

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

Josiane Alves França

**ESTUDO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES *STAG1* E *STAG2* DAS
COESINAS, E UM DOS SEUS FATORES REGULATÓRIOS, *PDS5B*, EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Belo Horizonte - MG

2016

Josiane Alves França

**ESTUDO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES *STAG1* E *STAG2* DAS
COESINAS, E UM DOS SEUS FATORES REGULATÓRIOS, *PDS5B*, EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa de Fátima Bernardes

Belo Horizonte - MG

2016

França, Josiane Alves.

F837e Estudo molecular das subunidades STAG 1 e STAG 2 das Coesinas, e um dos fatores regulatórios, PDS5B, em carcinomas de células escamosas de boca [manuscrito]. / Josiane Alves França. - - Belo Horizonte: 2016.

57f.: il.

Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.

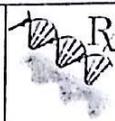
Área de concentração: Medicina Molecular.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

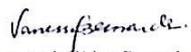
SUBUNIDADES DA COESINA, STAG1 E STAG2, E SEU FATOR REGULATÓRIO, PDS5B, EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

JOSIANE ALVES FRANÇA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 15 de janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes - Orientador
UFMG


Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes - coorientadora
UFMG


Prof(a). João Artur Ricieri Brito
FEAD

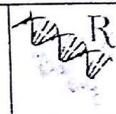

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
UFMG

Belo Horizonte, 15 de janeiro de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA JOSIANE ALVES FRANÇA 2014651030

Realizou-se, no dia 15 de janeiro de 2016, às 14:00 horas, sala3403 Faculdade de odontologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *SUBUNIDADES DA COESINA, STAG1 E STAG2, E SEU FATOR REGULATÓRIO, PDS5B, EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA*, apresentada por JOSIANE ALVES FRANÇA, número de registro 2014651030, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes - Orientadora (UFMG), Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes (UFMG) coorientadora, Prof. João Artur Riciéri Brito (FEAD), Prof(a). Marina Gonçalves Diniz (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 15 de janeiro de 2016.

Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes

Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes

Prof. João Artur Riciéri Brito

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz

Reservado
Centro de Pós Graduação
Faculdade de Medicina-UFMG
Av. Prof. Almirante Balena, 180- 5º Andar
CEP 30130-100-Funcionários -BHM/G

Reservado
CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais,
Ilda e Arnaldo, e à minha irmã Luciana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tornar tudo possível.

À minha orientadora, Carolina Cavaliéri Gomes, pela confiança, oportunidade, ensinamentos, paciência e disponibilidade.

À minha coorientadora Vanessa de Fátima Bernardes, pela disposição e carinho em me explicar e ajudar com este trabalho.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez, pela oportunidade e aprendizado constante.

À Marina Gonçalves Diniz pela importante contribuição.

Ao professor Renan Pedra Souza pela generosa cooperação.

À Raíssa C. Costa Silva, por ter sido a segunda observadora nas contagens.

A todos do Laboratório de Patologia Molecular, pela convivência e contribuição durante este trabalho.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e incentivo incondicionais.

À minha irmã pela cumplicidade, paciência e apoio.

À minha família e amigos, por serem essenciais em minha vida.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, pelo apoio.

Aos pacientes que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

Ao apoio financeiro do CNPQ, CAPES e da FAPEMIG.

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”

Carl Gustav Jung

RESUMO

O complexo coesina é responsável pela coesão das cromátides irmãs, sendo *STAG1* e *STAG2* partes integrantes deste complexo, que é regulado por *PDS5B*. Alterações nesses genes foram descritas em tumores sólidos e em leucemia mielóide aguda. O complexo coesina exerce funções que vão além da coesão, auxiliando também na transcrição e no reparo ao dano do DNA. Pouco se sabe sobre como a expressão desses três genes impacta a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular em neoplasias humanas. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações moleculares nos genes *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* e prever a expressão deles através da expressão de 84 genes do ciclo celular em amostras de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Investigar a relação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína pds5b e as proteínas ki-67 e p53, além de analisar a perda de heterozigidade (LOH) nos loci de *STAG1* e *STAG2*, utilizando três marcadores polimórficos em 15 amostras de CCEB. As associações entre a imunoexpressão da PDS5B, e KI-67 e P53 foram avaliadas em 62 amostras. Os níveis de transcrição de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* em oito amostra de CCEB e em cinco amostras de mucosa bucal normal (MN) foram avaliados por qPCR, e a técnica de qPCR array foi utilizada para avaliação da expressão de 84 genes do ciclo celular nas mesmas oito amostras de CCEB submetidas ao qPCR. LOH foi observada nos três marcadores polimórficos em, pelo menos, uma amostra. As proteínas PDS5B, KI-67 e P53 foram altamente expressas e não foi encontrada associação entre a imunoexpressão de PDS5B com KI-67 ou P53 ($p > 0,05$). Os grupos de CCEB e de MN apresentaram níveis semelhantes de transcrição de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B*. O modelo de regressão linear mostrou que a expressão de *STAG1* foi significativamente explicada pela expressão de *CUL3* ($STAG1 = 0.803 + 110.365 * CUL3$; $t = 5.112$, $p = 0.004$, ajustados $R^2 = 0.807$). Com base nos resultados, é possível concluir que houve LOH nos loci de *STAG1* e *STAG2* em CCEB, mas os níveis de transcrição de *STAG1*, *STAG2* and *PDS5B* foram similares entre CCEB e MN. A imunoexpressão de pds5b foi alta em CCEB, mas não foi associada com os índices de proliferação celular. Além disso, a expressão *STAG1* em CCEB foi explicada significativamente pela expressão de *CUL3* através do modelo de regressão linear.

Palavras-chave: *STAG1*, *STAG2*, *PDS5B*, *CUL3*, câncer de cabeça e pescoço, genes do ciclo celular.

ABSTRACT

Cohesin complex is responsible for sister chromatid cohesion. *STAG1/STAG2* are part of the complex, which is regulated by *PDS5B*. Alterations in these genes were described in tumors. *PDS5B* is a negative regulator of cell proliferation. We aimed to assess molecular alterations in these genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and predict their expression by the expression of 84 cell cycle genes. In addition, we investigated if pds5b protein expression impacted ki-67 and p53 immunopositivity. We assessed LOH at *STAG1* and *STAG2* loci in 15 OSCC by using 3 polymorphic markers. Associations between the immunoexpression of *PDS5B* and *KI-67* and *P53* were tested in 62 samples. Differences between transcriptional levels of *STAG1*, *STAG2* and *PDS5B* between OSCC and normal oral mucosa (NM) were evaluated by qPCR. A 84 cell cycle genes qPCR array was carried out OSCC samples and *STAG1*, *STAG2* and *PDS5B* were independently used as response variables in multiple linear regression models. LOH was observed at all 3 markers in at least one sample. *PDS5B*, *P53* and *KI-67* were highly expressed and no association was found between *PDS5B* immunoexpression and *KI-67* or *P53* ($p>0.05$). OSCC and MN showed similar transcriptional levels of *STAG1*, *STAG2* and *PDS5B*. *STAG1* and *CUL3* expression seem to be related ($p=0.004$). In conclusion, there is LOH at *STAG1* and *STAG2* loci in OSCC, but OSCC and MN showed similar transcriptional levels of *STAG1*, *STAG2* and *PDS5B*. *PDS5B* immunoexpression in OSCC was high, but it was not associated with proliferation cell index.

Keywords: *STAG1*, *STAG2*, *PDS5B*, *CUL3*, head and neck cancer, cell cycle genes

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MARCADORES POLIMÓRFICOS DOS LOCI DE <i>STAG1</i> E <i>STAG2</i>	31
TABELA 2: CONDIÇÕES DA PCR COM OS TRÊS MARCADORES POLIMÓRFICOS	31
TABELA 3: PRIMERS DA qPCR	36
TABELA 4: RESULTADOS DAS ANÁLISES DE LOH NOS TRÊS MARCADORES POLIMÓRFICOS DE <i>STAG1</i> E <i>STAG2</i> EM AMOSTRAS DE CCEB	42
TABELA 5: DADOS CLÍNICOS DAS AMOSTRAS DE IHQ	43
TABELA 6: RESULTADO DAS CONTAGENS DE IHQ EM CADA CASO PELOS DOIS EXAMINADORES	45
TABELA 7: DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À TÉCNICA DE qPCR	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: INCIDÊNCIA GLOBAL DE CCEB EM AMBOS OS GÊNEROS DE ACORDO COM O ÍNDICE ASR	16
FIGURA 2: PRINCIPAL FORMA DE APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CÂNCER DE BOCA.....	19
FIGURA 3: CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DO CCEB.....	20
FIGURA 4: DESENHO ESQUEMÁTICO DO COMPLEXO COESINA.....	21
FIGURA 5: REGULAÇÃO DA COESINA DURANTE O CICLO CELULAR.....	22
FIGURA 6: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA DO TRABALHO	28
FIGURA 7: CURVAS DE DILUIÇÃO SERIA DO TESTE DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS <i>STAG1</i> , <i>STAG2</i> E <i>PDS5B</i>	36
FIGURA 8: CURVA DE MELTING DE <i>STAG1</i> , <i>STAG2</i> E <i>PDS5B</i> OBTIDAS NO qPCR	37
FIGURA 9: PLACA DE qPCR ARRAY DE 84 GENES DO CICLO CELULAR..	38
FIGURA 10: RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE LOH EM CCEB.....	41
FIGURA 11: LÂMINAS DE CCEB COM ALTA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARAS AS TRÊS PROTEÍNAS AVALIADAS.....	45
FIGURA 12: EXPRESSÃO DE <i>STAG1</i> , <i>STAG2</i> E <i>PDS5B</i> EM MUCOSA BUCAL NORMAL E EM CCEB.....	48

LISTA DE ABREVIATURA

μL= Microlitros

μm = Micrometros

ASR= Age-standardised rate (taxa-idade padronizada)

CAPES= Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCEB = carcinoma de células escamosas de boca

CM= Centimetro

CNPQ= Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP= Comitê de Ética em Pesquisa

DAB= Diabinobenzidina

F= Forward,

FAPEMIG= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FFPE= Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (fixado em formol e incluído em parafina)

H&E= Hematoxilina e Eosina

IHQ= imuni-histoquímica,

LOH= loss of heterozygosity (perda de heterozigosidade)

MN= mucosa bucal normal,

Ng= nanograma

Nt=Nucleotídeo

PB= pares de base

PCR= Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Primers= iniciadores

qPCR= Reação de cadeia da polimerase quantitativa

R= Reverse

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Carcinoma de células escamosas de boca	16
2.2 Complexo coesinas	21
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	26
5. METODOLOGIA	28
5.1 Diagrama da Metodologia	28
5.2 Análise de Perda de Heterozigosidade (LOH)	29
5.2.1 Seleção das amostras	29
5.2.2 Microdissecção dos tecidos.....	29
5.2.3 Isolamento de DNA genômico.....	30
5.3.4 PCR, eletroforese capilar e análise de LOH.....	30
5.3 Imuno-histoquímica (IHQ)	33
5.3.1 Seleção das amostras	33
5.3.2 Reação e avaliação dos resultados das reações de IHQ	33
5.4 PCR em tempo real (qPCR)	35
5.4.1 Seleção das Amostras.....	35
5.4.2 Reação de qPCR	35
5.5 Reação de qPCR array	37
5.5.1 Seleção das amostras	37
5.5.2 Reação de qPCR Array	38
5.6 Análise Estatística	39
6. RESULTADOS	41
6.1 Análise de LOH	41
6.2 Imuno-histoquímica	42
6.3 qPCR	47
6.4 qPCR array	48
7. DISCUSSÃO	49
8. CONCLUSÃO	52
9. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de boca apresenta-se como o quinto câncer mais incidente nos homens e o décimo segundo mais comum nas mulheres (INCA, 2016). Segundo OMAR (2013), o câncer de boca chega a ser o câncer mais comum em alguns países. Entre as neoplasias malignas bucais, o carcinoma de células escamosas (CCE) representa aproximadamente 95% das lesões (OMAR, 2013).

O câncer de boca é um problema de saúde mundial e uma das maiores taxas de incidência ocorre no Brasil (DE CAMARGO *et al.*, 2010). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), (2016), a estimativa dessa neoplasia para o ano 2016 é de 11.140 novos casos em homens e 4.350 novos casos em mulheres.

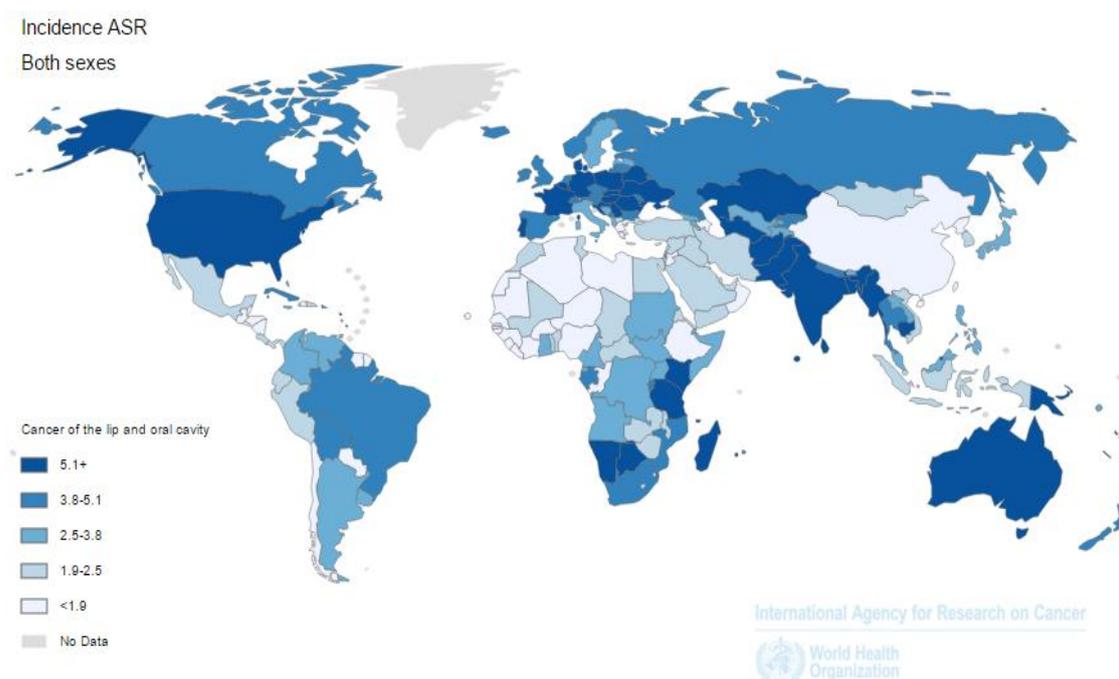
A patogênese do carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) não se restringe a um único fator ou agente, sendo provável que mais de um fator seja necessário para o desenvolvimento dessa neoplasia. Dentre os fatores extrínsecos mais importantes na etiopatogênese, podem-se ressaltar o tabaco e o álcool (BERNSTEIN *et al.*, 2013). Além desses, de acordo com KUMAR *et al.* (2013), as deleções são a segunda anormalidade cariotípica mais presente nas células tumorais, uma vez que deleções de partes específicas dos cromossomos podem acarretar a perda de genes supressores de tumor.

A correta segregação cromossômica é essencial para a manutenção da estabilidade genômica. Para isso, é necessário que as cromátides estejam ligadas até a metáfase/anáfase e que, em seguida, sejam devidamente separadas. O complexo coesina é essencial para que esse processo ocorra, auxiliando a coesão das cromátides irmãs. O complexo de coesina é constituído por quatro proteínas: SMC1, SMC3, RDA21 e STAG/SCC3, mas o mecanismo pelo qual as coesinas exercem o controle da coesão entre as cromátides irmãs ainda não foi completamente elucidado (GORRINGE *et al.*, 2009; ROCQUAIN *et al.*, 2010; MANNINI & MUSIO, 2011; SOLOMON *et al.*, 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas de boca

A estimativa mundial de câncer intra-bucal e de lábio para 2012 foi de 300.000 novos casos. Independentemente da confirmação dessa previsão, sabe-se que o número de mortes foi 145.000, tendo dois terços desses casos ocorridos em homens. Pôde ser observada uma incidência maior em países da Ásia (FERLAY *et al.*, 2013), como Sri Lanka, Índia, Paquistão e Bangladesh. O CCE tem sido nessa região o tipo de câncer mais comum e, na Índia, chega a representar mais de 50% de todas as neoplasias malignas (OMAR, 2013).
Figura 1.



Fonte: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>

Figura 1: Incidência global de CCEB em ambos os gêneros de acordo com o índice ASR (age-standardised rate) Uma taxa-idade padronizada (ASR) é um resumo da média da idade que a população teria se tivesse uma estrutura etária padrão.

O CCEB origina-se nos queratinócitos que sofrem mutação, seja ela espontânea seja induzida (SCULLY e BAGAN, 2009A). O epitélio bucal está em constante renovação, e essa renovação é mais intensa no epitélio pavimentoso fino não queratinizado do que no queratinizado. Portanto, o risco

de mutação e subsequente transformação em câncer é maior em queratinócitos basais com maior taxa de proliferação que se encontram no epitélio pavimentoso fino não queratinizado, o que explica o fato de a língua e assoalho bucal serem os locais de maior acometimento de CCEB (FELLER *et al.*, 2013).

Segundo FELLER *et al.* (2013), os queratinócitos sofrem uma transformação que pode ser causada por mutações decorrentes de carcinógenos químicos, físicos e biológicos, o que gera alterações que afetam a progressão do ciclo celular, o reparo ao dano do DNA, a diferenciação e a apoptose. Quando transformados, os queratinócitos formam um campo de pré-cancerização, que pode ser afetado pelo acúmulo de alterações moleculares adicionais nessas células transformadas, podendo se expandir e se estender pela mucosa bucal (FELLER *et al.*, 2013). O CCEB comumente é precedido por lesões potencialmente malignas, em especial a leucoplasia e a eritroplasia. Todavia a transformação maligna a partir do líquen plano é controversa (OMAR, 2013).

Tais mutações são comprovadamente relacionadas ao tabagismo e ao alcoolismo. O consumo exclusivo do tabaco resulta em um maior risco para o surgimento do CCEB do que o consumo isolado do álcool. No entanto, quando há o consumo combinado dessas duas substâncias, o risco é potencializado (ANTUNES *et al.*, 2013). De acordo com o INCA (2016) é possível perceber uma diminuição dos índices de incidência em homens e um aumento em mulheres. Isso se deve ao fato de as mulheres terem adquirido hábitos tabagista e etilista.

Outro fator de risco para o CCEB é o consumo do betel, que consiste em uma mistura de planta de videira, cal hidratada, noz de areca, caucho (goma de borracha) entre outros componentes. Essa mistura pode conter ou não tabaco. O hábito de mascar o betel é associado a alta de incidência de CCEB (OMAR, 2013), o qual é mais frequente nos países da Ásia.

Além disso, a infecção pelo vírus HPV está sendo associada a alguns subtipos específicos de CCEB. Outros fatores têm sido analisados, mas é ainda controversa sua atuação para o desenvolvimento dessa neoplasia, como a situação socioeconômica, a má higiene bucal e a infecção por fungos e bactérias (OMAR, 2013).

Apesar de existir possibilidade de cura, a melhor forma de diminuir a incidência dessa doença consiste em controlar os fatores de risco que conhecidamente favorecem seu desenvolvimento. Para reduzir a mortalidade, é necessário que haja diagnóstico precoce feito por meio do exame clínico, realizado obrigatoriamente por um profissional de saúde capacitado. Através desse exame será possível identificar tanto lesões potencialmente malignas quanto o câncer em estágios iniciais, o que possibilita um tratamento menos agressivo e o aumento da sobrevida. O autoexame não deve ser preconizado como método preventivo já que há risco de mascarar lesões e retardar o diagnóstico do tumor (INCA, 2016).

A American Joint Committee on Cancer, (2002) classifica as neoplasias bucais, incluindo lábio e câncer de boca, através de um sistema chamado TNM, em que T é o tamanho do tumor em centímetros, N metástase em linfonodos e M metástase a distância. Para ela, quanto menores os valores de TNM, melhor o prognóstico. O sistema de estadiamento da doença também é usado para avaliar o prognóstico e auxiliar o tratamento. Ele é composto de IV estadios que são avaliados de acordo com a associação do TNM.

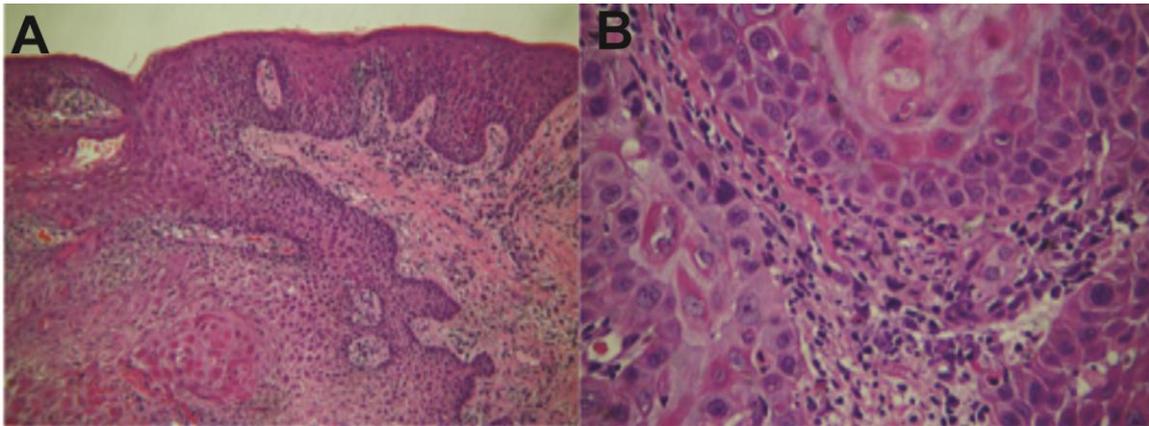
De acordo com FELLER e LEMMER (2012), o CCEB manifesta-se clinicamente de várias formas. Assemelha-se com leucoplasia, leucoplasia verrucosa, eritroleucoplasia as quais podem desenvolver uma úlcera com área irregular e necrótica com borda levantada e enrijecida ou uma massa exofítica com base verrucosa ou lisa. A principal manifestação clínica do CCEB ocorre sob a forma de úlcera na região de borda de língua (Figura 2). Os sítios mais acometidos são a língua, especialmente a borda lateral, o assoalho bucal e a gengiva (OMAR, 2013).



Fonte: Professor Ricardo Santiago Gomez

Figura 2: Principal forma de apresentação clínica do câncer de boca. Observa-se uma lesão ulcerada e única acometendo a borda de língua. As bordas da lesão são em rolete e endurecidas. Há áreas com limites imprecisos, fundo necrótico, áreas leucoplásicas na periferia.

No início, o tumor apresenta-se, de acordo com CARRERAS-TORRAS, GAY-ESCODA (2015) frequentemente assintomático, o que acarreta um atraso no diagnóstico. A detecção dessa neoplasia ocorre geralmente entre 50 e 79 anos. A confirmação diagnóstica é feita por meio de biópsia e análise histopatológica que apresenta imagem como a demonstrada na Figura 3. A proliferação de células da camada basal invade a lâmina própria, e forma nichos tumorais independentes, sem ligação com o epitélio da superfície. Essa invasão do conjuntivo pode alcançar vasos linfáticos e capilares sanguíneos originando metástase. Geralmente essas lesões apresentam intenso infiltrado inflamatório (NEVILLE *et al.*, 2004). A principal forma de tratamento é a cirurgia para retirada do tumor, mas a quimioterapia e radioterapia também são adotadas no tratamento dessa doença (SCULLY e BAGAN, 2009B).



Fonte: Professora Carolina Cavaliéri Gomes

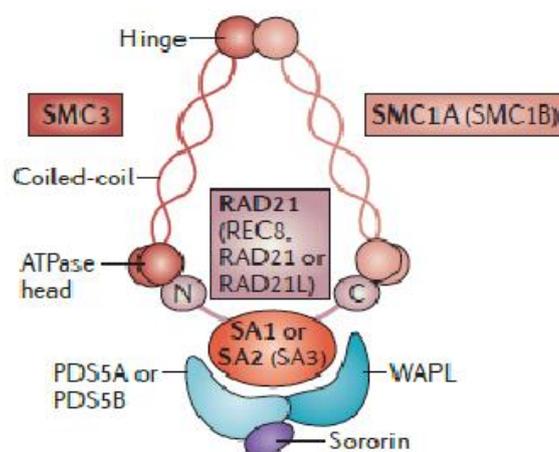
Figura 3: Características histopatológicas do CCEB. A: Proliferação de células neoplásicas com padrão sólido de crescimento e invasão da lâmina própria (Hematoxilina & Eosina, x10). **B:** Células neoplásicas exibindo pleomorfismo celular e nuclear, Intenso infiltrado inflamatório mononuclear adjacente à lesão (Hematoxilina & Eosina, x40).

A sobrevida global dos pacientes não tem melhorado significativamente nos últimos 20 anos, 45-50% tem sido a taxa de sobrevida em 5 anos. Isso se deve ao rápido crescimento e à rápida propagação local que refletem a agressividade da doença. A metástase a distância é relatada em 5-25% dos pacientes com CCEB. Quando o diagnóstico é feito no estágio I, a expectativa de sobrevida em 5 anos é de 80%, entretanto cai para 50% nos estágios iniciais e quando realizado tardiamente chega a 30-50% conforme CARRERAS-TORRAS e GAY-ESCODA (2015). Apesar dos avanços nas técnicas moleculares de detecção de CCEB, essa neoplasia ainda é diagnosticada tardiamente, o que tem reduzido as chances de cura drasticamente.

Por isso, no que se refere ao CCEB, o diagnóstico precoce é essencial para um melhor prognóstico, uma vez que a identificação da lesão em estágios iniciais pode evitar ou reduzir a necessidade de uma cirurgia radical que poderia comprometer fala, mastigação e deglutição (SCULLY, SCIUBBA e BAGAN, 2015). A detecção precoce pode também reduzir a morbidade e minimizar a agressividade do tratamento que geralmente é associado a um comprometimento severo de algumas funções fisiológicas, à desfiguração do rosto e à depressão e à baixa qualidade de vida do paciente (OMAR, 2013).

2.2 Complexo coesinas

O complexo das coesinas inicialmente foi descrito em leveduras, mas foi comprovado que muitas das proteínas desse complexo foram conservadas nos vertebrados (LOSADA, 2014). Em humanos, o complexo coesina é composto de quatro proteínas principais SMC1 e SMC3, RAD21 e STAG1/STAG2. As SMC1 e SMC3 são proteínas de manutenção estrutural do cromossomo e formam um heterodímero que se liga através da interação dos domínios N e C-terminal. A outra extremidade se liga à RAD21 que, por sua vez, se liga ao STAG1/STAG2 para formar o anel de coesina (HAERING e JESSBERGER, 2012, RHODES *et al.*, 2011). A Figura 4 ilustra esse componentes e a Figura 5 ilustra o complexo coesina no ciclo celular.

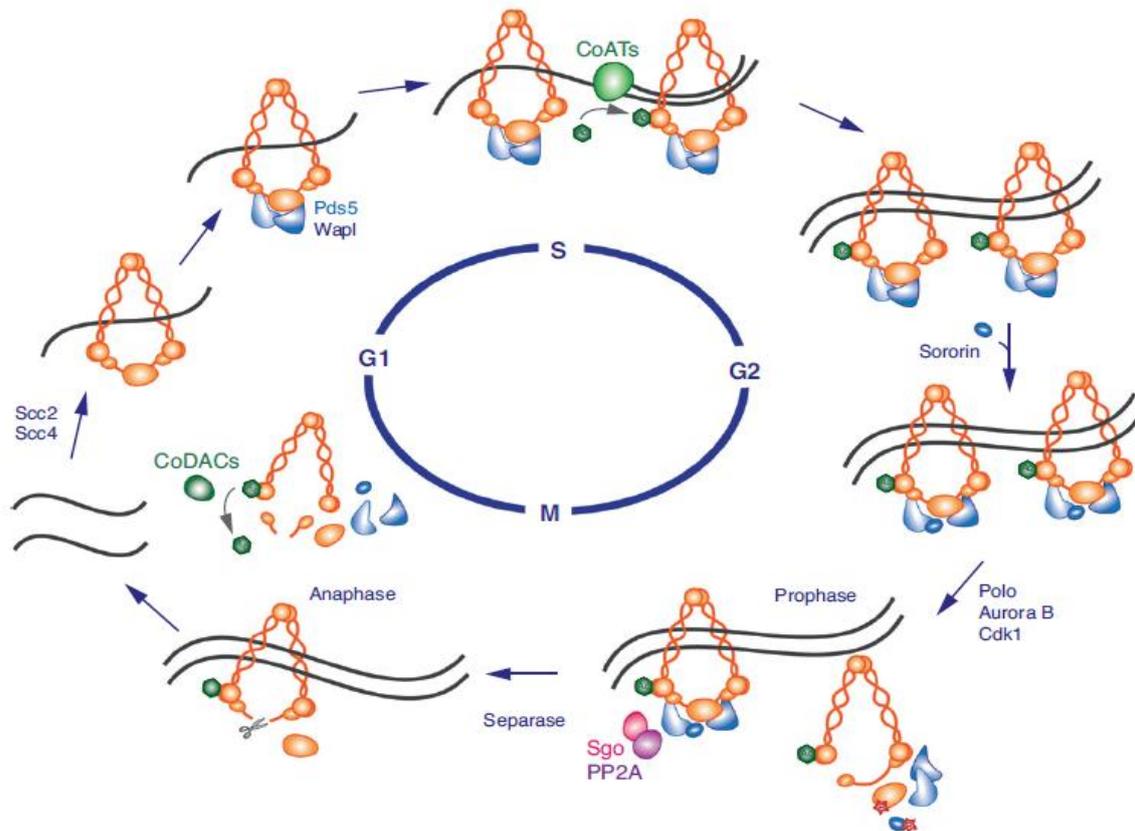


Fonte: (LOSADA, 2014).

Figura 4: Desenho esquemático do complexo coesina. Ele se apresenta na forma de um anel sendo que SMC3 e SMC1 se ligam e formam uma espécie de fechadura. Na outra porção N- C-terminal, RAD21 se liga às proteínas de manutenção do cromossomo e STAG1 ou STAG2 se liga a RAD21. Essas são as subunidades principais. No entanto, para que o complexo coesina seja eficiente, é necessária a interação de outros fatores. PDS5A ou PDS5B se liga à STAG e à WAPL. Então, recrutam a SORORINA, fazendo com que o complexo coesina funcione corretamente.

As diferenças entre o complexo coesina com a subunidade de STAG1 e de STAG2 não são conhecidas, entretanto STAG1 está associada à coesão nos telômeros, enquanto STAG2 está associado à coesão no centrômero. Ambas as subunidades são encontradas na coesão nos braços dos

cromossomos. Em estudos com cultura de células *Hela*, foi visto que a presença de STAG2 nesse tipo de célula é aproximadamente de 3 a 10 vezes maior do que a presença de STAG1 (REMESEIRO *et al.*, 2012A).



Fonte: REMESEIRO e LOSADA (2013)

Figura 5: Regulação da coesina durante o ciclo celular. No início da fase G1, o complexo coesina é carregado para a cromatina através da proteína NIPBL e MAU. Essas proteínas interagem com todas as quatro subunidades da coesina, mas parece que através delas a ligação do heterodímero SMC1 e SMC3 é quebrada, permitindo a entrada do DNA dentro do anel de coesina. Posteriormente a esse processo, ocorre a ligação das proteínas PDS5 e WAPLI, que se ligam a Stag e Rad21. Durante a replicação do DNA, as proteínas ESCO1 e ESCO2 acetilam a porção N-terminal de SMC3, fazendo com que PDS5 recrute a SORORINA. Na prófase, o complexo coesina é dissociado da cromatina quando PLK1 fosforila as subunidades de STAG e AURORAB e CDK1 fosforilam a Soronina, fazendo com que ela seja liberada. Concomitantemente a esse processo, ocorre um acúmulo de SGOLI1 nos centrômeros com o intuito de evitar a dissociação da coesina nesse lugar. A coesina nos centrômeros permanece íntegra até a anáfase, quando finalmente é dissolvida pela enzima Separase, que cliva RAD21. Os complexos de coesina que foram dissociados durante o ciclo celular podem ser usados novamente durante a fase G1.

Disfunções no complexo coesina podem contribuir para a tumorigênese, uma vez que a incorreta segregação cromossômica aumenta a instabilidade genômica, favorecendo a aneuploidia e erros de reparo do DNA. Alterações nesse complexo também podem favorecer a perda de heterozigidade por

não auxiliar na promoção da reparação homóloga do cromossomo (LOSADA, 2014). Se a disjunção das cromátides irmãs não acontecer de forma correta, pode haver perda cromossomal que, por sua vez, pode levar à remoção de genes supressores de tumor. Se um alelo já estiver inativo, esse fato pode resultar em anormalidades do crescimento e tumorigênese. O ganho cromossômico pode acarretar uma expressão aumentada de proto oncogenes, contribuindo também para a tumorigênese (MANNINI e MUSIO, 2011). Esse conjunto de informações suporta a ideia de que as coesinas representam uma espécie de zelador da estabilidade genômica (MANNINI *et al.*, 2010).

Geralmente a coesão dos telômeros é dissolvida durante a prófase ao mesmo tempo em que ocorre a coesão dos braços dos cromossomos. Porém, o excesso de coesão no telômeros prolonga a anáfase. As células utilizam esse mecanismo como meio de sobrevivência e manutenção da telomerase (KIM e SMITH, 2013).

O complexo coesina possui funções que vão além da coesão das cromátides irmãs. Ele está associado à transcrição, à compactação da cromatina e ao reparo do dano do DNA. Foram observados defeitos de desenvolvimento humano, incluindo defeitos de crescimento, retardo mental, anormalidades faciais e outras anormalidades sistêmicas (ZHENG e YU, 2015). A coesina pode também promover a transcrição através de laços de cromatina que facilitam a interação do *enhancer* (ativador) com o promotor. Devido a esse fato, acredita-se que as coesinas contribuem para a regulação da transcrição dos genes (LOSADA, 2014). Curiosamente, as subunidades das coesinas *STAG1* e *STAG2* são altamente expressas em tecidos pós-mitóticos como nas células do cérebro. Isso corrobora o fato de as coesinas terem funções além da coesão das cromátides irmãs (SUMARA *et al.*, 2000).

De acordo com ANAZAWA *et al.* (2004), *STAG1* está envolvido com o dano ao DNA, sendo um novo mediador de apoptose dependente de p53, o que possibilita o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

As funções das coesinas com *STAG1* e com *STAG2* são diferentes. Já se sabe que *STAG1* é necessário para a coesão dos telômeros e *STAG2* para os centrômeros. Porém, as coesinas com *STAG11* desempenham um papel importante da regulação dos genes e *STAG2* não possui essa função (REMESEIRO *et al.*, 2012B).

Devido à localização do gene *STAG2* ser no cromossomo X, apenas um evento é necessário para que ocorra a sua inativação. De acordo com SOLOMON *et al.* (2014), a perda de *STAG2* está intimamente relacionada com a instabilidade cromossômica e aneuploidia em glioblastoma, melanoma, sarcoma de Ewing, linfoma, meduloblastoma e carcinoma colorretal.

Além de desenvolver um papel na aneuploidia, *STAG2* parece ter uma importância clínica para certos tipos de tumores como o carcinoma urotelial invasivo de bexiga e carcinoma urotelial papilar não invasivo. A perda de expressão de *STAG2* no carcinoma não invasivo tratado por ressecção transuretral foi correlacionada com um aumento da sobrevida livre da doença. Já a perda de expressão de *STAG2* em carcinoma invasivo tratado com cistectomia radical foi associada à metástase do linfonodo e aumento da recorrência da neoplasia (SOLOMON *et al.*, 2013). Também no carcinoma de células transicionais de bexiga, foram encontradas mutação, deleção e metilação em *STAG2* (GUO *et al.*, 2013).

No entanto, BALBÁS-MARTÍNEZ *et al.*, (2013) observou que a perda de expressão de *STAG2* não foi associada a aneuploidia em carcinoma urotelial de bexiga. A perda de expressão desse gene ocorre principalmente em câncer urotelial não invasivo que já é mais estável.

Nas lesões bucais, alterações em *STAG2* parece não ser um evento frequente visto que BERNARDES *et al.*, (2014) não encontrou perda de imunexpressão dessa proteína em leucoplasias, quelites actínicas, CCEB e CCE de lábio. De acordo com GOMES *et al.*, (2013) também não foi encontrada perda de imunexpressão de *STAG2* em neoplasias de glândulas salivares. A aneuploidia nesses tumores, apesar de frequente, não foi associada à perda de imunexpressão da proteína codificada pelo gene *STAG2*.

O *PDS5B*, também conhecido como *APRIN* ou *AS3*, parece agir como supressor de tumor no câncer de próstata visto que ele se liga à região promotora dos genes e controla a sua expressão. (GECK *et al.*, 2000). Ele interage com o ciclo celular, induzindo a célula a ficar em G_0/G_1 , agindo como um regulador negativo da progressão celular (GECK *et al.*, 2001).

A frequente perda de heterozigidade em loci de *PDS5B* foi relatada tanto em lesões pré-neoplásicas quanto em CCE de esôfago, sugerindo que

ele pode ser um potencial gene supressor de tumor para o carcinoma de células escamosas de esôfago (ZHOU *et al.*, 2012). Em outro estudo, observou-se que pacientes com defeitos no septo ventricular apresentavam uma superexpressão de *PDS5B*, que inibe a diferenciação e proliferação celular, além de promover a apoptose nessas células (ZHOU *et al.*, 2012).

Alterações moleculares no complexo coesina estão associadas com aneuploidia, instabilidade cromossômica e perda de heterozigidade. Esses eventos estão geralmente presentes nas neoplasias. (SOLOMON *et al.*, 2014; De acordo com LEISERSON *et al.*, (2015) o complexo coesina apresentou mutação <4% nos 12 tipos de cancer estudados. Embora o complexo coesina apresente funções importantes como coesão das cromátides irmãs, reparo ao dano do DNA, na transcrição, além de estar mutado em vários tipos de câncer, caracterização molecular dos seus componentes, *STAG1*, *STAG2* e de um dos seus fatores regulatórios *PDS5B* em CCEB ainda é escassa. Além disso, pouco se sabe sobre as interações desses genes com os genes do ciclo celular.

3. JUSTIFICATIVA

Alterações moleculares nos genes da coesina parecem ser uma via comumente alterada em neoplasias sólidas, mas nenhum estudo apresentou um perfil molecular de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* em CCEB. Sabe-se, no entanto, que o entendimento da patogênese molecular do CCEB pode futuramente culminar em tratamentos moleculares menos invasivos, resultando em um melhor prognóstico e maior sobrevida para os pacientes. Por isso, este trabalho buscou identificar alterações moleculares que possam contribuir para esse entendimento.

4. OBJETIVOS

Analisar a perda de heterozigosidade no loci de *STAG1* e *STAG2* em CCEB, utilizando três marcadores polimórficos, PCR e eletroforese capilar;

Avaliar o perfil de imunexpressão das proteínas PDS5B, KI-67 e P53 em CCEB e verificar se esses perfis de imunexpressão se correlacionam;

Comparar os níveis de transcrição dos genes *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* em CCEB com os níveis de transcrição desses mesmos genes na mucosa bucal normal, por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR);

Investigar os níveis de transcrição dos genes do complexo das coesinas *STAG1* e *STAG2* e em seu fator de regulação *PDS5B* e prever a expressão desses três genes a partir da expressão de 84 genes do ciclo celular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 99.057. Foi criado um diagrama esquemático Figura 6, para ilustrar a metodologia deste estudo com o intuito de facilitar o entendimento da mesma devido à utilização de várias amostras para diferentes técnicas de Biologia Molecular. Basicamente, foram usadas quatro técnicas principais: análise de perda de heterozigosidade, imuno-histoquímica, PCR em tempo real e PCR *array* em tempo real. Cada técnica foi descrita detalhadamente, bem como a seleção das amostras.

5.1 Diagrama dos Métodos

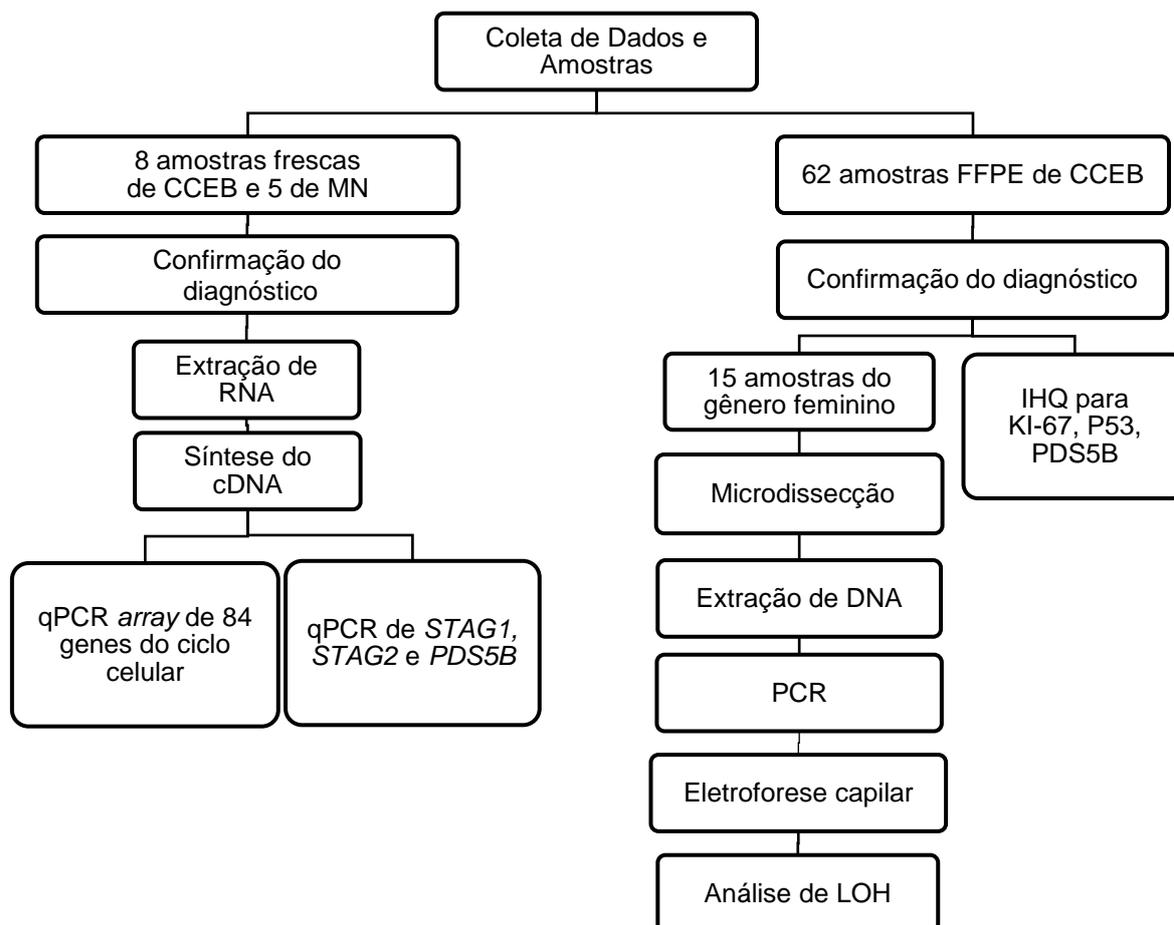


Figura 6: Diagrama esquemático da metodologia do trabalho. Após a confirmação do diagnóstico, as amostras de CCEB a fresco foram usadas para o qPCR quantitativo e para o qPCR array quantitativo. As amostras embebidas em parafina foram submetidas à análise de perda de heterozigosidade e imuno-histoquímica. CCEB = carcinoma de células escamosas, MN= mucosa bucal normal, FFPE= Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (fixado em parafina) IHQ= imuni-histoquímica, PCR= Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da

polimerase), qPCR= reação de cadeia da polímera quantitativa, LOH= loss of heterozygosity (perda de heterozigosidade).

5.2 Análise de Perda de Heterozigosidade (LOH)

5.2.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas fichas de indivíduos com diagnóstico de CCEB a partir do arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG). Foram excluídos os casos de lesões localizadas em lábio, palato mole e orofaringe, uma vez que a etiologia destes casos é diferente do CCEB intraoral. Foram incluídas apenas amostras provenientes de pacientes do gênero feminino, uma vez que o gene *STAG2* está localizado no cromossomo X e é necessário ter dois alelos do gene para a técnica de análise de LOH utilizada.

Após a seleção inicial, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) dessas amostras foram analisadas no microscópio óptico por uma patologista (C.C.G.). Procedeu-se à confirmação do diagnóstico e avaliação da presença de tecido normal e tumoral para possível separação dos mesmos por microdissecção manual. A partir desta análise, foram selecionadas 15 amostras de CCEB fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE, do inglês *formalin fixed paraffin embeded*).

5.2.2 Microdissecção dos tecidos

Para realizar a microdissecção manual no micrótomo, as lâminas coradas em H&E das amostras selecionadas foram novamente analisadas ao microscópio óptico para delimitação com caneta permanente das regiões de tecido normal (estroma) e tumoral. Depois disso, as lâminas marcadas foram sobrepostas aos respectivos blocos em parafina e, por meio de uma lâmina de bisturi estéril, foi realizada a separação no bloco de parafina. O mesmo foi cortado no micrótomo em 10 cortes de 20 µm. Os cortes foram armazenados em tubos devidamente estéreis devidamente identificados, separando amostra de tecido normal e de tecido tumoral.

5.2.3 Isolamento de DNA genômico

A desparafinização dos cortes histológicos foi realizada com três ou mais banhos de xilol (SIGMA P.A.) a 65°C em banho seco por 10 minutos. Após esta etapa, os cortes foram reidratados em banhos decrescentes de etanol (MERCK KGaA, Darmstadt, Germany de (100, 95% e 70%). A proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) foi usada para digerir o tecido e o DNA genômico foi isolado utilizando-se o kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado um microlitro (1µL) de cada amostra, para quantificação do DNA no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). A pureza do DNA foi estabelecida de acordo com o comprimento de onda sendo que a razão 260/280 que determina a pureza do DNA, deve ser de aproximadamente 1,8 e a razão 260/230 devendo estar aproximadamente 1,8 a 2,2. Disponível em: http://www.mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf.

5.3.4 PCR, eletroforese capilar e análise de LOH

Um painel de três marcadores polimórficos foi utilizado para analisar a LOH em *loci* de *STAG1* 3q22.3 (intragênicos) e *STAG2* Xq25 (intergênico), como pode ser visto na Tabela 1. Foram utilizados 100ng de DNA tanto do tecido normal quanto do tecido tumoral para amplificação através de PCR. As condições da PCR foram as mesmas para o tecido normal e tumoral e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Marcadores polimórficos dos loci de *STAG1* e *STAG2*

Gene	Marcador	Locus	Tipo de Repetição	Tamanho produto PCR	Sequência
<i>STAG1</i>	D3S1549	3q22.3	Dinucleotídeo	212-232pb	F: TAGGACCTCAGGTGCG R: ACATACAAATAAACGTGTGCTC
<i>STAG1</i>	D3S3528	3q22.3	Dinucleotídeo	266-272pb	F: AAGAGCCCAGATTTTCCACT R: AGCTTGTGGCTAATGACAGA
<i>STAG2</i>	REN52425	Xq25	Tetranucleotídeo	247pb	F:TTTATTGGTCAGCAGGCAGTTTAC R:CTAAGGCAGGAAAACCATTTGAAC

Pb= pares de base

As condições da PCR foram as mesmas para o tecido normal e tumoral e estão descritas na Tabela 2. Para cada amostra realizado um mix contendo 3,75µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (DNTP), 1,5µL de tampão comercial de PCR, 0,75µL de cloreto de magnésio, 0,25µL de cada primer (forward e reverse) e 0,12µL de Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O volume final da reação era de 15µL, incluindo o mix, DNA e H₂O destilada e deionizada.

Tabela 2: Condições da PCR com os três marcadores polimórficos

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	45 x Anelamento	Extensão	Extensão Final	Hold
REN52425	94°C 5min	94°C 30seg	54°C 30seg	72°C 2min	72°C 20min	4°C
D3S3528	94°C 5min	94°C 30seg	54°C 30seg	72°C 2min	72°C 20min	4°C
D3S1549	94°C 5min	94°C 30seg	55°C 30seg	72°C 2min	72°C 20min	4°C

Min= minutos, Seg= segundos

Três microlitros (3µL) dos produtos de PCR foi usado para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata para visualização das bandas de interesse. A intensidade e espessura de cada banda determinou a

diluição da amostra em água destilada e deionizada variando de na proporção de 1:1 a 1:20 (produto da PCR: H₂O). Um µL das amostra diluídas foram homogeneizadas com 12µL de formamida e 0,5 µL do padrão de peso molecular (GeneScan (500) LIZ Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Posteriormente foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C em termociclador e analisadas por eletroforese capilar no equipamento ABI Prism-310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise de LOH foi realizada utilizando o software Genescan versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para o cálculo da LOH, foi utilizada a seguinte fórmula :

$$\frac{\text{Altura do alelo 1 (normal) : Altura do alelo 2 (normal)}}{\text{Altura do alelo1 (tumoral) : Altura do alelo 2 (tumoral)}}$$

Foi considerada LOH quando a altura do alelo foi diminuída em mais de 50% na amostra de tumor (CCEB) quando comparada à altura do mesmo alelo no tecido normal (conjuntivo), (razão <0,5 ou >2). Quando necessário, foi realizada a correção de *stutter* conforme VAN HOUTEN *et al.* (2000).

A retenção alélica foi considerada quando a relação entre o alelo do tecido normal de referência e amostra de tumor não atingiu a pontuação de LOH. Quando a amostra normal não apresentou dois picos, esta foi considerada homozigótica. As amostras que não amplificaram na PCR foram repetidas pelo menos duas vezes. As amostras com resultados ambíguos foram considerados não informativas. Resultados homozigotos e não informativos foram agrupados e considerados não informativos.

5.3 Imuno-histoquímica (IHQ)

5.3.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas 62 amostras de CCEB fixadas em parafina. Foram incluídas amostras de ambos os gêneros sendo 15 amostras do gênero feminino e 47 do gênero masculino. Os cortes com espessura de 4 µm foram colocados em lâminas silanizadas (StarFrost, Braunschweig, Germany) para a reação de imuno-histoquímica.

5.3.2 Reação e avaliação dos resultados das reações de IHQ

A reação de IHQ foi realizada utilizando-se um protocolo padrão de dois dias de experimento. Os cortes eram desparafinizados, deixando as lâminas em xilol por 18 horas seguido por dois banhos de xilol de 15 minutos cada e a reidratação em etanol em concentrações decrescentes (100% a 80%) em banhos de 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em ácido cítrico pH 6,0 em vapor a 90° C durante 20 minutos e lavagem em banhos de água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 20 volumes e metanol, na proporção 1:1. Em seguida, os cortes eram lavados com água destilada e tampão Tris-HCl pH7,4. A incubação com os anticorpos primários PDS5B (ab84918, Abcam, Cambridge, MA, USA) na diluição de 1:200, KI-67 (clone MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark) e P53 (clone DO-7, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) ambos na diluição de 1:50, foi feita em câmara úmida por 16 a 18 horas em temperatura de 4°C.

No segundo dia da reação, a fim de minimizar as ligações inespecíficas, os cortes eram lavados com detergente Triton X + tampão Tris-HCl na proporção de 1:1000. O sistema de detecção utilizado foi o polímero Envision - dual link system HPR (Dako, Carpinteria, CA, EUA) incubado por 90 minutos a 4°C. O cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi aplicado e através da visualização foi determinado o seu tempo. Quando não era possível visualizar alteração na coloração, o tempo máximo de aplicação

de DAB foi de 7 minutos. As lâminas eram então lavadas em água corrente e contra coradas por imersão em hematoxilina de Mayer por 6 minutos, seguida de lavagem em hidróxido de amônio 10%. Ao final, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Os controles negativos consistiram na substituição do anticorpo primário por Tris-HCl e para os controles positivos foram utilizadas amostras de hiperplasia fibrosa e CCEB com reatividade conhecida para os anticorpos, sendo que os controles foram incluídos em todas as reações.

A expressão imuno-histoquímica para os anticorpos o KI-67 e P53 foi avaliada através da contagem de coloração nuclear em oito campos (ampliação 400x), com início a partir da área do tumor com maior imunopositividade. Para esses dois anticorpos foi calculada a porcentagem de células neoplásicas positivas que consistia na somatória das células positivas dos oito campos, dividido pelo total de células positivas e negativas dos oito campos. Já para o anticorpo PDS5B foi realizada uma estimativa visual da proporção de células tumorais positivas, independentemente da intensidade. Essa estimativa foi categorizada em três grupos: <25% de células positivas; entre 25-50% de células positivas ou mais do que 50% de células positivas.

A imuno-histoquímica foi avaliada por dois observadores diferentes (J.A.F. e R.C.C.S.). A partir da média obtida entre os resultados da contagem pelos dois examinadores, por anticorpo por amostra, foi calculada a mediana de marcação de P53 e KI-67. Para PDS5B, quando havia discordância, o caso foi reavaliado e foi alcançado um consenso. Foi realizada análise de concordância entre as contagens dos dois examinadores, descrita na seção de análise estatística. A associação entre imunopositividade de PDS5B, KI-67 e P53 foi testada.

5.4 PCR quantitativo (qPCR)

5.4.1 Seleção das Amostras

Foram selecionadas 8 amostras de CCEB frescas obtidas durante os procedimentos de biópsia. Cinco fragmentos de mucosa bucal normal (MN) foram coletados durante a extração de terceiros molares inclusos para serem utilizados como controles. No momento da coleta, uma porção da lesão foi armazenada em solução de RNA lather (Ambion, Austin, TX, EUA) a 4°C durante 24 horas e depois armazenada em nitrogênio líquido. Outra porção de cada amostra foi fixada em formol e incluída em parafina e esses blocos de parafina originaram lâminas que foram coradas com H&E. O diagnóstico de cada caso foi confirmado por dois patologistas (R.S.G. e C.C.G.). Somente foram incluídos neste estudo casos localizados no assoalho bucal ou na língua.

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por RT2 First Strand kit (Qiagen, Maryland, EUA). Um micrograma (1µg) do RNA total foi tratado com DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

5.4.2 Reação de qPCR quantitativo

Para quantificação dos níveis de transcrição de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* foi realizada a técnica de qPCR. Os *primers* de *STAG1* e *PDS5B* foram desenhados utilizando-se o software Primer-BLAST do NCBI e ProbeLibrary Universal da Roche, visto que o *primer* de *STAG2* foi previamente descrito por (CHEN, 2011). As especificidades dos *primers* foram verificadas usando o software de nucleotídeos BLAST on-line (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os detalhes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Primers da qPCR

Gene alvo	Localização do anelamento	Tamanho do amplicon	Sequência dos primers
<i>STAG1</i>	Exon 13	74 nt	F: 5'ACATCGCCCTGTTGCTGT3'
	Exon 14		R: 5'CTGCTTGTGGGTCATGTCTG3'
<i>STAG2</i>	Exon 31	90nt	F: 5' CCAATGCAGACTGAACATCA3'
	Exon 32		R: 5' TTCCACAATTGGCTCTTCA3'
<i>PDS5B</i>	Exon 33	75nt	F: 5' AAGGACGAGGAAGACCATCA3'
	Exon 34		R: 5' GTTTGGAGGGTCCTACACG3'

nt: nucleotídeo, F: forward, R: reverse

Os níveis de transcrição do mRNA de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* foram avaliados por Ct comparativo (cycle threshold) qPCR, comparando suas expressões entre as oito amostras de CCEB e as 5 amostras de MN. A partir de 1 ml de duas amostras de mucosa normal foram realizadas diluições seriadas 1:10 para o teste de eficiência dos primers. A reações dos testes de eficiência para cada primer forma realizadas em duplicata. Foi realizada regressão linear, gerando-se uma reta cuja inclinação (*slope*) esperada e -3,33 indica 100% de eficiência do primer de PCR. Figura 7.

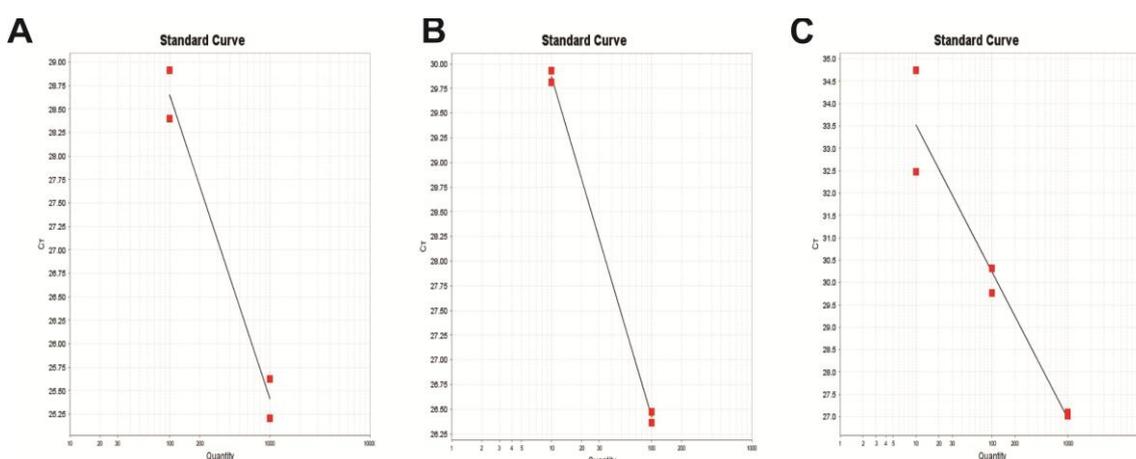


Figura 7: Curvas de diluição seriadas do teste de eficiência dos primers *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B*. As curvas de diluições foram obtidas pela plotagem dos valores de Threshold Cycle (Ct) no eixo-Y e o log da concentração dos produtos de PCR no eixo-X. **A)** *STAG1* Slope:-3.237, **B)** *STAG2* Slope:-3.237, **C)** *PDS5B* Slope:- 3.274.

O gene 28S foi usado como gene endógeno e uma amostra de MN que expressava todos os genes alvos e o endógeno foi utilizado como calibrador reação. Após as reações, foi feita uma avaliação da curva de melting para verificar a especificidade da reação. Figura 8. A mediana da duplicata do Ct de cada amostra foi utilizada para calcular ΔCt . A quantificação relativa das expressões dos genes foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como previamente descrito (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os níveis de expressão de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* foram comparados entre o grupo de MN e o grupo de CCEB.

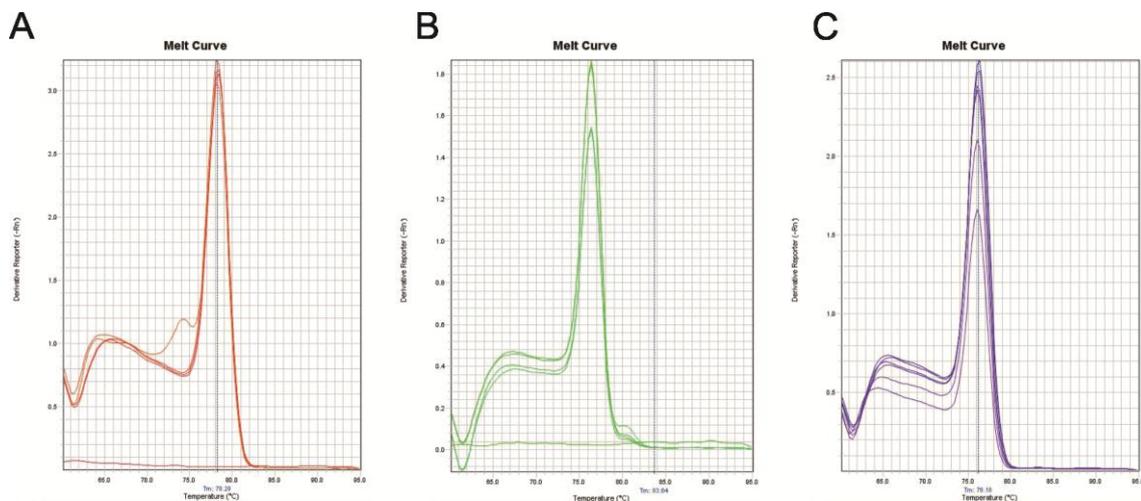


Figura 8: Curva de melting de STAG1, STAG2 e PDS5B obtidas no qPCR. Esta curva permite verificar a especificidade da reação. **A) STAG1, B) STAG2 e C) PDS5B.**

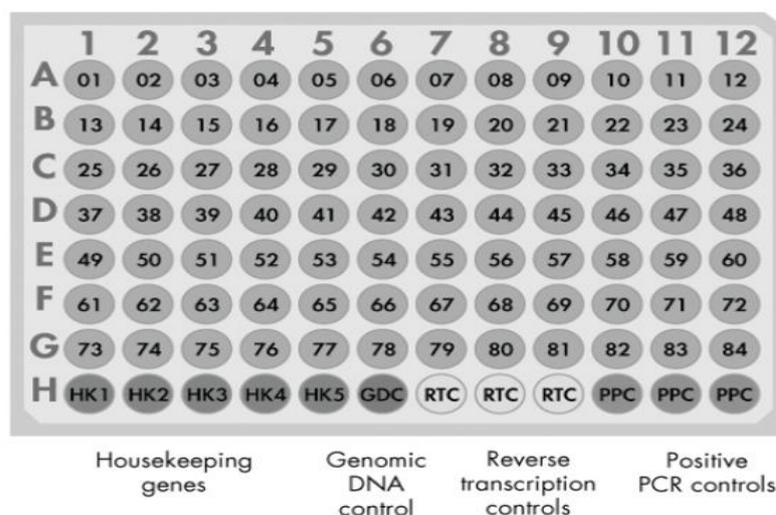
5.5 Reação de qPCR array

5.5.1 Seleção das amostras

As mesmas oito amostras de CCEB utilizadas para o qPCR foram utilizadas para este experimento, que teve como objetivo avaliar os níveis de transcrição de 84 genes do ciclo celular.

5.5.2 Reação de qPCR Array

As reações de qPCR para os 84 genes alvo que fazem parte da regulação do ciclo celular foram realizadas utilizando o kit comercial Cell Cycle RT² Profiler PCR Array: SAB:PAHS-020C-12 Qiagen, Germantown, MD, USA). A qPCR array foi realizada usando RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Germantown, MD, USA). O layout da placa de qPCR array está ilustrado na Figura 9. Para cada amostra de cDNA foi utilizada uma placa de qPCR array seguindo as instruções do fabricante.



Fonte: RT² Profiler PCR Array Handbook, 2011. Disponível em www.qiagen.com

Figura 9: Placa de qPCR array de 84 genes do ciclo celular. Na linha H nas colunas de 1 a 5 estão os 5 genes housekeeping (que são genes endógenos usados para normalizar a reação), ainda na linha H na coluna 6 está o gene de controle genômico do DNA e na coluna de 7 a 9 estão os genes de controle da transcrição reversa. Na colunas 10-12 estão os genes de controle positivo da PCR. Todos os genes presentes na linha H garantem o controle da reação de qPCR array.

O ensaio contém genes que são parte na regulação do ciclo celular em diferentes níveis, incluindo regulação do ciclo celular: *ABL1, ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, ATM, ATR, BCCIP, BCL2, BRCA2, CCNB1, CCNB2, CCNC, CCND1, CCND2, CCNE1, CCNF, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDC16, CDC2, CDC20, CDK2, CDK4, CDK5R1, CDK6, CDK7, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CKS1B, DDX11, E2F4, GADD45A, KNTC1, MKI67, PCNA, RAD9A, RB1, SKP2, TFDP1, TFDP2*; Regulação negativa do ciclo celular: *ATM, BAX, BRCA1, CDKN2B, RBL1, RBL2, TP53*; *Checkpoint* e parada do ciclo celular: *ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CCNG2, CDC2, CDC34, CDK2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, CHEK1, CHEK2, CUL1, Cul2, CUL3, GADD45A, HUS1, KNTC1, MAD2L1, MAD2L2, NBN, Rad1, Rad17, RAD9A, RB1, RBBP8, TP53*; transição de fase G1 / S: *ANAPC2, CCND1, CCNE1, CDC34, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN3, CUL1, CUL2, CUL3, SKP2* .; fase S e de replicação do DNA: *ABL1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, PCNA, RPA3, SUMO1, UBA1*; transição de fase G2 / M: *ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, BCCIP, BIRC5, CCNB1, CCNG1, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDK5R1, CDK5RAP1, CDK7, CDKN3, CKS1B, CKS2, DDX11, DNM2, GTF2H1, GTSE1, HERC5, KPNA2, MNAT1, SERTAD1*; fase M: *CCNB2, CCNF, CDK1, CDC16, CDC20, MRE11A, RAD51*. (DINIZ *et al.*, 2015).

Os resultados foram analisados utilizando o software SABiosciences PCR Template (SABiosciences versão 3.5), posteriormente os dados foram exportados para o Excel utilizando os valores Ct. Dentro os 5 genes housekeeping, foram selecionados o *HPRT1* e o *RPL13* devido aos valores do desvio padrão deles 1,2132 e 1,5393 respectivamente, e eles foram usados para normalizar os resultados, considerando as médias geométricas de Ct.

5.7 Análise Estatística

O software R versão 3.2.2. foi utilizado para todas as análises estatísticas. A normalidade dos dados foi avaliada através de testes de Anderson-Darling (AD) (dados da imuno-histoquímica) ou Shapiro-Wilk (resíduos da regressão, qPCR e dados do qPCR array). Para a técnica de

imuno-histoquímica a mediana dos resultados foi comparada utilizando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (W) e a concordância entre os dois observadores foi realizada de acordo com correlação de Spearman (ρ), seguido por testes t de significância. A correlação dos resultados de qPCR de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* foi avaliada pela correlação de Spearman seguido por testes t de significância. Além disso, eles foram usados de forma independente como variáveis de resposta em vários modelos de regressão linear. As co-variáveis foram selecionadas a partir da qPCR array para avaliar existência de relação linear com as variáveis de resposta, utilizando gráficos de dispersão. Análise de resíduos foi realizada para todos os modelos de regressão significativos, mas só foram reportados aqueles bem ajustados. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

6. RESULTADOS

6.1 Análise de LOH

Houve LOH em todos os marcadores, em pelo menos uma amostra. Os resultados estão mostrados na Tabela 6. Apenas 5 amostras foram informativas para REN52425 (marcador no locus de *STAG2*), e três destas 5 amostras apresentaram LOH neste marcador. Considerando-se os marcadores localizados no locus de *STAG1*, 1 de 6 amostras informativas mostrou LOH em D3S3528 e 2 de 10 amostras informativas mostraram LOH em D3S1549. Tabela 4. A Figura 10 mostra exemplos representativos de LOH.

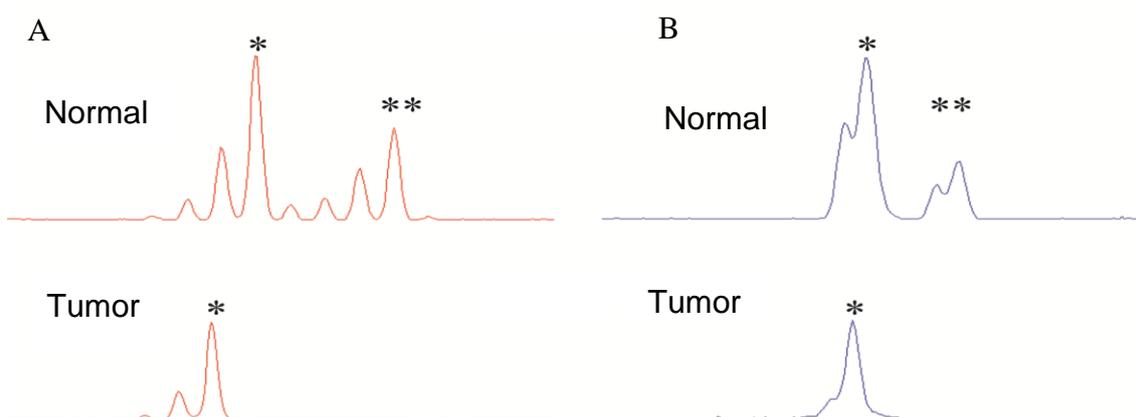


Figura 10: Resultados representativos de LOH em CCEB. A) LOH no marcador de D3S1549 amostra 6. **B)** LOH no marcador REN52425 amostra 4. Em ambos os exemplos observa-se dois alelos com pesos moleculares diferentes no tecido normal e ausência do alelo longo nos tecidos tumorais. * alelo curto (alelo1) e ** alelo longo (alelo 2).

Tabela 4: Resultados das análises de LOH nos três marcadores polimórficos de *STAG1* e *STAG2* em amostras de CCEB.

# Amostras	<i>Locus de STAG2</i>		<i>Locus de STAG1</i>
	REN52425	D3S3528	D3S1549
1	□	□	□
2	□	□	□
3	◇	□	◇
4	●	●	●
5	□	□	□
6	●	□	●
7	□	◇	◇
8	●	◇	◇
9	□	□	□
10	□	□	◇
11	□	□	◇
12	□	□	□
13	◇	◇	◇
14	□	◇	◇
15	□	◇	◇

(□) Não informativo, (◇) Retenção Alélica, (●) LOH

6.2 Imuno-histoquímica

A idade dos pacientes das amostras incluídas nas reações de IHQ variou de 16 a 82 nas mulheres e 32 a 78 nos homens. A maioria dos pacientes era fumante e as regiões dos tumores foram assoalho bucal, rebordo alveolar/gengiva, língua e região retromolar. Não foi possível estabelecer o TNM, uma vez que a ficha só fornecia o tamanho clínico da lesão. As características clínicas das amostras incluídas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Dados clínicos das amostras de IHQ

Amostras #	Gênero	Idade (em anos)	Fumante	Tamanho (em cm)	Localização
1	M	42	Sim	15	Assoalho bucal
2	M	55	Sim	3	Língua
3	M	50	X	3	Assoalho bucal
4	M	44	Sim	X	Posterior de língua
5	M	73	Sim	12	Assoalho bucal
6	M	59	Sim	0,5	Assoalho bucal
7	M	40	Sim	0,6	Língua
8	F	57	Sim	2,0	Língua
9	M	44	Sim	X	Assoalho bucal
10	M	62	Sim	1	Região retromolar
11	M	38	Sim	2	Posterior de língua
12	M	62	Sim	1	Assoalho bucal
13	M	54	X	5	Língua
14	F	16	Não	1	Língua
15	F	78	X	1	Língua
16	F	77	X	X	Rebordo alveolar/gengiva
17	M	54	X	4	Língua
18	M	53	Sim	X	Assoalho bucal
19	M	71	X	3	Região retromolar
20	M	33	Sim	2	Assoalho bucal
21	M	60	Sim	X	Língua
22	F	82	X	3	Língua
23	F	67	Não	1,5	Língua
24	M	63	X	X	Assoalho bucal
25	M	78	Sim	X	Rebordo alveolar/gengiva
26	M	49	X	3,5	Assoalho bucal
27	M	72	Sim	X	Língua
28	M	54	Sim	X	Assoalho bucal
29	M	51	Sim	5	Assoalho bucal
30	M	71	Sim	1,5	Rebordo alveolar/gengiva
31	M	56	Sim	5	Assoalho bucal
32	M	51	X	0,6cm	Assoalho bucal
33	M	57	Não	X	Posterior de língua
34	M	58	X	X	Língua
35	F	65	Não	3	Língua
36	F	67	Não	0,3	Língua
37	M	69	Sim	X	Assoalho bucal
38	M	73	X	3	Língua
39	M	71	Sim	X	Assoalho bucal
40	M	32	Sim	8	Língua
41	F	58	Sim	2	Região retromolar

42	M	42	Sim	8	Assoalho bucal
43	M	46	X	5	Posterior de língua
44	M	48	Sim	2	Assoalho bucal
45	M	69	Sim	X	Rebordo alveolar/gengiva
46	M	56	Sim	12	Rebordo alveolar/gengiva
47	M	54	Sim	1,5	Assoalho bucal
48	M	41	Sim	X	Língua
49	M	42	Não	7	Rebordo alveolar/gengiva
50	M	51	Sim	7	Mucosa bucal
51	M	X	Sim	1	Assoalho bucal
52	F	18	Não	0,4	Língua
53	M	54	Não	2	Assoalho bucal
54	M	52	Sim	X	Assoalho bucal
55	M	52	Sim	2	Língua
56	M	78	Sim	1	Língua
57	M	57	Sim	2	Região retromolar
58	F	52	Sim	X	Assoalho bucal
59	F	77	Não	3	Assoalho bucal
60	F	61	Não	3	Assoalho bucal
61	F	54	Sim	11	Língua
62	F	74	Não	6	Rebordo alveolar/gengiva

M: masculino, F: feminino, X: sem informação

Todas as proteínas apresentaram um padrão de imunomarcção alto e concentrado principalmente no núcleo. Para a proteína PDS5B, 51 das 62 amostras apresentaram imunopositividade compreendida no grupo de 25-50% e 11 apresentaram células positivas no grupo $\geq 50\%$, nenhuma amostra foi incluída no grupo $\leq 25\%$. Apesar de o anticorpo ser nuclear, houve marcação citoplasmática mesmo após o uso do detergente Triton. A marcação de KI-67 teve um percentual médio de 60,1%, variando de 25,7% para 81,4%. A marcação foi somente no núcleo das células dos ninhos tumorais. Já a marcação de P53, as células tumorais demonstraram imunopositividade média de 68,6%, variando de 45% a 89,3%.

Os resultados das avaliações por examinador, por amostra, estão detalhados na Tabela 6. Uma fotomicrografia representativa do padrão de marcação de cada anticorpo é observada na Figura 11. A imunomarcção da PDS5B foi principalmente nuclear com algumas marcações citoplasmáticas, já a imunomarcção da KI-67 e P53 foi exclusivamente nuclear. As amostras que apresentaram maior expressão imuno-histoquímica de PDS5B apresentaram

maior expressão de KI-67 e P53, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada (KI-67: $W = 1754,0$, $p = 0,6404$; P53: $W = 1798,0$, $p = 0,1482$).

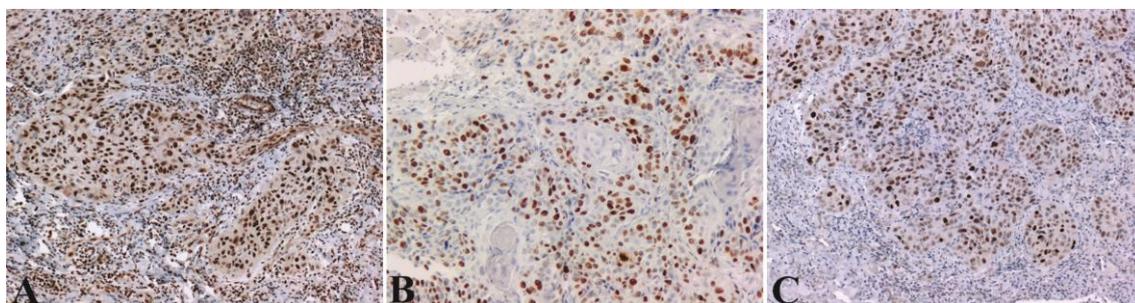


Figura 11: Lâminas de CCEB com alta expressão imuno-histoquímica para as três proteínas avaliadas. A) marcação de PDS5B principalmente no núcleo das células tumorais, sendo observada discreta marcação citoplasmática. O infiltrado inflamatório não apresentou marcação. **B)** expressão da proteína KI-67 nos núcleos das células neoplásicas. **C)** expressão de P53 no núcleo das células tumorais (x10).

Tabela 6: Resultado das contagens de IHQ em cada caso pelos dois examinadores

Amostras #	% KI-67 (*1)	% KI-67 (*2)	% P53 (*1)	% P53 (*2)	PDS5B (*1)	PDS5B (*2)
1	70,55	81,65	69,28	93,78	>50%	>50%
2	31,12	32,72	74,43	89,13	>50%	>50%
3	68,66	80,07	71,27	91,38	>50%	>50%
4	49,65	55,65	24,59	75,78	>50%	>50%
5	76,53	69,70	71,99	89,41	>50%	>50%
6	66,78	71,44	33,61	56,37	>50%	>50%
7	74,60	79,26	52,26	77,04	>50%	>50%
8	56,85	60,70	63,89	82,68	>50%	>50%
9	42,70	41,32	64,94	76,74	> 50%	>50%
10	40,34	40,18	78,19	78,76	>50%	>50%
11	72,31	70,07	77,93	93,17	>50%	>50%
12	31,49	42,45	62,56	79,26	> 50%	> 50%
13	37,84	57,87	44,86	81,45	>50%	>50%
14	28,42	23,02	63,53	80,05	>50%	>50%
15	45,30	35,52	57,33	77,98	>50%	>50%
16	51,80	57,03	85,32	93,39	> 50%	> 50%
17	66,60	75,12	60,25	89,80	25 - 50%	25 - 50%
18	49,09	82,32	68,58	79,96	> 50%	> 50%
19	56,83	60,99	49,94	65,73	>50%	>50%
20	47,97	42,29	67,94	91,11	> 50%	> 50%
21	46,10	20,31	53,48	84,54	25 - 50%	25 - 50%

22	25,64	21,25	61,04	75,63	> 50%	> 50%
23	34,60	40,59	54,41	73,55	> 50%	> 50%
24	64,76	61,84	54,76	81,14	> 50%	> 50%
25	68,67	68,74	56,71	66,78	> 50%	> 50%
26	65,10	39,65	64,78	83,37	> 50%	> 50%
27	47,39	39,62	51,44	56,65	> 50%	> 50%
28	73,70	74,93	55,50	75,41	> 50%	> 50%
29	43,85	58,37	50,33	69,54	25 - 50%	25 - 50%
30	49,81	37,92	55,25	78,64	> 50%	> 50%
31	73,97	80,17	61,96	60,86	> 50%	> 50%
32	64,11	63,79	53,51	64,70	25 - 50%	25 - 50%
33	57,68	50,95	62,31	76,47	> 50%	> 50%
34	50,57	53,36	57,42	77,88	25 - 50%	25 - 50%
35	26,18	38,53	55,19	92,18	> 50%	> 50%
36	27,68	28,54	65,13	77,45	> 50%	> 50%
37	74,54	66,11	52,12	66,25	25 - 50%	25 - 50%
38	52,53	45,10	40,82	77,11	> 50%	> 50%
39	73,59	72,79	45,62	64,95	> 50%	> 50%
40	79,77	81,54	7,73	47,26	> 50%	> 50%
41	62,31	66,29	46,27	66,76	> 50%	> 50%
42	34,33	47,85	58,75	77,25	> 50%	> 50%
43	47,08	80,40	71,61	80,11	> 50%	> 50%
44	56,54	59,62	58,72	75,42	> 50%	> 50%
45	66,20	81,79	32,04	77,91	> 50%	> 50%
46	74,64	88,08	51,48	56,29	> 50%	> 50%
47	40,84	51,14	60,13	87,31	> 50%	> 50%
48	80,88	71,18	67,08	85,05	> 50%	> 50%
49	66,84	64,67	57,08	80,54	> 50%	> 50%
50	73,60	53,56	61,90	77,73	> 50%	> 50%
51	86,53	72,36	52,41	88,81	> 50%	> 50%
52	37,39	43,86	57,16	78,12	> 50%	> 50%
53	67,48	55,39	84,50	82,40	> 50%	> 50%
54	44,71	53,51	69,46	90,27	> 50%	> 50%
55	66,88	72,87	45,32	68,41	> 50%	> 50%
56	66,80	55,83	69,97	88,53	> 50%	> 50%
57	70,49	61,14	63,16	89,36	> 50%	> 50%
58	53,81	37,70	35,04	55,91	25 - 50%	25 - 50%
59	79,75	80,64	56,96	77,68	> 50%	> 50%
60	74,06	77,76	52,26	64,83	> 50%	> 50%
61	62,53	54,76	81,88	91,30	> 50%	> 50%
62	67,97	56,61	56,43	81,96	> 50%	> 50%

*1: avaliador 1; *2: avaliador 2

A correlação entre contagem dos dois observadores foi considerada alta para PDS5B (Spearman rho= 1.000000, p<0.00001) onde foi feita uma estimativa categorizada em 3 grupos, para KI-67 (Spearman rho= 0,7463171,

$p < 0.00001$) e P53 (Spearman $\rho = 0,6788633$, $p < 0.00001$) onde foi realizada a contagem das células positivas e calculado o percentual de positividade.

6.3 qPCR

As informações clínicas das amostras incluídas nos experimentos de qPCR estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Dados clínicos dos pacientes das amostras submetidas à técnica de qPCR

Amostra #	Gênero	Idade (em anos)	Localização	Tamanho Clínico do Tumor	Linfonodos (N)	Consumo de Álcool (em anos)	Consumo de tabaco (em anos)
1	M	59	Assoalho bucal	T2	N2b	0	40
2	M	61	Assoalho bucal	T1	N0	0	40
3	M	52	Assoalho bucal	T1	N0	0	30
4	M	53	Assoalho bucal	T2	N0	12	12
5	M	67	Língua	T3	N0	50	50
6	M	63	Língua	T1	N0	50	50
7	M	53	Assoalho bucal	T2	N0	0	36
8	M	68	Assoalho bucal	T1	N0	0	30

T1: ≤ 2 cm T2: ≤ 4 cm T3: >4 cm; M= Masculino;

Os resultados do qPCR mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os os níveis de mRNA de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* em CCEB e mucosa bucal normal ($p > 0,05$). Os resultados estão ilustrados na Figura 12.

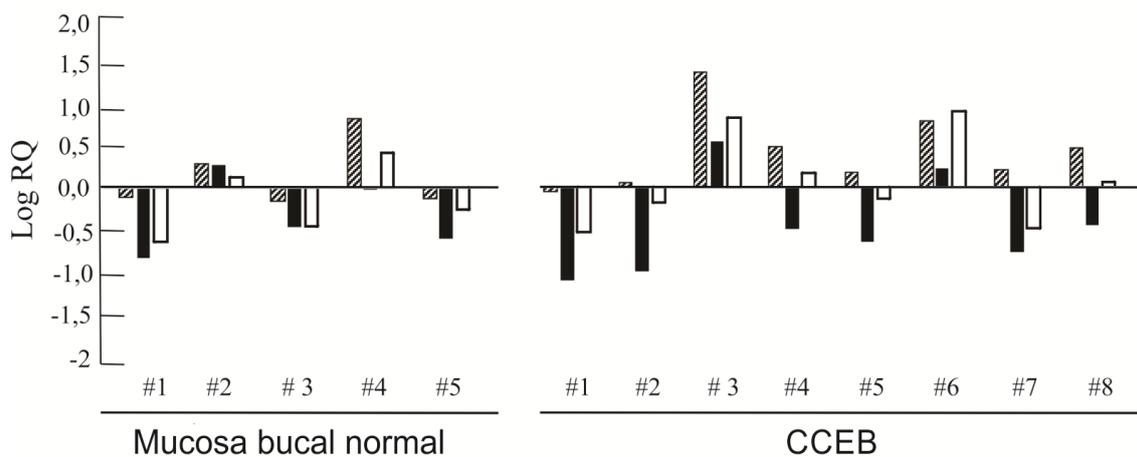


Figura 12: Expressão de STAG1, STAG2 e PDS5B em mucosa bucal normal e em CCEB. A coluna hachurada representa a expressão de *STAG1*, a coluna em preto a expressão de *STAG2* e a coluna branca a expressão de *PDS5B*.

6.4 qPCR array

A expressão do gene *STAG1* foi significativamente explicada pela expressão do gene *CUL3* ($STAG1 = 0.803 + 110.365 \cdot CUL3$; $t = 5.112$, $p = 0.004$, adjusted $R^2 = 0.807$).

Nenhum modelo significativo de regressão linear foi encontrado para *STAG2*, embora fortes correlações tenham sido observadas com os genes *CCNE1*, *CDKN1A* e *SERTAD1*. Da mesma forma, nenhum modelo significativo de regressão linear foi encontrado para *PDS5B* embora fortes correlações tenham sido identificadas com *CCNE1*, *CDKN1A*, *DDX11* e *TP53*.

7. DISCUSSÃO

O complexo coesina é composto por quatro proteínas principais e subunidades de proteínas, incluindo STAG1 e STAG2 (NASMYTH e HAERING, 2009). Este complexo é responsável pela coesão das cromátides irmãs, garantindo a correta segregação cromossômica durante a mitose (MANNINI *et al.*, 2010). Mutações nos genes da coesina e nos seus fatores regulatórios foram descritas no câncer (SOLOMON *et al.*, 2014). A perda da expressão *STAG2* foi relatada em linhagens celulares de câncer humano, bem como em vários tipos de tumores (SOLOMON *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012). De forma interessante, SOLOMON e colaboradores (2011) demonstraram que uma vez corrigindo a expressão de *STAG2* em cultura de células neoplásicas malignas aneuplóides, havia reversão da aneuploidia e as células voltavam a ser diploides.

Foi investigado recentemente a imunexpressão de *STAG2* no câncer de glândula salivar (GOMES *et al.*, 2014), de leucoplasias orais, queilite actínica, CCE intra-oral e CCE de lábio (BERNARDES *et al.*, 2014). Foi observado que a perda de imunexpressão de *STAG2* não é frequente nessas lesões

Mutações em *STAG1* foram descritas em leucemia mielóide aguda (THOL *et al.*, 2014). De acordo com o banco de dados COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk>), mutações *missense* são responsáveis pela maior parte das mutações em *STAG1* e *STAG2*, <1% das amostras de CCEB relatadas neste banco de dados apresentaram mutações pontuais em *STAG2*, e nenhuma mutação foi encontrada em *STAG1* no CCEB (FORBES *et al.*, 2015). No presente trabalho, LOH ocorreu tanto em marcadores localizados nos loci de *STAG1* quanto em *STAG2*. No entanto, deve-se salientar que o número de amostras que puderam ser avaliadas foi pequeno. Isto se deveu a uma dificuldade em selecionar caso de pacientes do gênero feminino (que são menos acometidas do que os homens) e, principalmente, por um baixo número de amostras informativas (i.e. heterozigotas) para os marcadores avaliados.

O complexo coesina é regulado por fatores regulatórios, incluindo NIPBL, PDS5B e ESPL1. O gene *PDS5B* também é conhecido como *AS3* e *APRIN*. Mutações *frameshift* são frequentes nos genes reguladores coesina e foram relatadas no *PDS5B* em adenocarcinomas gástricos e colorretais apresentando instabilidade de microssatélite (KIM *et al.*, 2013). Nestas amostras, a presença de mutações foi associada a uma fraca ou negativa expressão da proteína *pds5b*. Além disso, a LOH de *PDS5B* foi descrita em CCE de esôfago (HARADA *et al.*, 2001; SUGIMOTO *et al.*, 1999). Em nossa série, encontramos alta proporção de imunexpressão de *PDS5B* em CCEB, consistente com a baixa percentagem de mutações pontuais (<2%) neste gene descritas em amostras de CCEB no banco de dados COSMIC. Considerando a função de *pds5b* como um regulador negativo da proliferação celular, supõe-se que neoplasias exibindo superexpressão desta proteína apresentariam baixos índices de expressão de ki-67, um marcador de proliferação celular, o que não foi observado nas amostras avaliadas.

Ao contrário do que era esperado, foi visto um padrão de expressão de *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* semelhante tanto nas cinco MN quanto nos oito CCEB, embora vários estudos tenham demonstrado perda de expressão desses genes em neoplasias. (THOL, *et al.*, 2014; SOLOMON *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013)

A partir do modelo estatístico de regressão linear utilizado neste trabalho, a expressão de *STAG1* é significativamente explicada pela expressão de *CUL3*. O gene *CUL3* foi um dos 84 genes do ciclo celular que tiveram seus níveis de transcrição avaliados. Esse gene codifica um dos membros da família de proteínas culina. A proteína culina3 desempenha um papel na ubiquitinação e degradação de substratos de proteínas específicas, como o complexo de ubiquitina ligase E3 conhecido como Cul3-ligase E3, que desempenha um papel crucial na mitose (ANDÉRICA-ROMERO *et al.*, 2013).

Embora a expressão de *STAG1* e a expressão de *CUL3* não possa ser explicada de forma direta, uma vez que o modelo de regressão linear mostrou apenas que a expressão *STAG1* é explicada pela expressão *CUL3* mas não é possível estabelecer uma relação de causalidade. No entanto, as funções da proteína *cul3* e seus substratos durante o ciclo celular podem estabelecer uma correlação deste gene com o complexo coesina. Essa interação não foi

relatada anteriormente em CCEB ou em outros tipos de câncer, embora possa ser prevista em softwares on-line (geneorienter.org. ZHONG e STERNBERG (2006).

A proteína CUL3 regula a proteína AURORAB (AURKB) que atua nos cromossomos que estão na mitose. O ápice da acumulação AURKB acontece no final da anáfase (SUMARA *et al.*, 2007), e é precisamente nessa fase que todos os complexos coesina foram removidos do cromossomo. De acordo com SUMARA *et al.*, (2008) o complexo de CUL3 também participa da regulação da proteína POLO-LIKE KINASE-1 (PLK1) durante a mitose. Essa proteína é responsável pela remoção da PLK1 através da ubiquitinação que acontece através do complexo E3-ligase composto por CUL3/KLHL22 (SCHMUCKER e SUMARA, 2014).

Ambas as proteínas, PLK1 e AURKB são responsáveis pela dissociação do complexo coesina durante a mitose. Sendo que a proteína PLK1 é responsável pela fosforilação das subunidades da coesina STAG1 e STAG2, e a proteína AURKB está relacionada com a fosforilação de Sororin que é uma das proteínas responsáveis pela manutenção do complexo coesina (LOSADA, 2014).

Portanto, CUL3 regula proteínas que são responsáveis pela dissociação do complexo coesina sendo STAG1 um dos seus componentes, e, assim, mesmo que indiretamente a relação de STAG1 com CUL3 pode ser explicada.

8. CONCLUSÃO

A perda de heteroziguidade em *loci* de *STAG1* e *STAG2* está presente nos CCEB, mas não foi um evento frequente nos casos estudados.

As proteínas PDS5B, KI-67 e P53 apresentaram altos índices de expressão nas amostras de CCEB, porém, não houve correlação entre a expressão de *pds5b* com as duas.

A expressão dos genes *STAG1*, *STAG2* e *PDS5B* em CCEB foi semelhante à expressão destes genes na mucosa bucal normal.

A expressão de *STAG1* foi significativamente explicada pela expressão de *CUL3* apesar de não ser possível predizer uma causalidade.

9. REFERÊNCIAS

1. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Lip and oral cavity. In: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 23-32.
2. ANAZAWA Y, ARAKAWA H, NAKAGAWA H, et al. Identification of STAG1 as a key mediator of a p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2004; 23: 7621-7627.
3. ANDÉRICA-ROMERO AC, GONZÁLEZ-HERRERA IG, SANTAMARÍA A, et al. Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biology* 2013; 1: 366-372.
4. ANTUNES JLF, TOPORCOV TN, BIAZEVIC MGH, et al. Joint and Independent Effects of Alcohol Drinking and Tobacco Smoking on Oral Cancer: A Large Case-Control Study. *Plos One* 2013; 8: 1-7.
5. BALBÁS-MARTÍNEZ C, SAGRERA A, EARL J, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nature Genetics* 2013; 45 (12): 1464-1469.
6. BERNARDES VF, CORREA GTB, LOYOLA AM, et al. STAG2 expression in oral cancer and potentially malignant lesions. *Tumor Biol* 2014; 35: 3641-3645.
7. BERNSTEIN JM, BERNSTEIN CR, WEST CM, HOMER JJ. Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270:2585–93.
8. CARRERAS –TORRAS C, GAY-ESCODA C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015; 1;20 (3): 305-315.
9. CHEN S, NAGEL S, SCHNEIDER B, et al. Novel non-TCR chromosome translocations t (3;11)(q25;p13) and t (X;11)(q25;p13) activating LMO2 by juxtaposition with MBNL1 and STAG2. *Leukemia* 2011; 25: 1632-1664. doi:10.1038/leu.2011.119.
10. DE CAMARGO CANCELA M, VOTI L, GUERRA-YI M, CHAPUIS F, MAZUIR M, CURADO MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck.* 2010;32:357–67

11. DINIZ MG, PEREIRA NB, GOMES CC, *et al.* Association between cell cycle gene transcription and tumor size in oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2015. DOI 10.1007/s13277-015-3735-1.
12. Estimativa 2016: Incidência do Cancer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
13. FELLER L, LEMMER J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Journal of Cancer Therapy* 2012; 3: 263-268.
14. FELLER LL, KHAMMISSA RR, KRAMER BB, *et al.* Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell International* 2013; 13 (31): 1-8.
15. FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: 359-386.
16. FORBES SA, BEARE D, GUNASEKARAN P, *et al.* COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D805-11.
17. GECK P, MAFFINI MV, SZELEI J, *et al.* Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: The role of AS3 as its mediator. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(18): 10185–10190.
18. GECK P, SONNENSCHN C, SOTO AM. The D13S171 Marker, Misannotated to BRCA2, Links the AS3 Gene to Various Cancers. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69:461–463.
19. GOMES CC, BERNARDES VF, GOMEZ RS, *et al.* STAG2 loss of expression is rare in aneuploid malignant salivary gland neoplasms. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2014; 43: 273-275.
20. GORRINGE KL, RAMAKRISHNA M, WILLIAMS LH, *et al.* Are there any ovarian tumor suppressor genes? A new perspective using ultra high-resolution copy number and loss of heterozygosity analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 48 (10): 931-42, 2009.
21. GUO G, SUN X, CHEN C, *et al.* Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes

- involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nature Genetics* 2013; 45 (12): 1459-1463.
22. HAERING CH, JESSBERGER R. Cohesin in determining chromosome architecture. *Experimental Cell Research* 2012; 318: 1386-1393.
 23. HARADA H, UCHIDA N, SHIMADA Y, et al. Polymorphism and allelic loss at the AS3 locus on 13q12-13 in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2001; 18: 1003-1007.
 24. KIM MS, AN CH, YOO NJ, et al. Frameshift mutations of chromosome cohesion-related genes *SGOL1* and *PDS5B* in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. *Human Pathology* 2013; 44: 2234-2240.
 25. KIM MS, KIM SS, JE EM, et al. Mutational and expressional analyses of *STAG2* gene in solid cancers. *Neoplasia* 2012; 59(5): 524-529.
 26. LEISERSON MDM, VANDIN F, WU HT, et al. Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes. *Nature Genetics* 2015; 47 (2): 106-114
 27. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-408.
 28. LOSADA A. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature Reviews* 2014; 14: 389-393.
 29. MANNINI L, MENGA S, MUSIO A. The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer. *Human Mutation*. 2010; 31:623–30.
 30. MANNINI L, MUSIO A. The dark side of cohesion: The carcinogenic point of view. *Mutation Research* 2011; 728: 81-87.
 31. Manual do nanodrop. Disponível em: <http://www.mlz-garching.de/files/Nanodrop_2000_user_manual.pdf>. Acesso em: 10 de nov. 2015.
 32. NASMYTH K, HAERING CH. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*. 2009; 43:525–58.
 33. NEVILLE BW, ALLEN CM, DAMM DD, et al. *Patologia: Oral & Maxilofacial*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

34. OMAR EA. The Outline of Prognosis and New Advances in Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): Review of the Literature. *Journal of Oral Oncology* 2013; 1-13.
35. REMESEIRO S, CUADRADO A, CARRETERO M, *et al.* Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumorigenesis in mice due to impaired replication of telomeres. *The EMBO Journal* 2012; 31: 2076-2089. A.
36. REMESEIRO S, CUADRADO A, GÓMEZ-LÓPES G, *et al.* A unique role of cohesion-SA1 in gene regulation and development. *The EMBO Journal* 2012; 31 (9): 2090-2102. B.
37. REMESEIRO S, LOSADA A. Cohesin, a chromatin engagement ring. *Current Opinion in Cell Biology* 2013; 25: 63-71.
38. RHODES JM, MCEWAN M, HORSFIELD JA. Gene Regulation by Cohesin in Cancer: Is the Ring an Unexpected Party to Proliferation? *Molecular Cancer Research* 2011; 9 (12) 1587-1607.
39. ROCQUAIN J, GELSI-BOYER V, ADÉLAÏDE J, MURATI A, CARBUCCIA N, VEY N, *et al.* Alteration of cohesin genes in myeloid diseases. *Am J Hematol.* 85(9): 717-9, 2010.
40. SCHMUCKER S, SUMARA I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Molecular & Cellular Oncology* 2014; 1(2): 1-8.
41. SCULLY C, BAGAN J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology* 2009; 45: 301-308. A.
42. SCULLY C, BAGAN JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases* 2009; 15: 388-399. B.
43. SCULLY C, SCIUBBA JJ, BAGAN JV. Oral mucosal precancer and cancer: A helpful discriminating clinical tool. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015; Sep 1;20 (5): 587-590.
44. SOLOMON DA, KIM JS, BONDARUK J, *et al.* Frequent truncating mutations of *STAG2* in bladder cancer. *Nature Genetics* 2013; 45 (12): 1428-1430.
45. SOLOMON DA, KIM JS, WALDMAN T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. *BMB Reports* 2014; 47(6): 299-310.

46. SOLOMON DA, KIM T, DIAZ-MARTINEZ LA, *et al.* Mutational Inactivation of *STAG2* Causes Aneuploidy in Human Cancer. *Science* 2011; 333: 1039-1043.
47. SUGIMOTO M, NAKAMURA T, OHTANI N, *et al.* Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34^{SEI-1}. *Genes & Development* 1999; 13: 3027-3033.
48. SUMARA I, MAERKI S, PETER M. E3 ubiquitin ligases, mitosis and I: embracing the complexity. *Trends in Cell Biology* 2007; 18(2): 84-94.
49. SUMARA I, QUADRONI M, FREI C, *et al.* A Cul3-Based E3 Ligase Removes Aurora B from Mitotic Chromosomes, Regulating Mitotic Progression and Completion of Cytokinesis in Human Cells. *Developmental Cell* 2007; 12: 887-900.
50. SUMARA I, VORLAUFER E, GIEFFERS C, *et al.* Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *The Journal of Cell Biology* 2000; 151 (4): 749-761.
51. TAYLOR CF, PLATT FM, HURST CD, *et al.* Frequent inactivating of *STAG2* in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy numbers changes. *Human Molecular Genetics* 2014; 23 (8): 1964-1974.
52. THOL F, BOLLIN R, GEHLHAAR M, *et al.* Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *BLOOD* 2014; 123 (6): 915-920.
53. VAN HOUTEN VMM, TABOR MP, VAN DEN BREKEL MWM, *et al.* Molecular Assays for the Diagnosis of Minimal Residual Head-and-Neck Cancer: Methods, Reliability, Pitfalls, and Solutions. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3803-3816.
54. ZHENG G, YU HT. Regulation of sister chromatid cohesion during the mitotic cell cycle. *Science China Life Sciences* 2015; 58 (11): 1089-1098.
55. ZHONG W, STERNBERG PW. Genome-Wide Prediction of *C. elegans* Genetic Interactions. *Science*, 2006; 311: 1481-1484.
56. ZHOU X, KONG X, XU W, CHEN J. Overexpression of APRIN inhibits differentiation and proliferation and promotes apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells. *Molecular Biology Reports* 2013; 40: 491-495. DOI 10.1007/s11033-012-2085-y.