

UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Expressão imuno-histoquímica de HOXB7 é correlacionada com sobrevida global de pacientes com carcinoma espinocelular oral

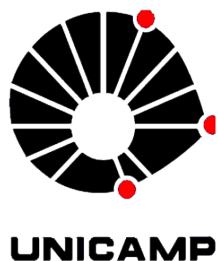
Aluna: Tamires Cristina Papetti

RA: 084138

O material contido no presente estudo
foi devidamente corrigido.

30/09/2011

Ano de Conclusão do Curso: 2011



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Aluna : Tamires Cristina Papetti

Expressão imuno-histoquímica de HOXB7 é correlacionada com sobrevida global de pacientes com carcinoma espinocelular oral

Orientador: Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba-SP

Ano: 2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P197e Papetti, Tamires Cristina, 1988-
Expressão imuno-histoquímica de HOXB7 é
correlacionada com sobrevida global de pacientes com
carcinoma espinocelular oral / Tamires Cristina Papetti.
-- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Genes homeobox. 2. Neoplasias bucais. I. Della
Coletta, Ricardo, 1972- II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mesmo eu tendo me afastado Dele na maior parte de minha caminhada, Ele não ter se afastado de mim.

Agradeço aos meus pais, Antonio e Aparecida pelo amor e dedicação e por terem me dado a oportunidade de estar estudando. Aos meus irmãos, Eliana e Adriano, pelo carinho ao longo desses anos e acima de tudo pela cumplicidade nas horas de maior apelo.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Renan, que desde sempre me acompanhou em todas as dificuldades e que sem sua ajuda eu não teria alcançado metade dos meus objetivos.

Às minhas novas amigas concebidas na faculdade. Que elas durem tanto quanto foram intensas.

Por fim, ao meu professor Ricardo Della Coletta, pelo tempo e paciência a mim dedicados e pelo espírito crítico o qual espero, pelo menos em parte, ter adquirido.

RESUMO

Os membros da família HOX de genes homeobox são classicamente conhecidos por regular a proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário. Contudo, inúmeros estudos demonstraram uma expressão desregulada de alguns membros desta família em neoplasias, incluindo melanomas, leucemias e cânceres de colón, pulmão, rim e próstata, entre outros. Estudos prévios do nosso laboratório analisaram o perfil de expressão dos 39 genes da família HOX em amostras orais de tecido normal e carcinoma espinocelular (CEC), identificando alguns genes diferencialmente expressos. Dentre estes genes estava HOXB7. Interessantemente, a expressão aberrante de HOXB7 em neoplasias malignas foi relacionada a um controle da proliferação, invasão e efetividade no reparo do DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da marcação imuno-histoquímica do gene HOXB7 em 115 amostras de CECs orais. A expressão elevada de HOXB7 foi significativamente correlacionada com o estágio N ($p=0,013$), infiltração vascular ($p=0,0218$), consumo de bebidas alcoólicas ($p=0,047$) e potencial proliferativo do tumor como revelado pela expressão de Ki67 ($p=0,0127$). Mais importante, a expressão de HOXB7 demonstrou ser um marcador independente de sobrevida global em 5 anos de pacientes com CEC oral ($p=0,009$). As taxas de sobrevida global em 5 anos foram respectivamente de 88,1% e 55,8% para pacientes com expressão baixa e elevada de HOXB7. Em conclusão, nossos resultados sugerem que HOXB7 pode ser um marcador importante para predizer o prognóstico de pacientes com CEC oral.

Palavras chaves: genes homeobox; neoplasia bucal; prognóstico.

ABSTRACT

HOX genes are master regulators of the cellular proliferation and differentiation during embryogenesis. However, some members of the HOX family have been shown to be dysregulated in malignancies, including melanomas, leukemias and cancers of colon, lung, kidney and prostate among others. Previous studies in our laboratory analyzed the expression profile of all 39 HOX genes in oral samples from normal mucosa and squamous cell carcinoma (SCC), identifying some differentially expressed. Among those genes were HOXB7. Interestingly, the aberrant expression of HOXB7 gene has been related with the regulation of proliferation, differentiation and invasion, and with the control of the DNA repair effectiveness. The goal of this study was to analyze the immunohistochemical expression of HOXB7 in 115 oral SCCs. High expression of HOXB7 was significantly correlated with N stage ($p=0.013$), vascular infiltration ($p=0.0218$), alcohol consumption ($p=0.047$), and tumor proliferative potential as revealed by Ki67 expression ($p=0.0127$). Most important, HOXB7 expression showed to be an independent marker of overall survival in 5 years. The overall survival in 5 years rates were respectively 88.03% and 55.78% for patients with low and high expression of HOXB7. In conclusion, our results suggest that HOXB7 could be an important marker for prognosis of patients with oral SSC.

Key words: homeobox genes, buccal neoplasia, prognosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4. RESULTADOS	10
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS	21
8. ANEXO	25

1. INTRODUÇÃO

Os genes homeobox são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). Estes genes 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, 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). 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 seqüência específica de DNA que codifica 61 aminoácidos, denominada de homeodomínio (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). O homeodomínio é a seqüência responsável pela ligação específica das proteínas ao DNA, estimulando ou inibindo a expressão de genes alvos (Samuel & Naora, 2005). 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).

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 (Myers *et al.*, 2000; Maroulakou & Spyropoulos, 2003). 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). 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).

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).

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. 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 pode 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 de esses genes estarem associado 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.

HOXB7 desempenha um 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 a 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 sobrevivência e proliferação prolongada de células orientadas para a diferenciação granulomonocítica (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). Recentemente foi descoberto que a superexpressão do gene HOXB7 parece estar envolvida no desenvolvimento do

mieloma múltiplo. Storti *et al.* (2010) demonstraram a superexpressão de HOXB7 em 40% de pacientes com mieloma múltiplo analisados. A expressão forçada de HOXB7 em linhagens de mieloma múltiplo alterou significativamente seu perfil transcricional e angiogênico, aumentando a expressão de VEGFA, FGF2, MMP2, WNT5a e PDGFA e a formação de vasos sanguíneos. De maneira contrária, o bloqueio da tradução de HOXB7 com o uso de RNA de interferência diminuíram a expressão de fatores angiogênicos. (Storti *et al.*, 2010). HOXB7 foi o único gene do locus B expresso constitutivamente em 25 diferentes linhagens celulares e em 5 amostras cirúrgicas de melanoma humano (Care *et al.*, 1996). Em culturas de melanócitos normais e em nevos melanocíticos, o gene HOXB7 é expresso somente em células em proliferação (Maeda *et al.*, 2005). Braig *et al.* (2010) demonstraram que a menor expressão do micro RNA miR-196a em células de melanoma está relacionada a maior expressão de HOXB7 e que por sua vez aumenta a expressão de bFGF e por final BMP4, aumentando o potencial migratório destas células.

Para tentar compreender o papel de HOXB7 em cânceres orais, nós construímos linhagens celulares de queratinócitos normais superexpressando o gene HOXB7 e inibimos os níveis endógenos de HOXB7 em uma linhagem de câncer oral (SCC9) por meio da técnica de RNA de interferência. Em adição, realizamos uma série de reações de imuno-histoquímica para determinar o valor prognóstico de HOXB7 para pacientes com câncer oral. Este estudo revelou que HOXB7 promove a proliferação de células de CEC oral e que pacientes apresentando tumores com expressão elevada de HOXB7 tenderam a apresentar um pior prognóstico, incluindo menor sobrevida global e livre de doença (Destro *et al.*, 2010). Embora os resultados desta análise imuno-histoquímica tenha sido bem animadores, o número de amostras de CEC oral incluídas neste estudo foi pequeno, limitando o poder de conclusão de nossos resultados.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar o valor prognóstico do gene HOXB7 para pacientes afetados por câncer oral por meio de análise imuno-histoquímica em 115 amostras de CEC oral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação do Comitê de Ética

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

Amostras

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

Imuno-Histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas com a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Os cortes histológicos foram diafanizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool, tratados com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido por incubação com 10 mM ácido cítrico pH 6 em panela de pressão elétrica. Depois de lavados com salina tamponada com fosfato (PBS), os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 1 h e incubados com anticorpo primário, seguidos pelo método ABC (LSAB, Dako Corp. Carpinteria, CA, USA). Os anticorpos primários foram anti-HOXB7 a uma diluição de 1: 100 (Zymed) e anti-Ki67 na diluição de 1:200 (Dako). As reações foram reveladas com solução de 0,06

mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) acrescida de 1% de H₂O₂ e 1% de DMSO. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos, soro total não-imunizado de coelho para HOXB7 e omissão de anticorpo para Ki67, foram sempre realizados.

Quantificação das Reações de Imuno-histoquímica

Cortes histológicos foram fotografados no fotomicroscópio DMR (Leica Microsystem, Nussloch, Germany), utilizando um aumento de 40x. Em seguida, a porcentagem de células positivas em relação ao total (número de células positivas para HOXB7 ou Ki67 em relação ao número total de células positivas e negativas) foi determinado com o auxílio do software ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, NIH, USA).

Análise Estatística

Para determinar a correlação entre a positividade para HOXB7 e dados clínico-patológicos, nós utilizamos o teste qui-quadrado. Para fins estatísticos, as amostras foram divididas em dois grupos baseado no valor da mediana da expressão de HOXB7. Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas através do método de Kaplan-Meier e o teste Log-rank foi empregado para comparar as curvas de sobrevida. O risco de ocorrência (hazard ratio, HR) foi avaliado por análise uni e multivariada de Cox. O nível de significância foi determinado como 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas NCSS e GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Para determinar o valor prognóstico de HOXB7, nós realizamos reações de imuno-histoquímica em 115 amostras distribuídas em 2 arranjos de tecido. Células positivas foram facilmente identificadas por uma marcação nuclear (Fig. 1). A presença intensa de células positivas para HOXB7 correlacionou positivamente e significativamente com hábito de beber, estágio clínico N e invasão vascular (Tabela 1). Maior parte dos pacientes que apresentaram baixa expressão de HOXB7 (<31%) foi classificada em estágio clínico N0 (66,67%), por outro lado, 56,37% dos pacientes classificados como N+ apresentaram níveis elevados de expressão de HOXB7. Similarmente, tumores com um número reduzido de células positivas para HOXB7 não apresentaram infiltração vascular. A positividade para HOXB7 não foi associada com idade, gênero, raça, hábito de fumar, localização do tumor, tamanho do tumor (estádio T), diferenciação celular das células tumorais, margem cirúrgica, infiltração neural e recorrência tumoral.

A taxa de proliferação dos tumores foi avaliada pela reação imunohistoquímica para Ki67. Núcleos com coloração amarronzada, independente da intensidade, foram interpretados como positivo para Ki67. A mediana da expressão imunohistoquímica de Ki67 foi empregada para dividir os tumores em 2 grupos, um a cima e outro abaixo da mediana (exibindo alta e baixa atividade proliferativa), que foram associados com a positividade para HOXB7. A positividade para HOXB7 foi significativamente maior em tumores exibindo uma elevada proporção de células positivas para Ki67 (Tabela 1).

A positividade para HOXB7 significativamente correlacionou com o período de sobrevida global (tempo transcorrido entre o diagnóstico da doença e a morte do paciente), onde pacientes que demonstraram um tumor com grande quantidade de células positivas apresentaram um período de sobrevida global significativamente menor que os pacientes com baixa positividade (Fig. 2). Não houve associação significativa entre a sobrevida livre de doença e a positividade para HOXB7 (Fig. 3). Para determinar se HOXB7 apresenta um valor preditivo independente de outros fatores para a sobrevida global dos pacientes com câncer bucal, nós realizamos análise multivariada incluindo os fatores correlacionados com HOXB7. Esta análise demonstrou

que a expressão de HOXB7 é um indicador independente da sobrevida global em 5 anos de pacientes com CEC oral (Tabela 2). As taxas de sobrevida global em 5 anos foram 88,1% e 55,8% para pacientes com baixa e alta expressão de HOXB7, respectivamente. Como antecipado, nenhuma correlação com sobrevida livre de doença foi observada em relação expressão de HOXB7, mas uma significativa correlação foi observada com estágio N (Tabela 3).

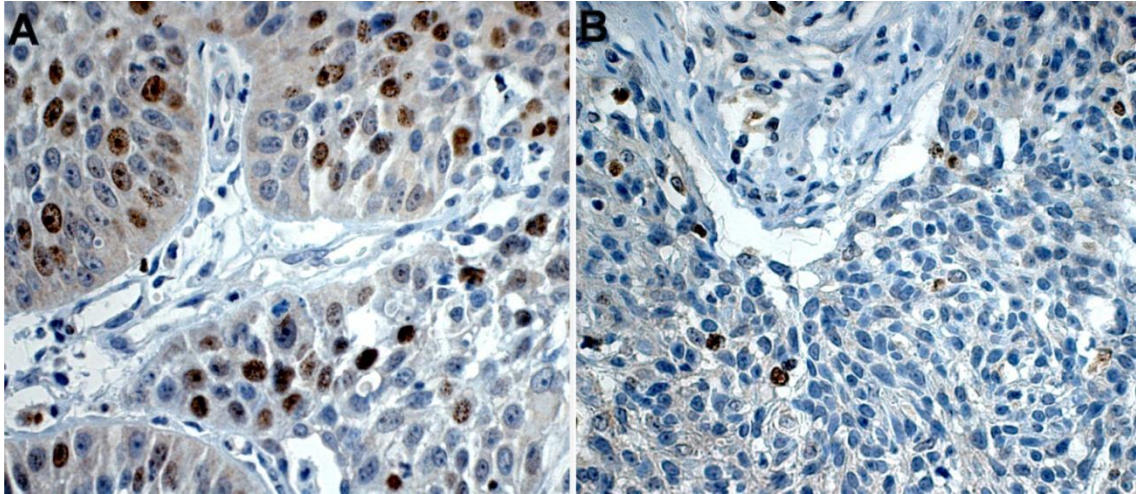


Figura 1. Marcação imuno-histoquímica de HOXB7 CECs orais. Em A é apresentado uma amostra representativa do estudo classificada como forte marcação para HOXB7, enquanto que em B temos uma amostras representativa do grupo fraca marcação.

Tabela 1. Correlação clínico-patológica da expressão imuno-histoquímica de HOXB7 em CECs orais (n=115).

Parâmetro	% de células positivas		Valor de p
	<31 n (%)	≥31 n (%)	
Idade			0,30
< 56 anos	33 (55)	25 (45,45)	
≥ 56 anos	27 (45)	30 (54,55)	
Gênero			0,80
Homem	48 (80)	45 (81,82)	
Mulher	12 (20)	10 (18,18)	
Raça			0,18
Caucasiana	55 (91,67)	46 (83,63)	
Não-Caucasiana	5 (8,33)	9 (16,37)	
Hábito de fumar			0,15
Não	8 (13,34)	3 (5,45)	
Sim	52 (86,66)	52 (94,55)	
Hábito de beber			0,047
Não	18 (30)	8 (14,55)	
Sim	42 (70)	47 (85,45)	
Localização			0,94
Língua	44 (73,33)	40 (72,72)	
Outra	16 (26,67)	15 (27,28)	
Estadio T			0,10
T1 + T2	25 (41,66)	15 (27,27)	
T3 + T4	35 (58,34)	40 (72,73)	
Estadio N			0,013
N0	40 (66,67)	24 (43,63)	
N+	20 (33,33)	31 (56,37)	
Diferenciação histopatológica			0,93
BD + MD	31 (51,67)	28 (50,91)	
Indiferenciado	29 (48,33)	27 (49,09)	
Infiltração vascular			0,021
Não	44 (73,33)	29 (52,72)	
Sim	16 (26,67)	26 (47,28)	
Infiltração neural			0,40
Não	37 (61,67)	38 (69,1)	
Sim	23 (38,33)	17 (30,9)	
Recorrência			0,56
Não	37 (61,67)	31 (56,37)	
Sim	23 (38,33)	24 (43,63)	
Células positivas para Ki67			0,012
< 23%	39 (65)	23 (41,82)	
≥ 23%	21 (35)	32 (58,18)	

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente Diferenciado.

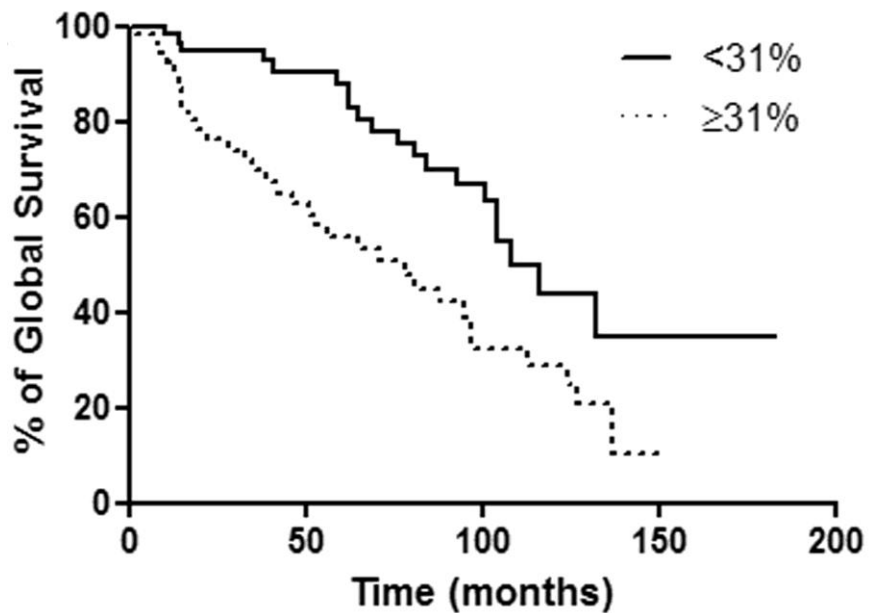


Figura 2. Curva de sobrevida global dos pacientes com CEC oral deste estudo divididos em relação à expressão de HOXB7. O período de sobrevida após 5 anos dos pacientes com tumores apresentado fraca expressão de HOXA1 foi significativamente maior que a de pacientes com elevada expressão ($p=0,001$).

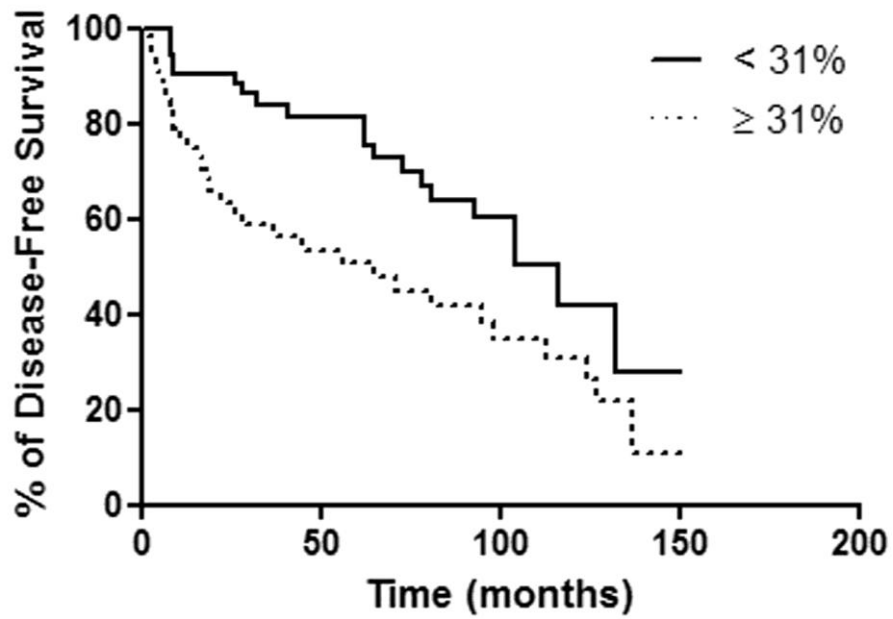


Figura 3. Curva de sobrevida livre de doença. Nenhuma correlação entre a expressão de HOXB7 e o período de sobrevida livre de doença foi observada ($p=0,07$).

Tabela 2. Análise uni e multivariada de COX para probabilidade de sobrevida de 5 anos em pacientes com CEC oral (n=115).

Parâmetro	Sobrevida global em 5 anos (%)	HR (95% IC) / valor de p	
		Univariada	Multivariada
HOXB7			
< 31%	88,1	Referencia	Referencia
≥ 31%	55,8	3,09 (2,82-6,39) / 0,001	2,74 (1,96-6,32) / 0,009
Estadio N			
N0	80,1	Referencia	Referencia
N+	62,9	1,54 (1,14-2,54) / 0,034	1,28 (0,91-1,80) / 0,08
Infiltração vascular			
Não	76,3	Referencia	Referencia
Sim	65,7	1,79 (0,57-5,63) / 0,45	1,53 (0,51-4,62) / 0,32
Células positivas para Ki67			
< 23%	75,1	Referencia	Referencia
≥ 23%	69,1	1,28 (0,91-1,80) / 0,28	1,07 (0,74-1,55) / 0,46

Tabela 3. Análise uni e multivariada de COX para probabilidade de sobrevida livre de doença de 5 anos em pacientes com CEC oral (n=115).

Parâmetro	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	HR (95% IC) / valor de p	
		Univariada	Multivariada
HOXB7			
< 31%	81,4	Referencia	Referencia
≥ 31%	60,8	1,39 (0,60-2,79) / 0,07	1,65 (0,78-2,41) / 0,083
Estadio N			
N0	76,2	Referencia	Referencia
N+	53,9	4,45 (2,15-9,78) / 0,008	3,56 (1,29-7,82) / 0,03
Infiltração vascular			
Não	68,9	Referencia	Referencia
Sim	62,1	1,39 (0,48-3,77) / 0,25	1,54 (0,94-2,81) / 0,33
Células positivas para Ki67			
< 23%	66,5	Referencia	Referencia
≥ 23%	62,5	1,20 (0,74-1,55) / 0,66	1,13 (0,64-1,99) / 0,86

5. DISCUSSÃO

O índice de sobrevida em 5 anos para pacientes com CEC oral permanece baixo e inalterado nas últimas décadas (entre 50 e 60%), mesmo havendo um progresso muito grande no campo do tratamento oncológico (Bagan & Scully, 2008; Sklenicka *et al.*, 2010; Jerjes *et al.*, 2010). Uma das principais causas da alta mortalidade é o diagnóstico tardio da doença, normalmente já se encontra em estágio avançado, facilitando a recorrência local e o desenvolvimento de metástase regional a distancia (Warnakulasuriya, 2009; Scully & Bagan, 2009). Além do diagnóstico precoce, o melhor conhecimento dos eventos biológicos associados à gênese do CEC oral e a caracterização de biomarcadores podem contribuir para a identificação e tratamento de pacientes afetados por este tipo de tumor.

Os processos de embriogênese e oncogênese possuem pontos em comum, como a intensa proliferação, diferenciação e morte celular, neovascularização e constante migração e invasão de tecidos adjacentes. Dentro deste contexto temos os genes HOX que são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário e são expressos de forma desregulada em cânceres (Maroulakou & Spyropoulos, 2003). A expressão desregulada do gene HOXB7 já foi associada a câncer de próstata (Waltregny *et al.* 2002), câncer de ovário (Yamashita *et al.* 2006), câncer de mama (Wu *et al.* 2006), melanomas (Waltregny *et al.*, 2002) e mieloma múltiplo (Storti *et al.* 2011). Poucos estudos avaliaram a expressão de genes da família HOX em cânceres de boca (Hassan *et al.*, 2006; Acquafreda *et al.*, 2010; Yamatoji *et al.*, 2010; Liborio *et al.*, 2011), e apenas um avaliou o papel do gene HOXB7 (Destro *et al.*, 2010). Este último estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a expressão de HOXB7 é significativamente maior nas amostras de CEC oral quando comparado com amostras de mucosa oral normal e a que a expressão desregulada do produto deste gene modula a capacidade proliferativa das células tumorais (Destro *et al.*, 2010). Este estudo ainda demonstrou, em um número reduzido de amostras, uma tendência de correlação entre a expressão imuno-histoquímica de HOXB7 e os parâmetros clínico-patológicos dos tumores, servindo de estímulo para a realização do estudo atual.

Nossos achados correlacionaram à expressão imuno-histoquímica de HOXB7 com o consumo de álcool, estágio N, presença de invasão vascular e maior positividade para Ki67. Embora moderada, uma associação causal entre a ingestão de bebidas alcoólicas e o câncer oral é bem aceita, e evidências apontam para uma influência do álcool no metabolismo de reparo do DNA (Boffetta & Hashibe, 2006). A associação de HOXB7 com consumidores de bebidas alcoólicas pode ser importante, visto que metabólitos do álcool podem alterar a expressão de HOXB7, que por sua vez alterar a função das enzimas do sistema de reparo do DNA, favorecendo a instabilidade genômica. A alta expressão de HOXB7 foi correlacionada a um comportamento mais agressivo como revelado por tumores com elevada percentagem (>31%) de células positivas para HOXB7 tenderam a um estágio clínico avançado da doença (estádio N+). A análise da sobrevida mostrou que pacientes com tumores com elevada expressão de HOXB7 tiveram um período de sobrevida em 5 anos significativamente menor comparado com os pacientes com baixa expressão de HOXB7. Quanto à sobrevida livre de doença, a positividade de HOXB7 não influenciou significativamente, porém pacientes com maior número de células positivas para HOXB7 tenderam a ter uma sobrevida pior. Além disso, demonstramos que o prognóstico desfavorável associado com HOXB7 foi independente de outros fatores, levando a concluir que HOXB7 é um fator independente de sobrevida global em 5 anos. Recentemente foi demonstrado que HOXB7, além de importante fator prognóstico para o câncer coloretal, é um mediador da progressão desta neoplasia (Liao *et al* 2011). Como HOXB7 está associado a outros tipos de neoplasias, nossos resultados podem servir de inspiração para futuras pesquisas em outros tipos de cânceres.

Em conclusão nossos resultados sugerem que altas expressões de HOXB7 em amostras de CEC estão correlacionadas com características clínico-patológicas importante, como estágio N mais avançado e um pior prognóstico. Porém serão necessários ainda mais estudos para estabelecer o real valor de HOXB7 como biomarcador para CECs orais.

6. CONCLUSÕES

- A positividade de HOXB7 foi correlacionada com o consumo de álcool, estadio N, presença de invasão vascular e expressão de Ki67 pelas células tumorais. HOXB7 correlacionou significativamente com sobrevida global em 5 anos e uma tendência em correlacionar com sobrevida livre de doença foi observada.
- Mais importante, a expressão imuno-histoquímica de HOXB7 foi um marcador independente de sobrevida global de pacientes com CEC oral.
- Uma vez que HOXB7 é expresso por neoplasias de diferentes órgãos, nossos resultados encorajam outros a estudar o papel de HOXB7 em tumores de diferentes origens.

7. REFERÊNCIAS*

- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause -or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 3.
- Acquafreda T, Nunes FD, Soprano DR, Soprano KJ. Expression of homeobox genes in oral squamous cell carcinoma cell lines treated with all-trans retinoic acid. *J Cell Biochem*. 2010; 111(6): 1437-44.
- Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol*, 2008; 44(2): 103-8
- Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(20): 3535-48.
- 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.
- 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.
- Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol*. 2001; 188: 161-169.
- De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol*. 2010; 36(1): 141-9.
- 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.
- Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16(3): 91-108.

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

- Dimartino JF, Claery ML. Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol.* 1999; 106: 614-626.
- Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu. Rev. Genet.* 1986; 20: 147–173.
- 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.
- 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.
- Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010; 2: 9.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell.* 1994; 78: 191-201.
- Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 1978; 276: 565-570.
- Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, Bian XW, Deng YJ, Ding YQ. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(11): 3569-78.
- Libório TN, Acquafreda T, Matizonkas-Antonio LF, Silva-Valenzuela MG, Ferraz AR, Nunes FD. In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology.* 2011; 58(2): 225-33.
- 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.
- 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.

- 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.
- Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res*. 2003; 23(3): 2101-10.
- Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J cell Biol*. 2000; 148(2): 343-51.
- 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.
- 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.
- Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and derulation. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 2428-37.
- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009; 15(6): 388-99.
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(6): 1270-5.
- Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev*. 1996; 55: 91-108.
- Storti P, Donofrio G, Colla S, Airoidi I, Bolzoni M, Agnelli L, *et al.* HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2011; 25(3): 527-37
- Waltregny D, Alami Y, Clause 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.
- Warnakulasuriya S. Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. *Evid Based Dent*. 2009; 10(1): 4-5.

- Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, *et al.* HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006; 66: 9527-9534.
- Yamashita T, Tazawa S, Yawel Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K *et al.* Supression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int Journal of Oncology* 2006; 28: 932-938.
- Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano Y, Sakuma K, Ogoshi. State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2010; 23(1): 61-7.
- 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.

8. ANEXO



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



CERTIFICADO

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

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

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

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

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