite que E-caderina estimule a proliferação independente de ancoragem das células tumorais.

O gene HOXA10 é um regulador positivo do gene supressor de tumor p53, o qual 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 malignas (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. 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).

Inúmeros estudos demonstram que a expressão inapropriada de N-caderina pelas células epiteliais induz a quebra da adesão célula-célula, migração e invasão de células derivadas de câncer de mama (Hazan *et al.*, 2000). Em

células superexpressando HOXD3 ocorre uma perda na expressão de E-caderina e indução da expressão de N-caderina, contribuindo para o fenótipo metastático e invasivo de células derivadas de câncer de pulmão (Hamada *et al.*, 2001). Juntamente com a expressão destes genes (HOXD3 e N-caderina), há um aumento concomitante na expressão de matriz metaloproteinase 2 (MMP-2) e fator ativador de plasminogênio (uPA), enzimas em íntima associação com os processos de angiogênese e invasão tumoral (Hazan *et al.*, 2000). A expressão de HOXD3 induz a expressão de integrina $\alpha 5\beta 3$ e dos ativadores de plasminogênio, os quais controlam a degradação de matriz extracelular (Grier *et al.*, 2005; Maroulakou & Spyropoulos, 2003). Por meio de tecnologia antisense foi demonstrado que o gene HOXB13 controla a capacidade invasiva de linhagens celulares derivadas de câncer endometrial (Zhu *et al.*, 2005). Utilizando a mesma metodologia foi demonstrado que HOXD3 controla a migração e invasão de células do melanoma humano (Okubo *et al.*, 2002).

Estudos superexpressando o gene HOXD3 demonstraram que há uma indução concomitante na expressão da integrina $\alpha v\beta 3$, a qual atua promovendo a motilidade celular (Boudreau *et al.*, 1997). Interessantemente, a superexpressão de HOXD3 promove também uma redução na expressão de genes associados à estrutura dos desmossomos, favorecendo desta forma a dissociação e migração das células neoplásicas (Miyazaki *et al.*, 2002). A expressão de HOXD3 nas células endoteliais parece regular seletivamente a expressão de genes que contribuem para a remodelação da matriz extracelular durante a angiogênese

(Boudreau *et al.*, 1997). Este gene é ainda necessário para o processo angiogênico normal e sua expressão prolongada ou em excesso pode provocar a manutenção do fenótipo ativo/invasivo das células endoteliais e interferir com a remodelação vascular (Boudreau *et al.*, 1997).

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). Em melanomas a expressão desregulada de HOXB7 contribui para a transformação e progressão das células neoplásicas via bFGF (Waltregny *et al.*, 2002). A inibição da atividade de HOXB7 com oligonucleotídeos antisense demonstrou uma redução na capacidade invasiva das linhagens celulares derivadas de câncer de ovário (Yamashita *et al.*, 2006). A superexpressão de HOXB7 foi também capaz de transformar células epiteliais humanas mamárias, alterando seu fenótipo e conferindo resistência ao tratamento destas células com radiação ionizante (Zhu *et al.*, 2005). Desta maneira, o aumento na resistência à radiação ionizante pode favorecer o acúmulo de mutações potencialmente deletérias para a célula, predispondo-a a transformação maligna (Zhu *et al.*, 2005). No trabalho realizado por Rubin *et al.* (2007) foi demonstrado que células superexpressando o gene HOXB7 apresentam aumento de sobrevivência e da taxa de reparo do DNA quando comparado com seus respectivos controles. Além disso, 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).

A expressão forçada do gene HOXB7 foi capaz de modular o programa de diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas, promovendo uma sobrevida e proliferação prolongada de células orientadas para a diferenciação granulo-monocítica (Nakamura *et al.*, 1996). Estes achados sugerem um importante papel da superexpressão de HOXB7 no processo de imortalização celular pré-leucemia (Dimartino *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1996). Na linhagem celular SkBr3 derivada de câncer de mama, a superexpressão do gene HOXB7 foi capaz de promover o crescimento celular em meio de cultura contendo 1% de soro em decorrência da indução da produção de bFGF pelo gene HOXB7, e ainda foi capaz de promover o crescimento das células SKBr3-HOXB7 em meio semi-sólido (Nakamura *et al.*, 1996). Neste mesmo estudo, experimentos com oligonucleotídeos antisense para bFGF bloquearam a capacidade de crescimento independente de soro das células SkBr3 superexpressando HOXB7, indicando a participação deste gene no processo de proliferação celular via liberação de bFGF (Dimartino *et al.*, 1999). Além da indução da liberação de bFGF, a linhagem celular SkBr3 superexpressando o gene HOXB7 aumentou a liberação de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular, interleucina-8 e angiotensina-2 (Dimartino *et al.*, 1999). Estas mesmas células foram capazes de induzir a neoformação capilar quando cultivadas *in vitro* com células endoteliais e

ainda, promoveram a formação de tumores *in vivo* caracterizados pela presença de lacunas vasculares, pequenos vasos com e sem organização, assim como induzir a formação de vasos maduros no interior do tumor e na área peritumoral (Dimartino *et al.*, 1999). Desta maneira, acredita-se que o gene HOXB7 desempenhe papel relevante como ativador da neoangiogênese associada à formação e progressão tumoral em diferentes tipos de câncer, favorecendo os processos de invasão e proliferação das células malignas (Waltregny *et al.*, 2002; Makiyama *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2006).

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo determinar o padrão de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox localizados nos loci B e C em amostras de mucosa oral normal proveniente de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o CEC oral e em amostras de mucosa oral normal e CEC oral provenientes do mesmo paciente por meio da técnica de transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) “duplex”. Em adição, este estudo analisou os níveis de expressão dos membros destes loci em uma linhagem de queratinócito normal e em quatro linhagens celulares de CEC oral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética

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

4.2 Culturas Celulares

As linhagens celulares SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 provenientes de CECs orais foram adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA). De acordo com o catálogo da ATCC, todas as linhagens celulares acima foram estabelecidas a partir de CECs primários de língua de pacientes do gênero masculino com 55, 25, 55 e 70 anos, respectivamente. A linhagem imortalizada de queratinócitos normais HaCAT foi gentilmente cedida pelo Dr. André Vetori (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo-SP). A linhagem HaCAT foi cultivada em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² (Corning Inc, Corning, NY, EUA) contendo o meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab Ltda, Campinas-SP), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), 100 µl/ml de penicilina (Invitrogen, E.U.A.) e 100 µl/ml de estreptomicina (Invitrogen, E.U.A.) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. As linhagens celulares derivadas de CECs orais

foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de FBS, 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, E.U.A.), 100 µl/ml de penicilina e 100 µl/ml de estreptomicina a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a confluência as células foram subcultivadas. Para isto, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2% em PBS, para frascos de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente. Após um período médio de 2 min, as células já haviam se separado do assoalho do frasco de cultura (o que foi determinado por observação em microscópio de contraste de fase) e então a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 5 ml (frascos de 25 cm²) ou 8 ml (frascos de 75 cm²) de meio de cultura suplementado com 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning) e estes centrifugados a 3.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi removido e descartado e o precipitado de células foi ressuspenso e plaqueado na concentração de 5x10⁵ células por placa de 100 mm de diâmetro (Corning) para posterior extração de RNA total. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas por no máximo 10 passagens e então descartadas.

4.3 Amostras de Tecido Oral

Todos os fragmentos de tecido utilizados neste estudo foram coletados durante o diagnóstico de pacientes com lesões orais no Orocentro da FOP-UNICAMP. A Tabela 1 descreve as principais características clínicas e histopatológicas das amostras utilizadas neste estudo. Os fragmentos de mucosa oral normal foram coletados de 10 indivíduos clinicamente saudáveis sem história de tabagismo e etilismo e que foram submetidos ao tratamento cirúrgico para remoção de lesões benignas comuns no Orocentro. À margem do leito cirúrgico foi realizada uma biopsia com “punch” para obtenção de um fragmento de 5 mm de diâmetro. Os pares de amostras orais de CEC e de tecido morfológicamente normal provenientes do mesmo paciente foram coletados da mesma maneira, por meio de biópsias com “punch” no interior da lesão, evitando-se áreas de necrose, e à margem da lesão, respectivamente. Uma porção de cada fragmento de tecido foi fixada em 10% formalina e processada 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 -80°C até o momento de sua utilização. 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, estágio de invasão (profundidade do tumor) e presença de infiltrado inflamatório linfomonoplasmocitário.

Tabela 1. Características clínico-patológicas das amostras deste estudo.

Paciente	Gênero	Idade	Localização	TNM	Graduação Histológica
Normal					
1	F	50	Língua	NA	Tecido normal
2	F	39	Mucosa jugal	NA	Tecido normal
3	M	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	M	40	Lábio inferior	NA	Tecido normal
10	F	35	Rebordo alveolar	NA	Tecido normal
CEC Oral					
1	M	38	Lábio inferior	T2N0M0	BD
2	M	60	Língua	T2N0M0	MD
3	M	51	Retromolar	T2N1M0	BD
4	M	68	Palato mole	T2N0M0	MD
5	M	54	Palato mole	T1N0M0	MD
6	M	62	Palato mole	T2N2M0	MD
7	M	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	M	72	Assoalho	T1N0M0	BD
12	M	54	Língua	T3N1M0	BD
13	M	69	Língua	T3N0M0	MD
14	M	70	Língua	T1N0M0	BD

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

4.4 Isolamento do RNA

RNA total foi extraído das culturas celulares e dos tecidos pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina. As linhagens celulares foram lavadas com PBS e incubadas com 1,5 ml de TRIzol (Invitrogen, E.U.A.) por 5 min. Os fragmentos de tecido foram cortados manualmente com um bisturi, colocadas em tubos de polipropileno contendo 1,5 ml de TRIzol e trituradas com um homogeneizador de tecido (Marconi MA102, Piracicaba, São Paulo) com a finalidade de tornar a ação do Trizol mais homogênea em toda a amostra. As etapas seguintes foram semelhantes para todas as amostras. Após a lise celular, foi adicionado 0,3 ml de clorofórmio para cada tubo e uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Após a centrifugação a 12.000 xg durante 15 min, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 0,75 ml de álcool isopropano por mililitro de solução desnaturante. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 xg por 10 min. Neste momento foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. A solução sobrenadante foi descartada e foi adicionado 1 ml de álcool a 75%. Após centrifugação a 6.000 xg durante 5 min, o álcool foi descartado e o RNA foi ressuspendido em água livre de DNase e RNase. A concentração do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 e 280 nm (Espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA). O RNA foi armazenado a -80°C até o momento de sua utilização.

A pureza e integridade do RNA isolado foram determinadas por um gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% e 0,2

µg de brometo de etídio. Três 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™ equipado com a câmera digital DC40 (Figura 2).

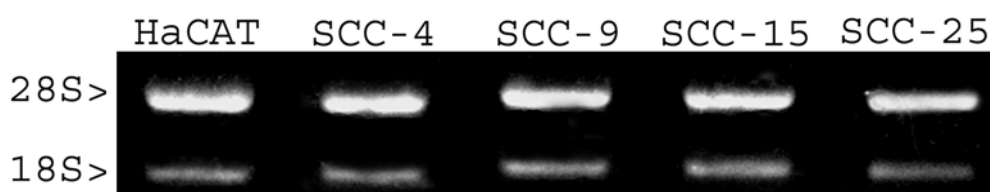


Figura 2. Imagem representativa de uma série de amostras de RNA analisadas neste estudo. Note a integridade das subunidades ribossômicas 28S e 18S após a separação eletroforética em gel de agarose/MOPS/formaldeído.

4.5 Síntese do DNA Complementar (cDNA)

Três µg de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA adicionando uma mistura contendo 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen, E.U.A.), 4 µl de 5x tampão de síntese (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 1 µl de 10 mM dNTPs, 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de RNase Out (40 U/µl; Invitrogen, E.U.A.), 1 µl de Superscript II RT (200 U/µl; Invitrogen, E.U.A.). A mistura foi incubada por 50 min a 42°C e posteriormente por 15 min a 70°C.

4.6 Reação de PCR “Duplex”

A reação de PCR “duplex” foi desenvolvida utilizando pares de primers específicos para cada membro da família HOX de genes homeobox e o gene

controle GAPDH (Tabela 2). Assim, 2 µl do cDNA foram amplificados em um termociclador (Modelo 9600, Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta pelos pares de primers específicos para cada membro dos clusters B e C da família HOX de genes homeobox (Yamamoto *et al.*, 2003), pares de primers específicos para o gene GAPDH, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs e 0,05 U/µl Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, E.U.A.). Para os membros do loci B a temperatura de anelamento da reação foi 57°C e para os membros do loci C a temperatura foi 60°C. A reação de PCR foi realizada com 32 ciclos. Os produtos de PCR foram separados eletroforicamente em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% e corados com 0,2 µg de brometo de etídeo durante 15 min. A documentação dos ensaios de RT-PCR foi realizada no sistema de fotodocumentação Kodak Digital ScienceTM equipado com a câmera digital DC120.

4.7 Análise Densitométrica

A quantificação das bandas dos ensaios de RT-PCR “duplex” foi realizada no programa 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, E.U.A.). O valor da densidade óptica foi calculado levando-se em consideração a área e a intensidade de cada banda. A normalização foi realizada dividindo-se o valor da densidade óptica da banda de interesse pelo valor da banda do gene controle GAPDH.

4.8 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, $p \leq 0,05$ foi considerado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2. Primers utilizados nos ensaios de RT-PCR “duplex”.

Gene	Seqüência (5'-3')	Concentração dos primers (nM)	Extensão do produto (pb)
HOXB			
B1	Forward: GAAACACAGGTCAAGATTTGGTT Reverse: GGAAGCCCCATTGGTGGCTAGGT	11,2 12,1	205
B2	Forward: GAAAGGCAGGTCAAAGTCTGGTT Reverse: GGTCGCAGATGTCCTCCAGGG	11,2 13,7	121
B3	Forward: GAGCGGCAGATCAAGATCTGGTT Reverse: GGTAGTTGGAGGGCAGCGCGTAG	11,6 11,6	241
B4	Forward: GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT Reverse: CGCGGGGGCCTCCATTGGGC	11,8 10,1	142
B5	Forward: GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT Reverse: GCAGGCTTGTGGGAACCGGTC	11,8 13,4	220
B6	Forward: GAGAGGCAGATCAAGATATCGTT Reverse: CCAGCACCTTACTCGGCCTGTTTTCTTC	10,9 10,8	125
B7	Forward: GAAAGACAGATCAAGATTTGGTT Reverse: CTGGGCTTCTCTTCTCGTCTCCCTTCTCATG	10,9 11,2	180
B8	Forward: GAGAGACAGGTCAAAATCTGGTT Reverse: CTTGTGCGCCCTCTGCGCGTC	11,1 16,1	168
B9	Forward: GAGAGACAAGTCAAAATCTGGTT Reverse: GCACTGGCTTTGCAGTCGTCACAT	10,9 12,3	156
B13	Forward: GAGCGCCAGATTACCATCTGGTT Reverse: CCAGGACACCCCCACTTTTCGC	12,3 14,7	134
HOXC			
C4	Forward: GAGAGGCAGATCAAAATCTGGTT Reverse: GTGGTCTTCAGAAGTACCCGGGGTA	11,1 11,0	150
C5	Forward: GAGAGACAGATCAAGATCTGGTT Reverse: CCCCCTGCCTCTAAAGAGCCT	11,1 13,9	95
C6	Forward: GAGCGACAGATCAAAATCTGGTT Reverse: GGGAGAGAGGGGTGGCAGGGAC	11,3 11,4	195
C8	Forward: GAGAGACAAGTGAAGATCTGGTT Reverse: GGGGTCTTTCTTTTGTCTAGTCCTTGT	10,9 10,6	180
C9	Forward: GAGCGGCAGGTCAAAATCTGGTT Reverse: TTTCCCTTGGCTGTGCTGAGG	11,6 14,7	126
C10	Forward: GACAGACAAGTCAAAATCTGGTT Reverse: CGCTCTCAGGTGAAATTAATTTGGAGGT	11,1 9,0	110
C11	Forward: GACCGACAAGTCAAAATTTGGTT Reverse: AAAGGGCCCGGTCTGCAG	11,2 10,1	118
C12	Forward: GACCAGCAGGTCAAGATCTGGTT Reverse: TTTGCTCTCTGCCAGGGACAGG	11,8 13,4	142
C13	Forward: GAGCGCCAGGTAACCATCTGGTT Reverse: GCGCGTTCTTCTCTTTCCTTAACA	12,2 12,5	215
GAPDH	Forward: GAAGGTGAAGGTCGCAGTC Reverse: GAAGATGGTGATGGGATTTTC	9,0 8,7	285

5. RESULTADOS

5.1 Expressão dos Membros dos Loci B e C da Família HOX de Genes Homeobox nas Linhagens Celulares de Queratinócitos Normais e de CEC Oral

O padrão de expressão de cada um dos membros dos loci B e C da família HOX de genes homeobox nas linhagens celulares HaCAT, SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 é demonstrado nas figuras 3-6.

Poucos membros do loci B foram expressos pelas linhagens celulares. A linhagem de queratinócitos imortalizada, mas não transformada HaCAT foi a que expressou o maior número de membros do loci B (Fig. 4). Esta linhagem expressou 5 dos 10 (50%) genes do loci B, incluindo HOXB2, HOXB6, HOXB7, HOXB8 e HOXB13 (Figura 3). As linhagens de CEC oral demonstraram um padrão de expressão semelhante para os genes do loci B, com a grande maioria dos membros não sendo expressa (Figura 3). As linhagens SCC-4 e SCC-15 apenas expressaram o gene HOXB13, enquanto que as linhagens SCC-9 e SCC-25 expressaram além de HOXB13, o membro HOXB7 (Figura 3). Nenhuma das linhagens celulares apresentou transcritos para HOXB1, HOXB3, HOXB4, HOXB5 e HOXB9 (Figura 3). Os níveis de expressão do gene HOXB7 foram maiores na linhagem HaCAT comparado com os níveis das linhagens de CEC oral (Figura 4). O membro HOXB13 apresentou o mesmo padrão de expressão em todas as linhagens celulares estudadas (Figura 4).

Ao contrário do encontrado para os membros do loci B, todos os membros do loci C foram expressos em, pelo menos, uma das linhagens celulares deste estudo (Figura 5). A linhagem HaCAT expressou 8 dos 9 (88,9%) membros deste loci (Figura 5). Apenas o membro HOXC5 não foi expresso pela linhagem celular HaCAT (Figura 5). O padrão de expressão entre as linhagens de CEC foi semelhante, com todas as linhagens celulares de CEC oral expressando todos os membros deste loci (Figura 5). Os genes HOXC4, HOXC5 e HOXC6 apresentaram maiores níveis de expressão nas linhagens celulares de CEC oral quando comparado com a linhagem celular HaCAT, enquanto que os membros HOXC10, HOXC11, HOXC12 e HOXC13 foram expressos em maiores níveis pela linhagem HaCAT (Figura 6). Os genes HOXC8 e HOXC9 demonstraram o mesmo padrão de expressão em todas as linhagens celulares estudadas (Figura 6).

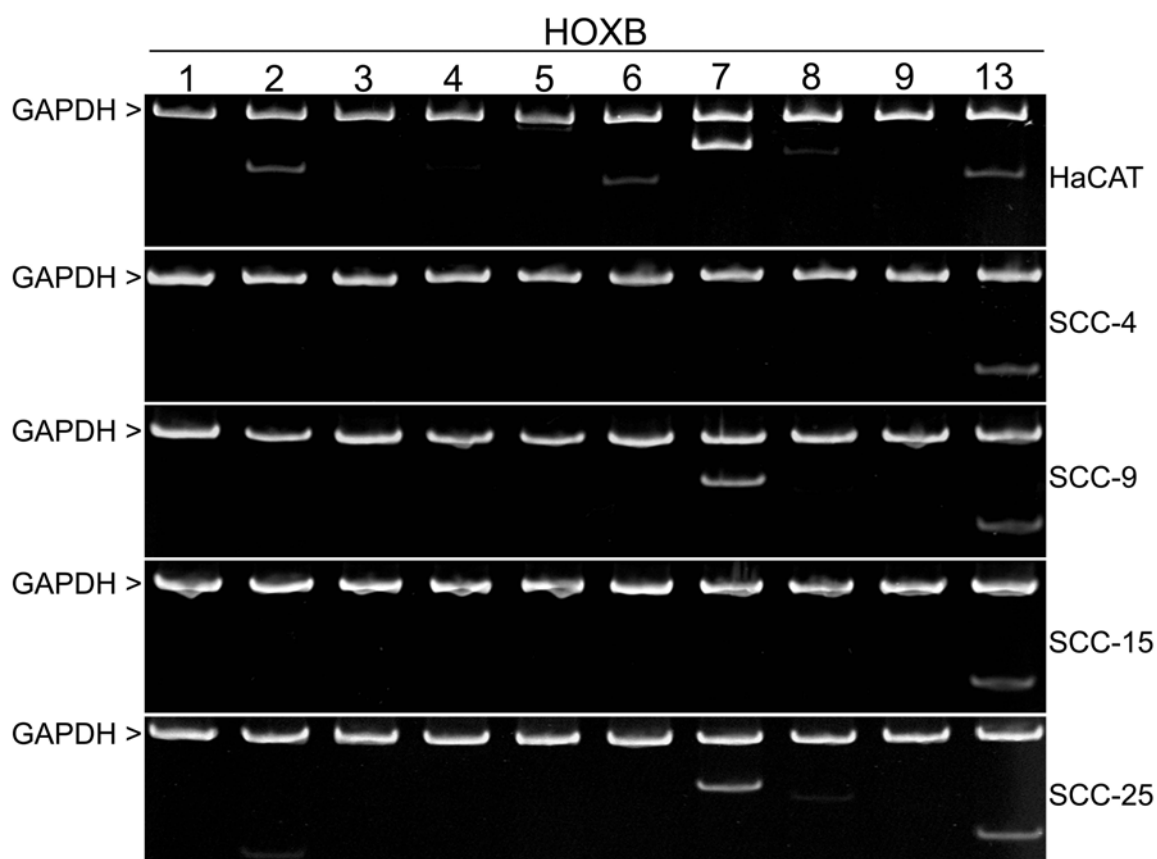


Figura 3. Padrão de expressão dos membros do loci B da família HOX de genes homeobox nas linhagens celulares de queratinócitos normais e CEC oral. Após amplificação, os produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 8% e corados com brometo de etídio. Poucos genes deste loci foram expressos pelas linhagens celulares analisadas. Os genes HOXB2, HOXB6 e HOXB8 foram expressos somente pela linhagem celular HaCAT. HOXB13 foi expresso por todas as linhagens celulares.

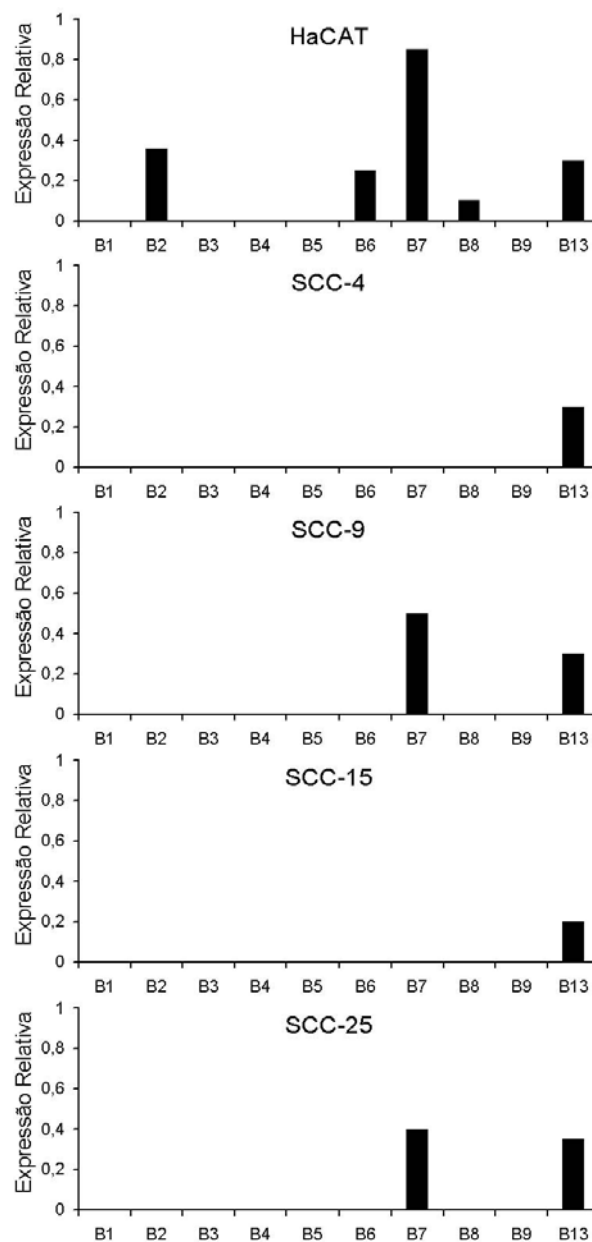


Figura 4. Análise densitométrica do padrão de expressão dos membros do loci B da família HOX de genes homeobox nas cinco linhagens celulares estudadas. Os valores são apresentados como a expressão de cada membro HOX normalizado pela expressão do gene controle GAPDH. O gene HOXB7 demonstrou maiores níveis de expressão na HaCAT quando comparado com as linhagens celulares de CEC oral.

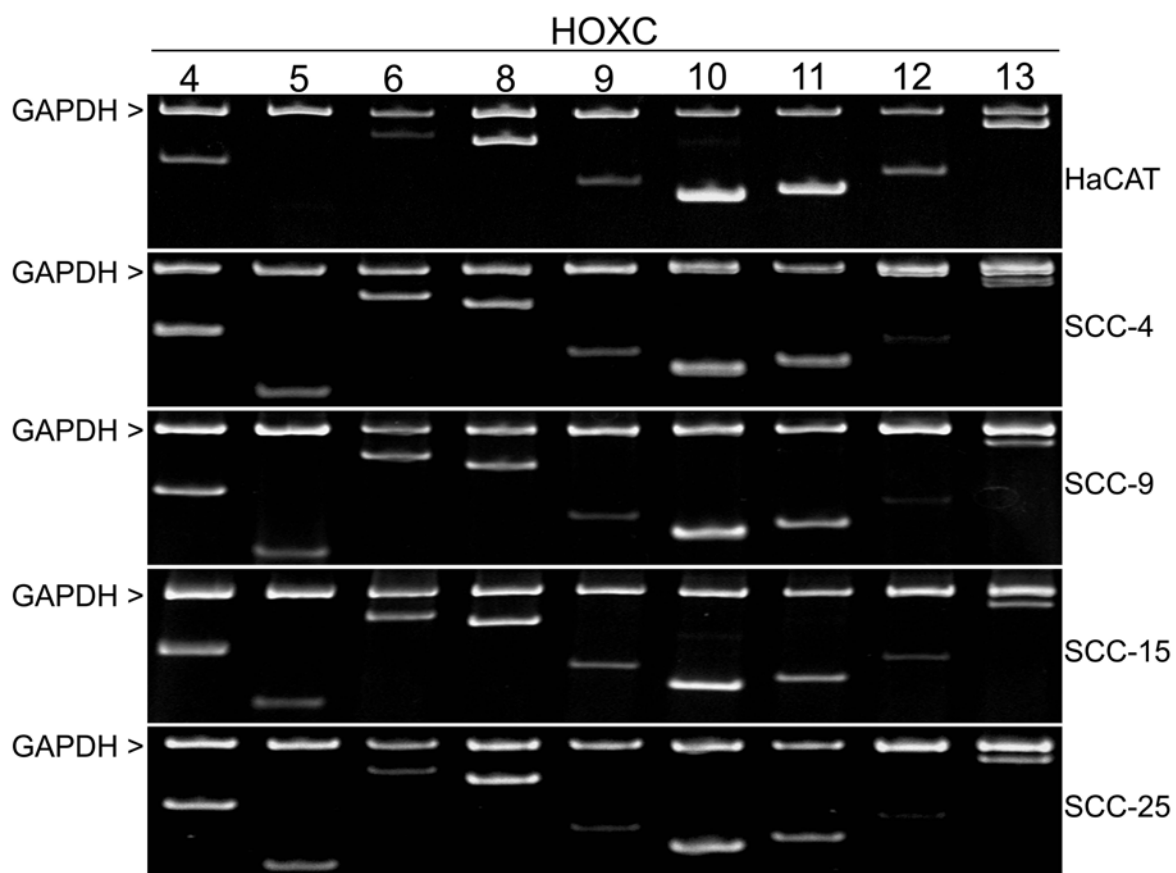


Figura 5. Padrão de expressão dos membros do loci C da família HOX de genes homeobox nas linhagens celulares de queratinócitos normais e CEC oral. Após amplificação, os produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 8% e corados com brometo de etídio. HOXC5 foi o único gene deste loci não expresso pela linhagem HaCAT. Os níveis de expressão de HOXC12 foram bastante reduzidos nas linhagens celulares de CEC oral.

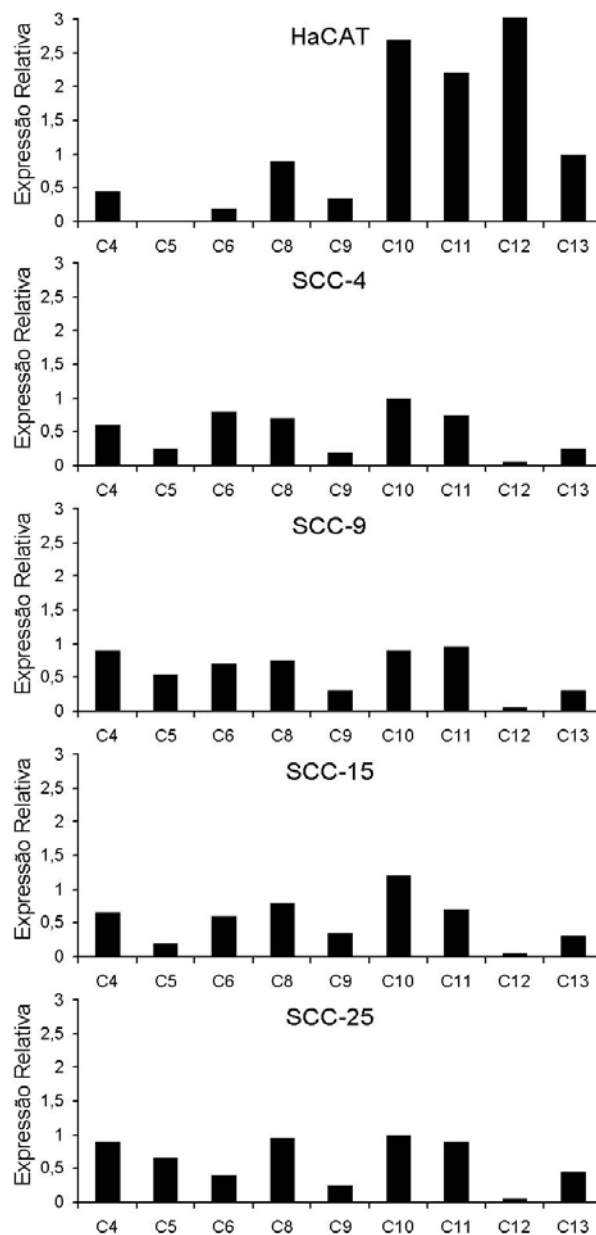


Figura 6. Análise densitométrica do padrão de expressão dos membros do loci C da família HOX de genes homeobox nas cinco linhagens celulares deste estudo. Os valores são apresentados como a expressão de cada membro normalizado pela expressão do gene controle da reação GAPDH. Os membros HOXC10, HOXC11, HOXC12 e HOXC13 apresentaram maiores níveis de expressão na linhagem HaCAT quando comparado com os níveis de expressão das linhagens de CEC oral.

5.2 Expressão dos Membros dos Loci B e C da Família HOX de Genes Homeobox em Amostras de Mucosa Normal de Pacientes Livres de Hábitos Associados à Oncogênese Oral e em Amostras Oraís de Mucosa Normal e CEC Provenientes do Mesmo Paciente

Os genes HOXB1 (Figura 7), HOXB3 (Figura 9), HOXB5 (Figura 11), HOXB8 (Figura 14) e HOXC12 (Figura 24) não foram expressos por nenhuma das amostras analisadas neste estudo, enquanto que o gene HOXB6 (Figura 12) foi expresso fracamente por apenas 1 amostra de CEC oral e HOXB4 (Figura 10) e HOXB9 (Figura 15) foram expressos por 2 amostras de CEC oral. Interessantemente, HOXB1, HOXB3 e HOXB5 também não foram expressos pelas linhagens celulares. Entretanto, níveis de mRNA do gene HOXC12 foram detectados em todas as linhagens celulares, sendo a expressão na linhagem HaCAT intensamente mais forte quando comparado com as linhagens de CEC oral.

As amostras de mucosa oral normal obtidas de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o CEC oral expressaram poucos transcritos e nenhum membro dos loci B e C foram expressos por todas as amostras deste grupo. Dentre os genes expressos por este grupo estão HOXB7, que foi expresso por 50% das amostras (5/10; Figura 13), HOXB13, expresso por 80% das amostras (8/10; Figura 16), HOXC9, expresso por 20% das amostras (2/10; Figura 21) e HOXC10, expresso por 30% das amostras (3/10; Figura 22). Os membros HOXB2 (Figura 8), HOXB4 (Figura 10), HOXB6 (Figura 12), HOXB9 (Figura 15),

HOXC4 (Figura 17), HOXC5 (Figura 18), HOXC6 (Figura 19), HOXC8 (Figura 20), HOXC11 (Figura 23) e HOXC13 (Figura 25) não foram expressos por nenhuma das amostras de mucosa oral normal de pacientes não expostos aos principais fatores de risco para o CEC oral.

As amostras de tecido normal provenientes dos pacientes com CEC oral demonstraram um padrão de expressão muito similar ao das amostras dos pacientes sem fatores de risco. Apenas o gene HOXB2 fugiu a esta regra, sendo expresso por 5 (35,7%) amostras do grupo de tecido normal proveniente de pacientes com CEC oral (Figura 8). Os genes HOXB4 (Figura 10), HOXB6 (Figura 12) e HOXB9 (Figura 15) não foram expressos por nenhuma das amostras deste grupo. O padrão de expressão dos membros do loci C foi parecido entre os grupos de mucosa morfolologicamente normal de pacientes com CEC oral e mucosa normal de pacientes sem exposição ao tabaco e álcool. Exceções incluíram o gene HOXC8, que foi expresso por 3 (30%) amostras deste grupo (Figura 20), HOXC9, que foi expresso por 4 (40%) amostras (Figura 21), e HOXC10, que foi expresso por 9 (90%) amostras (Figura 22). HOXC13 foi expresso por apenas 1 (10%) das amostras deste grupo (Figura 25), enquanto que os genes HOXC4 (Figura 17), HOXC5 (Figura 18), HOXC6 (Figura 19) e HOXC11 (Figura 23) não foram expressos por nenhuma das amostras deste grupo. Embora tenha existido uma pequena diferença na expressão de alguns genes, não existiu nenhuma diferença significativa entre a expressão dos genes HOX dos loci B e C entre os grupos de amostras orais normais.

Os genes HOXB2 (Figura 8), HOXB7 (Figura 13) e HOXB13 (Figura 16) foram expressos por um número marcadamente maior de amostras de CEC oral comparado com amostras de tecido oral normal independente da origem. O gene HOXB2 foi expresso por 7 (50%) das amostras do grupo de CEC oral (Figura 8), HOXB7 foi expresso por 13 (92,8%) (Figura 13) e HOXB13 foi expresso por 11 (78,6%) das amostras do grupo de CEC oral (Figura 16). Todos os membros do loci C foram expressos por um grande número de amostras de CEC oral, com exceção de HOXC12, que não foi expresso por nenhuma das amostras deste estudo (Figura 24), e HOXC13, que foi expresso por apenas 4 amostras (Figura 25). HOXC5 (Figura 18) e HOXC6 (Figura 19) foram expressos por 80% das amostras deste grupo, HOXC8 (Figura 20), HOXC9 (figura 21) e HOXC10 (Figura 22) foram expressos por todas as amostras e HOXC11 foi expresso por 90% das amostras do grupo de CEC oral (Figura 23). Independente da origem das amostras de mucosa oral normal, a expressão dos membros HOXB7 (Figura 13), HOXC4 (Figura 17), HOXC5 (Figura 18), HOXC6 (Figura 19), HOXC8 (Figura 20), HOXC9 (Figura 21), HOXC10 (Figura 22) e HOXC11 (Figura 23) foi significativamente maior nas amostras de CEC oral. Os níveis de expressão dos membros HOXB2 (Figura 8) e HOXC13 (Figura 25) foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral quando comparado com os níveis de expressão encontrados nas amostras de mucosa normal de pacientes livres de fatores de risco.

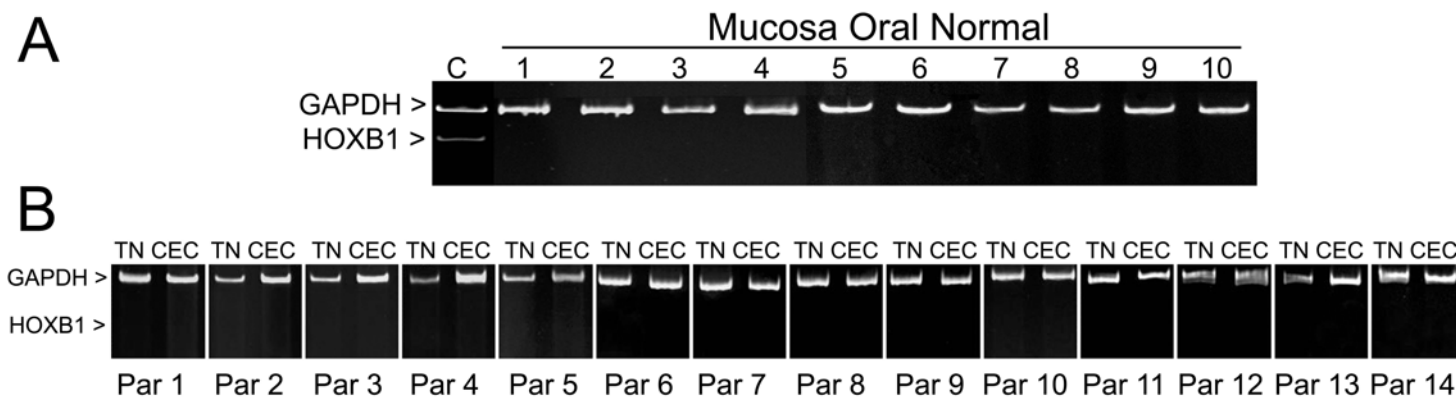


Figura 7. HOXB1 não é expresso por amostras de mucosa oral normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente.

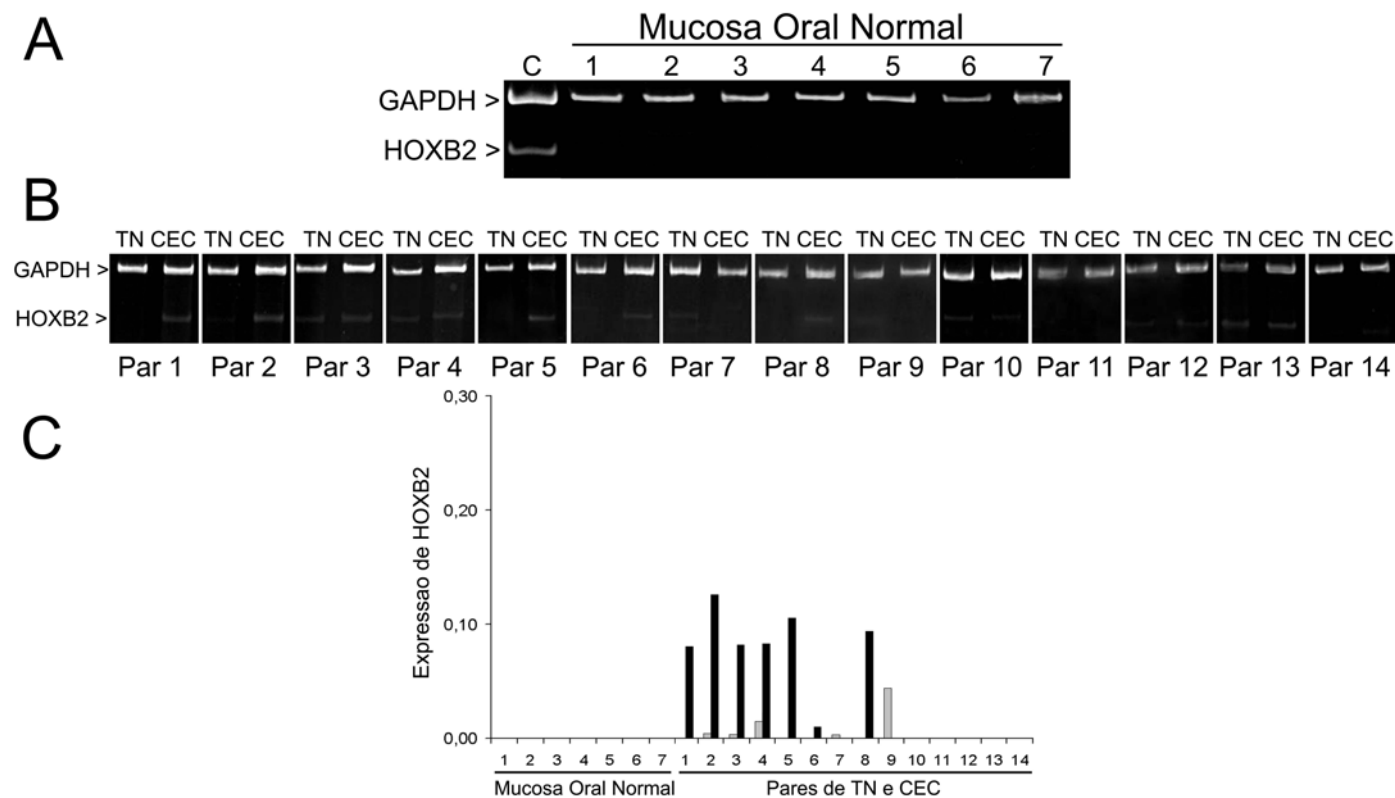


Figura 8. Análise dos níveis de expressão do gene HOXB2 em amostras de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 7 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (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. (C) Análise densitométrica da expressão de HOXB2 normalizada pelo gene controle GAPDH. A expressão de HOXB2 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,05$).

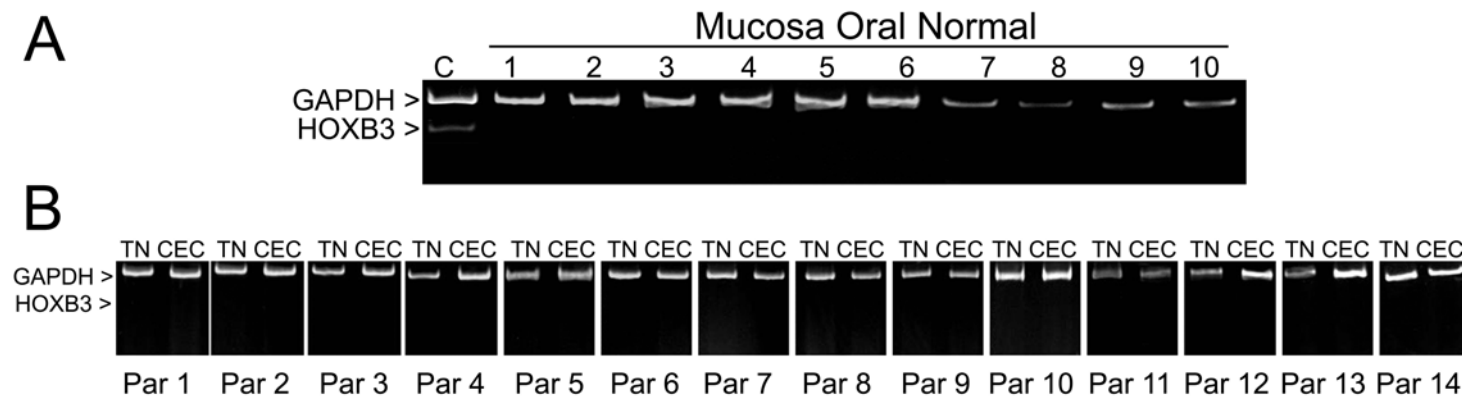


Figura 9. Expressão do gene HOXB3 em amostras de mucosa oral normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente. Em nenhuma amostra deste estudo foi possível detectar níveis de expressão de mRNA de HOXB3.

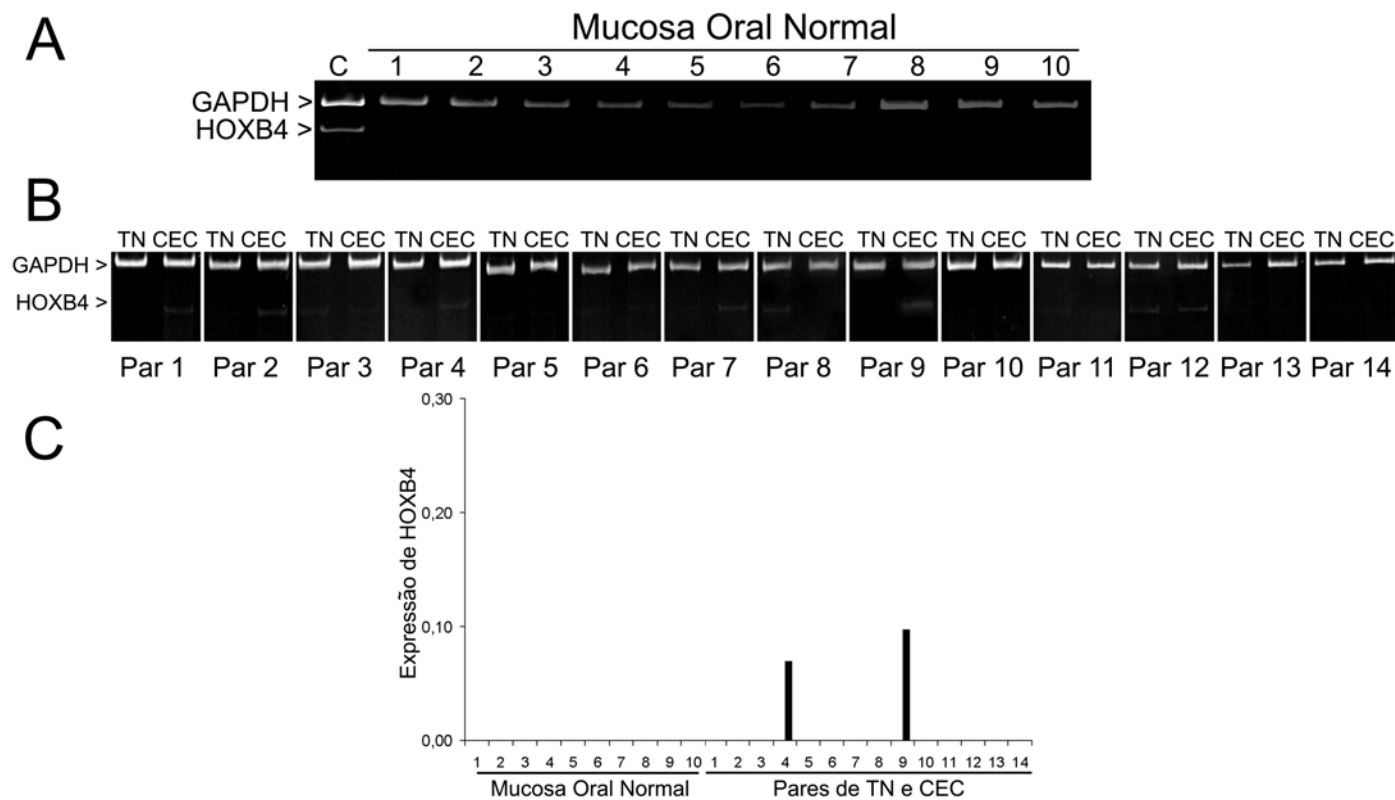


Figura 10. A expressão do gene HOXB4 foi detectada em apenas 2 amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 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 HOXB4 normalizada pelo controle GAPDH.

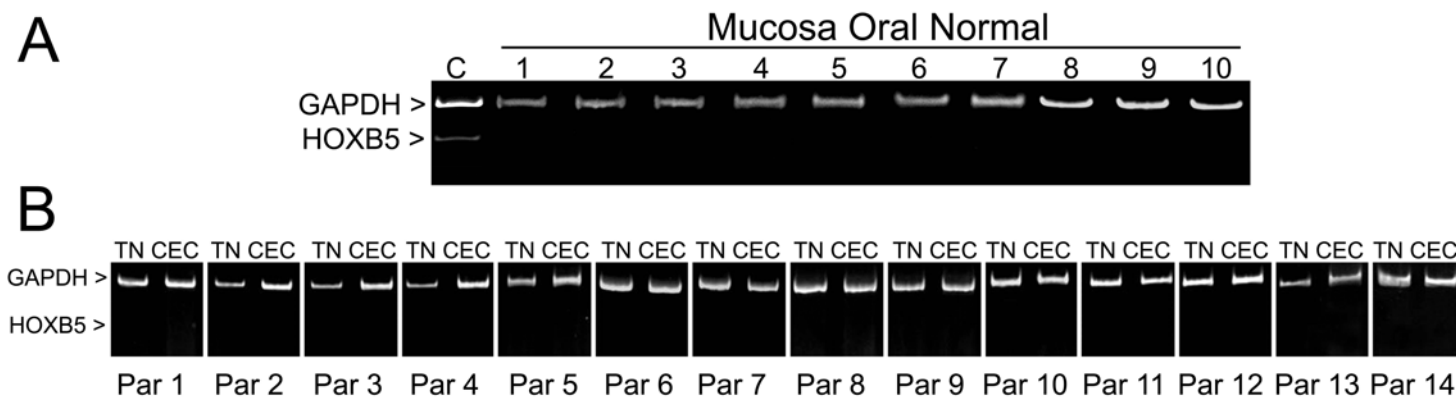


Figura 11. O gene HOXB5 não foi expresso em nenhuma das amostras de tecido oral analisadas. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (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.

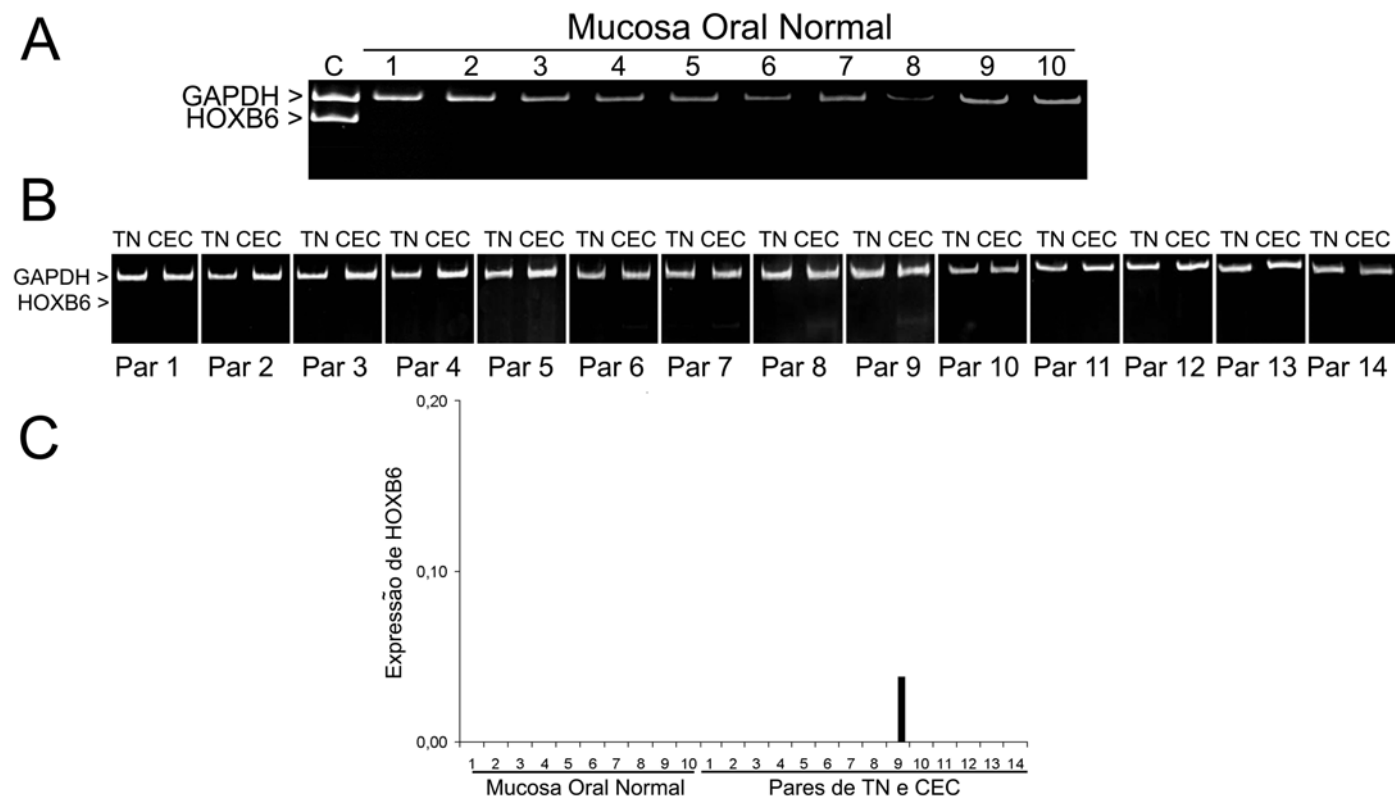


Figura 12. Níveis de mRNA para o gene HOXB6 foi fracamente detectado em uma amostra de CEC oral deste estudo. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação 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 HOXB6 normalizada pelo gene controle GAPDH.

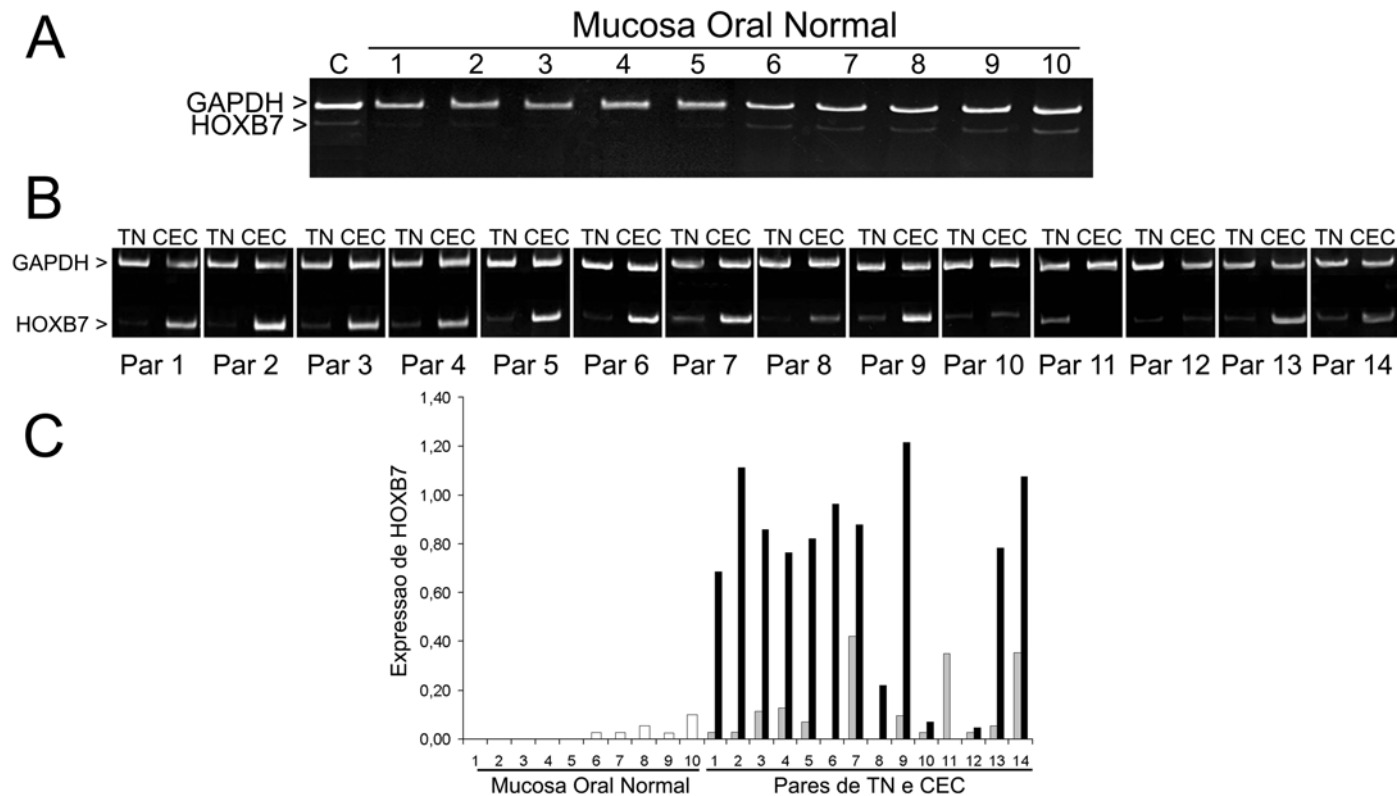


Figura 13. Expressão do gene HOXB7 foi significativamente maior em CECs orais em relação às amostras de mucosas orais normais. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo 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 HOXB7 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXB7 foi significativamente maior em amostras de CEC oral quando comparado com amostras de mucosa oral normal do mesmo paciente ($p < 0,05$) e de pacientes sem fatores de risco para o CEC oral ($p < 0,001$).

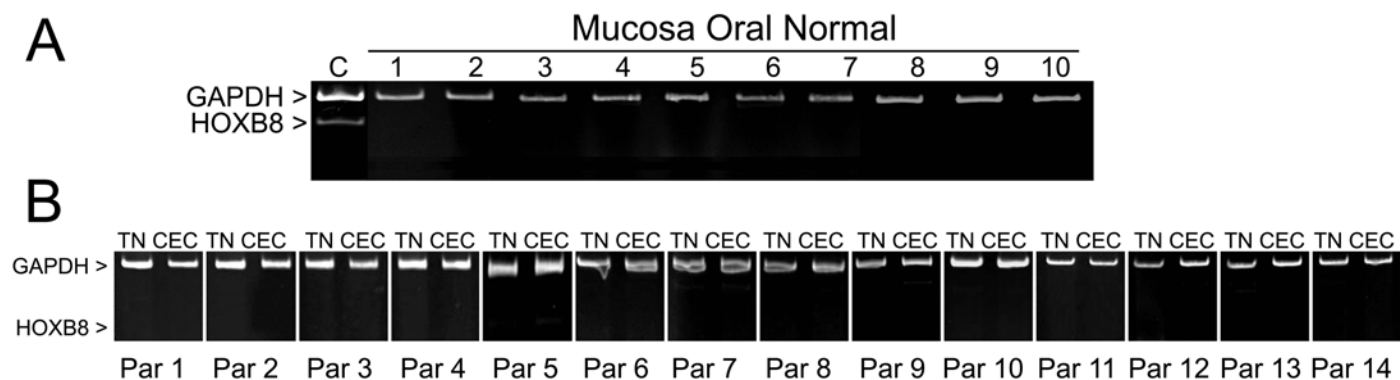


Figura 14. O gene HOXB8 é silenciado em tecidos orais normais e de CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 14 pares de amostras de mucosa oral normal (designadas como TN na porção superior da canaleta) e CEC do mesmo paciente.

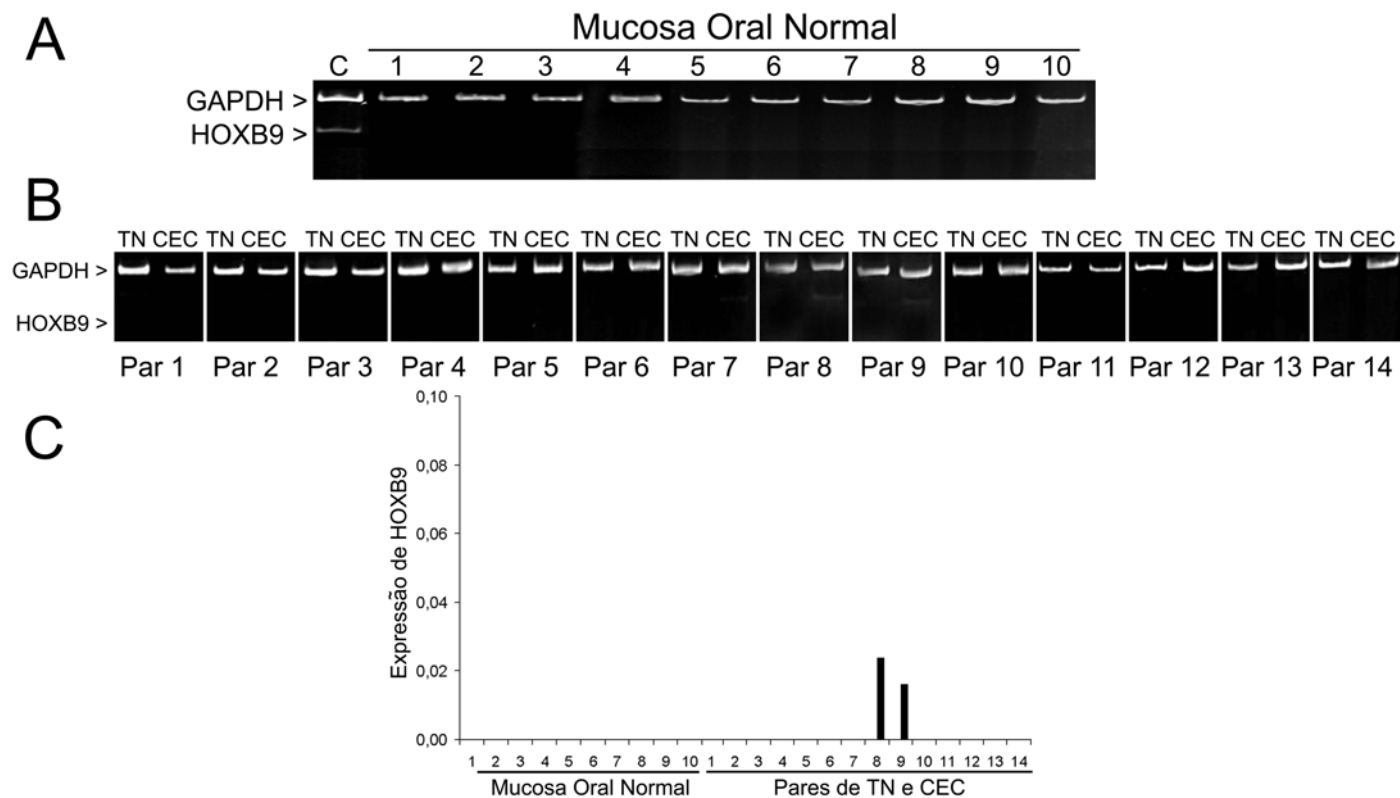


Figura 15. Expressão do gene HOXB9 em amostras de mucosa oral normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por 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 HOXB9 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXB9 foi limitada a 2 das amostras de CEC oral deste estudo.

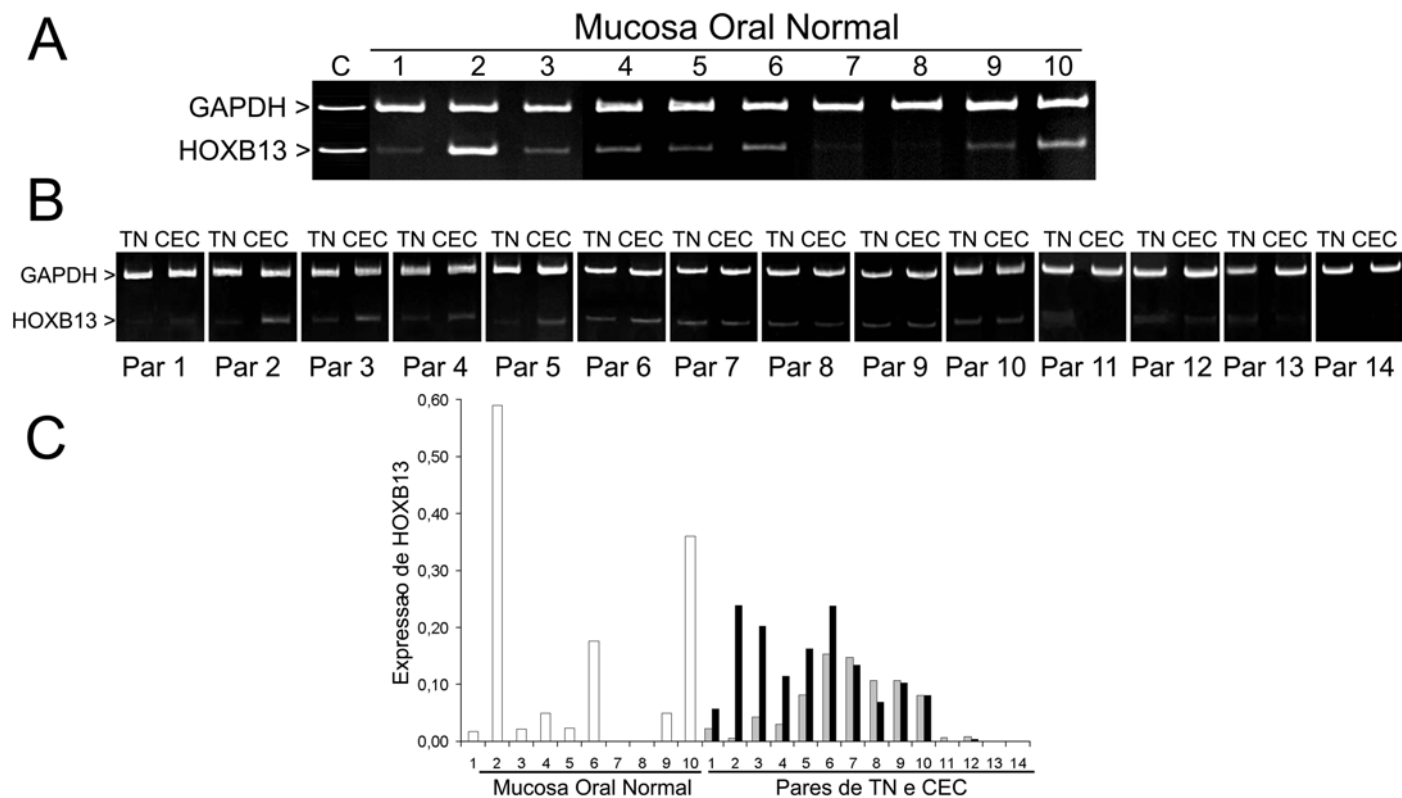


Figura 16. O gene HOXB13 foi expresso por um grande número de amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA 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 HOXB13 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão do gene HOXB13 não apresentou diferença estatística significativa entre as amostras orais de CEC e de mucosa normal.

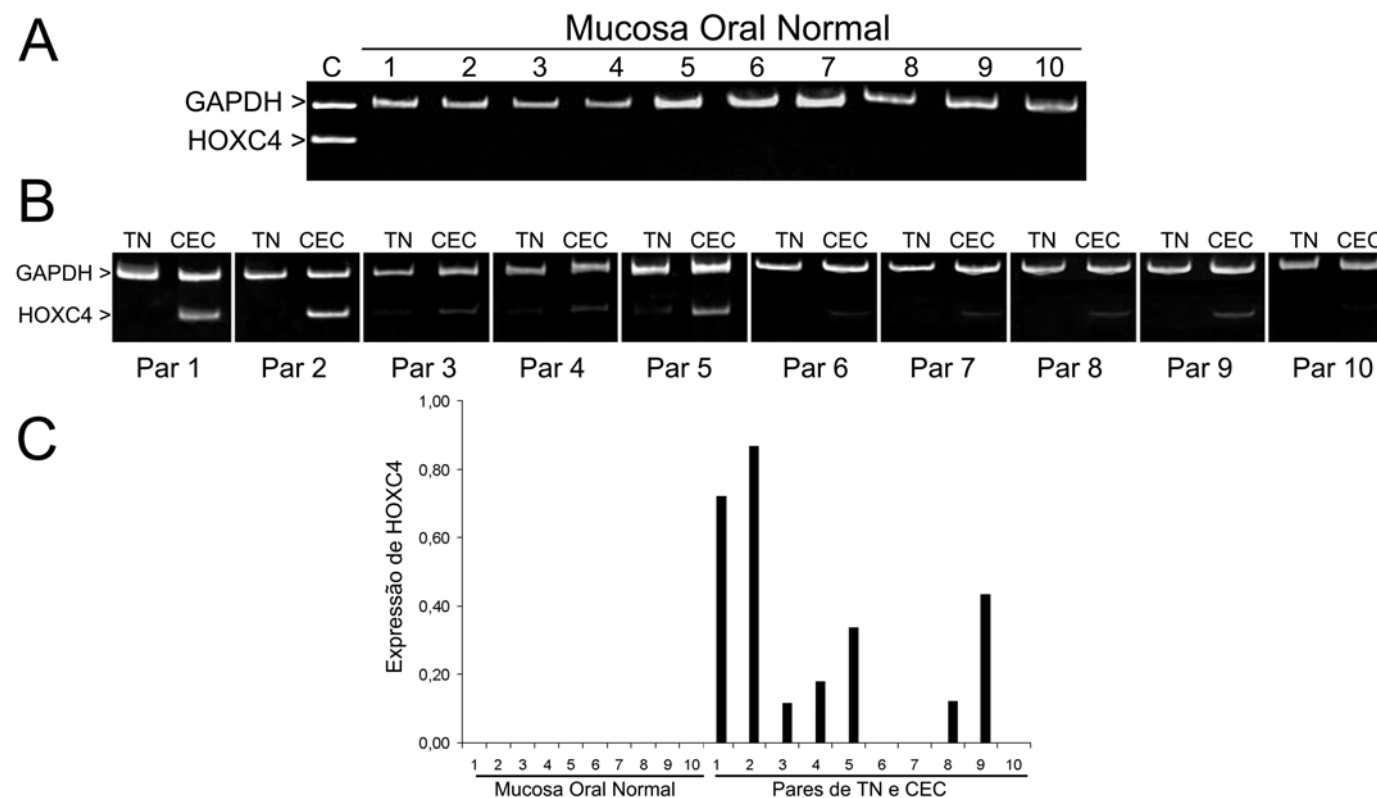


Figura 17. HOXC4 foi expresso apenas por amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” 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 HOXC4 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC4 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,001$) e amostras de mucosa normal de pacientes com CEC oral ($p < 0,001$).

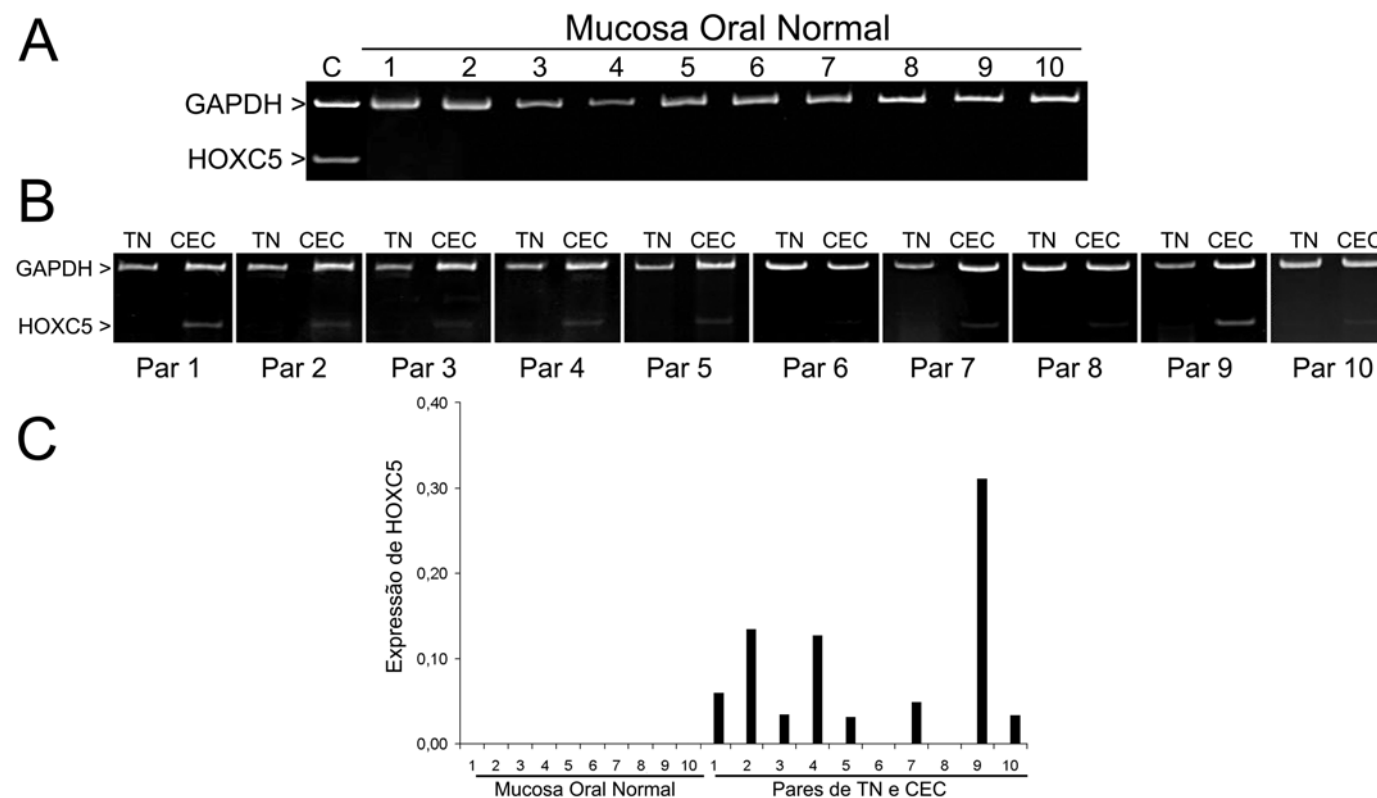


Figura 18. A expressão do gene HOXC5 foi restrita às amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por 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 HOXC5 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC5 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,001$) e amostras de mucosa normal de pacientes com CEC oral ($p < 0,001$).

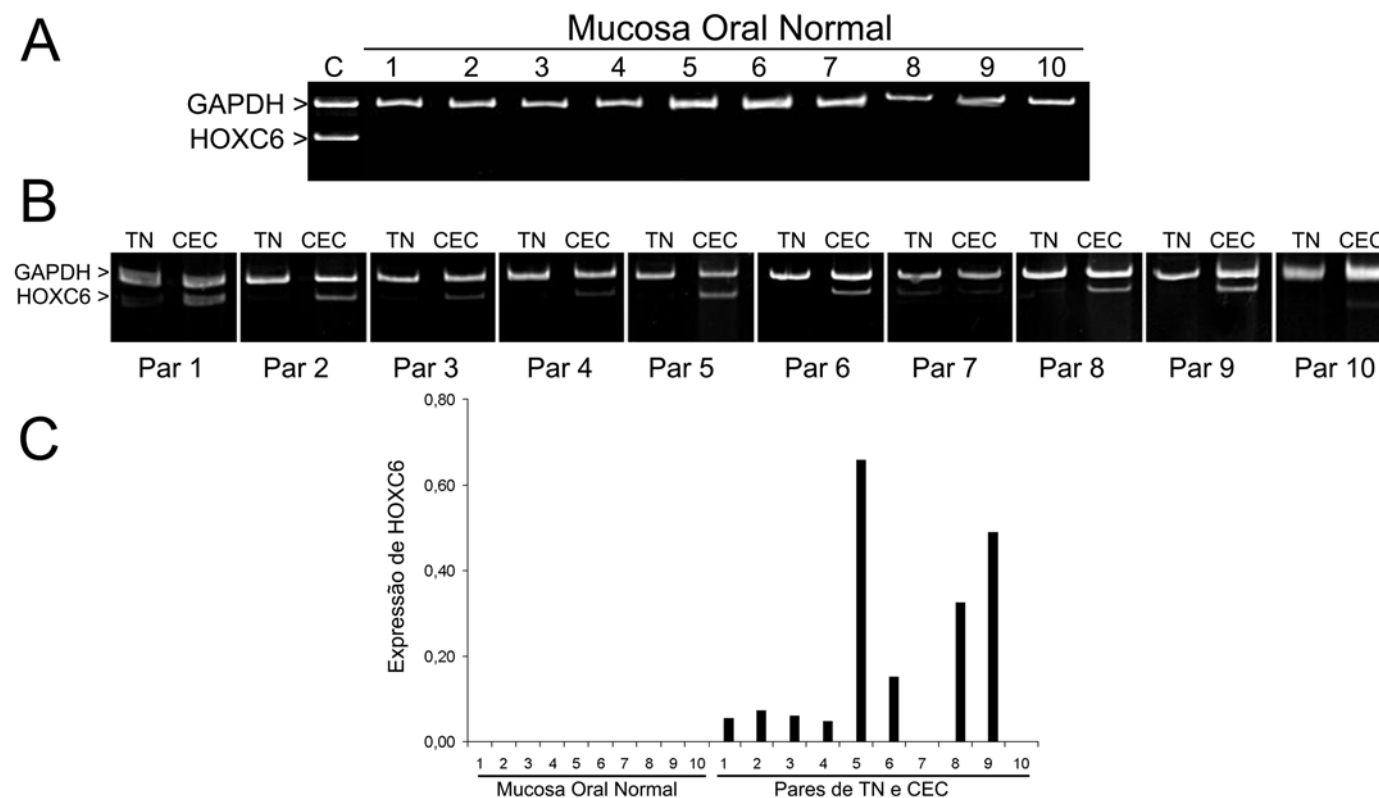


Figura 19. A expressão do gene HOXC6 foi significativamente maior em CEC oral. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise 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 HOXC6 normalizada pelo controle GAPDH. Independente da origem do tecido oral normal, a expressão de HOXC6 foi significativamente maior em amostras de CEC oral ($p < 0,001$).

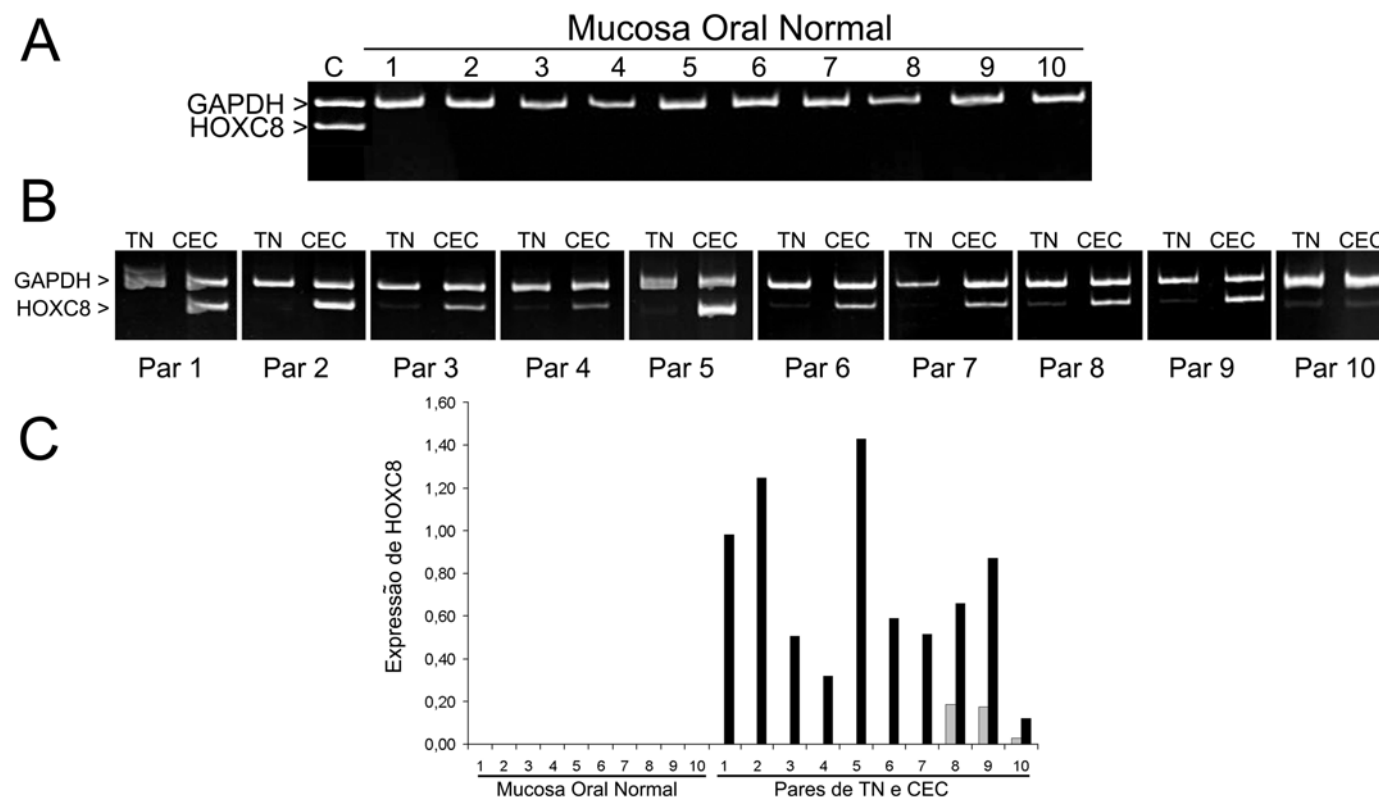


Figura 20. Análise da expressão do gene HOXC8. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 10 pares 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 HOXC8 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC8 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,001$) e amostras de mucosa normal de pacientes com CEC ($p < 0,001$).

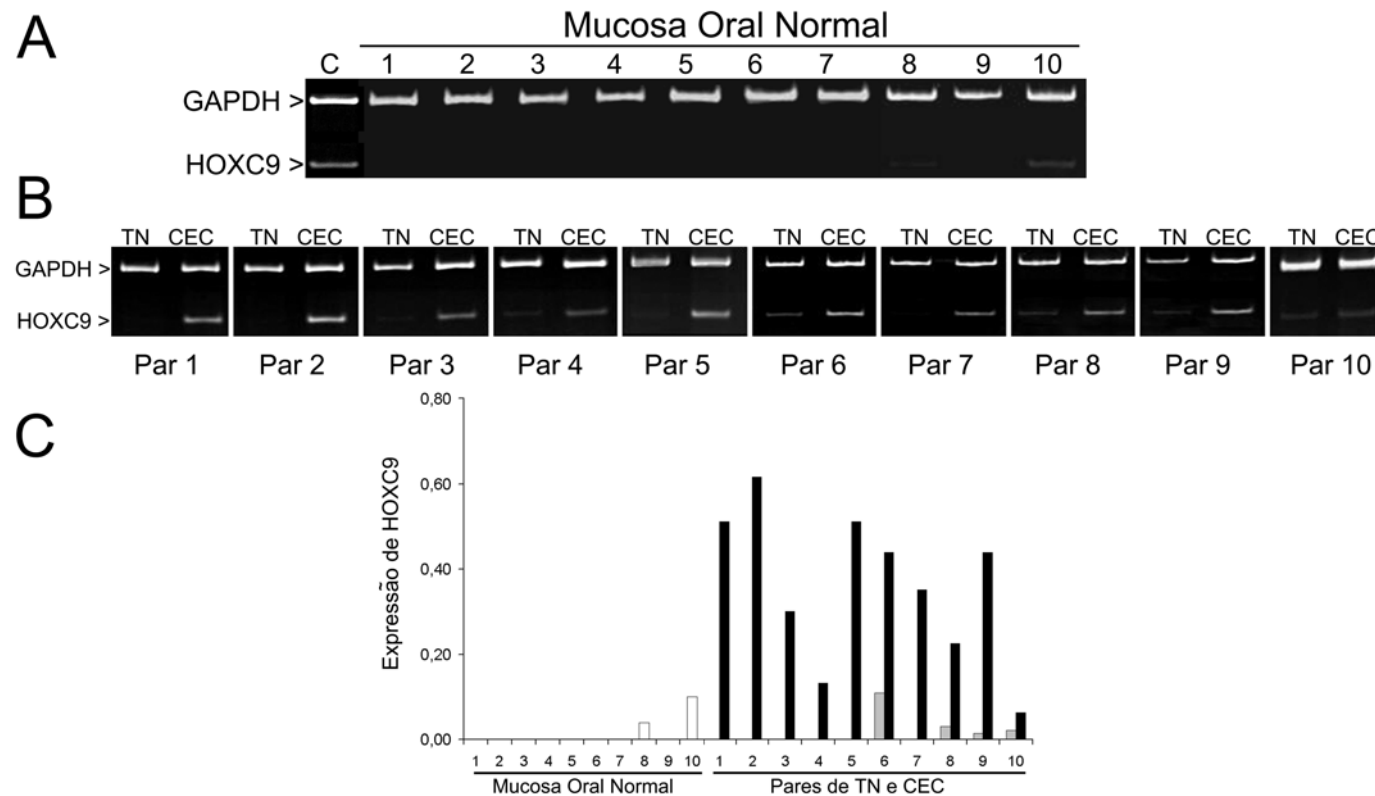


Figura 21. A expressão do gene HOXC9 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 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 HOXC9 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC9 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa normal do mesmo paciente ($p < 0,01$) e amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,001$).

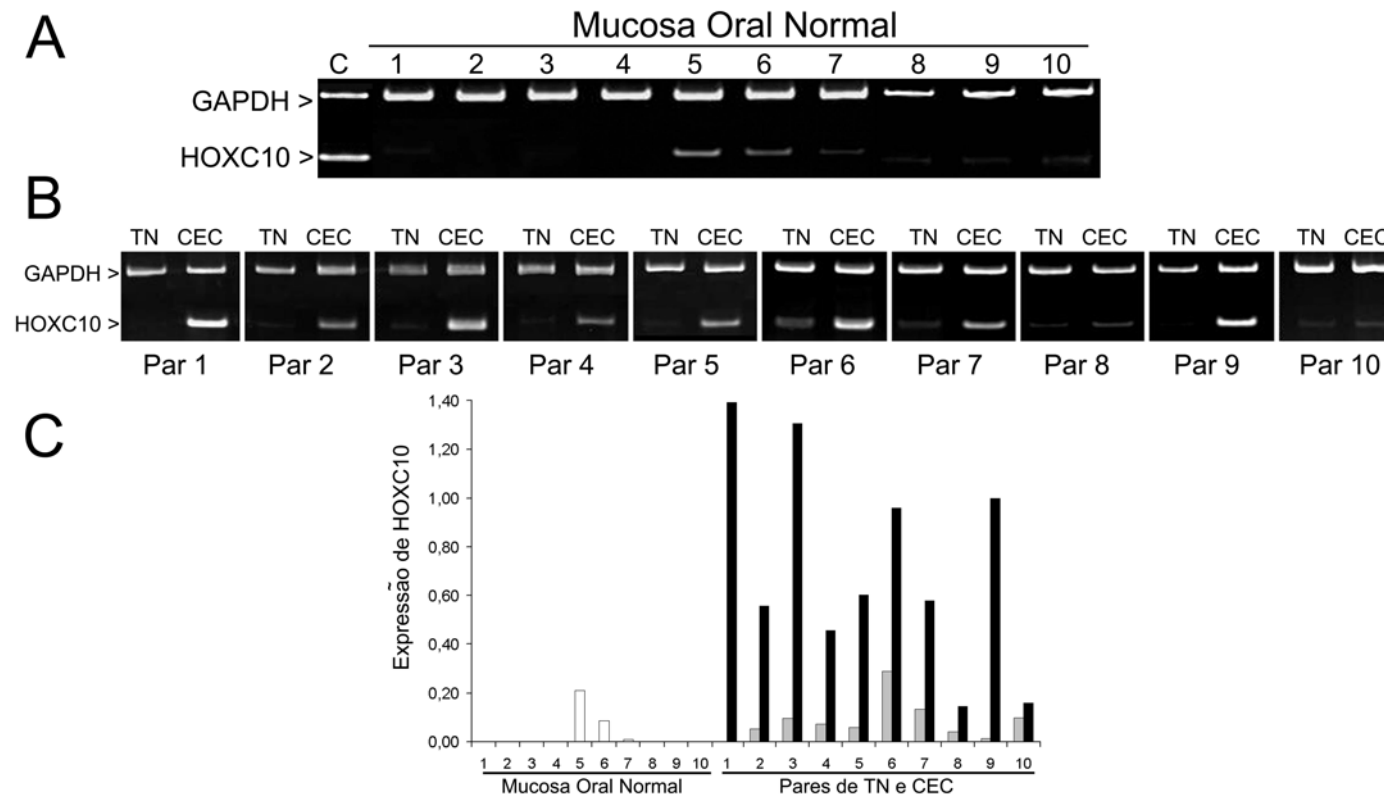


Figura 22. Análise da expressão do gene HOXC10 em amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) 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 HOXC10 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC10 foi significativamente maior em CECs orais comparado com ambos os grupos de mucosas orais normais estudadas ($p < 0,01$ para o grupo de mucosa normal de pacientes com CEC oral e $p < 0,001$ para o grupo de mucosa normal de pacientes sem fatores de risco).

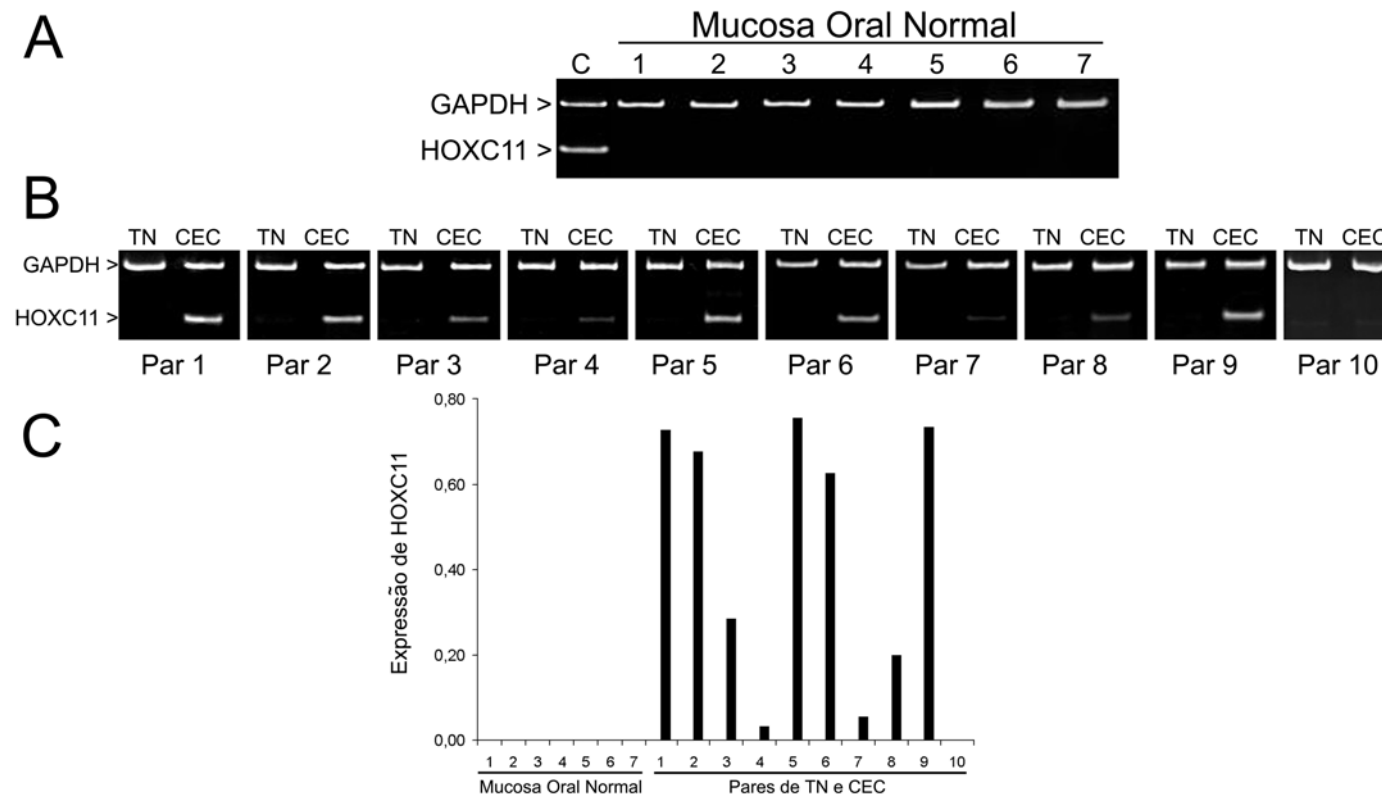


Figura 23. HOXC11 mRNA foi detectado apenas em amostras de CEC oral. (A) Reação de PCR “duplex” para 7 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise por PCR “duplex” para 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 HOXC11 normalizada pelo controle GAPDH revelou que a expressão de HOXC11 é significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,001$) e amostras de mucosa normal de pacientes com CEC ($p < 0,001$).

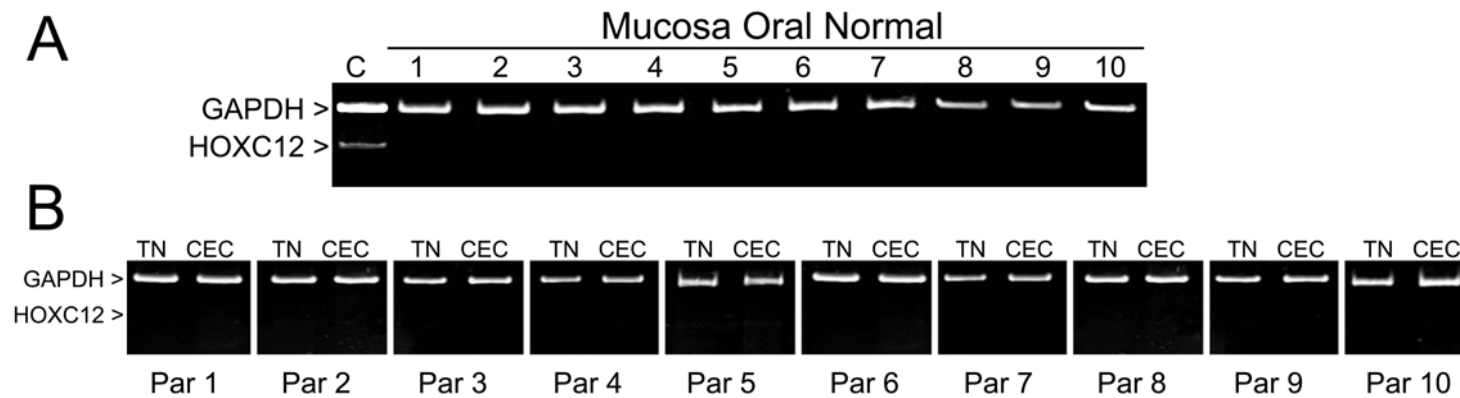


Figura 24. HOXC12 não foi expresso por nenhuma das amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico (B) 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.

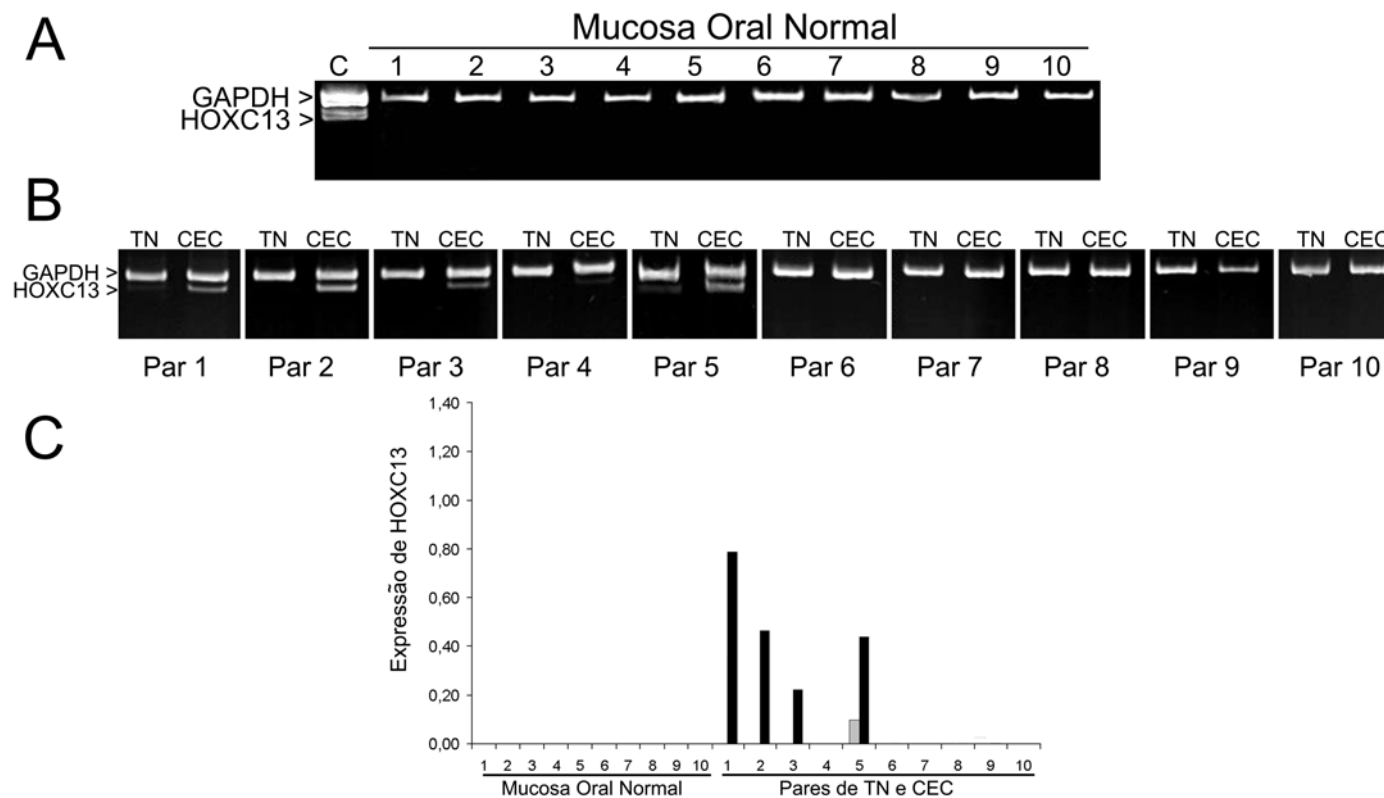


Figura 25. Expressão do gene HOXC13 em amostras orais de mucosa normal e CEC. (A) Reação de PCR “duplex” para 10 amostras de mucosa oral de pacientes sem fatores de risco para o câncer bucal. Canaleta indicada com a letra C representa o controle positivo de amplificação com DNA genômico. (B) Análise 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 HOXC13 normalizada pelo controle GAPDH. A expressão de HOXC13 foi significativamente maior em amostras de CEC oral comparado com amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores risco para o CEC ($p < 0,05$), mas não foram diferentes do grupo de amostras de mucosa normal de pacientes com CEC oral.

6. DISCUSSÃO

A família HOX de genes homeobox participa da regulação de vários mecanismos biológicos cruciais para a célula, incluindo a aquisição e manutenção da localização celular em nível espacial e temporal, o estabelecimento da identidade celular de acordo com os sinais determinados pelo microambiente, o controle do crescimento e proliferação celular por meio da interação com proteínas que regulam o ciclo celular e as vias de apoptose, o processo de comunicação célula-célula através da indução de fatores de crescimento, citocinas e vias de sinalização intracelular, e o controle do padrão ântero-posterior durante o desenvolvimento embrionário (Samuel & Naora, 2005; Abate-Shen, 2002). Devido à evidente importância da participação dos membros da família HOX no controle de processos celulares básicos, muitos estudos têm analisado a expressão destes genes em tecidos neoplásicos com a finalidade de demonstrar a participação destes genes no desenvolvimento e/ou progressão tumoral. A expressão desregulada de alguns membros da família HOX tem sido demonstrada em diferentes tipos de cânceres, dentre os quais se destacam os tumores de mama (Raman *et al.*, 2000), útero (Hung *et al.*, 2003), próstata (Miller *et al.*, 2000; Waltregny *et al.*, 2002), pulmão (Flagiello *et al.*, 2000), melanomas (Maeda *et al.*, 2005) e leucemias (Leroy *et al.*, 2004). Recentemente, a expressão destes genes foi estudada em amostras de mucosa oral normal, displasias orais e CEC orais (Hassan *et al.*, 2006). Em geral, independente da origem da neoplasia, uma elevação ou uma redução (ou ausência) na expressão de alguns genes HOX

específicos altera profundamente o fenótipo e o comportamento celular, com consequências deletérias para a célula, como a reversão celular para um estado indiferenciado, promovendo sobrevivência e proliferação celular e favorecendo a transformação maligna e/ou a progressão tumoral (Samuel & Naora, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre as funções específicas dos membros da família HOX devido a sua maneira complementar e redundante de agir e a sua capacidade/necessidade de interagir com co-fatores (Grier *et al.*, 2005). Além disso, a expressão dos genes HOX parece ser específica para cada tipo de tecido adulto, dificultando ainda mais a compreensão do papel destes genes.

A determinação do padrão de expressão dos genes HOX em tecidos específicos é extremamente importante para que seja possível a compreensão da função destes genes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer. Desta maneira, a expressão dos genes HOX pertencentes aos loci B e C foi analisada na primeira parte deste estudo, em 4 linhagens celulares derivadas de CECs de língua e em uma linhagem de queratinócitos normais imortalizada mas não-transformada HaCAT. A técnica de RT-PCR “duplex” foi escolhida pelo fato de admitir que em uma mesma reação tanto o gene de interesse quanto o gene controle GAPDH sejam amplificados, permitindo a normalização da reação e confirmação do sucesso do experimento.

A expressão dos genes HOX pertencentes ao loci B foi bastante semelhante entre as linhagens de CEC oral, sendo que a maioria dos genes apresentou-se silenciados, com exceção do gene HOXB13, o qual foi expresso por todas as linhagens, e do gene HOXB7, que foi expresso pelas linhagens SCC-

9 e SCC-15. O gene HOXB7 apresentou maiores níveis de expressão na linhagem celular HaCAT quando comparado com as linhagens de CEC oral, enquanto que a expressão de HOXB13 foi similar entre as linhagens celulares. Outros estudos têm demonstrado uma baixa expressão ou um silenciamento gênico da maioria dos membros do loci B em neoplasias de diferentes órgãos, incluindo próstata, ovário, útero, mama e pele (Care *et al.*, 1998; Alami *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006). No estudo com CECs orais, a grande maioria dos membros deste loci foi silenciada (Hassan *et al.*, 2006). Interessantemente, os membros do loci B que foram diferencialmente expressos entre as linhagens celulares (HOXB7 e HOXB13) têm sido considerados genes importantes para o desenvolvimento tumoral. Por exemplo, uma elevação na expressão de HOXB7 está relacionada com transformação celular (Waltregny *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005), progressão tumoral (Waltregny *et al.*, 2002), aumento da sobrevivência celular e da taxa de reparo do DNA (Rubin *et al.*, 2007) e indução da proliferação e crescimento (Nakamura *et al.*, 1996; Dimartino *et al.*, 1999). Similarmente, a expressão desregulada do gene HOXB13 está associada com um fenótipo mais agressivo das neoplasias malignas, incluindo um aumento na capacidade invasiva das células tumorais (Zhao *et al.*, 2004). Metodologias antisense para os genes HOXB7 e HOXB13 reduziram a capacidade de invasão de linhagens celulares derivadas de câncer de ovário em 85 e 50%, respectivamente (Yamashita *et al.*, 2005). Embora tenha sido sugerido que estes dois genes possam desempenhar papel importante para o desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias, nós observamos que HOXB7 foi mais expresso

pela linhagem de queratinócitos normais comparado com as linhagens de CEC oral, fato que não se confirmou posteriormente durante a análise dos tecidos normais e tumorais (ver abaixo). Desta maneira, estes resultados sugerem que os membros do loci B, com exceção do gene HOXB7, é silenciada em tecidos adultos e não desempenha um papel importante nas neoplasias, incluindo, provavelmente, o CEC oral.

A análise dos membros do loci C demonstrou que todos os genes foram expressos por, pelo menos, uma das linhagens deste estudo. Os genes HOXC4, HOXC5 e HOXC6 foram superexpressos nas linhagens de CEC oral quando comparado com a linhagem HaCAT. A superexpressão destes genes já foi identificada em linhagens e em amostras de câncer de próstata, no qual tem sido demonstrado que a expressão desregulada de membros do loci C é importante para a transformação maligna e o desenvolvimento tumoral (Alami *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000). Apesar de não haver diferença no nível de expressão do gene HOXC8 entre as linhagens estudadas, a superexpressão de HOXC8 está associada com uma redução no processo de diferenciação celular (Miller *et al.*, 2000).

Na segunda parte deste estudo nós analisamos a expressão dos genes da família HOX em amostras orais de CEC e mucosa morfolologicamente 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 grupo se baseou na hipótese de cancerização de

campo da cavidade oral. Esta teoria afirma 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 morfollogicamente normais, seu padrão genético pode estar alterado, incluindo alterações no padrão de expressão dos genes da família HOX.

Nas amostras de mucosa oral normal de pacientes não expostos aos fatores de risco para o câncer oral, somente 4 dos 19 genes HOX (HOXB7, HOXB13, HOXC9 e HOXC10) analisados foram expressos e nenhum membro foi expresso por todas as amostras deste grupo. Comparando os dois grupos de mucosa oral normal, o número de membros expressos pelas amostras de mucosa normal de pacientes com CEC oral foi maior. Neste grupo, além dos membros já expressos pelas amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco (HOXB7, HOXB13, HOXC9 e HOXC10), HOXB2, HOXC8 e HOXC13 foram expressos. Contudo, não existiu nenhuma diferença estatística nos níveis de expressão destes genes comparando os dois grupos de mucosa oral normal.

A expressão do gene HOXB7 foi significativamente maior no grupo de amostras de CEC oral quando comparado com os grupos de mucosa oral normal, independente da existência ou não dos fatores de risco. No estudo realizado por Hassan *et al.* (2006), o gene HOXB7 também foi superexpresso nas amostras de CEC oral estudadas, mostrando menores níveis de expressão nas amostras de displasia oral em relação às amostras de CEC oral. Estes resultados permitiram que os autores sugerissem que HOXB7 pode participar na progressão dos CECs

orais. Além disso, outros estudos já demonstraram a superexpressão deste gene em diferentes tipos de cânceres, incluindo tumores de esôfago, ovário, útero, mama e melanomas (Care *et al.*, 1998; Svingen & Tonissen, 2003; Chen *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2005). A expressão desregulada de HOXB7 pode contribuir para a transformação e progressão neoplásica via liberação de bFGF, o qual tem sido descrito como um dos mais importantes fatores de indução da proliferação celular e angiogênese (Care *et al.*, 1996). Células derivadas de tumores de mama superexpressando HOXB7 tornam-se positivas a bFGF, aumentam sua taxa de proliferação celular, adquirem capacidade de crescerem em meio de cultura sem soro e de formar colônias em soft ágar, e ainda apresentam maiores níveis de RNA mensageiro e proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucina-8 e angiotensina-2, proteínas estas essenciais para a neoformação vascular (Care *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que HOXB7, via indução da liberação da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), participa do processo de remodelação da matriz extracelular, mecanismo essencial para a invasão das células tumorais (Care *et al.*, 2001). Como a superexpressão de HOXB7 está associada a uma resposta angiogênica devido a sua capacidade de ativar diferentes moléculas pró-angiogênicas, foi sugerido que este gene pode representar um alvo terapêutico importante para a inibição da angiogênese tumoral e, conseqüentemente, proliferação e invasão das células tumorais (Dimartino *et al.*, 1999).

O gene HOXB13 apresentou níveis de expressão similares entre as linhagens celulares estudadas e os diferentes grupos de amostras de tecido oral,

resultado semelhante ao encontrado por Hassan *et al.* (2006). Entretanto, a expressão alterada deste gene já foi identificada em amostras de câncer de útero e ovário, nos quais induziu a invasão das células tumorais (Zhao *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2006). Em melanomas, o gene HOXB13 foi superexpresso em amostras que apresentavam metástases à distância quando comparado com amostras que não apresentavam metástases (Maeda *et al.*, 2005). Recentemente foi demonstrado que a superexpressão deste gene está associada com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Ma *et al.*, 2004). O gene HOXB2 não foi expresso por nenhuma das amostras de mucosa oral normal derivada de pacientes sem hábito de fumar ou consumir bebidas alcoólicas, porém foi expresso por 5 das amostras de mucosa oral normal de pacientes com CEC oral e foi expresso por 7 amostras do grupo de CEC oral. Ao contrário do resultado esperado, HOXB2 foi expresso pela linhagem HaCAT, mas não foi expresso pelas linhagens de CEC oral. Esta diferença encontrada no padrão de expressão entre linhagens celulares e amostras de tecido pode ter ocorrido devido à natureza biológica das amostras estudadas, uma vez que tem sido sugerido que o padrão de expressão dos genes HOX pode sofrer modificações durante o cultivo celular, isto é, as células podem adquirir mutações, fato este comum em culturas celulares mantidas por longos períodos de tempo (Li *et al.*, 2002). Outro ponto que pode contribuir para esta diferença é o fato da linhagem celular HaCAT ter sido imortalizada por um processo de transfecção de gene viral. No estudo realizado por López *et al.* (2006), o gene HOXB2 não foi expresso no epitélio cervical normal, porém, uma notável desregulação na expressão deste gene foi

encontrada em amostras de tumores cervicais e ainda em tecidos transformados, revelando uma possível participação deste gene no desenvolvimento do câncer cervical.

Todos os membros do loci C, com exceção de HOXC12 que não foi expresso por nenhuma das amostras deste estudo, foram expressos em níveis maiores nas amostras de CEC oral em relação às amostras de mucosa oral normal. Hassan *et al.* (2006) encontraram níveis de expressão elevados dos genes HOXC4, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC11 e HOXC13 em amostras de CEC oral quando comparado com amostras de mucosa oral normal. Neste mesmo estudo, as expressões dos genes HOXC5, HOXC6 e HOXC8 foram maiores nas amostras de CEC oral com metástases, sugerindo que a expressão destes genes pode desempenhar um papel fundamental na progressão e metástase do CEC oral. Além disso, a expressão alterada de vários membros do loci C foi encontrada em tumores de diferentes origens, incluídos os tumores de próstata, pulmão e esôfago (Miller *et al.*, 2000; Abate-Shen, 2002; Chen *et al.*, 2005). O gene HOXC4 é um dos genes da família HOX que está superexpresso em grande parte dos tumores de bexiga (Cantile *et al.*, 2003), próstata (Miller *et al.*, 2000) e melanomas (Maeda *et al.*, 2005), no qual apresenta maiores níveis de expressão em amostras tumorais com metástases à distância. HOXC5 e HOXC8 estão associados com a transformação de queratinócitos cervicais (Alami *et al.*, 1999), enquanto que HOXC4 e HOXC8 são superexpressos em linhagens celulares de câncer de próstata e em tumores com metástases regionais (Miller *et al.*, 2000). HOXC8 possui a habilidade de transformar fibroblastos em cultura (Maulbecker *et al.*,

1993) e ainda é altamente expresso em linhagens celulares de carcinoma cervical, mas não em tecidos cervicais normais (Alami *et al.*, 1999).

O gene HOXC6 foi altamente expresso em amostras de carcinoma esofágico quando comparado com as amostras de tecido normal, e ainda, HOXC4 e HOXC8 foram expressos somente nas amostras de carcinoma, sugerindo uma possível associação destes membros com a progressão tumoral (Chen *et al.*, 2005). Em linhagens celulares e em cânceres de ovário e câncer endometrial, o membro HOXC13 foi superexpresso quando comparado com amostras de tecido normal (Zhao *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre a função específica destes genes no desenvolvimento do câncer bucal, uma vez que estes genes atuam muitas vezes de maneira complementar, e ainda, ativando genes alvos, responsáveis por realizar as diferentes funções desencadeadas pelos genes HOX.

Em resumo, os resultados demonstrados neste estudo revelam que a expressão desregulada de membros específicos dos loci B e C da família HOX de genes homeobox pode estar relacionada com a aquisição ou manutenção do fenótipo neoplásico de CECs orais, e ainda sugerem a possibilidade de no futuro utilizar os genes HOX como alvos para a terapia do câncer. Entretanto, estudos mais detalhados sobre o papel específico de cada membro da família HOX de genes homeobox são necessários para a compreensão da participação destes genes no desenvolvimento e progressão do câncer oral.

7. CONCLUSÕES

1. Os genes HOXB1, HOXB3, HOXB5, HOXB8 e HOXC12 não são expressos por tecidos orais normais e tumorais.
2. Os genes HOXB2, HOXB6 e HOXB8 são expressos somente pela linhagem celular de queratinócitos normais HaCAT.
3. Os genes HOXB7 e HOXB13 são expressos diferencialmente nas linhagens celulares HaCAT e de CEC oral.
4. Os membros HOXB2, HOXB4, HOXB6, HOXB9, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC11 e HOXC13 não são expressos em mucosa oral normal proveniente de pacientes sem história de tabagismo e/ou etilismo.
5. Os genes HOXB7, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC10 e HOXC11 são superexpressos em CECs orais quando comparado com amostras de mucosa oral normal independente da associação ou não com os principais fatores de risco para o CEC oral.
6. Os níveis de expressão dos membros HOXB2 e HOXC13 foram significativamente maiores nas amostras de CEC oral quando comparado com os níveis de expressão encontrados nas amostras de mucosa normal de pacientes sem história de tabagismo e/ou etilismo.

REFERÊNCIAS*

1. Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause - or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:3.
2. 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. *Bioch and Bioph Commun*. 1999; 257: 738-745.
3. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH *et al*. Ex vivo expansion of human hematopoiética stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med*. 2003; 9(11):1423-7.
4. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987; 95: 229-49.
5. Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*. 2000; 247: 17-31.
6. Bijl JJ, Van Oostveen JW, Walboomers JM, Horstman A, Van den Brule AJ, Willemze R *et al*. HOXC4, HOXC5 and HOXC6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: preferential expression of the HOXC5 gene in primary cutaneous anaplastic T-cell and oro-gastrointestinal tract mucosa-associated B-cell lymphomas. *Blood*. 1997; 90(10): 4416-25.

*De acordo com a norma da FOP/UNICAMP, baseadas nas normas do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Bogue CW, Gross I, Vasavada H, Dynia DW, Wilson CM, Jacobs HC. Identification of HOX genes in newborn lung and effects of gestacional and retinoic acid on their expression. *Am J Physiol.* 1994; 277: L448-L454.
8. Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresch DA. Induction of the angiogenic phenotype by HOXD3. *The Journal of Cell Biology.* 1997; 139(1): 257-264.
9. Cantile M, Cindolo L, Napodano G, Altieri V, Cillo C. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated *in vivo* with human bladder transitional cell carcinomas. *Oncogene.* 2003; 22: 6462-8.
10. Care 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): 4842-4851.
11. Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Peschle C, Colombo MP. Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. *Oncogene.* 1998; 16: 3285-9.
12. Care A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A *et al.* HOXB7: A key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res.* 2001; 61: 6532-9.
13. Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 2001; 188: 161-169.

14. 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 USA*. 1999; 96(2): 541-6.
15. Chen KN, Gu ZD, Ke Yang, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1044-1049.
16. Chu MC, Selam EB, Taylor HS. HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol & Ther*. 2004; 3(6): 568-572.
17. Clayton SJ, Donnai D. Fetal valproate syndrome. *J Med Genet*. 1995; 32: 724-727.
18. Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes HOXA3 and HOXD3 reveal synergistic interactions. *Nature*. 1997; 370: 304-307.
19. Crooks GM, Fuller J, Petersen D et al. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increase myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood*. 1999; 94: 519-528.
20. Daftary GS, Taylor HS. Implantation in the human: the role of HOX genes. *Semin Reprod Med*. 2000; 18(3): 311-320.
21. Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16(3): 91-108.

22. De Vita G, Barba P, Odarchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G *et al.* Expression of homeobox genes containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1993; 6: 887-893.
23. Dimartino JF, Claery ML. MII rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol.* 1999; 106: 614-626.
24. Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert T *et al.* A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Human Mol Genet* 2000; 9(2): 227-236.
25. Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 115–131.
26. Flagiello D, Gibaud A, Dutrillaux B, Poupon MF, malfoy B. Distinct patterns of all-trans 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.
27. Ford HL, Kabingu EN, Bump EA, Mutter GL, Pardee AB. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 12608-13.
28. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu. Rev. Genet.* 1986; 20:147–173.

29. Giampaolo A, Sterpetti P, Bulgarini D, *et al.* Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood*. 1994; 84(11): 3637-47.
30. Goodman FR. Limb Malformations and the Human HOX Genes. *American J Med Genet*. 2002; 112: 256–65.
31. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine Drosophila homeobox genes complexes have common features of organization and expression. *Cell*. 1989; 57: 367-78.
32. Grier D, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle G, Halliday H, Lappin T. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*. 2005; 205: 154-71.
33. 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 Journal Cancer*. 2001; 93: 516-25.
34. Hassan NMM, 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. *Oncology Res*. 2006; 16: 217-224.
35. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol*. 2000; 148: 779-90.

36. 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.
37. Krosi J, Baban S, Krosi G, Rozenfeld S, Largman C, Sauvageau G. Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene.* 1998; 16: 3403-12.
38. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell.* 1994; 78:191-201.
39. Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860–921.
40. Leroy P, Berto F, Bourget I, Rossi B. Down-regulation of HOXA7 is required for cell adhesion for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(4) 680-8.
41. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 1978; 276: 565-570.
42. Li H, Huang CJ, Choo KB. Expression of homeobox genes in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2002; 84: 216-21.
43. López R, Garrido E, Pina P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoas R *et al.* HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16: 329-35.
44. Lumsden A, Krumlauf R. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science.* 1996; 274: 1109–15.

45. Ma XJ, Wang Z, Ryan P et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004; 5: 607-16.
46. Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T *et al*. Altered expression of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2005; 114: 436-41.
47. 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 USA*. 1991; 15(88): 6348-52.
48. Makiyama K, Hamada J, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M *et al*. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncology Reports*. 2005; 13: 673-79.
49. Manak JR, Scott MP. A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Dev Suppl*. 1994; 71-7.
50. Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res*. 2003; 23(3): 2101-10.
51. Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ*. 1993; 4(5): 431-41.
52. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*. 1992; 68: 283–302.

53. 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.* 2000; 63: 5879-88.
54. Miyazaki YJ, Hamada J, Tada M, Furuuchi K, Takahashi Y *et al.* HOXD3 enhances motility and invasiveness through the TGF- β -dependent and – independent pathways in A549 cells. *Oncogene.* 2002; 21: 798-808.
55. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOX A13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet.* 1996; 15: 179–180.
56. Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J cell Biol.* 2000; 148(2): 343-51.
57. Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K *et al.* Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOX A9 by the chromosome translocation t(7;11) (p15;p15) in human myeloid leukemia. *Nat Genet.* 1996; 12: 154-8.
58. 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. *Clinical & Experimental Metastasis.* 2002; 19: 503-11.
59. Pattin A, Goridis C, Brunet JF. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci.* 2000; 15: 235-43.

60. Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusions proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 1907-17.
61. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol.* 1999; 187: 112-6.
62. Raman V, Martensen AS, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E *et al.* Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumors. *Nature.* 2000; 405: 974-8.
63. Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JCY, Chen H, Lorinez A *et al.* A role for HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res.* 2001; 67(4): 1527-35.
64. Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and derulation. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 2428-37.
65. 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 USA.* 1994; 91(25): 12223-7.
66. Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell.* 1992; 71: 551-3.
67. 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.

68. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6(5): 963-8.
69. Srebrow A, Friedmann Y, Ravanpary A, Daniel CW, Bissel MJ. Expression of Hox A1 and Hox B7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. *J Cell Biochem*. 1998; 69: 377-91.
70. Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev*. 1996; 55: 91-108.
71. Svingen T, Tonissen KF. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity*. 2006; 97: 88-96.
72. Tibério C, Barba P, Magli MC, Aryelo F, Lê Cevalier 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.
73. Volpe MV, Pham L, Lessin M *et al*. Expression of HOXB5 during human lung development and in congenital lung malformations. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. 2003, 67: 550-556.
74. Waltregny D, Alami Y, Clausse N, Leval J, Castronovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *The Prostate*. 2002; 50: 162-9.
75. Wellik DM, Capecchi MR. HOX10 and HOX11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*. 2003; 301: 363-7.
76. Yamamoto M, Takai D, Yamamoto F. Comprehensive expression profiling of highly homologous 39 hox genes in 26 different human adult tissues by

the modified systematic multiple 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: 199-210.

77. Yamashita T, Tazawa S, Yawel Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K *et al.* Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int Journal of Oncology.* 2006; 28: 932-938.
78. Yap AS, Kovacs EM. Direct cadherin activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *The J of Cell Biol.* 2003; 160(1): 11-16.
79. Zhao Y, Yamashita T, Ishikawa M. Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncology Reports.* 2005; 13: 721-6.
80. Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *The J Biol Chem.* 2003; 278(9): 7580-90.
81. 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. *The Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281(10): 6471-81.
82. Zhu T, Starling-Emerald B, Zhang X, Lee KO, Gluckman PD, Mertani HC *et al.* Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer Res.* 2005; 65(1): 317-24.

 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS 	CERTIFICADO O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Expressão e função dos membros da família hox de genes homeobox em carcinomas espinocelulares bucais", protocolo nº 060/2006, dos pesquisadores RICARDO DELLA COLETTA, CAROLINA CAVALCANTE BITU e MARIA FERNANDA DE SOUZA SETÚBAL DESTRO, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/06/2006. The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Hox homeobox gene expression and role in squamous cell carcinomas", register number 060/2006, of RICARDO DELLA COLETTA, CAROLINA CAVALCANTE BITU and MARIA FERNANDA DE SOUZA SETÚBAL DESTRO, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 07/06/2006.  Profa. Cecília Gatti Guirado Secretária CEP/FOP/UNICAMP  Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.
--	--