



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



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Rafael Araújo

Orientador(a): Ricardo Della Coletta

Ano de Conclusão do Curso: 2010

Rafael Araújo

Efeito da diferenciação celular na expressão de membros da família
HOX de genes homeobox em culturas celulares de carcinoma
espinocelulares bucais

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgião
Dentista

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Ar15e Araújo, Rafael.
 Efeito da diferenciação celular na expressão de membros da família HOX de genes homeobox em culturas celulares de carcinoma espinocelulares bucais. / Rafael Araújo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.
 40f. : il.

 Orientador: Ricardo Della Coletta.
 Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

 1. Carcinoma de células escamosas. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/top)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, que me deu a oportunidade de realizar este projeto, desde meu primeiro ano.

À Carolina Bitu e todo o corpo de pós-graduação em Patologia Oral e Biologia Molecular pelo apoio durante a realização deste projeto, outros experimentos, experiências e informações.

Ao CNPq e o PIBIC, pela bolsa e oportunidade de apresentar este projeto em congresso.

Aos meus amigos de turma Patrick, Rafael Furuse, Gregório, Hécio, Fernando, Alexandre, Henrique, Victor, Edson, Izabella Patta, Giuliana, Daniela pelas férias e finais de semanas que passávamos em Piracicaba ao invés de voltamos para nossos lares. E em especial a Isabela Tardivo, que me apoiou e deu novas forças na reta final do curso.

EPÍGRAFE

"Nada pode impedi-lo quando você estabelece um objetivo. Ninguém pode impedi-lo, a não ser você mesmo. Eu acredito nisso"

Sidney Sheldon

RESUMO

Células neoplásicas são caracterizadas por uma alteração no padrão de diferenciação celular. Inúmeros membros da família HOX de genes homeobox estão envolvidos com a especificidade da diferenciação celular durante a embriogênese e com a manutenção deste padrão em tecidos normais adultos. Interessantemente, estes genes apresentam uma expressão desregulada em cânceres. Este estudo analisou o efeito de indutores da diferenciação celular em linhagens celulares de carcinoma espinocelular (CEC) bucal e o efeito da diferenciação celular na expressão de membros da família HOX de genes homeobox. Três métodos clássicos foram aplicados para induzir a diferenciação celular: aumento dos níveis de íons cálcio no meio de cultura, exposição ao ácido retinóico ALL-TRANS e crescimento em suspensão em metil-celulose. O padrão de diferenciação celular foi determinado pela análise morfológica das células coradas pela técnica de papanicolau. A expressão dos membros HOX foi avaliada pela técnica semi-quantitativa da transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) "duplex" com primers específicos para cada um dos cinco membros da família HOX escolhidos (HOXA5, HOXA9, HOXA10, HOXB4 e HOXB7) e para o gene controle GAPDH. Em todas as análises, para fins de comparação, foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos imortalizada mas não-transformada HaCAT. Nossos resultados demonstraram que os três métodos foram capazes de induzir significativamente a diferenciação da linhagem celular HaCAT. Por outro lado, as linhagens celulares de CEC bucal foram apenas significativamente induzidas à diferenciação celular pelo método de crescimento em suspensão em metil-celulose.

A elevação dos níveis de íons cálcio não alterou o padrão de diferenciação das células de CEC bucal, enquanto que o tratamento com ácido retinóico induziu uma significativa morte celular. HOXB7 foi o único gene que apresentou uma modulação na sua expressão, passando de pouco expresso nas células indiferenciadas para uma expressão elevada em células das linhagens HaCAT e de CEC bucal diferenciadas pelo crescimento em suspensão. Estes resultados sugerem que a expressão alterada de HOXB7 pode estar associada ao desenvolvimento e/ou progressão do CEC bucal.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma Espino-Celular - Diferenciação – Homeobox

ABSTRACT

Neoplastic cells are characterized by a change in the pattern of cellular differentiation. Several members of the HOX family of homeobox genes are involved in the specificity of cellular differentiation during embryogenesis and the maintenance of this pattern in normal adult tissues. Interestingly, these genes show a deregulated expression in cancer. This study examined the effect of inducers of cell differentiation in cell lines of squamous cell carcinoma (SCC) and the effect of oral cell differentiation in the expression of members of the HOX family of homeobox genes. Three classical methods were applied to induce cell differentiation: Increased levels of calcium ions in the culture medium, exposure to all-trans retinoic acid and growth in suspension in methyl cellulose. The pattern of cellular differentiation was determined by morphological analysis of stained cells papanicolau technique. The members of the HOX expression was analyzed by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) "duplex" with specific primers for each of the five members of the HOX family chosen (HOXA5, HOXA9, Hoxa10, HOXB4 and HOXB7) and the control gene GAPDH. In all analysis, for comparison purposes, we used a cell line of human keratinocytes immortalized but non-transformed HaCaT. Our results showed that the three methods were able to significantly induce the differentiation of the cell line HaCaT. Moreover, cell lines of oral SCC were only significantly induced cell differentiation by the method of growth in suspension in methyl cellulose. Increased levels of calcium ions did not alter the pattern of differentiation of oral SCC cells, whereas treatment with retinoic acid induced a significant cell death.

HOXB7 was the only gene that showed a modulation in their expression from low expressed in undifferentiated cells to a high expression of HaCaT cells and differentiated by growth in suspension oral SCC cells. These results suggest that altered expression of HOXB7 might be associated with the development and / or progression of oral SCC.

KEYWORDS: Squamous cell carcinoma - Differentiation – Homeobox

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico 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 carcinoma cell
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient Mixture F12
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
PBS	“Phospate Buffered Saline” - Salina tamponada com fosfato
FBS	“Fetal bovine serum” – soro fetal bovino
µg	Microgramas
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

Dedicatória	ii
Agradecimento	iii
Epígrafe.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
Sumário.....	x
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
Carcinoma Espinocelular Bucal	3
Diferenciação Celular e Genes Homeobox.....	4
3. Proposição	9
4. Materiais e Métodos.....	10
Cultura de Células	10
Diferenciação por CaCl_2	10
Diferenciação por ATRA	10
Diferenciação por Suspensão.....	11
Fixação e Coloração	12
Isolamento de RNA.....	12
Síntese de cDNA	13
Reação RT-PCR.....	13
5. Resultados	15
6. Discussão	21
7. Conclusões	24
* Referencias.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	13
Figura 2	17
Figura 3	17
Figura 4	18
Figura 5	18
Figura 6	19
Figura 7	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	14
----------------	----

1. INTRODUÇÃO

Genes homeobox codificam fatores de transcrição que atuam durante a embriogênese e o desenvolvimento tecidual por meio de um sistemático controle da proliferação e diferenciação celular (1) Estes genes foram inicialmente descobertos em moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*) como genes onde mutações causavam transformações homeóticas, ou seja, substituição de uma parte ou segmento do corpo por outro não encontrado normalmente naquele lugar (2;3). Em Drosófilas, esta família de genes recebeu o nome de complexo HOM-C. Posteriormente, os genes homeobox foram encontrados em todas as espécies que tiveram seu genoma mapeado, indicando que sua origem é antiga e precede a divergência filogenética (4). Desde sua descoberta na década de 80, mais de 200 membros diferentes, formando uma superfamília, já foram descritos (5). A característica comum de todos estes genes é a presença de uma seqüência altamente conservada, das moscas de fruta aos humanos (6), de 183 nucleotídeos, codificando um domínio de 61 aminoácidos, chamado homeodomínio (7; 8 ;9). O homeodomínio está usualmente localizado na posição terminal ou subterminal da proteína correspondente, sendo responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox (3;6).

Dentre os genes homeobox em vertebrados, os pertencentes à família HOX se destacam como os homólogos aos genes homeóticos do complexo HOM-C de Drosófilas (10). Esta família de genes homeobox tem sido extremamente estudada durante a evolução das espécies, sendo sugerido que a família HOX representa um microcosmo de mudanças genômicas evolucionárias, acompanhando a evolução dos cordados, visto que a complexidade do plano corporal parece estar

correlacionada ao aumento do número de clusters de genes (11). Os genes da família HOX são encontrados em praticamente todos os animais, com a exceção das esponjas, e se apresentam em números de 4 a 48 genes por genoma, dependendo da espécie (4). Por exemplo, em Drosófilas, o complexo HOM-C é formado por apenas 8 genes, cada um codificando um fator de transcrição específico (11).

Mamíferos apresentam 39 genes HOX organizados em 4 clusters, denominados A, B, C e D, localizados respectivamente em 4 cromossomos diferentes (7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31)(8). Existem 13 grupos de parálogos, numerados de 1 a 13 começando a partir da extremidade 3' de seus loci (9). Estima-se que os genes HOX nos mamíferos tenham surgido através da combinação de dois eventos evolucionários diferentes, a cis-amplificação e a transduplicação, a partir de complexos ancestrais (12). Os genes HOX que se originaram por transduplicação, também chamados de parálogos, compartilham uma similaridade maior entre si quando comparado com os genes localizados nas posições adjacentes do mesmo cromossomo (6). Apesar do fato que durante o processo de duplicação alguns parálogos terem sido perdidos, as estruturas dos seus clusters foram mantidas intactas, mantendo-os em suas posições cromossômicas (11).

Coletivamente, os inúmeros estudos na literatura demonstram que a expressão inapropriada de genes da família HOX pode está associada ao desenvolvimento e/ou progressão de tumores. Em adição, a expressão dos genes HOX varia de acordo com as células e tecidos dos quais as células tumorais são provenientes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de alguns membros da família HOX de genes homeobox durante a indução da diferenciação celular de culturas celulares de células epiteliais normais e tumorais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL

O carcinoma espinocelular (CEC) ou também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide é uma neoplasia maligna derivada da camada espinhosa do epitélio pavimentoso estratificado, que representa aproximadamente 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal. No Brasil, os CECs bucais representam 7% de todos os cânceres nos homens (sendo o 5º mais freqüente) e 1,7% nas mulheres (sendo o 7º mais freqüente), estimando-se mais de 10.000 novos casos em homens e 3.500 novos casos em mulheres por ano (13).

Inúmeros fatores contribuem para o desenvolvimento do CEC bucal, contudo, os consumos de cigarro e álcool encabeçam esta lista. Outro ponto interessante é que existem fortes evidências para uma relação entre dose e tempo de exposição dos carcinógenos encontrados no cigarro e álcool para o desenvolvimento do CEC bucal (14). Todas as formas de fumo são ligadas à etiologia do CEC bucal. A fumaça do tabaco é uma mistura composta por mais de cinco mil elementos diferentes, e muitos destes são carcinogênicos, capazes de induzir mutações no material genético celular, ou pró-carcinogênicos, que durante seu metabolismo induzem a formação de substâncias nocivas. Entre estas substâncias encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas. O álcool é também considerado um fator de risco a vários tipos de câncer, incluindo o CEC. Contudo, o mecanismo pelo qual o álcool atua neste processo ainda é incerto. A radiação solar, em particular os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia de CECs no lábio, principalmente inferior (13). Agentes carcinogênicos ou pró-carcinogênicos atuam na célula epitelial,

causando mutações no DNA. O acúmulo destas mutações altera grupos de genes que desempenham características específicas na célula, são estes: os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor, as telomerasas e os genes que regulam o processo de apoptose. Para que o tumor seja capaz de invadir os tecidos adjacentes e produzir metástases, suas células devem ter a capacidade de degradar a matriz extracelular, assim os genes que transcrevem as principais enzimas ligadas à degradação da matriz extracelular, as metaloproteinases de matriz, também devem estar ativos (15).

DIFERENCIAÇÃO CELULAR E GENES HOMEBOX

É amplamente aceito que muitas das vias que estimulam a oncogênese representam aberrações de processos normais que controlam a embriogênese. Existem vários exemplos no qual genes que regulam crescimento e desenvolvimento das células e tecidos estão implicados em oncogênese. Entre os principais exemplos estão os genes homeobox, que codificam fatores de transcrição utilizados amplamente durante os processos de desenvolvimento tecidual, e apresentam uma expressão alterada em cânceres. Genes homeobox foram originalmente identificados na década de 80 devido a grande homologia com os genes homeóticos de *Drosófilas*, também conhecidos como complexo HOM-C, que promovem alterações nos segmentos corporais das moscas quando alterados (alterações homeóticas) (7). Posteriormente foi demonstrado que estes genes estão virtualmente presentes em todas as espécies de seres eucariontes (16). Os genes homeobox codificam fatores de transcrição que desempenham um papel fundamental na especificação da identidade celular. Desde sua descoberta na década de 80, mais de 200 seqüências gênicas similares já foram identificadas, sendo que todas apresentam uma região altamente conservada de 183 nucleotídeos que codifica uma seqüência de 61

aminoácidos conhecida como homeodomínio (17). O homeodomínio é a região responsável pela ligação ao DNA e pela estimulação ou repressão da transcrição gênica, o principal mecanismo de ação dos produtos protéicos dos genes homeobox.

Entre as diversas famílias de genes homeobox, os membros da família HOX são considerados os protótipos desta classe, e representam os genes homólogos do complexo HOM-C em humanos e camundongos (18). Os genes da família HOX apresentam uma distribuição genômica única, com quatro clusters de aproximadamente 100 K bases de comprimento (clusters A-D), chamados loci HOX, cada qual localizado em um cromossomo diferente (lócus HOXA em 7p15.3, lócus HOXB em 17p21.3, lócus HOXC em 12q13.3, e lócus HOXD em 2q31), e apresentando uma organização homóloga específica de 9 a 11 genes (19). Com base na homologia da seqüência e na posição no lócus, os genes nos quatro clusters podem ser alinhados entre si e com os genes do complexo HOM-C em 13 grupos de genes parálogos (20).

O completo conhecimento das funções dos membros da família HOX durante o desenvolvimento tem, em certa parte, esbarrado na falta de mutações naturais nestes genes em humanos. Contudo, o uso de animais transgênicos com ganho ou perda de função gênica tem respondido questões importantes. Por exemplo, estes métodos demonstraram que o fenômeno de dominância posterior que ocorre em Drosófilas, onde o programa morfogênético do embrião é especificado pelo membro da família HOX com localização mais posterior expresso no momento (21), em camundongos e, provavelmente humanos, é substituído pela teoria da redundância. Esta teoria afirma que o padrão de desenvolvimento de uma célula ou tecido é resultado da expressão combinada de vários membros da família HOX, e não da

atividade específica ou dominante de um membro individual (22). O melhor exemplo desta teoria é demonstrado pelos membros do parálogo 9 (HOXA9, HOXB9 e HOXD9) durante o desenvolvimento da glândula mamária. As glândulas mamárias em animais sem a expressão individual ou em pares (knock out simples ou duplo) destes genes são normais, enquanto que glândulas sem a expressão dos três membros (knock out triplo) apresentam uma intensa hipoplasia durante a gravidez e lactação (23).

Embora genes homeobox sejam definidos como genes do desenvolvimento, alguns estudos iniciais demonstram a expressão esporádica de alguns membros da família HOX em tecidos normais adultos (20). A manutenção da homeostasia dos tecidos adultos é fundamental e deve ser intimamente controlada para a adequada função dos órgãos. No pulmão humano adulto, 11 membros da família HOX de genes homeobox são expressos, incluindo cinco membros do locus A (HOXA2-HOXA6) e cinco do locus B (HOXB2-HOXB6) e o gene HOXD1 (24). Em uma subsequente análise específica do locus B durante o desenvolvimento pulmonar de camundongos foi demonstrado que os genes HOXB3 e HOXB4 induzem a formação da região proximal (tráquea e brônquio principal), enquanto que os genes HOXB2 e HOXB5 a região distal (25). A expressão dos membros da família HOX em diferentes tecidos humanos normais (incluindo rim, mama, cólon, cérvix uterino e fígado) demonstrou resultados muito similares aos encontrados na análise do tecido pulmonar; cada tecido adulto apresenta uma combinação específica de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox (26-30). Estes resultados demonstram que o número de membros ativos ou silenciados apresenta uma grande variação entre os órgãos, e esta variação pode ser dependente do padrão de diferenciação das células que compõem cada órgão.

Após os estudos iniciais que demonstraram a expressão dos membros da família HOX de genes homeobox em linhagens celulares neoplásicas e nos correspondentes tecidos embrionários, a expressão desregulada de genes homeobox tem sido descrita em muitos outros tumores e linhagens celulares (31;32). Não é surpresa alguma a identificação da expressão desregulada de membros da família HOX e de outros genes homeobox em cânceres, onde alterações na proliferação e na identidade (diferenciação) celular são marcantes. Os mecanismos moleculares pelo qual genes homeobox, em particular a família HOX, controlam oncogênese são melhores conhecidos em leucemias. Diferenças importantes têm sido detectadas na expressão entre os membros da família HOX de genes homeobox em neoplasias malignas comparado com os correspondentes tecidos adultos. A análise da expressão dos membros da família HOX em câncer de bexiga revelou que quatro membros fortemente expressos no câncer (HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC11) não são expressos em amostras de bexiga normal (30). Em câncer de próstata, HOXC8 parece ser o membro mais importante, visto que tumores superexpressando o produto protéico deste gene apresentam um padrão mais indiferenciado com um comportamento invasivo e metastático agressivo (33). Expressões alteradas de membros da família HOX são encontradas em metástases de cólon e reto quando comparado com tumores primários e mucosas intestinais normais, reforçando a hipótese que genes da família HOX estão associados às etapas de evolução tumoral (34). Em um recente estudo foi demonstrado que a expressão dos membros do locus B 2, 4 e 13 são diferencialmente expressos em cérvix normal e carcinoma cervical, em favor do último (34). Adicionalmente, a expressão de genes HOX correlaciona com os estágios de progressão do tumor e padrão histológico em cânceres de pulmão (24).

Os membros da família HOX de genes homeobox estão associados com vários dos eventos biológicos associados com o processo de oncogênese, incluindo controle na proliferação e diferenciação celular, apoptose, síntese de moléculas de adesão celular e, indiretamente, no controle da migração e invasão celular via regulação na síntese de componentes da matriz extracelular. Recentes evidências demonstram que HOXB7 desempenha um papel fundamental na proliferação de diversos tipos celulares, incluindo células de melanoma, ovário e mama, via transativação de bFGF (35;36). HOXB4 induz proliferação de células da medula óssea via estimulação dos níveis protéicos de c-Jun, Fra-1 e ciclina D1 (37). HOXA10 diretamente liga-se a região promotora do gene p21, induzindo uma paralisação no ciclo celular e, a subsequente, diferenciação celular (38). Similarmente, a expressão forçada de HOXD10, o qual não é normalmente expresso em cânceres de mama, em uma linhagem celular altamente agressiva de câncer de mama (linhagem MDA-MB-231) reduz a proliferação celular, bloqueia a migração e induz diferenciação com formação de estruturas similares a ductos de glândulas mamárias (39). A homeoprotéina HOXA5 diretamente ativa a região promotora do gene p53 induzindo apoptose, e a expressão destas duas proteínas são coordenadamente perdidas em cânceres de mama. Então, a ausência de p53 em cânceres de mama pode ser primariamente resultado da perda de expressão de HOXA5 (40). Como p53 é conhecido por regular alguns aspectos do ciclo celular tão bem quanto apoptose, a habilidade de HOXA5 em regular p53 sugere um papel deste gene no controle do ciclo celular. Coletivamente, estes estudos demonstram que os membros da família HOX de genes homeobox controlam eventos importantes no processo de oncogênese, incluindo diferenciação celular. Interessantemente, este grupo não foi devidamente explorado em cânceres de boca.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Comparar o efeito de 3 métodos clássicos de indução da diferenciação celular em culturas celulares de CECs bucais.

3.2 Determinar o efeito do processo de diferenciação celular na expressão de membros da família HOX de genes homeobox em culturas celulares de CECs bucais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA DE CÉLULAS

Para induzir a diferenciação celular das linhagens de queratinócito normal (HaCAT) e células de CEC oral das linhagens SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 foram descongeladas e cultivadas em uma mistura de partes iguais de meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco e meio de cultura Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% e 400 ng/ml de hidrocortisona. Ao atingirem uma confluência desejada, as células foram sub-cultivadas com a retirada do meio de cultura, lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e remoção das células aderidas ao fundo do frasco de cultura com 2 ml de tripsina, atuando por 3 minutos e inativação da mesma por 8 ml de DMEM/F12 com 10% FBS. Esta solução de células foi transferida para tubos de 15 ml para centrifugação a 400xg durante 3 minutos. O meio foi aspirado e descartado e o precipitado foi ressuspensão em 5 ml de DMEM/F12 para contagem de células. Então uma solução com $1,5 \times 10^5$ células/ml foi distribuída em lâminas de cultura celular (LABTEK) de 4 poços e mantidas na estufa úmida por 24 h para adesão.

DIFERENCIAÇÃO POR CaCl_2

CaCl_2 foi adicionado diretamente no meio de cultura nas concentrações 20, 10, 8, 5, 4, e 2 mM e as células foram cultivadas por 24 ou 48 horas.

DIFERENCIAÇÃO POR ATRA

Para o ácido retinóico, as concentrações tituladas foram: 500, 300, 250, 150, 125, 75, 50, 25 e 12,5 μM . O controle negativo foi realizado adicionando a mesma alíquota do solvente puro (clorofórmio) no meio da titulação mais concentrada de

cada lâmina de cultura. Os tempos de incubação dos reagentes foram de 24, 8, 6, e 4 horas. Em uma segunda série de experimentos, nós cultivamos as células na presença de ácido retinóico por 6, 4 e 2 horas, seguido por um período adicional de 16 horas em DMEM/F12.

DIFERENCIAÇÃO POR SUSPENSÃO

A técnica de tratamento em suspensão necessita modificar o DMEM/F12 com metil-celulose de acordo com o Protocolo utilizado por *Monk et al* (41). Este reagente foi esterilizado em autoclave e adicionado ao DMEM/F12 aquecido a 65°C, misturado por 30 minutos em temperatura ambiente com auxílio de um misturador magnético e por 16 horas a 4°C. O conteúdo foi transferido para 2 frascos e centrifugado durante 1 hora à 12.000×g a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um frasco único para armazenamento a 4°C e o precipitado formado foi descartado.

Para o ensaio de diferenciação, 1×10^6 células foi cultivada em 2 ml de DMEM/F12 com metil-celulose e depositada em garrafa de cultura com 25 cm² durante 5 h na posição inclinada. Após o período de incubação, a metil-celulose foi dissolvida em 10 vezes o volume inicial com PBS gelado e o conteúdo foi centrifugado a 4.000×g durante 4 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 10 ml de DMEM/F12 com 10% FBS e novamente centrifugado a 4.000×g por 4 min. As células foram ressuspendidas em meio de cultura fresco e cultivadas por 16 h. Estas células foram posteriormente utilizadas para coloração de papanicolau ou para a reação de RT-PCR “duplex”.

FIXAÇÃO E COLORAÇÃO

Após o termino dos tratamentos, as culturas foram fixadas com formol neutro 10% durante 15 minutos e coradas histologicamente com a técnica Papanicolau.

ISOLAMENTO DE RNA

Para o Isolamento, o RNA total foi extraído das culturas celulares pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina. As linhagens celulares foram lavadas com PBS e incubadas com 1,5 ml de TRIzol (Invitrogen) por 5 min. Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,3 ml de clorofórmio. Após a centrifugação a 12.000×g 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×g 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×g 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. O RNA foi armazenado a -80 °C até o momento de sua utilização. A pureza e integridade do RNA isolado foram determinadas por gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% e 0,2 µg de brometo de etídio. 3 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.

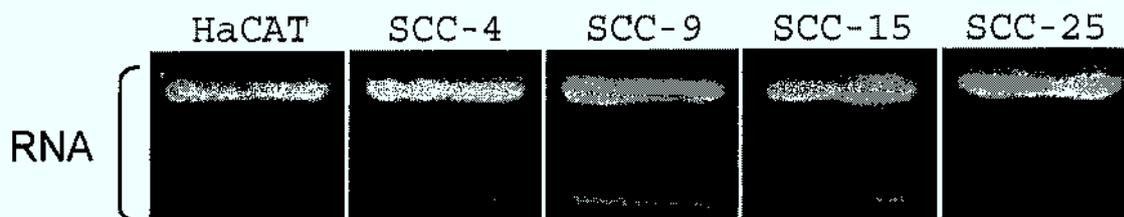


Figura 1. Gel de qualidade do RNA submetido a análise de RT-PCR. Imagem representativa das amostras de RNA revelando a integridade das subunidades ribossômicas 28S e 18S após a separação eletroforética em gel de agarose/MOPS/formaldeído.

SÍNTESE DE CDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), 3 µg de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA adicionando uma mistura contendo 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen), 1 µl de 10 mM dNTPs, 4 µl de 5x tampão de síntese (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de RNase Out (40 U/µl; Invitrogen), 1 µl de Superscript II RT (200 U/µl; Invitrogen). A mistura foi incubada por 50 min a 42°C e posteriormente por 15 min a 70°C.

REAÇÃO RT-PCR

A reação de PCR "duplex" foi desenvolvida utilizando pares de primers específicos para os cinco membros da família HOX de genes homeobox e o gene controle GAPDH (Tabela 1). Assim, 2 µl do cDNA foi amplificado em um termociclador (Modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta pelos pares de primers específicos para cada membro da família HOX, pares de primers específicos para o gene GAPDH, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs e 0,05 U/µl Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi

realizada com 32 ciclos de amplificação com os seguintes parâmetros: 94°C por 45 s, 57°C por 30 s e 72°C por 45 s. 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 foi realizada no sistema de fotodocumentação Kodak Digital science TM equipado com a câmera digital DC120.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de RT-PCR.

Gene	Seqüência (5'-3')	Concentração dos primers [nM]	Extensão do produto (pb)
HOX A5	F: TTGCCTCTCCGAGAGACAAATTAATAATCTGG	11,0	173
	R: ACTGACACTACGCGGGATCCGCTAATA	10,1	
HOX A9	F: GAGAGGCAGGTCAAGATCTGGTT	11,4	217
	R: GAGGTTTAGAGCCGCTTTGTGCG	12,4	
HOX A10	F: ACGGACAGACAAGTGAAAATCTGGTT	9,7	141
	R: GGAAGTGAAAAACCGCGTCGCCTGG	10,0	
HOX B4	F: GAGCGCCAGATCAAGATCTGGTT	11,8	142
	R: CGCGGGGGCCTCCATTGGGC	10,1	
HOX B7	F: GAAAGACAGATCAAGATTTGGTT	10,9	180
	R: CTGGGCTTCTCTTCGTCTCCCTTTCTCATG	11,2	
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	9,0	285
	R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC	8,7	

5. RESULTADOS

As células da linhagem de queratinócitos humanos normais HaCAT responderam ao tratamento com CaCl_2 . As células sofreram uma intensa diferenciação celular que foi associada a uma proeminente morte celular sob a elevação de 40 vezes nos níveis dos íons de cálcio no meio de cultura (Figura 2). Interessantemente, níveis inferiores de CaCl_2 falharam em induzir a diferenciação e morte celular do queratinócitos normais. Porém as linhagens de CEC oral demonstraram ser resistentes a diferenciação induzida pelo tratamento com CaCl_2 na concentração de 40 mM por 24 horas (Figura 3). Mesmo o tratamento por 48 horas não foi capaz de induzir a diferenciação celular das células de CEC oral (dado não mostrado).

O tratamento de queratinócitos normais HaCAT com ATRA por 6 horas na concentração de 300 μM induziu significativamente a diferenciação celular como revelado pela mudança nas características morfológicas das células incluindo redução significativa no tamanho do citoplasma celular, presença de núcleo picnótico e hiper Cromático (Figura 4). O tratamento com ATRA também foi acompanhado uma morte celular proeminente. Contudo, o resultado do estudo com ATRA revelou uma alta toxicidade para as linhagens de CEC oral. O tratamento com 300 μM durante 6 horas induziu significativamente a taxa de morte celular (Figura 5). Concentrações inferiores a esta e tempos mais curtos de incubação não foram suficientes para induzir a diferenciação celular. Então, o ATRA não é um indutor eficaz para diferenciação celular das linhagens de CEC oral deste estudo.

O experimento de indução da diferenciação celular por crescimento em suspensão das células em metil-celulose demonstrou um grau de diferenciação aceitável e com baixa taxa de morte celular em todas as linhagens celulares

testadas (Fig. 2). Em uma análise qualitativa, estimamos que pelo menos 70% das células cultivadas foram induzidas a diferenciação. Então, este método foi escolhido para determinar o padrão de expressão de alguns membros da família HOX de genes homeobox. Foi realizada uma análise comparativa entre células cultivadas em condições controle e células cultivadas em suspensão em metil-celulose para indução a diferenciação celular. O critério de escolha dos cinco membros foi sua associação com os eventos de diferenciação celular e com oncogênese. Este estudo revelou que apenas o gene HOXB7 apresentou uma modulação no seu padrão de expressão após indução da diferenciação celular das linhagens HaCAT e de CEC bucal (Fig. 3). Em condições normais, HOXB7 foi expresso em maiores níveis nas linhagens de CEC bucal comparada com a linhagem HaCAT, onde a expressão de HOXB7 não foi detectada nas condições de nosso ensaio. Por outro lado, a indução da diferenciação celular por crescimento em suspensão em metil-celulose induziu significativamente a expressão de HOXB7 em todas as linhagens celulares (Figura 6).

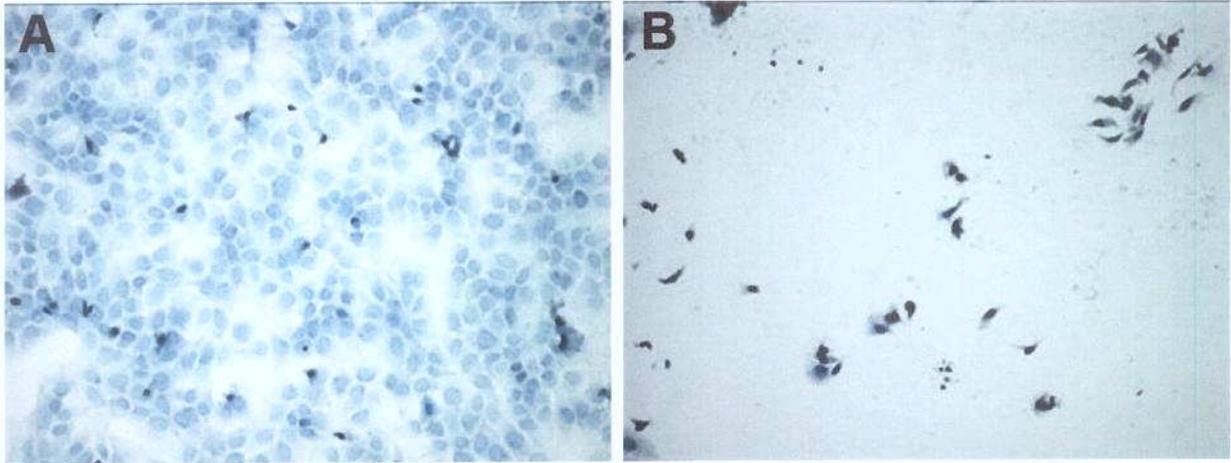


Figura 2. Tratamento com CaCl_2 induz a diferenciação e morte celular dos queratinócitos humanos normais. Células foram plaqueadas e cultivadas com meio de cultura acrescido de 40 mM de CaCl_2 por 24 horas. (A) Células controle e (B) células sob tratamento com 40 mM de CaCl_2 .

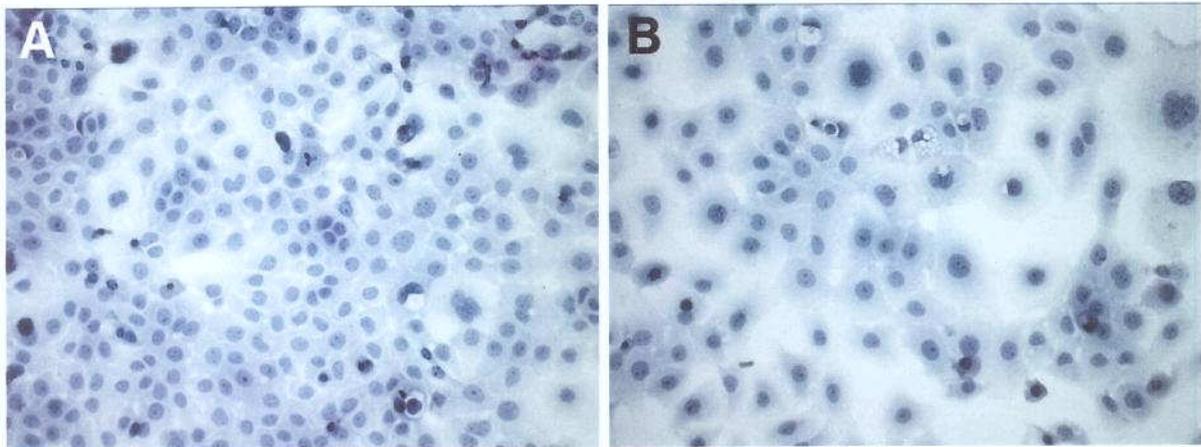


Figura 3. Efeito de CaCl_2 na diferenciação celular de células de CEC oral. Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com 40 mM de CaCl_2 na diferenciação celular da linhagem SCC25. (A) Células controle e (B) células sob tratamento com 40 mM de CaCl_2 .

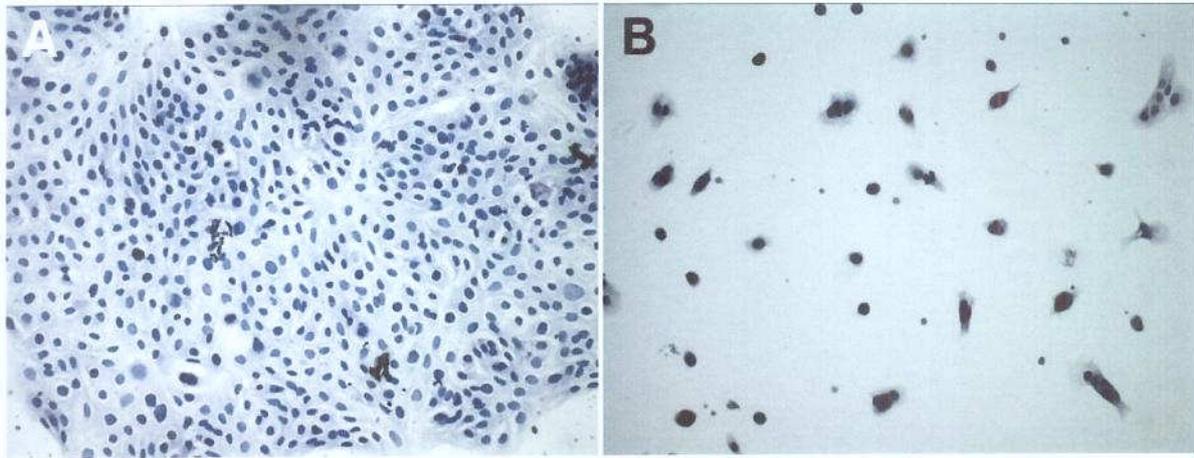


Figura 4. ATRA induz a morte celular de queratinócitos da linhagem HaCAT. Células foram incubadas com 300 μM de ATRA e cultivadas por 6 horas. Seguindo a incubação, as células foram fixadas e coradas pela técnica de Papanicolaou. Note o pequeno número de células remanescentes quando tratado com ATRA (**B**) comparado com células controle (**A**).

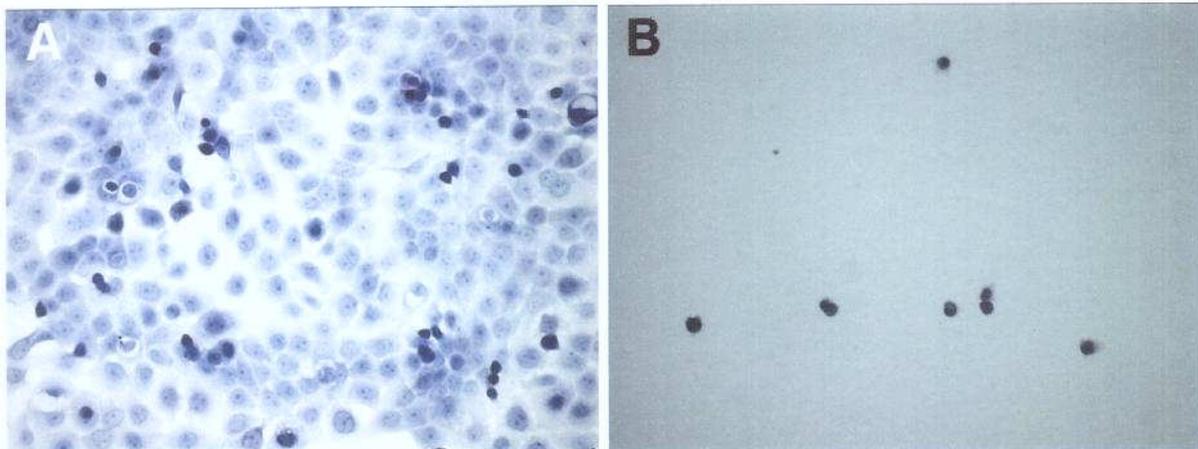


Figura 5. Fotomicrografias representativas do efeito de ATRA na linhagem de CEC oral SCC25. Células foram cultivadas por 6 horas com 300 μM de ATRA, adicionado diretamente no meio de cultura, seguido por um período de 16 horas em meio de cultura sem o fator. ATRA induziu significativamente a morte das células de CEC oral. (**A**) Células controle e (**B**) células tratadas com 300 μM de ATRA.

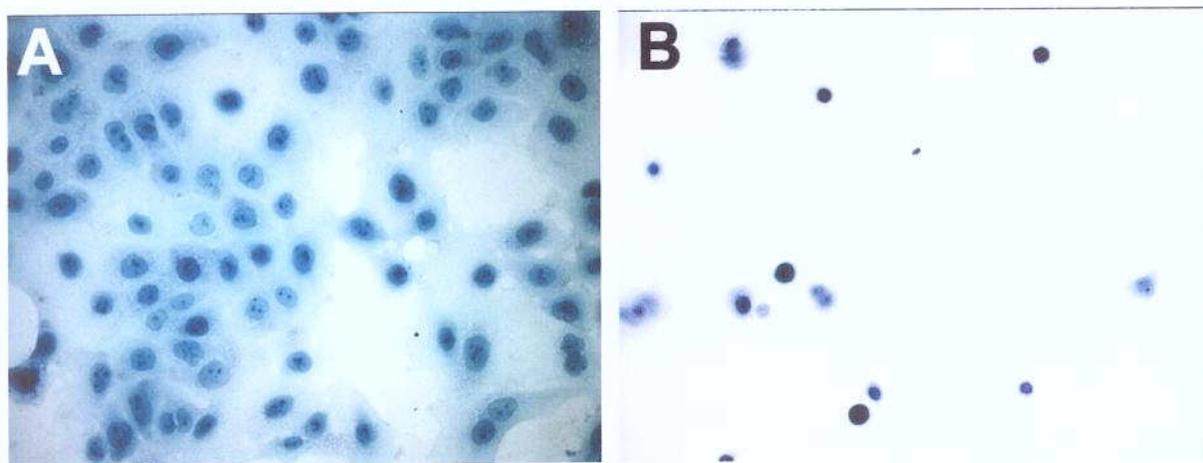


Figura 6. Indução da diferenciação pelo crescimento em suspensão em metil-celulose. Fotos representativas da linhagem SCC15. Células foram cultivadas por 5 h em suspensão e posteriormente deixadas aderir em lâminas de cultura de células. Seguindo a incubação, as células foram fixadas e coradas pela técnica de Papanicolau. (A) Células controle e (B) Células diferenciadas.

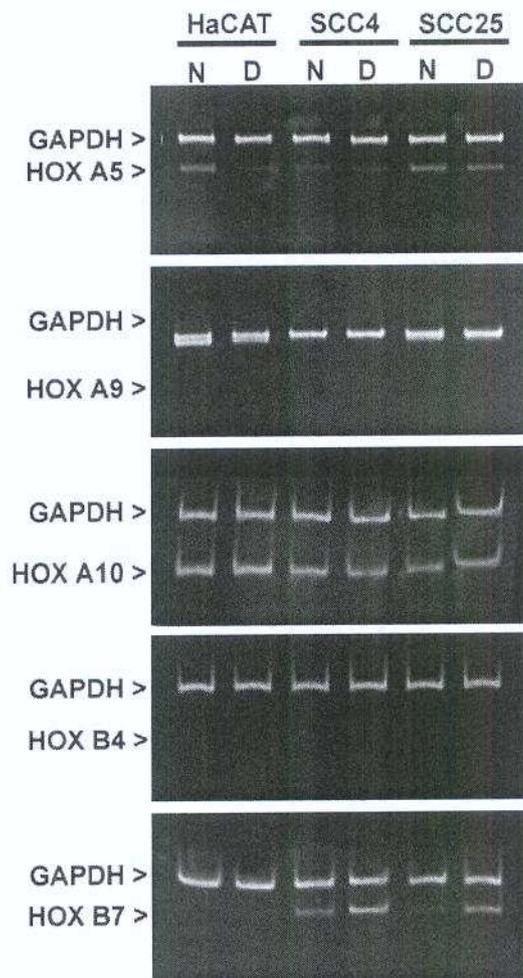


Figura 7. Diferenciação celular induz a expressão de HOXB7 em linhagens celulares de CEC bucal. Experimento representativo na análise de RT-PCR “duplex” nas linhagens de queratinócitos normais HaCAT e CEC bucal SCC4 e SCC25. Células controle (N) e diferenciadas (D) por suspensão em metal-celulose durante 5h. O padrão de expressão do gene HOX B7 está aumentado nas células diferenciadas.

6. DISCUSSÃO

Queratinócitos normais possuem no ciclo celular uma série de eventos dos quais estão presentes a diferenciação e a morte celular programada (apoptose). Células neoplásicas são indiferentes a estes eventos, possuindo uma alta taxa de proliferação em oposição a um ciclo celular regulado. A hipótese do estudo trata o fato que uma diferenciação induzida pode reduzir a taxa de proliferação, forçar a célula a produzir queratina e regular o ciclo novamente a induzir a apoptose.

Para desempenhar este estudo, nós utilizaremos 3 métodos de indução da diferenciação celular de células epiteliais, a saber: tratamento com ácido retinóico, elevação dos níveis de íons cálcio no meio de cultura e cultivo celular em suspensão (sem aderência aos frascos de cultura). Embora estes métodos sejam clássicos para indução da diferenciação de células epiteliais, apenas o método de cultivo celular em suspensão foi efetivamente capaz de induzir diferenciação das células de CEC bucal deste estudo. É importante ressaltar que as células foram identificadas como diferenciadas pela coloração de Papanicolau, com a evidência do acúmulo citoplasmático de citoqueratina.

Os experimentos de indução da diferenciação celular com elevação dos níveis de íons cálcio não foram capazes de afetar as linhagens de CEC bucal, enquanto o tratamento com ácido retinóico induziu uma morte celular muito intensa. Interessantemente, como também relatado no primeiro relatório, a linhagem HaCAT respondeu bem a indução da diferenciação pelo tratamento com elevação de íons cálcio e com o tratamento com ácido retinóico.

Como destacado anteriormente, inúmeros membros da família HOX de genes homeobox participam do processo de diferenciação celular. Para melhor compreender o papel destes genes na oncogênese durante o processo de

indiferenciação celular, linhagens celulares de CECs bucais indiferenciadas e diferenciadas foram submetidas à técnica semi-quantitativa de transcriptase reversa-reação de cadeia da polimerase (RT-PCR) para a análise comparativa dos níveis de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox.

Muitos trabalhos têm registrado diferenças na expressão dos genes HOX entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno ainda permanece obscura. As expressões dos genes homeobox em tumores podem ser divididas em três categorias. 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 (12). 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). 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 (12).

Dentre os genes escolhidos para esta análise estavam HOXA10 e HOXA5. O gene HOXA10 é um regulador positivo do gene supressor de tumor p53, que apresenta papel importante no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (42). A expressão forçada do gene HOXA10 em células humanas derivadas de câncer de mama resulta na expressão de p53, o que é associado a uma redução na capacidade invasiva e no potencial oncogênico das células (43). Desta forma, estes

autores sugeriram que a perda da expressão de HOXA10 pode ser importante para o desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que a ausência de expressão deste gene provoca uma redução na expressão do gene p53, favorecendo o aparecimento do tumor. Além do gene HOXA10, o gene HOXA5 também atua como um regulador transcricional de p53. 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 (40).

Alguns estudos sugerem que o gene HOXB7 desempenhe papel importante na progressão maligna do câncer de mama através da liberação do fator angiogênico bFGF (36). 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 (35). Em melanomas é possível que a expressão desregulada deste gene contribua para a transformação e progressão das células neoplásicas via bFGF. A inibição da expressão de HOXB7 utilizando-se fragmentos antisense demonstrou uma redução na capacidade de invasão de linhagens celulares derivadas de câncer de ovário (44). Desta maneira, acredita-se que o gene HOXB7 desempenhe papel importante para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer através da promoção da angiogênese tumoral e, conseqüentemente, favorecendo os processos de invasão e proliferação das células malignas (35;44).

7. CONCLUSÕES

As linhagens de CEC bucal demonstram resistência à diferenciação induzida pela elevação dos níveis de cálcio, ao contrário de linhagens de queratinócitos normais HaCAT.

O ácido retinóico ALL TRANS provou uma intensa morte celular nas linhagens de CEC bucal deste estudo.

A suspensão em metil-celulose induziu a diferenciação celular em todas as linhagens deste estudo.

Dentre o grupo de genes homeobox analisados, somente HOXB7 elevou sua expressão em células diferenciadas, sugerindo uma associação deste gene ao desenvolvimento e proliferação do CEC bucal.

* REFERENCIAS

1. Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;**66**(2):889-97.
2. Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, Danenberg PV, DeMeester TR. *Surgery.* 2005 Nov;**138**(5):924-31.
3. Samuel S, Naora H. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;**41**(16):2428-37. Epub 2005 Sep 30. Review.
4. Lemons D, McGinnis W. *Science.* 2006 Sep 29;**313**(5795):1918-22. Review.
5. Booth HA, Holland PW. *Gene.* 2007 Jan 31;**387**(1-2):7-14. Epub 2006 Aug 22.
6. Svingen T, Tonissen KF. *Heredity.* 2006 Aug;**97**(2):88-96. Epub 2006 May 24. Review.
7. Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. *Mech Dev.* 1996 Mar;**55**(1):91-108. Review.
8. Chen KN, Gu ZD, Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;**11**(3):1044-9.
9. Freschi G, Taddei A, Bechi P, Faiella A, Gulisano M, Cillo C, Bucciarelli G, Boncinelli E. *Int J Mol Med.* 2005 Oct;**16**(4):581-7.
10. Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. *Ulster Med J.* 2006 Jan;**75**(1):23-31. Review. Erratum in: *Ulster Med J.* 2006 May;**75**(2):135.
11. Martinez P, Amemiya CT. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;**133**(4):571-80. Review.
12. Abate-Shen C. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;**2**(10):777-85. Review
13. INCA. (2006) *Ministério da Saúde*
14. Scully, C., Field, J. K., and Tanzawa, H. (2000) *Oral Oncol* **36**, 404-413
15. Coletta, R. D., Graner, E., Lopes, M. A., Vargas, P. A., Junior, J. J., and Almeida, O. P. (2002) *Revista da APCD* **56**, 60-67
16. Ferrier, D. E., and Holland, P. W. (2002) *Mol Phylogenet Evol* **24**, 412-417
17. Ford, H. L. (1998) *Cell Biol Int* **22**, 397-400
18. Krumlauf, R. (1994) *Cell* **78**, 191-201
19. Scott, M. P. (1992) *Cell* **71**, 551-553

20. Cillo, C., Cantile, M., Faiella, A., and Boncinelli, E. (2001) *J Cell Physiol* **188**, 161-169
21. Duboule, D., and Morata, G. (1994) *Trends Genet* **10**, 358-364
22. Condie, B. G., and Capecchi, M. R. (1994) *Nature* **370**, 304-307
23. Chen, F., and Capecchi, M. R. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 541-546
24. Tiberio, C., Barba, P., Magli, M. C., Arvelo, F., Le Chevalier, T., Poupon, M. F., and Cillo, C. (1994) *Int J Cancer* **58**, 608-615
25. Bogue, C. W., Lou, L. J., Vasavada, H., Wilson, C. M., and Jacobs, H. C. (1996) *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 163-171
26. Hung, Y. C., Ueda, M., Terai, Y., Kumagai, K., Ueki, K., Kanda, K., Yamaguchi, H., Akise, D., and Ueki, M. (2003) *Cancer Sci* **94**, 437-441
27. De Vita, G., Barba, P., Odartchenko, N., Givel, J. C., Freschi, G., Bucciarelli, G., Magli, M. C., Boncinelli, E., and Cillo, C. (1993) *Eur J Cancer* **29A**, 887-893
28. Cillo, C., Barba, P., Freschi, G., Bucciarelli, G., Magli, M. C., and Boncinelli, E. (1992) *Int J Cancer* **51**, 892-897
29. Cantile, M., Pettinato, G., Procino, A., Feliciello, I., Cindolo, L., and Cillo, C. (2003) *Eur J Cancer* **39**, 257-264
30. Cantile, M., Cindolo, L., Napodano, G., Altieri, V., and Cillo, C. (2003) *Oncogene* **22**, 6462-6468
31. Ford, H. L., Kabingu, E. N., Bump, E. A., Mutter, G. L., and Pardee, A. B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12608-12613
32. Coletta, R. D., Jedlicka, P., Gutierrez-Hartmann, A., and Ford, H. L. (2004) *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 39-53
33. Waltregny, D., Alami, Y., Clause, N., de Leval, J., and Castronovo, V. (2002) *Prostate* **50**, 162-169
34. Lopez, R., Garrido, E., Pina, P., Hidalgo, A., Lazos, M., Ochoa, R., and Salcedo, M. (2006) *Int J Gynecol Cancer* **16**, 329-335
35. Care, A., Silvani, A., Meccia, E., Mattia, G., Peschle, C., and Colombo, M. P. (1998) *Oncogene* **16**, 3285-3289
36. Care, A., Silvani, A., Meccia, E., Mattia, G., Stoppacciaro, A., Parmiani, G., Peschle, C., and Colombo, M. P. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4842-4851

37. Schmittwolf, C., Porsch, M., Greiner, A., Avots, A., and Muller, A. M. (2005) *Oncogene* **24**, 561-572
38. Del Bene, F., and Wittbrodt, J. (2005) *Semin Cell Dev Biol* **16**, 449-460
39. Carrio, M., Arderiu, G., Myers, C., and Boudreau, N. J. (2005) *Cancer Res* **65**, 7177-7185
40. Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J., and Sukumar, S. (2000) *Nature* **405**, 974-978
41. Monk, S.A., Denison, M.S., Rice, R.H. (2001) *Arch Biochem Biophys* **393**, 154-162.
42. Prives C & Hall PA. *J Pathol.* 1999 Jan; **187**(1):112-26
43. Chu MC, Selam EB, Taylor HS. *Cancer Biol Ther.* 2004 Jun; **3**(6):568-72.
44. Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, Yokohama Y, Ishikawa M. *Int J Oncol.* 2006 Apr; **28**(4):931-8.