

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESTÁGIO EM DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO III
ÊNFASE EM CIÊNCIAS BÁSICAS EM SAÚDE

MANUELLA CAZELATO PIRES

**Expressão da proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação
de carcinomas**

Ribeirão Preto

2017

MANUELLA CAZELATO PIRES

Expressão da proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação de carcinomas

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas pela Comissão de Graduação.

Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular

Orientador(a):
Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021

Pires, Manuella Cazelato

Expressão da proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação de carcinomas. Ribeirão Preto, 2017.

60 f. : il. ; 30cm

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharel em Ciências Biomédicas), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, 2017. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador(a): Sales, Katiuchia Uzzun.

1.Câncer. 2.Protease. 3.Indução Carcinogênica. 4.Avaliação Fenotípica. 5.Bioinformática.

ERRATA

PIRES, MC. Expressão da proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação de carcinomas. 2017. Número total f. Defesa de tese (Graduação em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

[illegible]

Nome: PIRES, MC

Título: Expressão da proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação de carcinomas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas pela Comissão de Graduação.

Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Dedico esse trabalho aos desesperançosos...

AGRADECIMENTOS

Sinônimo de agradecer pode ser lido como reconhecer, recompensar, recolher ou retribuir. Devo dizer que reconheço todo meu aprendizado nesses 4 anos de curso, não acho e não gostaria de ter adquirido esse conhecimento, nessa fase da vida, em outro lugar. A recompensa é aquela que espero dar ao mundo, ao utilizar da sabedoria que adquiri, poder fornecer, da maneira mais simplória que posso me expressar, uma qualidade de vida melhor àqueles que se encontram enfermos. O que recolhi foi mais do que no âmbito profissional; recolhi dessa pequena parte do mundo amizades e sentimentos que nunca poderei esquecer, foram muitos deles que me fizeram como pretexto permanecer, porém muitos que me fizeram enxergar o futuro longe daqui. Minha retribuição está acima da minha habilidade na saúde do corpo: está na retribuição como cidadã, como filha, como irmã, como amiga, como um amor; espero retribuir à beleza pura da mãe-natureza, aquilo que as simples mãos de um humano podem dar.

Pessoalmente agradeço imensamente à minha família, por fornecer o abrigo, o carinho, a atenção, a serenidade, a percepção do quão importante essa fase da minha vida foi para mim, ouvindo todas as minhas queixas e compartilhando meus momentos de glória. Às minhas irmãs Amanda B.C. Pires e Giovanna C. Pires, aos meus pais Manoel Pires e Marta Cazelato Pires. À estes um agradecimento especial que, pelo que me conhecem, um “amo vocês” todas as noites permite completa interpretação dos meus sentimentos. Agradeço à Turma I desse curso, que me proporcionou momentos impressionantes, turma que merece todo o reconhecimento pelo esforço que teve, sendo esta, portanto, insuperável. Especialmente agradeço aos amigos que ganhei, Frederico Fazan, Alan Andrade de Britto e Gabriel Ishioka, que assistiram na minha evolução. Aos profissionais completamente capacitados com que trabalhei, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales, e ao colegas Márcio Kodama, Bruno Gomes, Rodrigo Alves, Gabriel Viliod, Elaine da Silva, Marina Cândido, Márcia Gaião, Naira Bibó, Ana Carolina Santana, Carol Kobori e Mara Costa, mais do que um laboratório constituído pelo bom, um ambiente esculpido pelo bem, meu muito obrigada. Agradeço ao aluno Lucas Goedert, colaborador do projeto.

Finalmente, agradeço à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo por fornecer todos os subsídios, tanto de conhecimento quanto instrumentais, para a realização desse trabalho; a faculdade encaixou-se como uma segunda (se não primeira) casa para mim, nela obtive no meu cotidiano momentos de alegria, tristeza, frustrações, realizações e principalmente amadurecimento. Agradeço também aos coordenadores do curso de Ciências Biomédicas, por se dedicarem a prover um curso de tamanha complexidade, com tamanha organização e autenticidade. A todos os funcionários, que auxiliaram no planejamento de aulas, agradeço a paciência e compreensão de vocês, nos tornamos pró-ativos e independentes devido ao bom planejamento de que fizeram parte. Agradeço à agência de fomento FAPESP que me permitiu exercer esse trabalho com ampla virtude.

“Não acreditem em mim! Eu também não sei nada! Só sei que diante de mim existe aberta uma grande porta escura, e além dela é o infinito - um infinito que não acaba nunca. Só sei que a vida é muito curta demais para viver e muito longa demais para morrer!”

(Moraes, Vinícius de., 1962, p.152.)

RESUMO

PIRES, Manuella Cazalato. Expressão de proteína codificada pelo gene TMPRSS11A e seu envolvimento na formação de carcinomas. 2017. Número total de f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. Versão original.

O carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) é a sexta neoplasia mais comum em todo o mundo, sendo responsável por 600 mil novos casos por ano. Apesar de todos os avanços científicos ocorridos nos últimos anos, ainda não existe uma terapia específica para o HNSCC. Além disso, apenas cerca de 30% dos pacientes acometidos com essa doença atingem o índice de sobrevivência de 5 anos. Assim sendo, é de suma importância que se aprofunde o conhecimento a respeito de novas abordagens nos âmbitos do diagnóstico e da terapia para HNSCC. Já foi descrito que a expressão desregulada de algumas serino proteases transmembrana do tipo II (TTSPII) está associada ao surgimento e desenvolvimento de diferentes tipos de carcinomas. Com o objetivo de testar a hipótese de que a serino protease TMPRSS11A exerce atividade supressora tumoral em carcinomas, coortes de animais selvagens e transgênicos TMPRSS11A^{-/-} foram estabelecidos e desafiados com indutores e promotores tumorais; Paralelamente, foi realizada uma análise de bioinformática de alterações na expressão de RNA mensageiro de TMPRSS11A e outros genes relacionados em amostras provenientes de pacientes diagnosticados com HNSCCs. Nos animais desafiados somente com o indutor tumoral DMBA, a ausência da serino protease TMPRSS11A predispõe ao aparecimento e à progressão tumoral quando comparados aos animais selvagens oriundos da mesma ninhada, ou seja, a ausência da protease TMPRSS11A nos animais nocautes atua como promotor tumoral. Por outro lado, quando o desafio foi realizado pela aplicação do indutor tumoral seguida da aplicação sequencial do promotor tumoral (TPA) não houveram diferenças quanto a incidência e progressão das lesões entre os animais nocaute e selvagens para a protease. Estes dados indicam que o TPA atua como um promotor mais robusto quando comparado à atividade promotora que acontece em resposta à ausência da protease TMPRSS11A. As análises de bioinformática revelaram que a protease TMPRSS11A está diminuída em tecidos de tumor primário (HNSCC) quando comparados aos tecidos normais, além disso verificou-se uma relação da protease com processos celulares como, por exemplo, diferenciação celular, supressão tumoral e sinalização de Rap1. Ainda em dados de bioinformática, os níveis de metilação da protease apresentaram-se alterados em regiões promotoras do gene. Baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que a serino protease TMPRSS11A apresenta potencial de supressor tumoral em modelo murino de HNSCC através da modulação de inúmeros processos celulares que precisam ser validados e melhor elucidados.

Palavras-chave: Câncer. Protease. Modelo Carcinogênico. Avaliação Fenotípica. Bioinformática.

ABSTRACT

PIRES, Manuella Cazelato. Expression of the protein codified by the TMPRSS11A gene and its involvement in the carcinoma formation. 2017. Number of pages p. Work for Course Conclusion (Biomedic Science Graduate) – Medicine School of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirao Preto, 2017. Original version.

Head and neck carcinoma (HNSCC) is the sixth most common neoplasm in the world, accounting for 600,000 new cases per year. Despite all the scientific advances that have occurred in recent years, there is still no specific therapy for HNSCC. In addition, only about 30% of patients with this disease reach the 5-year survival rate. Therefore, it is of the utmost importance to deepen the knowledge about new approaches in diagnosis and therapy for HNSCC. Dysregulated expression of some type II transmembrane serine proteases (TTSP II) has been reported to be associated with the onset and development of different types of carcinomas. In order to test the hypothesis that the serine protease TMPRSS11A has a tumor suppressor role in carcinomas, wild type and TMPRSS11A^{-/-} transgenic mice were challenged with tumor inducers (DMBA) and promoters (TPA); In parallel, a bioinformatics analysis was carried out to explore changes in the expression levels of TMPRSS11A and other related genes in samples from HNSCC patients. In animal challenged only with the inducer, the results showed that the absence of the TMPRSS11A in knockout mice leads to an increase in lesion incidence and tumor progression when compared with littermate wild type control mice. Therefore, the absence of TMPRSS11A acts as a tumor promoter. However, when the challenge was performed with both the inducer and the promoter there were no differences between the knockout and wild type mice with regards to tumor incidence or progression. This data indicates that TPA acts as a more robust promoter than the promoting action originated as a result of the absence of TMPRSS11A. The bioinformatics analysis revealed that the expression of TMPRSS11A is negatively regulated in HNSCC tumors when compared to healthy tissues. In addition, genes related to cellular processes such as cellular differentiation, tumor suppression and Rap1 signaling, were found to be related to TMPRSS11A expression levels. Moreover, the methylation levels of TMPRSS11A were found altered in the promoter regions of the gene. Taking together, these results suggest the serine protease TMPRSS11A act as a tumor suppressor in squamous cell carcinogenesis. The mechanisms by which TMPRSS11A interfere with cellular processes to achieve this outcome need to be better elucidated.

Keywords: Cancer. Protease. Carcinogenic Model. Phenotypic Evaluation. Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das Serino Proteases tipo II.....	06
Figura 2 - Figura representativa dos grupos experimentais formados e seus respectivos desafios carcinogênicos.....	14
Figura 3 - Animais TMPRSS11A KO possuem maior incidência de lesões comparados à animais TMPRSS11A WT.....	16
Figura 4 - Tumores em animais TMPRSS11A KO progridem mais rapidamente quando comparados aos animais TMPRSS11A WT.....	17
Figura 5 - Animais TMPRSS11A KO possuem lesões com progressão mais acelerada, quando comparados aos animais TMPRSS11A WT.....	18
Figura 6 - Animais TMPRSS11A KO possuem número semelhante de lesões quando comparados aos animais TMPRSS11A WT.....	20
Figura 7 - Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO possuem a mesma taxa de incidência de lesões, quando tratados com DMBA+TPA.....	21
Figura 8 - Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO possuem o mesmo número de lesões, quando tratados com DMBA+TPA.....	21
Figura 9 - Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO apresentam semelhante progressão tumoral.....	22
Figura 10 - Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO apresentam lesões com progressão semelhante.....	23
Figura 11 - Figura representativa da região do dorso lombar de um animal WT e um animal KO para a protease TMPRSS11A do grupo controle tratado com TPA.....	24
Figura 12 - Figura representativa da região do dorso lombar de um animal WT e um animal KO para a protease TMPRSS11A do grupo controle tratado com acetona.....	24
Figura 13 - Níveis de expressão do mRNA de TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	25
Figura 14 - Processos biológicos em que TMPRSS11A pode estar atuando, em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	27

Figura 15 - Categoria Funcional em que Tmprss11a poderia ser classificada, em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	28
Figura 16 - Vias de Sinalização que Tmprss11a poderia regular ou estar sob regulação, em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	29
Figura 17 - Componentes Celulares que Tmprss11a poderia estar associado, em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	30
Figura 18 - Níveis de metilação do gene Tmprss11a em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-/-	Camundongo nocaute para um gene
+/-	Camundongo heterozigoto para um gene
+/+	Camundongo selvagem para um gene
4NQO	4-nitroquinolina 1-óxido
Akt/PKB	Proteína Quinase B
ANP	Polipeptídeo Natriurético Atrial
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
ATP	Adenosina Trifosfato
BALB/C	Linhagem de Camundongos Albinos
C57Bl/6	Linhagem de Camundongos
CBA	Linhagem de Camundongos
CCND1	Ciclina D1
CD151	Cluster of Differentiation 151
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
cDNA	DNA Codificante
CEACAM	<i>Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLDN	Claudina
c-Met	Proteína Tirosina Quinase Met
CpG	Nucleotídeo Citosina seguido de Guanina
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CUB	<i>Urchin Embryonic Growth Factor</i>
CYP	Citocromo P
DESC	Célula Escamosa Diferencialmente Expressa
DMBA	7,12-Dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECRG1	Gene Relacionado ao Câncer de Esôfago 1
EDC	Complexo de Diferenciação Epidermal
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial
EnaC	Canais de Sódio Epitelial Sensíveis à Amilorida
ESCC	Carcinoma de Esôfago de Células Escamosas
FAT1	FAT Caderina Atípica 1
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSTL3	<i>Follistatin Like 3</i>
FUT6	Alpha-(1,3)-fucosiltransferase 6
FVB/N	Linhagem de Camundongos

GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase
Gln	Glicina
GPI	Glycofosfatidilinositol
HAI-	Inibidor de Fator Ativador de Crescimento de Hepatócito Tipo
HAT	Protease tipo Tripsina de Via Aérea Humana
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócito
His	Histidina
HNSCC	Câncer de Cabeça e Pescoço de Células Escamosas
HPV	Vírus do Papiloma Humano
ILK	Proteína Quinase Ligada a Integrina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KLK	Calicreína
KO	Nocaute para o gene
KRT	Queratina
LDLA	Lipoproteína de Baixa Densidade Classe A
LEKTI	Inibidor Linfo-epitelial tipo Kazal
LGALS	Lectina, Ligante de Galactosídeo, Solúvel
MAM	Meprin/A5 antígeno/proteína receptora fosfatase Mu
MAPK/ERK	Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos
MEK	<i>MAP kinase kinase coding gene</i>
Miz-1	<i>Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1</i>
mRNA	RNA mensageiro
MSPL	<i>Mosaic Serine Protease Large-form</i>
mTOR	Alvo Mecânico de Rapamicina
NFκB	Fator Nuclear Capa B
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
PAI-	Inibidor do Ativador de Plasminogênio
PAR-	Receptor Ativador de Protease
PCI	Inibidor de Proteína C
PDLIM7	PDZ eDomínio LIM 7
PHC2	<i>Polyhomeotic-like Protein 2</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PINCH	<i>Particularly Interesting New Cys-His Protein</i>
PLOD1	Procolágeno-Lisina,2-Oxoglutarato 5-Dioxigenase 1
PRR	Papilomatose Respiratória Recorrente
PTEN	Homólogo de Tensina e Fosfatase
qRT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RAF	<i>MAP kinase kinase kinase coding gene</i>
RCL	Alça Central de Reatividade
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
SA	Sinal de Ancoramento

SCC	Carcinoma de Células Escamosas
SDS	Software de Detecção de Sequência
SEA	Proteína de Ouriço do Mar, Enteropeptidase e Agrina
Ser	Serina
SERPIN	Inibidor de Serino Protease
SLC	Família Carregadora de Solutos
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SPINK5	<i>Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5</i>
SPRR	Proteína Pequena Rica em Prolina
TGFB	Fator de Transformação de Crescimento β
TGFBR	Receptor do Fator de Transformação de Crescimento β
TGM	Transglutaminase
TMPRSS	Serino Protease Transmembrana
TMPRSS11A	Serino Protease Transmembrana 11A
TN	Tecido Normal
TP	Tumor Primário
TP63	Proteína Tumoral p63
TPA	12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato
TTSP	Serino Protease Transmembrana
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WT	Selvagem para o gene
ZBTB	Família de Fatores Transcricionais

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. Carcinoma de Células Escamosas.....	01
1.2. Câncer de Cabeça e Pescoço.....	02
1.3. As Serino Proteases Transmembrana (TTSP).....	04
1.4. A TMPRSS11A.....	08
2. Justificativa	10
3. Objetivo	
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. Material e Métodos	
4.1. Modelos animais experimentais.....	12
4.2. Descrição dos grupos experimentais.....	12
4.3. Desafio Carcinogênico.....	13
4.4. Análise de dados de bioinformática para TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC.....	15
4.5. Análises Estatísticas.....	15
5. Resultados	
5.1.A ausência da protease TMPRSS11A atua como “promotor” da tumorigênese em camundongos tratados com DMBA (conhecido iniciador tumoral)	16
5.1.1. Contribuição de TMPRSS11A para a incidência de tumor (iniciação tumoral) em camundongos tratados com DMBA	
5.1.2. Contribuição de TMPRSS11A para a progressão de lesões tumorais em camundongos tratados com DMBA	
5.1.3. Contribuição de TMPRSS11A para o número de lesões tumorais em camundongos tratados com DMBA	
5.2. A ausência da protease TMPRSS11A é dispensável para a carcinogênese quando os camundongos são tratados com o iniciador (DMBA) e promotor (TPA) de tumor.....	20
5.2.1. Contribuição de TMPRSS11A para a incidência tumoral em camundongos tratados com DMBA (iniciador de tumor) + TPA (promotor de tumor)	

5.2.2. Contribuição de TMPRSS11A para a progressão tumoral em camundongos tratados com DMBA (iniciador de tumor) + TPA (promotor de tumor)	
5.3. Os camundongos submetidos à aplicação de somente o promotor tumoral (TPA) ou o solvente dos carcinógenos (Acetona) não desenvolvem lesões de nenhum gênero.....	23
5.4. Em pacientes diagnosticados com HNSCC, a expressão da protease TMPRSS11A está alterada, conforme dados de análise bioinformática.....	25
5.4.1. A expressão do mRNA da protease TMPRSS11A está diminuída em tecidos de tumor primário (HNSCC) quando comparados a tecidos normais	
5.4.2. Análise de envolvimento de <i>TMPPRSS11A</i> em processos celulares através da associação com outros genes	
5.4.3. Alterações de metilação em sítios promotores de TMPRSS11A	
6. Discussão.....	32
7. Conclusão.....	36
8. Referências.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma de Células Escamosas

Carcinoma de Células Escamosas (SCC) é uma classe de câncer que se desenvolve em tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado ou não queratinizado. Os órgãos envolvidos neste tipo de neoplasia maligna incluem: cabeça e pescoço, pulmão, cérvix, ânus, vagina, pele, entre outros⁽¹⁾. A partir desses sítios anatômicos, existem quatro tipos de SCCs majoritariamente desenvolvidos: câncer de pele não-melanoma, câncer de cabeça e pescoço, câncer de esôfago e câncer de pulmão de células não-pequenas⁽²⁾. Os fatores etiológicos associados a este tipo de câncer são inúmeros como, por exemplo, o HPV, a exposição a raios ultravioletas, os medicamentos imunossupressores, o tabaco, o álcool e as alterações hormonais⁽³⁾. Atualmente, a prevenção para esta neoplasia fundamenta-se na promoção de cuidados básicos com a saúde, como abstenção do fumo, utilização de protetores solares, controle do consumo de bebidas alcoólicas, proteção sexual, prática de exercícios, boa nutrição, entre outras condutas; além de campanhas de saúde pública para o diagnóstico precoce⁽⁴⁾.

O SCC na maioria das vezes é assintomático, porém a identificação inicial de características físicas dessa doença permite um diagnóstico precoce, tratamento adequado e uma maior sobrevida, se desenvolvida esta neoplasia maligna. Quando sintomática, a lesão inicial de SCC pode ser identificada conforme o sítio de origem, por exemplo: (i) placas avermelhadas na pele ou mucosa que crescem vagarosamente, associadas a dor, coceiras, irritações, inflamação ou secreções; estas evoluem para feridas de bordas rígidas e elevadas com centro abaulado; (ii) na língua, o tumor formará uma pequena úlcera incapaz de curar e com sangramento intermitente (*Squamous Cell Carcinoma - Causes and Risk Factors – 2014 – <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts> - acesso em: 6 de Agosto*).

Pouco se avançou no sentido do diagnóstico precoce nos últimos 30 anos⁽⁵⁾. Isso se deve ao fato dos mecanismos moleculares e oncogenes envolvidos no SCC serem pouco conhecidos e caracterizados, consequentemente são poucos os biomarcadores de diagnóstico funcionais clinicamente em uso. Além disso, ainda é limitado o número de alvos moleculares favoráveis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas⁽⁵⁾.

As novas estratégias terapêuticas desenvolvidas que almejam atingir alvos moleculares específicos são apresentadas como sendo uma alternativa moderna e personalizada. Mutações

específicas identificadas como indutoras carcinogênicas são alvos para desenvolvimento farmacológico⁽⁶⁾. Entretanto, para pacientes diagnosticados com SCC, até o momento, a terapia básica inclui quimioterapia inespecífica, cirurgias invasivas e radioterapia⁽⁷⁾.

1.2. Câncer de Cabeça e Pescoço

Câncer de Cabeça e Pescoço é o nome dado a um complexo grupo de neoplasias que acometem a região da cabeça e do pescoço, sendo os seguintes sítios anatômicos afetados: (i) cavidade oral, que compreende mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da língua; (ii) faringe, que inclui a orofaringe, a nasofaringe e a hipofaringe; (iii) cavidade nasal e seios paranasais; e (iv) laringe glótica e supraglótica⁽⁸⁾. O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais frequente no mundo, com cerca de 600.000 novos casos por ano⁽⁹⁾. De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de boca, que pertence ao grupo de cânceres que acomete a região da cabeça e pescoço, possui uma incidência de 15.490 mil novos casos por ano, no Brasil⁽⁸⁾.

Clinicamente, o tipo histológico mais frequente é o carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas (HNSCC), correspondendo a aproximadamente 90% dos casos⁽⁹⁾. O principal fator etiológico do HNSCC é o tabaco, geralmente associado ao etilismo⁽¹⁰⁾. Estudos mais recentes demonstram que infecções por HPV estão envolvidas na etiologia de cerca de 25% dos casos desta neoplasia⁽¹¹⁾. Macroscopicamente, o diagnóstico para HNSCC, conforme Barnes em 2005 e Thompson em 2006, se inicia com a avaliação médica da queixa dos pacientes em regiões específicas da cabeça e pescoço; por exemplo, queixas de obstrução, dor e inchaço em regiões dos seios nasais, dificuldade de engolir, dores e inchaço nos linfonodos cervicais, mudanças no tom da voz, perda de paladar ou anosmia (diminuição ou perda absoluta do olfato), dores na orelha interna, maxilar rígido, sangramentos, perda de peso, dores no pescoço ou cabeça, entre outros. Microscopicamente, identificada através de biópsia incisional, a lesão pode ser classificada em: (i) displasia leve, (ii) displasia moderada, (iii) displasia severa e (iv) carcinoma *in situ*⁽¹²⁾.

Os aspectos biológicos moleculares associados ao desenvolvimento dessa doenças, conforme S. Michael Rothenberg e Leif W. Ellisen em 2012, se originam de alterações da homeostase de processos de ativação e inibição de vias de sinalização, associadas a mutações genéticas induzidas ou hereditárias, alterando processos celulares globais essenciais para o funcionamento,

sobrevivência ou morte da célula ou tecido. As alterações essencialmente identificadas no caso de HNSCC são de processos biológicos de (i) diferenciação celular, (ii) sobrevivência celular, (iii) proliferação celular e (iv) capacidade de invasão e metástase⁽¹³⁾. Muitos desses processos são regulados por vias de sinalização precisamente detalhadas na literatura: alguns exemplos são a mutação de p53, sendo em 75% dos casos causada por mutação *missense*, agregado à amplificação de CCND1 ou à regulação negativa de TGFBR2/SMAD4, estando associadas a proliferação celular anormal e desregulação dos processos de morte celular programada^(14, 15); a expressão alterada de TP63 e a inativação de NOTCH1, quando combinados a moléculas do ciclo celular, são referidos à sobrevivência de células tumorais, através do impedimento do bloqueio ou parada do ciclo⁽¹⁶⁾; modelos experimentais de metástase bem sucedida para células HNSCC apresentaram um desequilíbrio entre genes de adesão celular, como a regulação negativa de FAT1, sendo este membro da família de caderinas, e genes promotores de migração celular, como a superexpressão de TGFB1 e a consequente fosforilação e translocação nuclear de SMAD3⁽¹⁷⁾.

Outra relação, não menos importante, da frequência de aparição de câncer na população, até mesmo em pessoas jovens, tem sido relacionada a pacientes HPV positivo. Um estudo publicado em 2005, por Kreimer *et al.*, apresentou que a partir de amostras obtidas de 5.046 pacientes diagnosticados com HNSCC, a prevalência de HPV era de 25% dos casos; a maioria deles para cânceres de orofaringe. Algumas ligações diretas de HPV com tumorigênese podem ser feitas; como é o caso da doença papilomatose respiratória recorrente (PRR); caracterizada pela presença de múltiplos papilomas benignos nas porções medial e inferior do trato respiratório, Larson e Derkay em 2010 mostraram que PRR apesar de relativamente rara, pacientes com essa doença apresentam um estado debilitado e são submetidos a diversos procedimentos cirúrgicos mutilantes, já que os tumores desenvolvidos crescem em tamanho e número, causando obstrução respiratória fatal; os subtipos HPV 6 e 11 já foram associados a essa doença⁽¹⁸⁾.

Finalmente, o tratamento para HNSCC, além de ser agressivo, permanece inalterado nos últimos 50 anos e apenas cerca de 50% dos pacientes sobrevivem por até 5 anos⁽¹⁹⁾. As baixas taxas de sobrevida se devem principalmente ao diagnóstico tardio e à falta de marcadores moleculares para o correto prognóstico^(20, 21, 22). Os tratamentos atuais se baseiam na combinação de radio e quimioterapia, uma forma não-cirúrgica de preservação do órgão, porém em muitos casos pós tratamentos há ocorrência *de novo* do aparecimento do câncer, se não no sítio de

origem, em tecidos secundários, recorrendo inevitavelmente às cirurgias⁽²³⁾. As cirurgias atuais, objetivando a menor invasão possível, avançaram de técnicas mutilantes que submetem o paciente a dor e sofrimento, para técnicas avançadas como endoscopias específico-removedoras, especificamente nesse caso para cânceres de lateral do pescoço e laringe, com possibilidade de cura do paciente e limitando os efeitos adversos⁽²⁴⁾. No entanto, permanece de suma importância aprofundar o conhecimento sobre possíveis marcadores de prognóstico e de novos alvos para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos.

1.3. As Serino Proteases Transmembrana (TTSPII)

Proteases, também denominadas peptidases ou proteinases, são proteínas que possuem função enzimática de hidrolisar cadeias polipeptídicas, através da clivagem de ligações entre resíduos de aminoácidos, promovendo o catabolismo de proteínas alvos⁽²⁵⁾. As proteases podem ser classificadas conforme seu resíduo catalítico alvo, sendo estas portanto: (i) serino proteases, (ii) cisteína proteases, (iii) treonina proteases, (iv) ácido aspártico proteases, (v) ácido glutâmico proteases, (vi) metaloproteinases e (vii) asparagina proteases⁽²⁶⁾. Novas proteases são descritas periodicamente, desde as suas primeiras descrições na década de 50, encontradas em organismos desde procariotos, até eucariotos e vírus. Fisiologicamente, as proteases em plantas apresentam função na regulação do processo de fotossíntese; em bactérias as proteases exercem atividades essencialmente importantes para os ciclos de carbono e nitrogênio⁽²⁷⁾. Em eucariotos, as proteases são subclassificadas em diversas classes e tipos, são encontradas em múltiplos processos biológicos incluindo progressão do ciclo celular, diferenciação e migração celular, morfogênese, remodelamento tecidual, desenvolvimento neuronal, sistema imunológico, cicatrização, angiogênese e apoptose⁽²⁸⁾. As proteases podem ser encontradas na forma ativa como proteínas secretadas, ancoradas à membrana plasmática com seu domínio catalítico voltado intracelularmente (TTSP Tipo I) ou com seu domínio catalítico voltado extracelularmente (TTSP Tipo II)⁽²⁹⁾. Um exemplo específico funcional de protease é a cicatrização tecidual, em que a atividade proteolítica de calicreínas, como KLK5, KLK6 e KLK14, através de ativação de PAR-1 (Receptor ativado por proteinase 1), regulam positivamente processos de migração de queratinócitos através da indução de fosforilação de EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal)⁽³⁰⁾.

A família das serino proteases transmembrana do tipo II (TTSP-II) é composta por enzimas proteolíticas ancoradas à membrana, cuja forma inicial é sintetizada como zimógenos⁽³¹⁾. São divididas em quatro grandes subgrupos familiares: (i) subfamília HAT/DESC que, além de ser a protease em foco desse trabalho, é composta pelas proteases HAT, DESC1, HAT-like2/3/4 e 5; (ii) subfamília Hepsin/TMPRSS, composta por hepsina, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, MSPL, spinesina e enteropeptidase; (iii) subfamília Matriptase, composta pela matriptase, matriptase-2/3 e poliserase-1; e (iv) a subfamília Corina, descrita até o momento como composta por somente uma protease, a corina⁽³²⁾. Todas elas são caracterizadas pela existência de pelo menos dois domínios padrões: os domínios ancorados à membrana plasmática e domínio catalítico serina. A classificação subfamiliar será definida portanto pelo domínio intermediário entre o domínio catalítico C-terminal e o de ancoramento (Figura 1). A subfamília HAT/DESC é composta por um domínio único intermediário denominado *sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin* (SEA), a subfamília Hepsin/TMPRSS de forma geral é composta por dois domínios intermediários denominados receptor de lipoproteína de baixa densidade classe A (LDLA) e Scavenger (a protease enteropeptidase em específico apresenta mais domínios intermediários como *Clis/Clr*, *urchin embryonic growth factor* (CUB) e *meprin/A5 antigen/receptor protein phosphatase mu* (MAM)), a subfamília matriptase é majoritariamente composta pelos domínios intermediários SEA, dois domínios CUB e de três a quatro domínios LDLA (a protease poliserase-1 em específico é composta por três domínios serina e um LDLA), e a subfamília Corina é composta por um domínio Scavenger e três a cinco domínios LDLA alternados com o domínio *Frizzled*⁽³²⁾ (Figura 1).

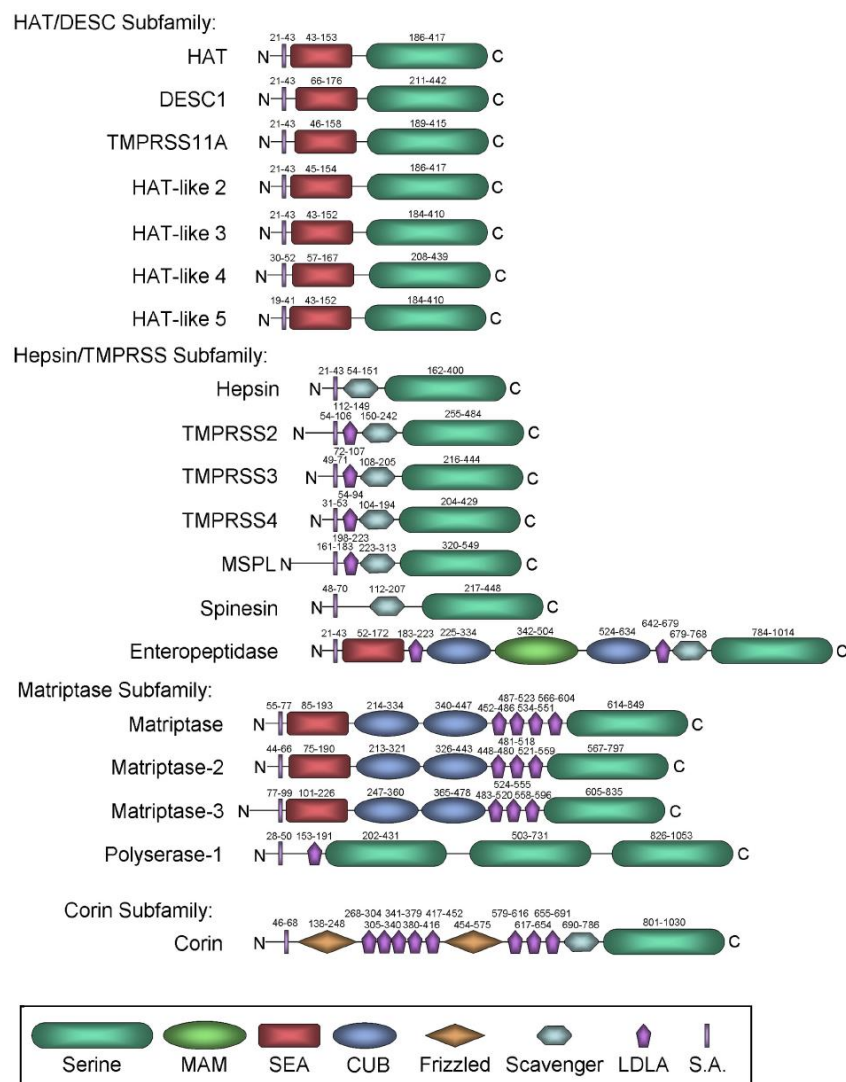


Figura 1. Estrutura das Serino Proteases tipo II. (extraído de: *Minireview: Type II Transmembrane Serine Proteases*. Thomas H. Bugge, 2009). A família de serino proteases transmembrana tipo II é composta por 4 subfamílias denominadas HAT/DESC, Hepsin/TMPRSS, Matriptase e Corina. Estas possuem alguns domínios em comum, como os domínios de ancoramento e serina, que as classificam como integrantes dessa família. Algumas proteases são estritamente descritas em murinos e não em humanos, como Desc4 e Tmprss11c.

A conversão dessas serino proteases zimógenas em proteases ativas é feita por auto-catálise ou hetero-catálise⁽³¹⁾. Para exercer as funções corretamente, a atividade destas deve ser delicadamente regulada. A inibição de atividade catalítica da protease deriva da formação de complexos com inibidores de protease, associados à membrana ou secretados, com a consequente remoção da protease da superfície celular ou através da sua internalização e degradação lisossomal⁽³¹⁾. A atividade das serino proteases e seus reguladores diretos foi descrita em diversos

processos celulares que objetivam a homeostase fisiológica do organismo. Alguns dos processos que podem ser exemplificados são: (i) formação da orelha interna fetal, a partir do mesoderma, na quarta semana de vida, em que pelo menos duas serino proteases participam no desenvolvimento da audição. A serino protease TMPRSS3 foi identificada mutada e consequente causadora da surdez recessiva autossomal infantil, e estudos de indução mutagênica para a serino protease Hepsina foram capazes de desenvolver em modelo murino, defeitos aberrantes na membrana tectorial da cóclea⁽³³⁾; (ii) a protease enteropeptidase estimula a digestão dos alimentos, através da promoção de ativação da enzima tripsina em sua forma ativa, a partir da sua forma não ativa, tripsinogênio⁽³⁴⁾; (iii) Corina, única de sua família, apresenta atividade na regulação da pressão sanguínea corpórea, através da ativação de ANP (hormônio polipeptídeo natriurético atrial) a partir da sua forma inativa, pró-ANP⁽³⁵⁾; e por último, relacionando as proteases a processos regulatórios celulares globais (iv) Matriptase, TMPRSS3 e TMPRSS4 mostraram-se capazes de ativar canais de sódio epitelial sensíveis à amilorida (EnaC), sendo esta regulação essencial para manutenção dos fluidos extracelulares, composição e volume de células epiteliais polarizadas⁽³⁶⁾.

Com relação aos processos de carcinogênese, liderados por modificações de matriz extracelular, desregulação de sinalizações celulares, expressão proteica alterada e indução de inflamação; a alteração na expressão de determinadas serino proteases, como hepsina, TMPRSS2, TMPRSS4 e matriptase está relacionada com a progressão de diferentes tipos de cânceres, não somente epiteliais, como cânceres de mama, cérvix, próstata, coloretal, endometrial, esofageal, gástrico, pancreático, pulmonar, hepático, renal e outros⁽³⁷⁾. A Matriptase é um membro da família recém-descoberta de serino proteases transmembranas tipo II. No processo de indução maligna, em que está envolvida quando superexpressa, há um avanço no estágio clínico-patológico da doença, através da ativação de vias de sinalização como HGF/c-Met, descrita na literatura como promotora de proliferação, motilidade, migração e invasão celular⁽³⁸⁾, e vias de sinalização indutoras de inflamação, como NFκB e PI3K-Akt-mTOR⁽³⁹⁾. Uma segunda serino protease cuja expressão apresenta-se alterada, e está relacionada com a fase de indução de câncer, é a TMPRSS4, pertencente à família Hepsin/TMPRSS, esta serino protease encontra-se superexpressa no câncer de tireoide, sua atividade está envolvida na indução de proliferação celular, e é mediada pela fosforilação de fatores integrantes da via de sinalização de CREB⁽⁴⁰⁾. Há também, na literatura, serino proteases que atuam de forma a suprimir o desenvolvimento de cânceres de diferentes classes, como acontece com as serino proteases

TMPRSS1 e TMPRSS3, onde baixas expressões no nível de RNAm e proteico foram correlacionados a um baixo índice de sobrevivência para pacientes diagnosticados com câncer de mama, porém os processos moleculares envolvidos na possível atividade supressora tumoral, até o momento não foram elucidados⁽⁴¹⁾. Sendo assim, inibidores diretos de serino proteases, como LEKTI, serpinas, HAI-1 e HAI-2, tornam-se importantes alvos de estudo para futuros desenvolvimentos farmacológicos personalizados, para os diagnósticos de câncer cujas alterações se apresentaram em alguma das classes de TTSPs.

1.4. A TMPRSS11A

A TMPRSS11A (também conhecida como DESC-3, ECRG1 e HAT-like 1) é uma serino protease transmembrana do tipo II (TTSP II), pertencente à família recém-descoberta HAT/DESC. É composta por três domínios principais (domínio catalítico, SEA e SA), sendo um deles o domínio transmembrana (domínio SA)⁽¹⁾. A propriedade enzimática da protease se origina em seu domínio catalítico, em que apresenta uma tríade composta por três aminoácidos principais: histidina (His), ácido aspártico (Asp) e serina (Ser)⁽⁴²⁾. Resultados oriundos de RT-PCR mostram que o RNAm desta serino protease está localizado em tecidos epiteliais suscetíveis à carcinogênese como a pele e mucosa oral⁽¹⁾; no entanto, em animais modelo nocaute para a serino protease, esta se mostrou dispensável para o desenvolvimento do animal, onde observaram-se filhotes nascidos saudáveis, peso adquirido pós-nascimento normal e falecimento em idade padrão⁽¹⁾.

Pouco se sabe sobre os aspectos moleculares que envolvem a atividade catalítica de TMPRSS11A. Estudos envolvendo proteases homólogas à TMPRSS11A⁽⁴³⁾, como DESC-1 (codificada pelo gene TMPRSS11E), avaliaram possíveis papéis dessa protease. DESC-1 é uma serino protease transmembrana tipo II, identificada expressa em tecidos como pele (principalmente queratinócitos primários), glândula salivar e órgão reprodutor masculino (epidídimo). Seu gene codificador foi identificado no DNA como *upstream* à sequência genética codificadora da TMPRSS11A, assim como de mais três outras TTSPs, na mesma orientação transcricional. A ativação de DESC-1 é dependente de exposição à tripsina e sua inibição deriva da formação de complexos proteicos com PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio 1) e PCI (inibidor de proteína C), podendo também ser alvo de inibidores serpina. Trata-se de uma glicoproteína que é submetida a processamentos pós-traducionais, apresentando 3 sítios de

glicosilação entre os domínios de ancoramento à membrana (SA) e o domínio catalítico (dois sítios identificados no domínio SEA e o terceiro na ligação bisulfito entre SEA e o domínio catalítico)⁽⁴⁴⁾. Até o momento, a caracterização funcional de DESC-1 mostrou que esta exerce atividade gelatinolítica e caseinolítica, e que em sua cauda N-terminal foram identificados sítios putativos de treonina para fosforilação, podendo exercer atividade em eventos de sinalização intracelular⁽⁴⁵⁾.

Foi atribuído à TMPRSS11A a função de suprimir as fases de iniciação e progressão de câncer de células do esôfago (ESCC)⁽⁴⁶⁾; TMPRSS11A, através do estímulo de atividade do fator transcricional Miz-1, estaria promovendo a regulação positiva de p15INK4b (também conhecido como CDKN2B) e induzindo a parada do ciclo celular. As características celulares de grandes vacúolos, mitocôndria diminuída e membrana nuclear irregular, observadas em células de câncer de esôfago, após indução de expressão de TMPRSS11A, são características de célula em senescência⁽⁴⁶⁾. Estudos mais recentes hipotetizam que a deficiência de sua ação seja devido a uma mutação do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região codificadora da protease, especificamente no éxon 8, no qual o aminoácido da posição 290, Glicina (Gln), é mutado para Arginina (Arg), produzindo as variações Gln290Gln e Arg290Gln⁽⁴⁷⁾. Outras hipóteses a serem testadas e avaliadas são o envolvimento de TMPRSS11A em processos de diferenciação epitelial e proliferação celular, no qual alguns processos celulares como de adesão celular, diferenciação de queratinócitos e organização de matriz extracelular parecem estar alterados, comprometendo uma epitelização tecidual correta, sendo este um fator que contribuiria para o desenvolvimento de carcinomas.

Ainda, a porção catalítica desta enzima está localizada extracelularmente, o que facilita a acessibilidade de drogas à protease⁽¹⁾. TMPRSS11A mostra-se, assim, um importante candidato no desenvolvimento de futuras quimioterapias e provável fator de prognóstico. Assim, o estudo de sua localização tecidual e a correlação desta protease com carcinomas de cabeça e pescoço são fundamentais para o aumento da especificidade farmacológica quimioterápica e consequente melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

O carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) é o sexto câncer mais comum no mundo, e aproximadamente 600.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. Os tratamentos quimioterápicos disponíveis hoje em dia, para o câncer de cabeça e pescoço, são inespecíficos; e a terapia cirúrgica é invasiva e mutilante, com consequente submissão dos pacientes à intensa dor e sofrimento. Desta maneira, novas informações e alvos terapêuticos mais específicos precisam ser desenvolvidos para estas neoplasias a fim de promover melhorias em termos de diagnósticos e tratamentos mais eficazes.

3. Objetivo Geral

O objetivo desse projeto foi estudar o papel de TMPRSS11A no desenvolvimento e progressão de HNSCC e analisar possíveis processos celulares em que TMPRSS11A poderia estar envolvido. A hipótese do projeto aborda se a proteína codificada pelo gene TMPRSS11A possui potencial como supressora tumoral.

3.1. Objetivos Específicos

- Desafio Carcinogênico
 - 23 animais TMPRSS11A WT e 21 animais TMPRSS11A KO desafiados com aplicação de 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA);
 - 10 animais TMPRSS11A WT e 10 animais TMPRSS11A KO desafiados com aplicação de DMBA e 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA);
 - 5 animais TMPRSS11A WT e 5 animais TMPRSS11A desafiados com aplicação de TPA
 - 5 animais TMPRSS11A WT e 5 animais TMPRSS11A desafiados com aplicação de Acetona.
- Análise de dados de bioinformática
 - Avaliação de expressão do gene codificador da proteína TMPRSS11A em amostras de HNSCC;
 - Avaliação de correlação genética e atribuições em processos celulares;
 - Avaliação dos níveis de metilação de TMPRSS11A.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelos animais experimentais

Os animais utilizados foram camundongos da espécie *Mus musculus* (linhagem FVB/N), machos e fêmeas, com idades de 3-4 semanas, pesando de 15-20g. Os camundongos foram obtidos e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os camundongos selvagens (WT) ou nocautes (KO) para TMPRSS11A foram resultantes do cruzamento de animais heterozigotos para expressão de TMPRSS11A. Isto é, animais que carregam apenas um alelo funcional deste gene, sendo denominados TMPRSS11A +/- . A geração dos camundongos nocautes para TMPRSS11A foi descrita em manuscrito previamente publicado⁽¹⁾.

A confirmação dos animais foi feita por genotipagem, que consiste, resumidamente, da extração do DNA proveniente de biópsia da cauda e posterior reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com iniciadores específicos para TMPRSS11A (sequência dos primers: *Forward* para animal selvagem – 5' GCAATTCAAACCTCGCCAATGGAC 3', *Forward* para animal nocaute – 5' GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT 3', *Reverse* para animais selvagem e nocaute – 5' CCCACCGCCATAGTAAAGTGCTCCG 3').

Todos os experimentos executados nesse trabalho, previamente ao início experimental, foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA/FMRP; protocolo n°090/2016).

4.2. Descrição dos grupos experimentais

Os animais utilizados neste estudo foram divididos em grupos de acordo com as diferentes abordagens metodológicas propostas. Todas as aplicações foram iniciadas com 4 semanas de vida.

Para o desafio carcinogênico, os animais foram divididos em grupos de acordo com o genótipo (TMPRSS11A WT ou TMPRSS11A KO) e de acordo com a aplicação do carcinógeno ou solvente controle (DMBA, TPA, DMBA+TPA ou Acetona) utilizado. Os grupos foram compostos por (i) 23 animais WT e 21 animais KO para a protease TMPRSS11A, onde houve indução carcinogênica somente com DMBA; (ii) 10 animais WT e 10 animais KO para a protease

TMPRSS11A, onde houve indução carcinogênica realizada com a combinação de DMBA e TPA; (iii) 5 animais WT e 5 animais KO para a protease TMPRSS11A, onde houve a indução carcinogênica somente com TPA; e (iv) 5 animais WT e 5 animais KO para a protease TMPRSS11A, onde houve a aplicação do solvente dos carcinógenos citados acima, a Acetona. Foram utilizados camundongos *littermates* como controles (total: 84 camundongos).

4.3. Desafio Carcinogênico (modelos murinos de carcinogênese) (Figura 2)

Os camundongos tiveram os pelos da região de aplicação previamente removidos. Os animais do primeiro grupo foram desafiados semanalmente na região do dorso lombar com o iniciador DMBA na concentração de 25µg, até o aparecimento de lesões; os animais do segundo grupo foram desafiados semanalmente com a combinação de 25µg de DMBA e 12µg do promotor TPA⁽⁴⁸⁾ até que lesões evidentes fossem formadas. Foram necessárias 11 aplicações de DMBA⁽⁴⁹⁾ no grupo 1, 11 aplicações da combinação de DMBA (1 aplicação) + TPA (10 aplicações) no grupo 2, 11 aplicações de TPA no grupo 3 e 11 aplicações de Acetona no grupo 4. Os carcinógenos (DMBA e TPA) e a Acetona foram aplicados topicamente em animais previamente anestesiados com 5% de isoflurano (em oxigênio).

As lesões foram medidas semanalmente com o auxílio de um paquímetro. As dimensões avaliadas das lesões foram feitas em diâmetro, no plano coronal do corpo, no sentido horizontal e vertical da lesão. As lesões foram avaliadas quanto a (i) tempo decorrido até a incidência das lesões, (ii) número de lesões, (iii) progressão representativa das lesões e (iv) tamanho das lesões. As lesões foram fotografadas a cada duas semanas, com os animais previamente anestesiados com 5% de isoflurano (em oxigênio).

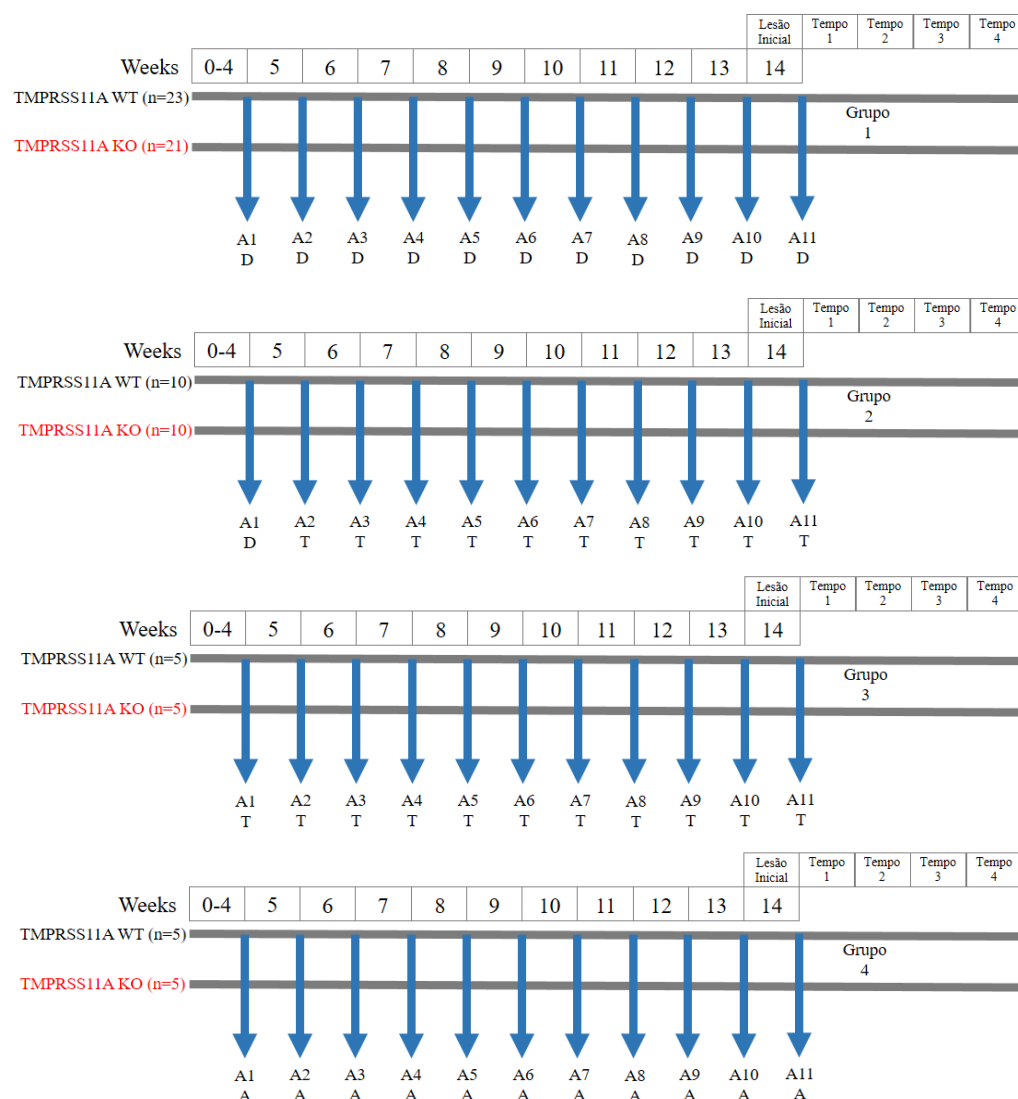


Figura 2. Figura representativa dos grupos experimentais formados (grupos 1, 2, 3 e 4) e seus respectivos desafios carcinogênicos (DMBA - D, DMBA+TPA, TPA - T e Acetona - A). Os animais foram tratados semanalmente por 11 semanas, após 4 semanas de vida, e avaliados semanalmente para Lesão Inicial e Tempos 1, 2, 3 e 4.

4.4. Análise de dados de bioinformática para TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC

Informações obtidas a partir de banco de dados de bioinformática (os principais bancos de dados utilizados foram cBioPortal for Cancer Genomics⁽⁵⁰⁾, DAVID Bioinformatics Resources 6.8⁽⁵¹⁾ e MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data⁽⁵²⁾ (todos os dados computados até o ano de 2017)) foram utilizadas para relacionar, biologicamente e molecularmente, a protease TMPRSS11A com eventos necessários ao desenvolvimento tumoral de câncer de cabeça e pescoço (HNSCC). As análises realizadas foram: (i) expressão da TMPRSS11A em tecido normal (NT) e tecido oriundo de tumor primário (TP) de HNSCCs; (ii) análises de genes, em processos celulares, cuja expressão apresentava-se alterada, positiva ou negativamente, em relação à expressão de TMPRSS11A; e (iii) alteração nos processos de metilação.

4.5. Análises Estatísticas

Os primeiros resultados, correspondentes ao experimento de desafio carcinogênico (Materiais e Métodos, Item 4.3.), foram avaliados inicialmente para teste de normalidade e padrão de distribuição. Os dados não assumiram padrão de normalidade e não assumem distribuição Gaussiana, portanto os resultados foram avaliados através de testes estatísticos não-paramétricos.

Os resultados (i) incidência de lesões, foi analisado através dos testes Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon; (ii) número de lesões, foi analisado através do teste Wilcoxon; (iii) tamanho de lesões, foi analisado através do teste Man-Whitney.

Os últimos resultados, referentes aos dados de bioinformática (Materiais e Métodos, Item 4.4.), foram avaliados através dos testes estatísticos não-paramétrico Spearman e não paramétrico Pearson (os dados atribuídos foram previamente identificados como não detentores de distribuição Gaussiana e padrão de normalidade, pelos próprios bancos de dados). Os genes selecionados possuíam uma significância mínima $p < 0,05$ (*), e as validações experimentais feitas para corroborar as afirmações dos resultados foram através da seleção de genes fortemente correlacionados positivamente ($r > 0.7$ - genes cuja expressão correlacionava-se diretamente com a expressão de TMPRSS11A) e moderadamente correlacionados negativamente ($r < -0.5$ - genes cuja expressão correlacionava-se inversamente com a expressão de TMPRSS11A), conforme atribuição de correlação de Spearman.

5. RESULTADOS

5.1. A ausência da protease TMPRSS11A mimetiza ação de promotor da tumorigênese em camundongos tratados com DMBA (conhecido iniciador tumoral)

5.1.1. Contribuição de TMPRSS11A para a incidência de tumor (iniciação tumoral) em camundongos tratados com DMBA:

Para avaliar a influência de TMPRSS11A sobre a fase de iniciação tumoral, sendo esta sucintamente caracterizada por: (i) ativação metabólica de pró-carcinogênicos e ligação covalente ao DNA; (ii) replicação do material genético e fixação de mutações; e (iii) mutações indutoras de alterações gênicas em células progenitoras, com consequente hiperplasia celular e inflamação tecidual (Erika L. Abel, et al. 2009); foram avaliadas as incidências de lesões, comparando-se o grupo de animais selvagens (WT, controles) e o grupo de animais nocautes (KO) para a protease. As análises foram feitas semanalmente, a partir da última aplicação do carcinógeno no grupo (nocaute ou controle); e o surgimento de lesão foi registrado conforme a idade de vida do animal, em semanas. Os resultados obtidos mostraram que a ausência de TMPRSS11A, nos animais nocautes, contribui para a incidência das lesões. As lesões iniciam-se em tempos semelhantes nos animais WT e KO (entre 16 e 17 semanas de vida), entretanto, aproximadamente 70% dos animais WT desenvolvem tumor, em comparação com 90% dos animais KO. Os resultados até o momento não apresentam significância estatística ($p < 0,0785$), quando se compara os grupos experimentais TMPRSS11A KO e TMPRSS11A WT (Figura 3).

Incidência de Lesões

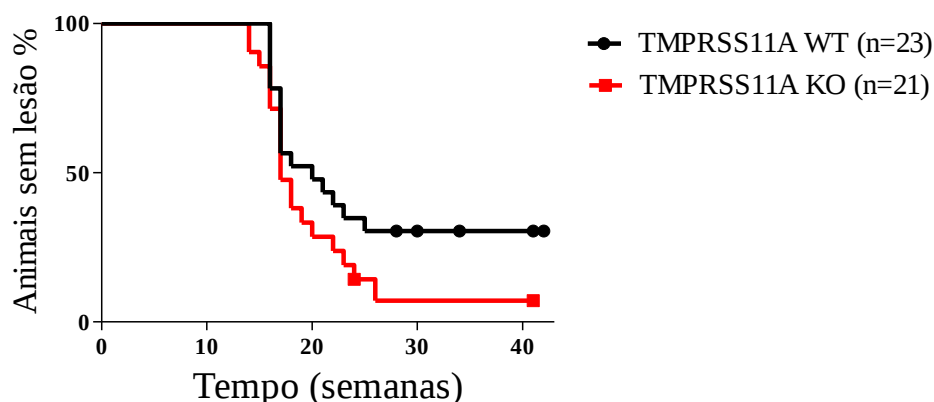


Figura 3. Animais TMPRSS11A KO possuem maior incidência de lesões comparados a animais TMPRSS11A WT. Gráfico apresentando a incidência das lesões nos grupos experimentais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO, tratados com DMBA semanalmente, por 11 sessões. Apesar de haver uma menor incidência tumoral em TMPRSS11A WT, quando comparado ao grupo TMPRSS11A KO, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa (análise estatística Mantel-Cox, $p < 0,0785$).

5.1.2. Contribuição de TMPRSS11A para a progressão de lesões tumorais em camundongos tratados com DMBA:

A partir da observação acima mencionada, de incidência tumoral, avaliamos então a progressão tumoral dependente de TMPRSS11A. A progressão tumoral é descrita como a fase onde as modificações celulares alteram vias de sinalização completas, promovendo ativações constitutivas de genes pró-proliferativos e inibições de genes envolvidos com morte celular. Permite-se, assim, a evolução da ferida formada, em tamanho e agressividade. Os resultados foram obtidos a partir das medições semanais dos tumores desenvolvidos (em milímetros), com o auxílio de um paquímetro (largura x comprimento). A progressão tumoral nesse resultado pareceu ser dependente, pelo menos em parte, da ausência de expressão da protease TMPRSS11A. Como representado na Figura 4, o painel à esquerda representa o início da formação de lesão; painéis centrais e à direita representam a progressão das lesões, respectivamente, quantificadas a cada duas semanas. Como apreciado nesta figura representativa, houve maior progressão da lesão quando a protease TMPRSS11A estava geneticamente anulada (TMPRSS11A KO).

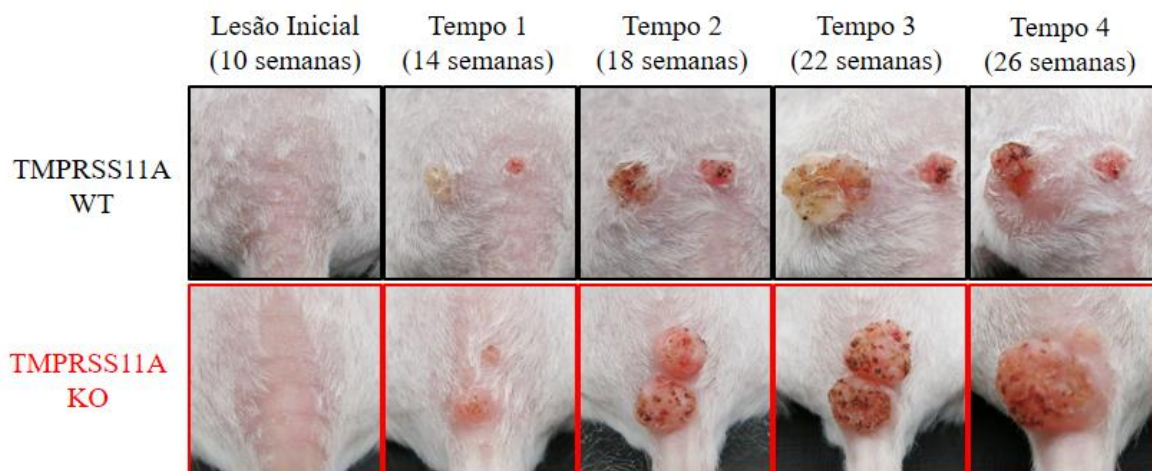


Figura 4. Tumores em animais TMPRSS11A KO progridem mais rapidamente quando comparados aos animais TMPRSS11A WT. Progressão das lesões tumorais, figura representativa. Coluna à esquerda representa o início da lesão após o término da aplicação de DMBA (décima semana após o início da aplicação de DMBA); painéis centrais e à direita representam a progressão das lesões, nestes casos, décima-quarta, décima-oitava, vigésima-segunda e vigésima-sexta semanas após o início da aplicação de DMBA. Houve maior progressão da lesão quando a protease TMPRSS11A estava geneticamente anulada (TMPRSS11A KO).

Ainda, como mostrado na Figura 5, observou-se o aumento progressivo em 57% dos tumores, nos camundongos nocautes (tons de vermelho no gráfico) para a protease. Por outro lado, o desenvolvimento dos tumores nos camundongos selvagens (tons de cinza no gráfico) apresentou-se majoritariamente estagnado (35% do total de animais de mesmo genótipo), com a eventual regressão em 4 casos (17%). Algumas observações a serem consideradas nos levam à hipótese de que em alguns casos há outras vias de sinalização independentes de TMPRSS11A: (i) progressão tumoral de animais do grupo experimental TMPRSS11A WT que alcançaram o tamanho de 15-20mm (0,09%) e; (ii) a regressão tumoral total após a última aplicação de DMBA, de animais do grupo experimental TMPRSS11A KO (0,1%).

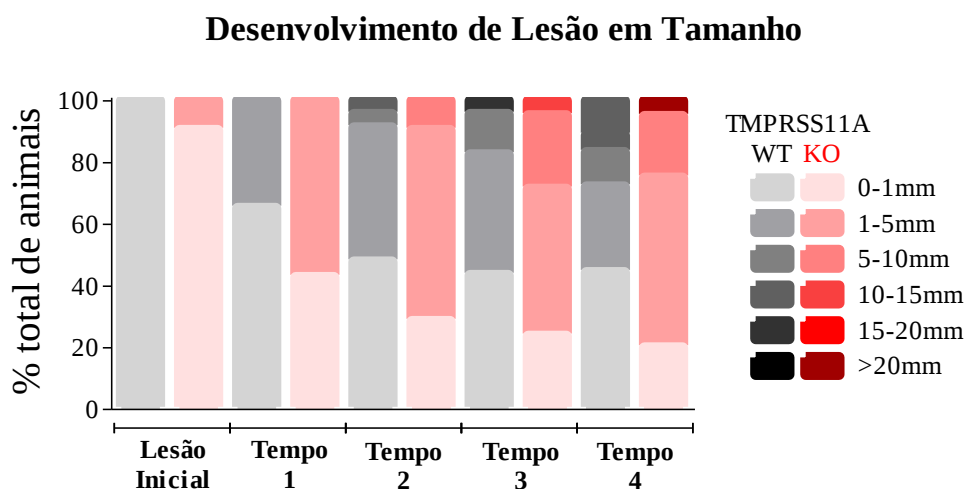


Figura 5. Animais TMPRSS11A KO possuem lesões com progressão mais acelerada, quando comparados aos animais TMPRSS11A WT. Progressão das lesões tumorais, com a quantificação dos tamanhos das lesões por animal. Barras nas quais os tons escurecem para a cor preto representam o desenvolvimento dos tumores dos animais selvagens para a protease estudada (TMPRSS11A WT); barras nas quais os tons escurecem para a cor vermelha representam o desenvolvimento dos tumores dos animais nocautes para a protease estudada (TMPRSS11A KO). A medida de 0-1mm representa animais que não possuíram nenhum tumor desenvolvido durante toda a vida ou que em algum momento tiveram seu(s) tumor(es) regredidos. A medida de >20mm representa animais cujos tumores alcançaram o tamanho de 20mm e foram, portanto, eutanasiados (*endpoint* do estudo, no protocolo aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais 090/2016).

5.1.3. Contribuição de TMPRSS11A para o número de lesões tumorais em camundongos tratados com DMBA:

Com o intuito de verificar se existiria uma influência de TMPRSS11A sobre a dispersão tumoral, foram avaliados o número de lesões formados em cada animal de cada grupo experimental. A quantificação foi feita manualmente, através da contagem das lesões macroscópicas observadas. O número de lesões apresentado, por animal, em ambos os grupos experimentais, foi de 1 a 2 em média. Os resultados mostraram que há uma semelhança do número de lesões desenvolvidas, quando comparamos animais TMPRSS11A WT (n=16) e TMPRSS11A KO (n=19). Porém, a relação do número de lesões por camundongo em cada grupo experimental avaliados semanalmente, mostra uma incidência de maior número de lesões em camundongos TMPRSS11A KO quando comparados aos camundongos TMPRSS11A WT, em que até o momento não existe diferença estatística significativa. O início da formação de lesão após o término da aplicação de DMBA (11 semanas de aplicações) é representado no “Lesão inicial” (Figura 6 – Relação à esquerda do gráfico). A progressão da lesão está representada nas “Semanas” (Semana14-Semana26) a partir do início de aplicação do DMBA (Figura 6). Cabe ressaltar que o número de lesões nas semanas apresentadas pode diminuir em quantidade (3 → 2 lesões, 2 → 1 lesão ou 1 → 0 lesão) devido a (i) lesões que estavam próximas e desenvolveram ao ponto de se unirem, correspondendo a uma progressão da lesão ou (ii) lesão que diminuiu e desapareceu, correspondendo a uma regressão da lesão; a interpretação correta originar-se-á da correlação com o resultado 5.1.2., especificamente a Figura 5, pois esta apresenta o tamanho das lesões na progressão das semanas.

Gráfico de dispersão com erro padrão da média (SEM) mostrando o número de lesões macroscópicas por animal ao longo do tempo. O eixo Y representa 'Lesões Macroscópicas/animal' (0 a 3). O eixo X mostra os pontos de avaliação: Lesão Inicial, Tempo 1, Tempo 2, Tempo 3 e Tempo 4. Os dados são representados por pontos pretos e vermelhos, com barras de erro vermelhas. A maioria dos animais apresenta 0 ou 1 lesão, com uma exceção no Tempo 3 onde um animal apresenta 3 lesões.

5.2. A ausência da protease TMPRSS11A é dispensável para a carcinogênese quando os camundongos são tratados com o iniciador (DMBA) e promotor (TPA) de tumor

Avaliando os resultados do grupo 2 (grupo tratado com uma aplicação de DMBA e 10 aplicações de TPA), da mesma forma que foram feitas as análises do grupo 1, é possível afirmar que as aplicações sequenciais do promotor tumoral TPA foram importantes para a formação tumoral em camundongos Tmprss11a WT e Tmprss11a KO. Dentro dos resultados obtidos a incidência (Figura 7) e o número de lesões (Figura 8) não apresentaram diferenças significativas, sendo o início de aparecimento de lesões com 14 semanas de vida e a média de 2 a 3 lesões por animal, independente do genótipo.

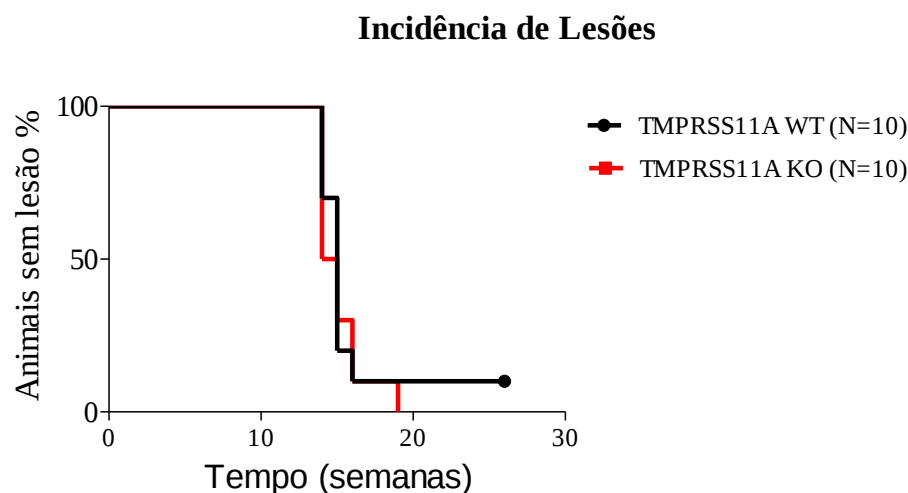


Figura 7. Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO possuem a mesma taxa de incidência de lesões, quando tratados com DMBA+TPA. Gráfico apresentando a incidência das lesões nos grupos experimentais TMPRSS11A WT (linha preta) e TMPRSS11A KO (linha vermelha), tratados com DMBA+TPA semanalmente, por 11 sessões (Análise estatística Mantel-Cox, $p < 0,6302$).

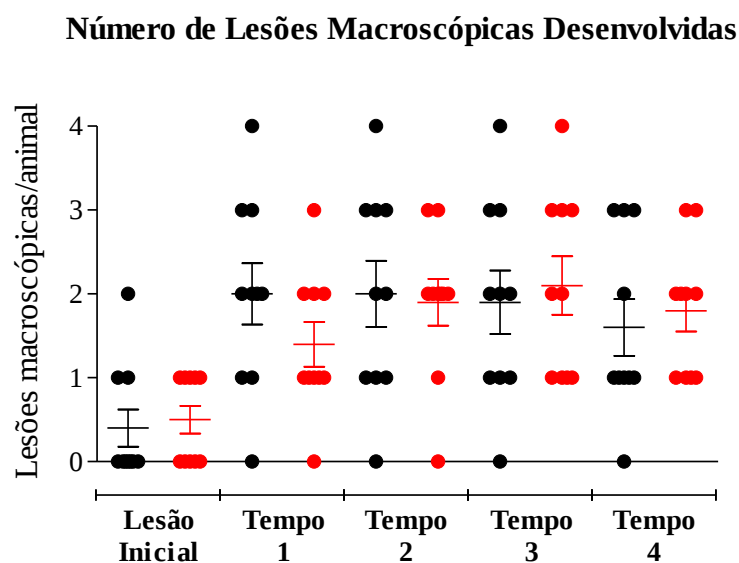


Figura 8. Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO possuem o mesmo número de lesões, quando tratados com DMBA+TPA. Gráfico mostrando o número de lesões por animal nos grupos experimentais TMPRSS11A WT (círculos pretos) e TMPRSS11A KO (círculos vermelhos), após o tratamento com DMBA+TPA, nas fases de lesão inicial e progressão das lesões. Não houve diferença significativa no número de lesões por animal, na relação de comparação entre os grupos experimentais. A média foi de 2 lesões por animal por grupo.

5.2.2. Contribuição de TMPRSS11A para a progressão tumoral em camundongos tratados com DMBA (iniciador de tumor) + TPA (promotor de tumor):

Os animais de ambos os grupos experimentais apresentaram semelhante progressão das lesões tumorais (Figura 9). Em ambos os coortes houveram animais cujos tumores: (i) progrediram constantemente até o final da avaliação; (ii) progrediram até uma determinada semana e depois regrediram; (iii) apareceram como Lesão Inicial e não progrediram. Ainda, apenas um animal (coorte selvagem) não apresentou lesão (Figura 10).

Dados da literatura descrevem que a aplicação experimental de mais de um promotor tumorigênico não confere maior nocividade ao carcinoma em desenvolvimento⁽⁴⁹⁾. Assim, a ausência de diferenças na incidência e progressão das lesões no grupo tratado com DMBA e TPA pode ser explicada pelo fato de somente um promotor (o TPA) ser necessário para a ocorrência e progressão de tumores.

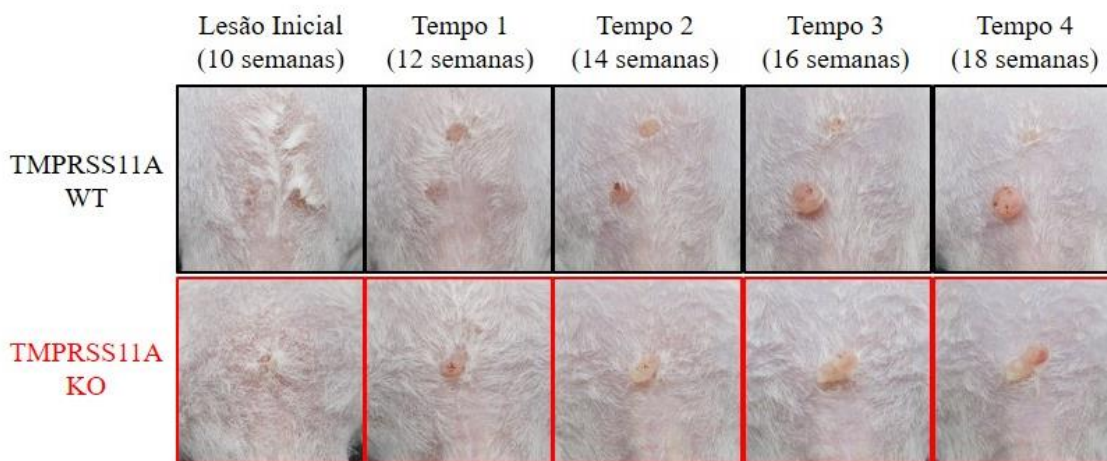


Figura 9. Animais TMPS11A WT e TMPS11A KO apresentam semelhante progressão tumoral. Progressão das lesões tumorais, figura representativa. Coluna à esquerda representa o início da lesão após o término da aplicação de DMBA (décima semana após o início da aplicação de DMBA); painéis centrais e à direita representam a progressão das lesões, nestes casos, décima-segunda, décima-quarta, décima-sexta e décima-oitava semanas após o início da aplicação de DMBA. Não houve diferença nas progressões tumorais dos animais selvagens ou nocauteados para a protease TMPS11A.

Desenvolvimento de Lesão em Tamanho

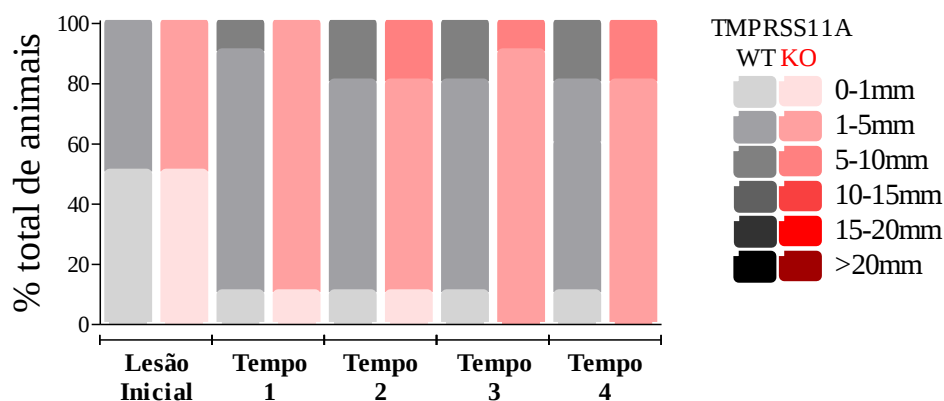


Figura 10. Animais TMPRSS11A WT e TMPRSS11A KO apresentam lesões com progressão semelhante. Progressão das lesões tumorais, através da quantificação dos tamanhos das lesões por animal. Barras cujo tons escurecem para a cor preto representam o desenvolvimento dos tumores dos animais selvagem para a protease estudada (TMPRSS11A WT). Barras cujo tons escurecem para a cor vermelha representam o desenvolvimento dos tumores dos animais nocaute para a protease estudada (TMPRSS11A KO). A medida de 0-1mm representa animais que não possuíram nenhum tumor desenvolvido durante toda a vida ou que em algum momento tiveram seu(s) tumor(es) regredidos. A medida de >20mm representa animais cujos tumores alcançaram o tamanho de 20mm e foram, portanto, eutanasiados (*endpoint* do estudo, no protocolo aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais 090/2016).

5.3. Os camundongos submetidos à aplicação de somente o promotor tumoral (TPA) ou o solvente dos carcinógenos (Acetona) não desenvolvem lesões de nenhum gênero

Grupos controles foram estabelecidos, com a aplicação de TPA e acetona, respectivamente. O grupo controle de animais que foram tratados com o promotor tumoral TPA (grupo 3; verificar itens 4.2 e 4.3 da sessão de Materiais e Métodos) e o grupo controle de animais que foram tratados com a Acetona, o veículo utilizado para a diluição do DMBA e do TPA (grupo 4; verificar itens 4.2 e 4.3 da sessão de Materiais e Métodos) não apresentaram o desenvolvimento de lesões (Figura 11-12).

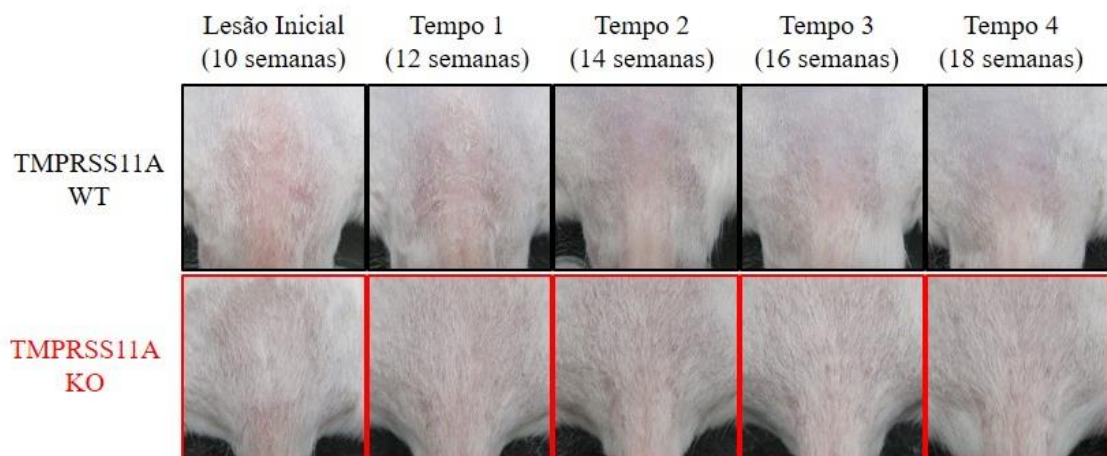


Figura 11. Figura representativa da região do dorso lombar de um animal WT e um animal KO para a protease TMPRSS11A do grupo controle tratado com TPA. Os animais do grupos controle tratados com o promotor tumoral TPA, semanalmente, durante 11 semanas, não apresentaram lesões de característica tumorais em nenhuma fase da vida, até o Tempo 4, onde possuíam 18 semanas de vida após a finalização das aplicações.

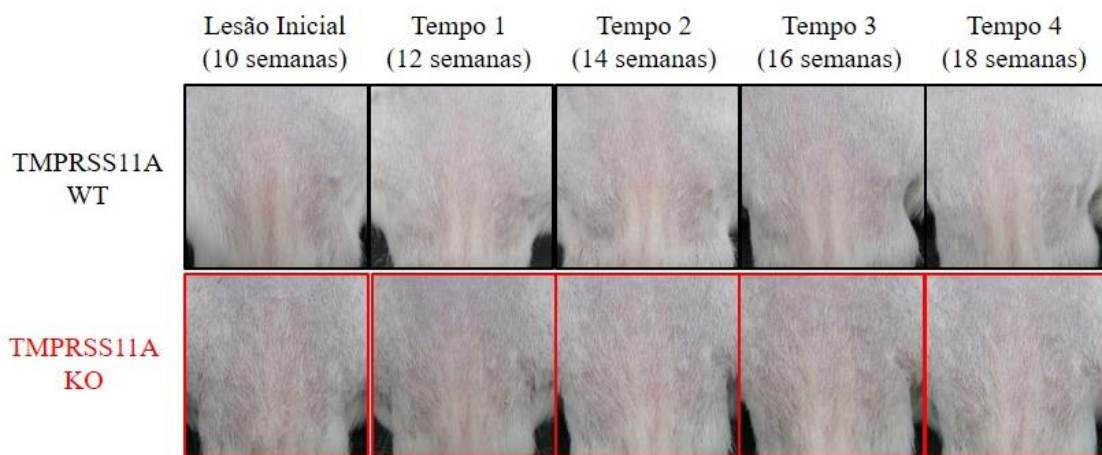


Figura 12. Figura representativa da região do dorso lombar de um animal WT e um animal KO para a protease TMPRSS11A do grupo controle tratado com acetona. Os animais do grupos controle tratados com o solvente Acetona, semanalmente, durante 11 semanas, não apresentaram lesões de característica tumorais em nenhuma fase da vida, até o Tempo 4, onde possuíam 18 semanas de vida após a finalização das aplicações.

5.4. Em pacientes diagnosticados com HNSCC, a expressão da protease TMPRSS11A está alterada, conforme dados preliminares de análise bioinformática

De maneira a aprofundar o entendimento sobre as alterações de TMPRSS11A no HNSCC, utilizamos dados de bioinformática que nos permitiram estudar preliminarmente biópsias humanas. De forma mais específica, a bioinformática nos possibilitou estudar um número grande de casos que, de outra forma, seriam laboriosos e de difícil execução. Ainda, os resultados aqui descritos são preliminares e complementares àqueles obtidos com os modelos murinos.

5.4.1. A expressão do mRNA da protease TMPRSS11A está diminuída em tecidos de tumor primário (HNSCC) quando comparados aos tecidos normais:

Conforme pode ser observado na Figura 13, a expressão do RNAm de TMPRSS11A encontra-se alterada em pacientes com HNSCC. A análise comparativa foi feita através de amostras de tecido normal (TN) e tumor primário (TP). A expressão do RNAm de TMPRSS11A, em 522 amostras de tumor primário, apresentou uma média de expressão no valor de 6,97 RSEM. Esta expressão foi 38% menor do que a média de expressão das 44 amostras de tecidos normais, no valor de 11,3 RSEM. A protease TMPRSS11A apresentou, portanto, diminuição dos níveis de RNAm nas amostras tumorais (dados: FireBrowse, 2017).

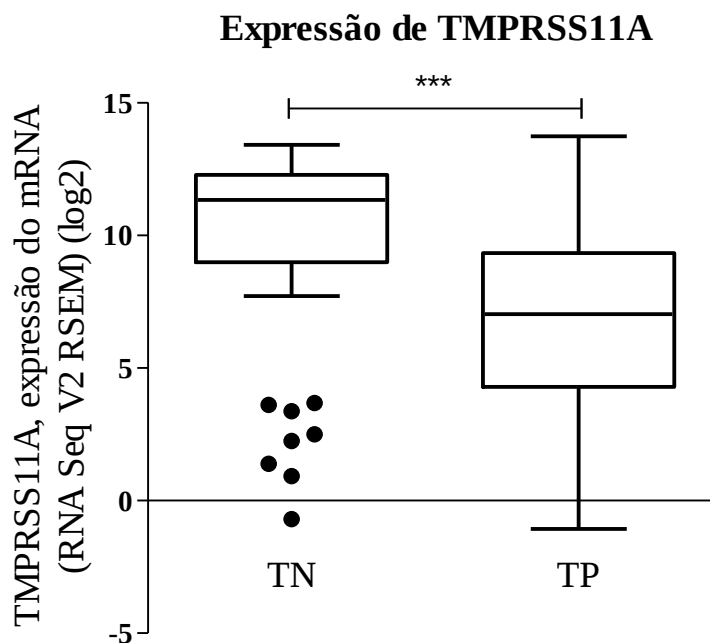


Figura 13. Níveis de expressão do mRNA de TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC. As amostras dos pacientes foram avaliadas para níveis de expressão do mRNA de TMPRSS11A. As amostras foram classificadas em tecido normal (TN; n=44) e tumor primário (TP; n=522) (Teste Man-Whitney, $p < 0,001$). Os pontos pretos nas amostras de tecido normal são estatisticamente classificados como *outliers*.

5.4.2. Análise de envolvimento de TMPRSS11A em processos celulares através da associação com outros genes:

Adicionalmente, relacionamos possíveis processos celulares onde a TMPRSS11A pode ter papel regulatório. Os processos celulares avaliados foram: Processos Biológicos, Categoria Funcional, Vias de Sinalização e Componentes Celulares. Encontramos a modulação dos seguintes genes (i) positivamente correlacionados ($p > 0,38$; cinza): SPINK5, SPRR1/2/3, CLDN8/7/4/17, TMPRSS11B/F/D, TMPRSS2/4, ATP13A4, FUT6, KRT13, CYP2C18, CEACAM5/7, ZBTB7B/C; e (ii) negativamente correlacionados ($p < -0,32$; vermelho): SERPINE1, LGALS1, SLC39A13, ILK, PDLIM7, PHC2, PLOD1, FSTL3, CD151, VEGFB/C. A modulação destes genes acontece possivelmente de forma associada ao TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC (Figura 14-17) (dados: CBioPortal e DAVID Bioinformatics Resources, 2017).

O primeiro parâmetro avaliado se refere aos processos biológicos possivelmente regulados pela protease TMPRSS11A. Este resultado foi obtido através do agrupamento de genes cujas funções são atribuídas aos processos apresentados na Figura 14. Os processos biológicos significativamente envolvidos foram, de maneira genérica, classificados como: adesão célula-célula, organização da matriz celular, desenvolvimento da epiderme, diferenciação epitelial celular, regulação positiva de sinalização PKB, cicatrização, diferenciação de queratinócitos, adesão célula-matriz e queratinização (Figura 14). Os processos foram selecionados não somente por significância estatística ($p < 0,05$) como também pela determinação de um limite mínimo de 10 genes cuja expressão encontrou-se correlacionada com a expressão de TMPRSS11A. O resultado apresentou uma correlação positiva entre a expressão da protease e os genes SPINK5, SPRR3 e CECAM5, e apresentou também uma correlação negativa de expressão com o gene ILK.

Processos Biológicos - Genes mais correlacionados (HNSCC)

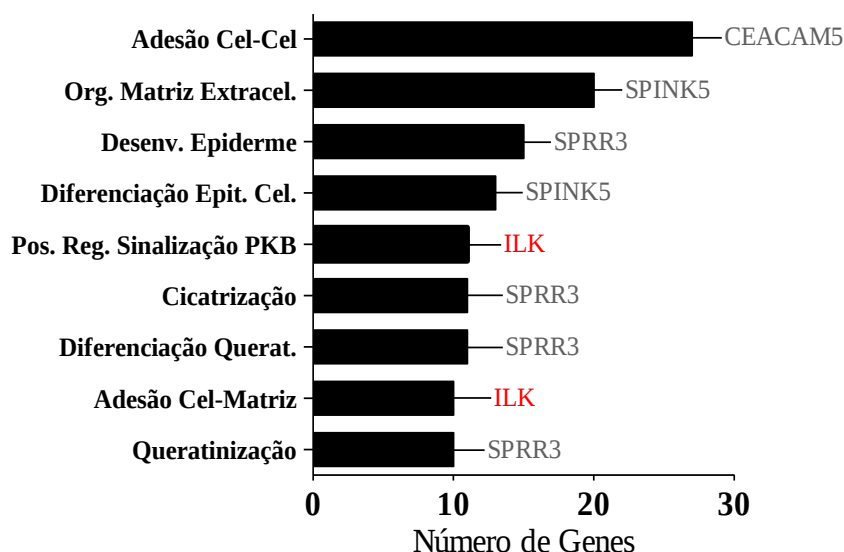


Figura 14. Processos biológicos em que TMPRSS11A pode estar atuando, em pacientes diagnosticados com HNSCC. Genes cuja expressão se apresentaram estatisticamente correlacionados com a expressão de TMPRSS11A foram analisados para processos biológicos enriquecidos associados (Spearman-Score $1 < \rho < -1$). Encontramos a modulação dos seguintes genes; positivamente correlacionados ($\rho > 0,38$; cinza) com a expressão de TMPRSS11A: SPINK5, CEACAM5, SPRR3; e negativamente correlacionados ($\rho < -0,32$; vermelho) com a expressão de TMPRSS11A: ILK.

O segundo parâmetro avaliado foi a categoria funcional geneticamente relacionada à protease TMPRSS11A. A categoria funcional determina, preliminarmente, possíveis classes de substratos que, de maneira direta ou indireta, se relacionam à via de sinalização de TMPRSS11A. As categorias funcionais, ou classes de substratos, relacionados à expressão de TMPRSS11A foram: hidrolase, lipoproteína, supressor tumoral, serino protease, simporte e inibidor de protease (Figura 15). As correlações genéticas positivas mostradas nesse resultado foram dos genes CEACAM5/7, ZBTB7B/C, TMPRSS11B/F/D, TMPRSS2/4, ATP13A4 e SPINK5. Os genes correlacionados negativamente foram CD151, SLC39A13, SERPINE1, SERPINB11/12/13.

Categoria Funcional - Genes mais correlacionados (HNSCC)

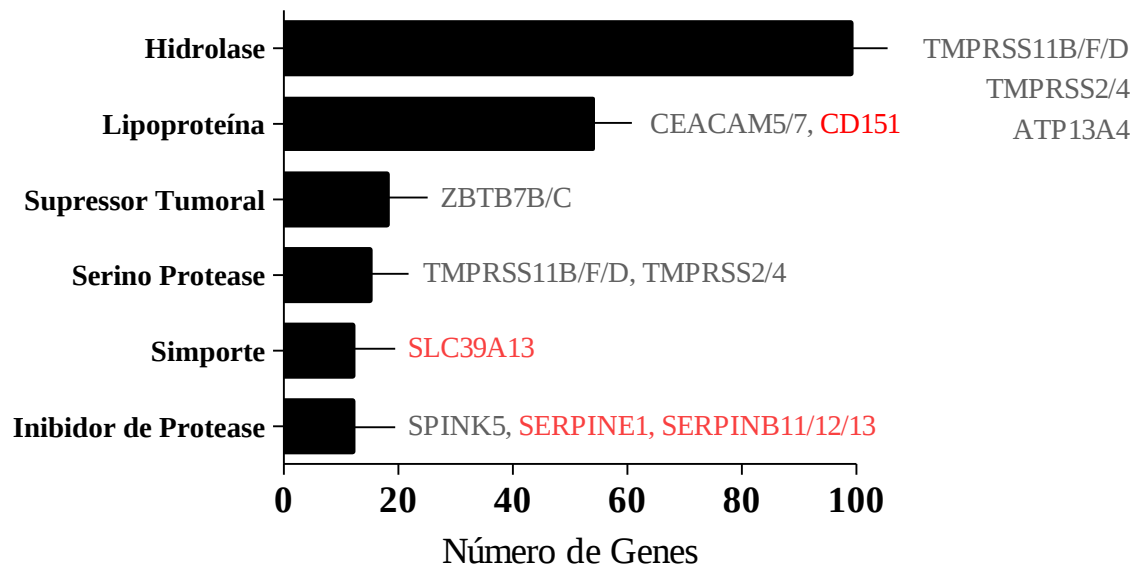


Figura 15. Categoria Funcional em que TMPRSS11A poderia ser classificada, em pacientes diagnosticados com HNSCC. Genes cuja expressão se apresentaram estatisticamente correlacionados com a expressão de TMPRSS11A foram analisados para suas categorias funcionais associadas (Spearman-Score $1 < p < -1$). Encontramos a modulação dos seguintes genes; positivamente correlacionados ($p > 0,38$; cinza) com a expressão de TMPRSS11A: CEACAM5/7, TMPRSS11B/F/D, TMPRSS2/4, ATP13A4, ZBTB7B/C SPINK5; e negativamente correlacionados ($p < -0,32$; vermelho) com a expressão de TMPRSS11A: CD151, SLC39A13, SERPINE1, SERPINB11/12/13.

O terceiro parâmetro analisado objetivou avaliar as possíveis vias de sinalização que estariam regulando a protease em estudo ou que estariam sendo reguladas por TMPRSS11A. As vias de sinalização que se apresentaram significativamente envolvidas foram vias relacionadas à adesão focal (vias de VEGFB/C e ILK), vias mediadas por atividade de proteoglicanos no processo carcinogênico (vias de MAPK12 e MAPK13), via de sinalização de Rap1 (vias de VEGFB/C e MAPK12 e MAPK13) e vias de metabolização de carcinógenos químicos (via de CYP2C18) (Figura 16). Aqui, os genes MAPK13 e CYP2C18 demonstraram uma expressão positiva correlacionada com a expressão de TMPRSS11A, enquanto os genes VEGFB/C, ILK e MAPK12 exibiram uma correlação negativa.

Vias de Sinalização - Genes mais correlacionados (HNSCC)

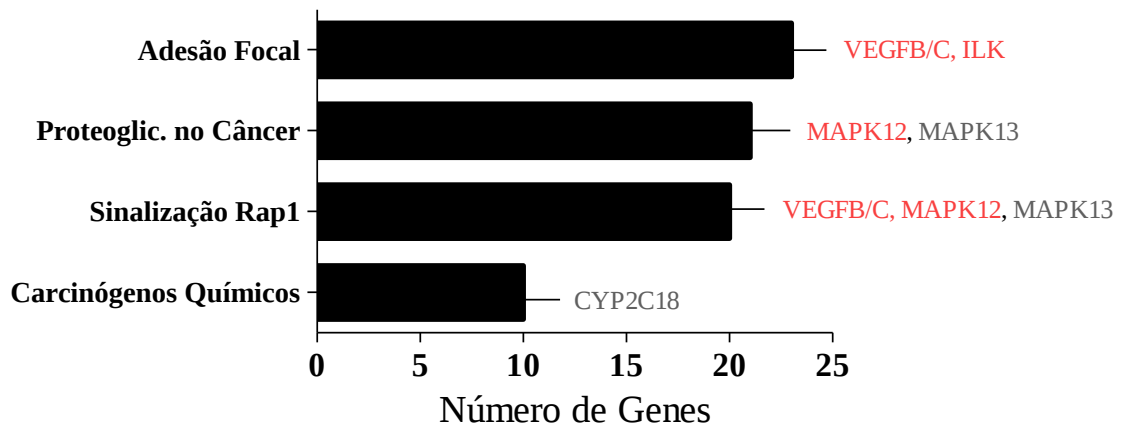


Figura 16. Vias de Sinalização que TMPRSS11A poderia regular ou estar sob regulação, em pacientes diagnosticados com HNSCC. Genes cuja expressão se apresentaram estatisticamente correlacionados com a expressão de TMPRSS11A foram analisados para categorias funcionais associadas (Spearman-Score $1 < \rho < -1$). Encontramos a modulação dos seguintes genes: positivamente correlacionados ($\rho < 0,38$; cinza) CYP2C18, MAPK13; e negativamente correlacionados ($\rho < -0,32$; vermelho) com a expressão de TMPRSS11A: ILK, VEGFB/C, MAPK12.

O quarto e último parâmetro apresenta quais dos possíveis componentes das células, integrantes dos processos biológicos celulares, poderiam estar direta ou indiretamente associados à protease TMPRSS11A. O resultado apresentou alteração em genes, que codificam majoritariamente proteínas de membrana, relacionados aos componentes celulares de adesão focal, matriz extracelular, junção célula-célula e envelope cornificado (Figura 17). Os genes cuja expressão se correlacionam positivamente com a expressão de TMPRSS11A são SPRR3 e TGM1. Os genes cuja expressão acontece de maneira inversa, ou seja, correlacionados negativamente, são LGALS1, CD151 e ILK. Os genes aqui modulados foram: (i) CD151 codifica uma tetraspanina (família de proteínas caracterizadas por seus quatro domínios transmembrana) de superfície celular, (ii) ILK, gene que codifica uma quinase de integrina (receptor transmembranar), e se liga ao domínio citoplasmático destas integrinas (iii) LGALS1, gene que codifica uma galectina encontrada não somente na superfície celular, como no espaço extracelular, citoplasma e núcleo, (iv) gene que codifica a proteína SPRR3, que faz parte do complexo de diferenciação epidermal (EDC), e que somente é descrito em membranas de envelopes cornificados e (v) gene que codifica a transglutaminase TGM1, uma proteína de membrana celular encontrada em queratinócitos.

Componentes Celulares - Genes mais correlacionados (HNSCC)

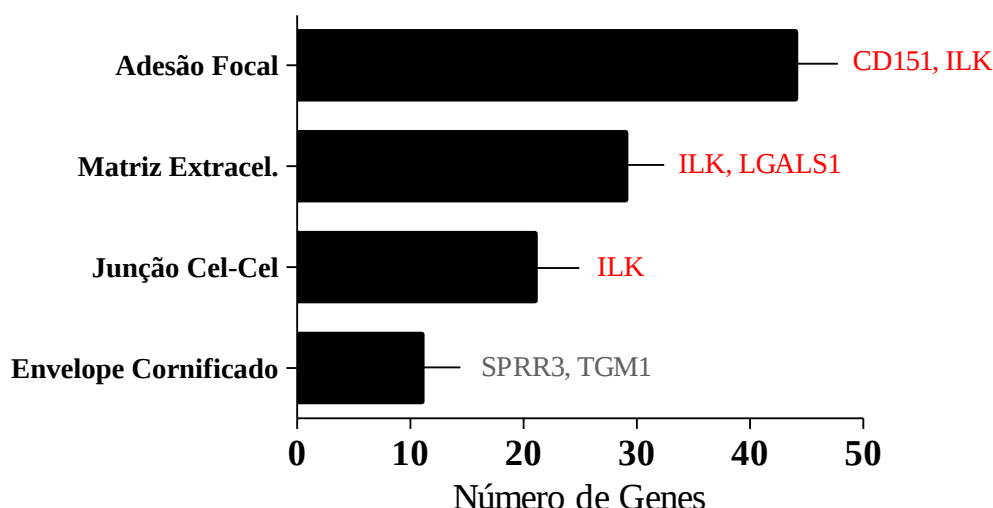


Figura 17. Componentes Celulares que TMPRSS11A poderia estar associado, em pacientes diagnosticados com HNSCC. Genes cuja expressão se apresentaram estatisticamente correlacionados com a expressão de TMPRSS11A foram analisados para categorias funcionais associadas (Spearman-Score $1 < p < -1$). Encontramos a modulação dos seguintes genes; positivamente correlacionados ($p > 0,38$; cinza) com a expressão de TMPRSS11A: SPRR3, TGM1; e negativamente correlacionados ($p < -0,32$; vermelho) com a expressão de TMPRSS11A: LGALS1, CD151, ILK.

5.4.3. Alterações de metilação em sítios promotores de TMPRSS11A:

Os resultados de bioinformática mostraram que os níveis de metilação do gene de TMPRSS11A se apresentaram alterados em pacientes diagnosticados com HNSCC. Pôde-se observar que a taxa de metilação foi inversamente proporcional à expressão de TMPRSS11A. Esta correlação inversa determina que a metilação diminui quando os níveis de expressão de TMPRSS11A aumentam e vice-versa. Portanto, ambos os resultados, obtidos de correlação próximos aos valores de -0,5 e -0,6, determinaram este dado como moderado e inversamente significativo (Figura 18A). Os sítios-alvos de metilação significativamente alterados foram identificados como sendo regiões promotoras do gene, como mostrado na Figura 18B. O teste estatístico de correlação de Pearson determinou que uma região promotora apresentou correlação direta de metilação com a taxa de expressão de TMPRSS11A de maneira suavemente significativa ($r = +0.204$) e uma segunda região promotora apresentou correlação inversamente proporcional de metilação e expressão de TMPRSS11A, de maneira moderadamente significativa ($r = -0.610$) (dados: CBioPortal e Mexpress, 2017).

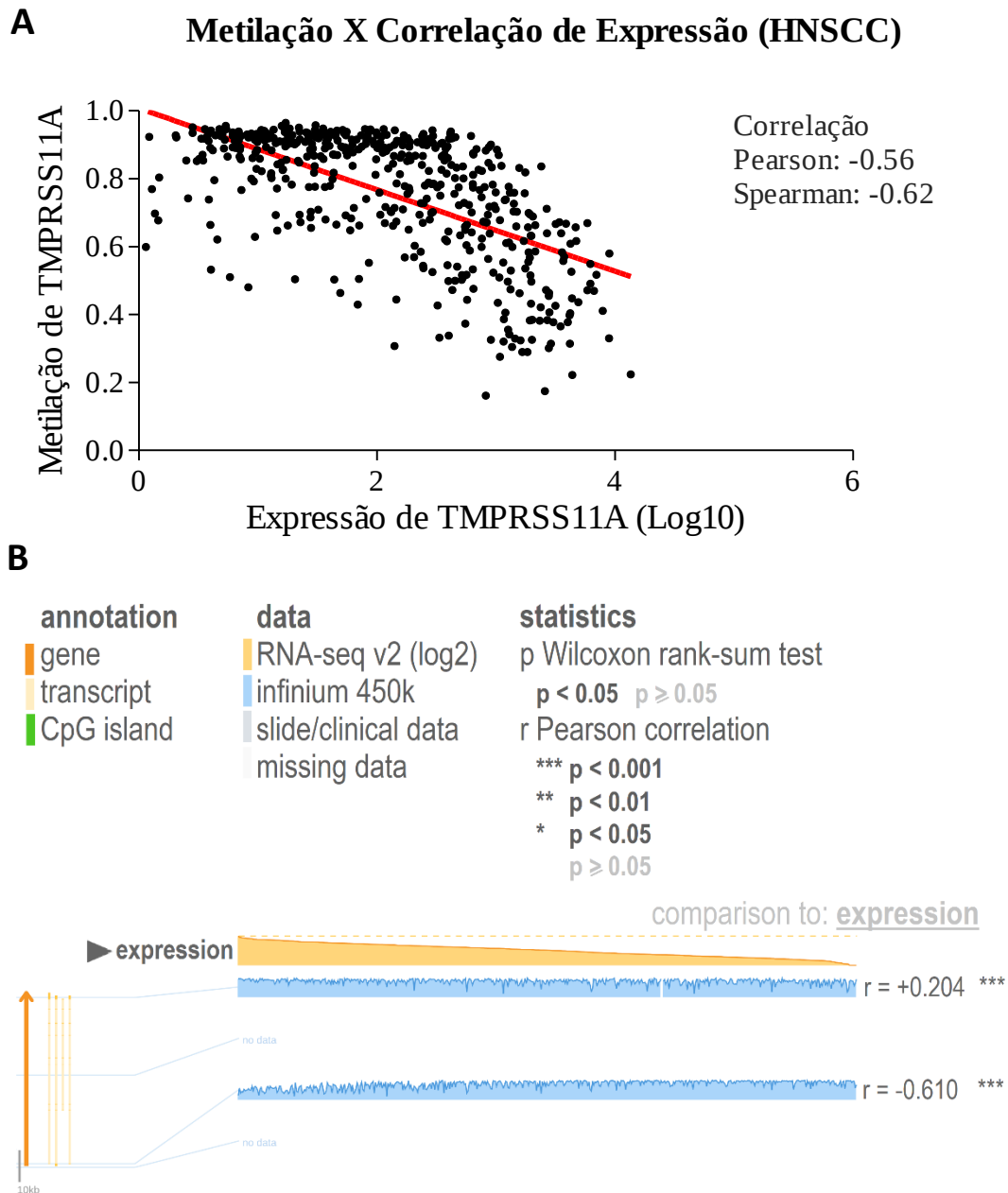


Figura 18. Níveis de metilação do gene TMPRSS11A em pacientes diagnosticados com HNSCC. A taxa de metilação se apresenta inversamente proporcional à taxa de expressão de TMPRSS11A de maneira moderadamente significativa (A). Possível região alvo de metilação do gene TMPRSS11A, mostra regiões promotoras com correlação direta e suavemente significativa e correlação inversa e moderadamente significativa em relação a taxa de metilação (B) (Spearman-Score $1 < \rho < -1$, Pearson correlation $1 < r < -1$).

6. DISCUSSÃO

Neste projeto de iniciação científica estudamos o papel da serino protease TMPRSS11A na carcinogênese, em especial, nos HNSCCs. Para tal, foram utilizadas duas abordagens: (1) desafio carcinogênico de camundongos selvagens (WT) e nocautes (KO) para TMPRSS11A; e (2) análise por bioinformática de alterações na expressão de RNA mensageiro de TMPRSS11A e outros genes relacionados em amostras provenientes de pacientes diagnosticados com HNSCCs.

Os resultados obtidos à partir dos experimentos de indução carcinogênica, com a aplicação sequencial do indutor tumoral DMBA, revelaram que a presença da protease TMPRSS11A parece atuar de forma protetiva diminuindo a incidência e progressão dos tumores. Esses resultados nos levam a concluir que a ausência da protease TMPRSS11A, nos animais nocautes, parece atuar como promotor tumoral. Em outras palavras, a protease TMPRSS11A trabalha como um supressor tumoral, na carcinogênese. A incidência e progressão de lesões, em animais selvagens, nos leva a considerar que outras vias de sinalização estão sendo ativadas, de forma independente de TMPRSS11A⁽²¹⁾.

Por outro lado, quando a indução tumoral foi promovida pela aplicação do indutor tumoral (DMBA) seguida da aplicação sequencial do promotor tumoral (TPA), tanto a incidência quanto a progressão das lesões não apresentaram diferenças significativas entre os animais nocaute e selvagem para a protease. Estes dados mostraram, como esperado, que o TPA atua como um promotor mais robusto quando comparado à atividade promotora que acontece em resposta à ausência da protease TMPRSS11A⁽⁵³⁾.

A análise por bioinformática da expressão de RNA mensageiro de TMPRSS11A em amostras provenientes de pacientes diagnosticados com HNSCCs revelou que a protease TMPRSS11A está diminuída em tecidos de tumor primário (HNSCC) quando comparados aos tecidos normais. Esses dados corroboram com os resultados acima obtidos, nos experimentos de desafio carcinogênico, e evidenciam o papel protetivo desempenhado pela protease no carcinoma de células escamosas.

Em 2008, estudou-se 102 pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de esôfago, e foi mostrado que a quantidade e o tipo de polimorfismo, para o gene TMPRSS11A, influenciava na taxa de sobrevivência dos pacientes⁽⁵⁴⁾. Desta forma, em busca de alterações na expressão de TMPRSS11A e genes relacionados, realizamos análises de bioinformática. Os

resultados desta análise, ainda que preliminares, revelaram correlações positivas e negativas destes genes em relação à expressão de TMPRSS11A, em diversos processos celulares considerados *hallmarks* no câncer.

Os dados de bioinformática foram explorados, analisados estatisticamente e categorizados em: (1) processos biológicos; (2) categorias funcionais; (3) vias de sinalização; e (4) componentes celulares. Por fim, a metilação do gene TMPRSS11A foi cuidadosamente estudada qualitativa e quantitativamente.

Quanto aos processos biológicos, a relação funcional de muitas das proteínas codificadas pelos genes correlacionados, envolve diferenciação terminal de células escamosas (SPRR3, SPINK5, KRT13), um processo necessário para a manutenção do epitélio como barreira protetiva. Células do estrato basal da pele (células especializadas na renovação epitelial através da proliferação celular) iniciam um processo de diferenciação terminal, onde atingem diferentes camadas da epiderme, como o estrato espinhoso, granuloso e córneo, e são atribuídas funções protetivas para o tecido, em relação à influências ambientais como danos físicos, infecções, radiações UV e perda de calor, sais e líquido corporal (Cooper GM., 2000). Outros genes identificados estão envolvidos com processos de adesão celular (KRT13, CEACAM5, PDLIM7, FSTL3, CD151), sendo adesão célula-célula, adesão focal, junções oclusivas e aderentes, alguns exemplos dos processos possivelmente desregulados no câncer⁽⁵⁵⁾. Portanto, dentre as alterações celulares potencialmente indutoras de câncer, no modelo de HNSCC, a correta epitelização, dependente da união célula-célula para formação da barreira epitelial, pode estar associada a regulação negativa de TMPRSS11A.

Os resultados obtidos pela análise da categoria funcional dos genes correlacionados à TMPRSS11A indicam uma possível relação da protease à processos de supressão tumoral. A categoria funcional de supressão tumoral, entretanto, não apresentou correlação genética de genes fortemente correlacionados com TMPRSS11A (Correlação de Spearman - vide Materiais e Métodos, Itens 4.4. e 4.6.). Relação plausível de se analisar é a aquela entre TMPRSS11A e ZBTB7C, que é um gene codificador de uma proteína *zinc-finger* reguladora de transcrição gênica, conhecida por possuir uma provável atividade supressora tumoral (Reuter S., 1998). O simporte, outro processo encontrado em nossas análises, é classificado como o transporte de moléculas e íons através da membrana de células epiteliais, onde os componentes são transportados unidirecionalmente para o meio extracelular ou o meio citoplasmático⁽⁵⁶⁾. O correto

gradiente de concentração iônico entre o meio intra e extracelular é essencial para a ativação de cascatas de vias de sinalização intracelulares, que acontecem a partir da membrana celular. Já o complexo celular formado pelas *tight junctions* é essencial para a manutenção tecidual contra perda de sais e líquidos. Um conjunto de genes da família de proteínas carregadoras de soluto (*Solute Carrier Family*) apresentaram correlação de expressão significativamente alterada com a expressão de TMPRSS11A. Mais especificamente, dezesseis membros apresentaram correlação direta e sete membros apresentaram correlação inversa de expressão (nem todos os genes aqui mencionados apresentaram correlação forte de Spearman), corroborando para a atividade previamente descrita de serino proteases em ativação de canais iônicos, como canais de sódio sensíveis à amilorida⁽³⁶⁾ e por consequência, para a estabilização das *tight junctions* no selamento da epiderme (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al, 2000). Por último, dados encontrados na categoria de inibidores de protease apresentaram uma correlação significativa de expressão genética entre a família serpina de inibidores e o gene TMPRSS11A. Assim como acredita-se que ocorra com DESC-1 (homóloga de TMPRSS11A)⁽⁴³⁾, as serpinas possuem uma alça central de reatividade (*reactive centre loop*, *RCL*) e, quando esta alça se encontra na forma relaxada (forma ativa), ela interage com o domínio catalítico das serino proteases e promove a clivagem deste segmento, que é liberado no citoplasma de maneira complexada com o inibidor⁽⁵⁷⁾. A atividade das serpinas são essenciais na regulação funcional das proteases em processos de inflamação, complementação e câncer (Mohammad Sazzad Khan, 2011).

Quanto às vias de sinalização, as análises de bioinformática revelaram correlações positivas e negativas com genes ativados ou inibidos nos seguintes processos: adesão focal, proteoglicanos envolvidos no processo carcinogênico, sinalização de Rap1 e carcinógenos químicos. A via de sinalização Rap1 apresentou genes cuja correlação de expressão estão alterados em HNSCC. Rap1 é uma GTP-ase que pertence à família de Ras, localizada na membrana plasmática. Acredita-se que sua função em promover adesão celular é mediada por integrinas e dependente de um citoesqueleto intacto. Um dos fatores responsáveis pela regulação da sinalização mediada por Rap1 é o fator de crescimento epidermal, EGF (Johannes L. Bos., *Review*, 2001). Não somente a adesão celular como outras funções são também atribuídas à sinalização de Rap1, dentre elas os processos de exocitose (e liberação de AMP cíclico), associação com citocromo b e atividade de fagossomos, regulação intracelular de níveis de cálcio através da inibição de ATPases, e proliferação celular. Além disso, estudos demonstraram que a superexpressão de Rap1

induz carcinogênese celular^(58, 59, 60, 61). Ainda, onze diferentes membros da família de citocromo P apresentam a expressão de seus genes codificadores positivamente correlacionados com a expressão de TMPRSS11A. Essa família é responsável pela monoxigenação de proteínas e transformação de xenobióticos lipofílicos em hidrossolúveis, sendo este um processo de metabolização de fármacos em uma situação homeostática, em que são passíveis de eliminação pelo organismo após a aquisição por processos de ingestão, inalação, absorção e outros⁽⁶²⁾. Portanto, a inibição funcional da protease poderia estar agindo de maneira a impedir a eliminação de agentes carcinogênicos, como citados durante a introdução, e o acúmulo exponencial destes no organismo induziriam a transformação maligna das células (Rodriguez Antona C., 2006). Entretanto, estuda-se a possibilidade de membros da família de citocromo P não agirem como anti-câncer quando funcionalmente estimulados a metabolizar as drogas submetidas aos pacientes diagnosticados, mas alternativamente agirem como potenciais oncogenes⁽⁶³⁾.

Na categoria de componentes celulares, nossas análises mostraram correlação positiva com algumas proteínas que compõe o envelope cornificado: locrinas, queratinas, filagrinas, involucrinas, pequenas proteínas ricas em prolina (SPRRs) e aminoácidos. O envelope consiste formalmente de moléculas de queratina (KRT13/4) anexadas à proteínas insolúveis que estão ligadas às transglutaminases (TGs) e envolvidas por um envelope lipídico^(64, 65). O envelope cornificado possui a função de repor a membrana plasmática de queratinócitos em diferenciação, sendo assim integrante do processo de queratinização epitelial, processo no qual atribui ao epitélio estabilidade estrutural, elasticidade, resistência mecânica e reposição de líquidos^(66, 67). As transglutaminases (TGM1/3) citadas são responsáveis pela catalisação de ligações isopeptídicas estáveis dentro da formação do envelope cornificado, assumindo uma característica de resistência e insolubilidade⁽⁶⁸⁾. O envolvimento de proteases na diferenciação epitelial, tais como elafina, hupina, maspina, PAI-1 e PAI-2 são essenciais no processo de formação do envelope cornificado, devido ao fato de assumirem pelo menos três diferentes funções: (i) processamento proteolítico de precursores de envelope cornificado antes da formação deste, (ii) a perda de núcleo e mitocôndria requer processamento proteolítico, e (iii) descamação requer a proteólise de corneodesmossomos. Além de que a ligação de substratos (como filagrina) mediada por TGs requer ativação desta previamente, por clivagem (Eleonora Candi, Rainer Schmidtand Gerry Melino, 2005). Com isso, existe a possibilidade de TMPRSS11A atuar em algumas das atividades proteolíticas descritas acima.

Outro aspecto analisado por bioinformática foram os níveis de metilação do gene TMPRSS11A. Observou-se que taxa de metilação do gene TMPRSS11A está aumentada em pacientes diagnosticados com HNSCC e foi inversamente proporcional à expressão de TMPRSS11A. A metilação é o processo de adição de um grupo metila à substratos alvos, como por exemplo o DNA. Quando o DNA é metilado (sendo possível somente a metilação de duas das quatro bases nitrogenadas existentes, citosina e adenina), principalmente em regiões promotoras de codificação genética, ocorre o que denomina-se de repressão transcricional. A metilação é essencial para o normal desenvolvimento embrionário de seres procariotos e eucariotos, e está associada a processos chaves incluindo fenômenos epigenéticos como a inativação do cromossomo X, repressão de transposon, envelhecimento, diferenciação celular e carcinogênese (Theresa Phillips, 2008) ^(69, 70). Regiões promotoras conhecidas como ilhas CpGs são regiões do genoma onde os dinucleotídeos citosina e guanina encontram-se agrupados, são frequentes regiões-alvo para processos de metilação, assim fazendo com que a transcrição dos genes seja inibida. Quando associado ao câncer estas regiões geralmente correspondem às regiões de codificação de genes supressores de tumor, genes responsáveis pela parada do ciclo celular, morte celular, inflamação e sinalização imunológica⁽⁷¹⁾. Esse dado corrobora um possível papel da TMPRSS11A na supressão tumoral.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a protease TMPRSS11A pode exercer uma função de gene supressor de tumor em carcinogênese de células escamosas. A iniciação e a progressão do carcinoma de células escamosas aumentou em animais nocaute para TMPRSS11A quando comparados aos animais selvagens. A expressão diminuída de TMPRSS11A foi correlacionada com a presença de tumor primário HNSCC em pacientes humanos e, ainda com relação aos dados analisados de bioinformática, TMPRSS11A foi identificada como moduladora de diferentes processos celulares essenciais para carcinogênese. Finalmente, estes resultados se mostram pioneiros e de grande importância, contudo, ainda são preliminares. As direções futuras serão: (i) o coorte de animais selvagens e nocautes, desafiados com DMBA, será aumentado; e (ii) dados de bioinformática garimpados e analisados, neste estudo, serão validados por RT-PCR e western blotting.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WUSHENG YAN, et al. Squamous Cell Carcinoma – similarities and differences among anatomical sites. *Am J Cancer Res*. 2011; 1(3): 275–300.
2. HEIDEI S. ERICKSON and IGNACIO I. WISTUBA. Pathology of Lung Cancer. In *Lung Cancer: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management*. Edited by Kemp Kernstine MD, Ph.D., Karen Reckamp, M.D., M.S, and Charles Thomas, J.R., M.D. New York, NY: Demos Medical, Inc.; 2010.
3. Squamous Cell Carcinoma – Causes and Risk Factors. (<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/squamous-cell-carcinoma/scc-causes-and-risk-factors>). 2017.
4. Smoking, Sun, Vaccines (<http://www.aicr.org/reduce-your-cancer-risk/smoking-and-other-lifestyle-factors/smoking-sun-vaccines.html>)
5. AGADA FO, Patmore H, Alhamarneh O, Stafford ND, Greenman J. Genetic profile of head and neck squamous cell carcinoma: clinical implications. *J Laryngol Otol*. 2009;123:266–272.
6. GOLD KA, et al. New Strategies in Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Identification of Tumor Drivers to Personalize Therapy. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 1; 18(11): 3002–3007.
7. EARLE AS., et al. Treatment of oral squamous cell carcinoma with simultaneous chemotherapy and radiation: results and surgical implications. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990 Apr;48(4):367-72.
8. JUCIMARA COLOMBO, Paula Rahal. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_55/v02/pdf/11_revisao_literatura2.pdf>. Acesso em 16 de jun. 2016.
9. CHATURVEDI, A. K. et al. Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 36, p. 4550–4559, 2013.
10. MAO, L., HONG, W.K., PAPADIMITRAKOPOULOU, V.A. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*, 5 (4) (2004), pp. 311–316.
11. GYPSYAMBER D’Souza, Amanda Dempsey. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3287051/>>. Acesso em 16 de jun. 2016.

12. CRISSMAN JD., et al. Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol.* 1989;13 Suppl 1:5-16.
13. MARK A. FEITELSON, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology* 35 (2015) S25–S54.
14. SMEETS SJ, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene.* 2006;25(17):2558–2564.
15. QIU W, SCHONLEBEN F, LI X, SU GH. Disruption of transforming growth factor beta–Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer Lett.* 2007;245(1–2):163–170.
16. YUGAWA T, HANDA K, NARISAWA-Saito M, OHNO S, FUJITA M, KIYONO T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (10): 3732-3742.
17. WANG D, SONG H, EVANS JA, LANG JC, SCHULLER DE, WEGHORST CM. Mutation and down regulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis.* 1997;18(11):2285–2290.
18. GYPSYAMBER D' SOUZAA and AMANDA DEMPSEY. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med.* 2011 October 1; 53.
19. FORASTIERE, A. et al. Head and neck cancer. *N Engl J. Med,* 345 (26) (2001), pp. 1890–1900.
20. MOLINOLO, A. et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol,* 45(4-5) (2009), pp. 324-34.
21. LIST, K. et al. Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. *Genes Dev.* 2005 Aug 15;19(16):1934-50.
22. SZABO R, Rasmussen AL, Moyer AB, Kosa P, Schafer JM, Molinolo AA, Gutkind JS, Bugge TH. c-Met-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase. *Oncogene,* 30(17) (2011), pp.2003-16.
23. DAVID M. COGNETTI, et al. Head and Neck Cancer: An Evolving Treatment Paradigm. *Cancer.* 2008 Oct 1; 113(7 0): 1911–1932.
24. SNYDERMAN CH, et al. Endoscopic skull base surgery: principles of endonasal oncological surgery. *J SurgOncol.* 2008;97:658–664.

25. DAVID CLARK NANETTE PAZDERNIK. Book - Biotechnology 2nd Edition. Academic Cell. p850, 25th June 2015.
26. KOHEI ODA (2012). "New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases". Journal of Biochemistry. 151 (1): 13–25. PMID 22016395. doi:10.1093/jb/mvr129.
27. ZELISKO A and JACKOWSKI, G (October 2004). "Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoid membrane-bound protease". Journal of plant physiology. 161 (10): 1157–70.
28. LOPEZ-OTIN C, BOND JS. J. Biol. Chem. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. (Epub Ahead of print July 23, 2008). doi:10.1074/jbc.R800035200.
29. SAJAL CHAKRABORTI NARANJAN S. DHALLA. Proteases in Physiology and Pathology. Springer, 14 de set de 2017 - 619 pages.
30. JULIE CHAO, et al. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. Biol. Chem., Vol. 391, pp. 345–355, April 2010.
31. ROMAN SZABO and THOMAS H. BUGGE. Membrane-Anchored Serine Proteases in Vertebrate Cell and Developmental Biology. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011 November 10; 27: 213–235. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154247.
32. THOMAS H. BUGGE, et al. Type II Transmembrane Serine Proteases. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 35, pp. 23177–23181, August 28, 2009.
33. DONGYAN FAN, et al. Identification of a Novel Homozygous Mutation, TMPRSS3: c.535G>A, in a Tibetan Family with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. PLoS ONE 9(12): e114136. doi:10.1371/journal.pone.0114136.
34. WEI WANG, et al. Corin Variant Associated with Hypertension and Cardiac Hypertrophy Exhibits Impaired Zymogen Activation and Natriuretic Peptide Processing Activity. Circ Res. 2008 August 29; 103(5): 502–508.
35. J WANG, et al. The Involvement of Corin in the Progression of Diabetic Erectile Dysfunction in a Rat Model by Down-Regulating ANP /NO/cGMP Signal Pathway. J Cell Biochem 118 (8), 2325-2332. 2017 Apr 25.
36. MICHEL GUIPONNI, et al. The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. Human Molecular Genetics, Volume 11, Issue 23, 1 November 2002, Pages 2829–2836.

37. ANDREW S. MURRAY, et al. Type II Transmembrane serine proteases as potential targets for cancer therapy. *Biological Chemistry*. p, 1437-4315
38. SHAWNA LESLIE ORGAN, et al. An overview of the c-Met signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov; 3(1 Suppl): S7–S19.
39. SALES KU, et al. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. *Oncogene*. 2015 Jan 15; 34(3): 346–356.
40. GUAN H, et al. Transmembrane protease serine 4 promotes thyroid cancer proliferation via CREB phosphorylation. *Thyroid*. 2015 Jan;25(1):85-94. doi: 10.1089/thy.2014.0155.
41. PELKONEN M. et al. Low Expression of hepsin and TMPRSS3 are associated with poor breast cancer survival. *BMC Cancer*. 2015 May 27;15:431. doi: 10.1186/s12885-015-1440-5.
42. SABHA RASOOL, et al. ECRG1 and Its Relationship with Esophageal Cancer: A Brief Review. *Onkologie*. March 18, 2013. 36:213–216.
43. LANG JC, SCHULLER DE. Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*. 2001;84:237–243.
44. RAWLINGS, N.D., and BARRET, A.J. (1994) *Methods Enzymol*. 244, 19 – 61.
45. JOHN P. HOBSON, et al. Mouse DESC1 Is Located within a Cluster of Seven DESC1-like Genes and Encodes a Type II Transmembrane Serine Protease That Forms Serpin Inhibitory Complexes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 279, No. 45, pp. 46981–46994, 2004.
46. NIANXI ZHAO. Induction of G1 Cell Cycle Arrest and P15INK4b Expression by ECRG1 Through Interaction With Miz-1. *Journal of Cellular Biochemistry*. 92 (2004), pp. 65-76.
47. YUANYUAN LI. Identification of a novel polymorphism Arg290Gln of esophageal cancer related gene 1 (ECGR1) and its related risk to esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 27 (2006), pp. 798-802.
48. ERIN, M. et al. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews*. v.7, p. 281-294, 2007.
49. VITALE-CROSS, L. et al. Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-targeted prevention and treatment of oral cancer. *Cancer Prevention Research*, v. 2, n. 5, p. 419–422, 2009.
50. cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/index.do>)

51. DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)
52. MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data (<http://mexpress.be/>)
53. ERIKA L. ABEL, JOE M. ANGEL, KAORU KIGUCHI and JOHN DIGIOVANNI. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc.* 2009; 4(9): 1350–1362. doi:10.1038/nprot.2009.120.
54. KAI BACHMANN et al., Polymorphism Arg290Arg in Esophageal-Cancer-Related Gene 1 (ECRG1) is a Prognostic Factor for Survival in Esophageal Cancer. *J Gastrointest Surg* (2009) 13:181–187.
55. MEI CHUNG MOH and SHALI SHEN. The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration. *Landes Bioscience. Cell Adhesion & Migration* 3:4, 334-336; 2009.
56. LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL., et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. Section 15.6 Cotransport by Symporters and Antiporters. New York: W. H. Freeman; 2000.
57. A. J. HORVATH, et al. The murine orthologue of human antichymotrypsin: a structural paradigm for clade A3 serpins. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 52, pp. 43168–43178. 2005.
58. OZAKI, N. et al. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature Cell Biol.* 2, 805–811
59. QIU, W., ZHUANG, S., von LINTIG, F. C., BOSS, G. R. & PILZ, R. B. Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 31921–31929 (2000).
60. LACABARATZ-PORRET, C. et al. Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology. *Biochem. J.* 332, 173–181 (1998)
61. ALTSCHULER, D. L. & RIBEIRO-NETO, F. Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23; 95(13): 7475–7479.
62. ANDERSON JOSÉ GONZAGA LEMOS et al. Interferência no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromo P450. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v.7, n.2, Pub.3, Abril 2014.

63. GIBSON P., et al. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) is overexpressed in human colon adenocarcinomas relative to normal colon: implications for drug development. *Mol Cancer Ther.* 2003 Jun;2(6):527-34.
64. MICHEL, S., SCHMIDT, R., SHROOT, B. & REICHERT, U. Morphological and biochemical characterization of the cornified envelopes from human epidermal keratinocytes of different origin. *J. Invest. Dermatol.* 91, 11–15 (1988).
65. KALININ, A. E., KAJAVA, A. V. & STEINERT, P. M. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24, 789–800 (2002).
66. STEVEN, A. C. & STEINERT, P. M. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* 107, 693–700 (1994).
67. KALININ, A., MAREKOV, L. N. & STEINERT, P. M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. CellSci.* 114, 3069–3070 (2001).
68. LORAND, L. & GRAHAM, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140–156 (2003).
69. SINHA P, BAHADUR S, THAKAR A, MATTA A, MACHA M, RALHAN RG, et al. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck* 2009; 31(11):1423-30.
70. TAGHAVI N, et al. p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10:138.
71. OLIVEIRA NFP, Planello AC, Andia DC, Pardo APS. Metilação de DNA e Câncer. Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2010; 56(4): 493-499, 2010.