



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Patrícia Matos Biselli Chicote

**Expressão de isoformas do gene *VEGF*
e de proteínas reguladoras de *splicing* em
carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio preto para obtenção do
Título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto

2011

Patrícia Matos Biselli Chicote

Expressão de isoformas do gene *VEGF* e de
proteínas reguladoras de *splicing* em carcinoma
espinocelular de cabeça e pescoço

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto

2011

Biselli-Chicote, Patrícia Matos

Expressão de isoformas do gene *VEGF* e de proteínas reguladoras de *splicing* em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço/ Patrícia Matos Biselli Chicote

São José do Rio Preto, 2011.

81 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertollo

1. Câncer de cabeça e pescoço; 2. Neovascularização patológica; 3. Fator de crescimento endotelial vascular; 4. Splicing alternativo

PATRÍCIA MATOS BISELLI CHICOTE

**Expressão de isoformas do gene VEGF e de
proteínas reguladoras de *splicing* em carcinoma
espinocelular de cabeça e pescoço**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Eny Maria
Goloni Bertollo

2º Examinador: Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini

3º Examinador: Adriano Mondine

4º Examinador: Érika Cristina Pavarino

5º Examinador: André Lopes Carvalho

Suplentes: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva

São José do Rio Preto, 17/11/2011.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	10
2. Casuística e Métodos.....	11
2.1. Casuística.....	12
2.2. Classificação dos tumores malignos (TNM).....	14
2.3. Análises moleculares.....	17
3. Resultados.....	30
4. Discussão.....	52
5. Conclusões.....	63
6. Referências Bibliográficas.....	65
7. Anexos.....	79
Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	80
Anexo II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81

Dedicatória

Ao meu amado filho Gustavo

Dedico a você todo o meu esforço e minha luta. É por você que busco ser uma pessoa melhor. Te amo muito.

Ao meu marido Leandro

Pela compreensão e companheirismo. Obrigada por respeitar meus sonhos e ajudar a torná-los possíveis. Te amo.

Aos meus pais Sandra e João Hélio

Consegui graças a vocês, que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos. Muito obrigada pelo amor, apoio e esforço. Amo muito vocês.

Aos meus avós Edite e Jarbas

Pelo amor e orgulho que sempre demonstraram. Agradeço muito por ter a chance de conviver e aprender com vocês. Amo vocês.

Aos meus avós Yolanda e Otávio

Gostaria que vocês pudessem estar presentes. Dedico também a vocês essa importante conquista. Amo vocês.

À minha irmã Joice

Amiga e companheira de todas as horas. Sua presença é essencial na minha vida.

Muito obrigada pela ajuda e pela força. Amo você.

Aos meus tios, tias e primos

Pelo apoio e incentivo.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertollo

Obrigada pela confiança, pela oportunidade de crescer, pelo apoio e também por ter me ajudado durante todo o processo.

À Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

Obrigada por me acolher e ter me proporcionado a chance de aprender e de realizar o meu sonho. Agradeço muito poder contar sempre com sua ajuda e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva

Pela contribuição para a realização deste projeto.

Ao Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, nas pessoas de Dr. José Francisco de Góis Filho e Dra. Érika Erina Fukuyama

Pela disponibilização de amostras.

Ao Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto

Pela colaboração na coleta das amostras.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Base de São José do Rio Preto

Pela colaboração no processo de microdissecção das amostras.

Aos amigos Rodrigo, Tialfi, Gustavo e Vitor

Pela grande ajuda na execução deste projeto e pela demonstração de amizade.

Aos amigos e pós-graduandos da UPGEM e Bloco U-6

Obrigada pela colaboração e trabalho em equipe.

Ao Diretor Geral Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior

Pelo incentivo e apoio para a consolidação da pesquisa na FAMERP.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP

Pela constante dedicação na manutenção e fortalecimento do curso de pós-graduação da Instituição.

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

Albert Einstein

Lista de figuras

- Figura 1. (A)** Estrutura de éxons do gene *VEGF*. O gene *VEGF* consiste de oito éxons. A seleção do sítio de splicing proximal (PSS) resulta em isoformas da família *VEGF_{xxx}* e a seleção do sítio de splicing distal (DSS) resulta em isoformas da família *VEGF_{xxx}b*. ATG: códon de início; TGA: códon de parada. **(B)** O splicing alternativo de *VEGF* resulta em duas famílias de isoformas que possuem diversas isoformas com números variados de aminoácidos. UTR: região não-traduzida..... 06
- Figura 2.** Gel de agarose 1% para análise de RNA total. M – Marcador de peso molecular de um quilobase. As bandas 18S e 28S correspondem ao RNA ribossômico..... 19
- Figura 3. (A)** Curva Padrão dos genes candidatos a controles endógenos. **(B)** Curva Padrão dos genes alvos. Testes de Extensão Dinâmica..... 23
- Figura 4. A.** Análise realizada pelo Software *Data Assist (Applied Biosystems)* mostrando a estabilidade dos cinco controles endógenos avaliados. **B.** Gráfico mostrando os valores de estabilidade após a exclusão dos dois genes com valores mais elevados de *M*..... 26
- Figura 5.** Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os fragmentos correspondentes às isoformas *VEGF_{xxx}* (colunas 2, 3 e 4), com 74 pares de base, e *VEGF_{xxx}b* (colunas 5, 6 e 7), com 71 pares de base. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pares de base..... 32
- Figura 6.** Expressão de *VEGF_{xxx}* **(A)** e *VEGF_{xxx}b* **(B)** em tumores de cabeça e pescoço em relação aos tecidos normais. Os dados foram

apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 32

Figura 7. Expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). VEGF_{xxx} apresentou mediana de RQ de 1,8 e VEGF_{xxx}b, mediana de RQ de 2,1. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 33

Figura 8. Expressão de VEGF_{xxx} em tumor de cavidade oral (mediana com variação interquartil) (A), faringe (média ±DP) (B) e laringe (média ±DP) (C) em relação às amostras normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 34

Figura 9. Expressão de RNAm de VEGF_{xxx} em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 35

Figura 10. Expressão de VEGF_{xxx}b em tumor de cavidade oral (mediana com variação interquartil) (A), faringe (média ±DP) (B) e laringe (média ±DP) (C) em relação às amostras normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 36

Figura 11. Expressão de RNAm de VEGF_{xxx}b em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 37

Figura 12. Expressão de VEGF_{xxx} em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 38

Figura 13. Expressão de VEGF_{xxx}b em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 38

Figura 14. Expressão de VEGF_{xxx} em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 39

Figura 15. Expressão de VEGF_{xxx}b em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 39

Figura 16. Expressão de RNAm de ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1, em tumores de cabeça em relação aos tecidos normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 41

Figura 17. Expressão de SRp55 em tumor de cavidade oral (A), faringe

(B) e laringe (C) em relação às amostras normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 42

Figura 18. Expressão de SRPK1 em tumor de cavidade oral (A), faringe (B) e laringe (C) em relação às amostras normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 43

Figura 19. Expressão de RNAm de SRp55 em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 44

Figura 20. Expressão de RNAm de SRPK1 em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 44

Figura 21. Expressão de SRp55 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 45

Figura 22. Expressão de ASF/SF2 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em 46

escala logarítmica de base 2.....

Figura 23. Expressão de SRp40 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 46

Figura 24. Expressão de SRPK1 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 47

Figura 25. Expressão de ASF/SF2 em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 48

Figura 26. Expressão de SRp55 em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 48

Figura 27. Expressão de SRp40 em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 49

Figura 28. Expressão de SRPK1 em tumores mais agressivos e menos agressivos em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2..... 49

Figura 29. Correlação positiva entre os valores de expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço..... 50

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço incluídos no estudo.....	13
Tabela 2. Distribuição dos casos por sítio primário de ocorrência do tumor.....	15
Tabela 3. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T). Informação obtida para 43 pacientes.....	15
Tabela 4. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N). Informação obtida para 43 pacientes.....	15
Tabela 5. Classificação dos tumores de acordo com TNM.....	16
Tabela 6. Correlação entre os fatores reguladores de <i>splicing</i> e as isoformas de VEGF em tumores de cabeça e pescoço.....	51
Tabela 7. Correlação entre os fator regulador de <i>splicing</i> SRPK1 e as proteínas SR (ASF/SF2, SRp55 e SRp40) em tumores de cabeça e pescoço.....	51

Lista de abreviaturas e símbolos

ACTB	Beta actina
ASF/SF2	Alternative <i>splicing</i> factor/ <i>splicing</i> factor 2
ATP	Adenosina trifosfato
CDKPRR	Cisteína - Ácido aspártico – Lisina – Prolina – Arginina - Arginina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CES	Células endoteliais estáveis
Clk1	Proteína quinase de dupla especificidade 1
Cqt	Ciclo de quantificação
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAc	DNA complementar
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
ESE	Intensificadores de <i>splicing</i> exônicos
ESS	sSilenciadores de <i>splicing</i> exônicos
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
hnRNP	Partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas
HNSCC	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 β
ISE	Intensificadores de <i>splicing</i> intrônicos
ISS	Silenciadores de <i>splicing</i> intrônicos
M	Presença de metástase à distância
MAPK	Proteína tirosina quinase ativada por mitógenos
MGB	<i>Minor groove binder</i>
N	Presença de linfonodos regionais comprometidos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRq	PCR quantitativa em tempo real
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PKC	Proteína quinase C
pré-RNA _m	Pré RNA mensageiro
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RPLPO	<i>Large ribosomal protein</i>
RQ	Quantificação relativa
siRNA	RNA de interferência
SLTRKD	Serina – Leucina – Treonina – Arginina – Lisina - Ácido aspártico
SRF	Fatores reguladores de <i>splicing</i>
SRp40	Fator de <i>splicing</i> rico em serina 40
SRp55	Fator de <i>splicing</i> rico em serina 55

SRPK	SR quinase proteína específica
SRPK1	SR quinase proteína específica tipo 1
SRPK2	SR quinase proteína específica tipo 2
T	Tamanho do tumor
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGF- β 1	Ffator de transformação do crescimento β 1
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	Receptor 1 de VEGF
VEGFR-2	Receptor 2 de VEGF

Resumo

Introdução: O crescimento e a progressão de tumores dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio vascular preexistente. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente mitógeno de células endoteliais e o aumento de sua expressão é associado com crescimento tumoral e metástase. Entretanto, a seleção do sítio alternativo de *splicing* na extremidade 3' do éxon 8 do gene *VEGF* resulta em uma família-irmã de isoformas, VEGF_{xxx}b, as quais parecem possuir propriedades anti-angiogênicas. **Objetivos:** A finalidade deste trabalho foi analisar quantitativamente a expressão de isoformas do gene *VEGF* geradas por *splicing* alternativo e de proteínas reguladoras de *splicing* do gene *VEGF* em amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e tecidos normais adjacentes. **Método:** Os níveis de RNA mensageiro das isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b e das proteínas reguladoras de *splicing* SRp55, SRp40, ASF/SF2 e SRPK1 foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real. **Resultados:** Expressão elevada de ambas as isoformas de VEGF (VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b) foi observada nas amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço quando comparadas às amostras de tecido normal. Correlação positiva entre a expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b foi observada em tumores de cabeça e pescoço. O fator de *splicing* ASF/SF2 apresentou maior expressão em tumores em relação aos tecidos normais. Tumores de faringe apresentaram expressão mais elevada de VEGF_{xxx} em relação aos outros sítios anatômicos. VEGF_{xxx}b apresentou expressão reduzida em tumores de cavidade oral. Expressão elevada de ambas as isoformas de VEGF foi observada em tumores mais agressivos. Correlação positiva foi observada entre as proteínas ASF/SF2, SRp55 e SRp40 e ambas as isoformas de VEGF e entre a proteína SR quinase SRPK1 e

ASF/SF2, SRp55 e SRp40 nos tecidos tumorais. **Conclusões:** Os resultados indicam que ambas as isoformas de VEGF atuam na promoção da angiogênese em tumores de cabeça e pescoço. As isoformas de VEGF apresentam expressão diferencial em relação ao sítio anatômico e em relação à progressão da doença. As proteínas ASF/SF2, SRp55 e SRp40 estão envolvidas na regulação do mecanismo de *splicing* alternativo do gene *VEGF*.

Abstract

Background: Tumor growth and progression depend on angiogenesis, a process that involves the formation of new blood vessels from a preexisting vascular endothelium. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mitogen for endothelial cells and its overexpression is associated with tumor growth and metastasis. However, the selection of an alternative splicing site at the end of the exon 8 of *VEGF* gene results in a sister-family of isoforms, VEGF_{xxx}b, that seems to have anti-angiogenic properties. **Objectives:** The aim of this work was to quantitatively analyze the expressions of *VEGF* gene isoforms generated by alternative splicing in samples of head and neck squamous cells carcinoma and adjacent normal tissues, and to determine the effect of regulatory proteins in the control of *VEGF* gene splicing. **Methods:** The levels of VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b mRNA and the splicing regulatory proteins SRp55, SRp40, ASF/SF2 and SRPK1 were quantified by real time quantitative PCR. **Results:** The overexpression of both VEGF isoforms (VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b) was observed in head and neck squamous cells carcinoma related to normal tissue samples. A positive correlation between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b expression was observed in head and neck tumors. Splicing factor ASF/SF2 presented higher expression in tumors when compared to normal tissues. Pharynx tumors presented overexpression of VEGF_{xxx}. VEGF_{xxx}b was underexpressed in oral cavity tumors. Overexpression of both VEGF isoforms was observed in aggressive tumors. There was a positive correlation among ASF/SF2, SRp55 and SRp40 proteins and both VEGF isoforms, and among SRPK1 protein and ASF/SF2, SRp55 and SRp40 in tumor tissues. **Conclusions:** The results suggest that both VEGF isoforms play a role in angiogenesis promotion in head and neck tumors. VEGF isoforms present differential expression related to the anatomic sites of tumor

and tumor aggressiveness. ASF/SF2, SRp55 and SRp40 proteins are involved in the regulation of the VEGF gene splicing mechanism.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Câncer de cabeça e pescoço é um termo amplo, que engloba tumores epiteliais dos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe. Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe e 15% na faringe. A grande maioria desses tumores epiteliais é classificada como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço ou de células escamosas (HNSCC – *head and neck squamous cell carcinoma*).^(1,2)

Consumo de álcool e tabaco é implicado em 75% de todos os HNSCC e estes possuem efeito multiplicativo quando combinados.⁽³⁾ O cigarro contém cerca de 70 substâncias carcinógenas, dentre elas as N-nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas. Fumantes têm risco 5-25 vezes maior de desenvolver cânceres de cabeça e pescoço em comparação a não-fumantes.⁽⁴⁾

Estudos indicam que apesar do álcool não ser genotóxico, pode agir como solvente para a penetração de carcinógenos. Possui como metabólito primário o acetaldeído, o qual é altamente reativo e se liga a proteínas, aos constituintes celulares e ao DNA, formando adutos estáveis.^(5,6,7) O consumo excessivo de álcool também pode levar a deficiências nutricionais devido a falhas na absorção intestinal e a alterações em algumas vias metabólicas.⁽⁶⁾

O processo de transformação de uma célula normal para uma célula tumoral envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas. Hanahan e Weiberg,⁽⁸⁾ em 2000, descreveram seis processos essenciais para transformação celular maligna. Esses processos incluem: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento; 2) insensibilidade a sinais anti-crescimento; 3) evasão da apoptose (morte programada); 4) potencial de replicação infinita; 5) invasão de tecidos e metástase; e 6) angiogênese. O progresso

conceitual na última década, acrescentou dois processos emergentes a esta lista: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune.⁽⁹⁾

O crescimento tumoral é garantido, inicialmente, por vasos sanguíneos próximos ao tumor. No momento em que o tumor atinge determinado tamanho, esses vasos sanguíneos passam a não ser suficientes, e novos vasos são necessários para a manutenção do crescimento tumoral.⁽¹⁰⁾ A angiogênese pode resultar de alterações genéticas ou mudanças ambientais locais que levam a ativação de células endoteliais estáveis (CES). O tumor ativa as CES por meio da secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos, que se ligam a receptores nas CES, no interior dos vasos, promovendo vasodilatação e permeabilidade. As CES são liberadas da matriz extracelular e membrana basal por meio da secreção de proteases conhecidas como matriz metaloproteinases. Ocorrem, então, a migração e a proliferação das CES para formação de novos ramos da vasculatura pré-existente.^(10,11) Os vasos recém-formados fornecem nutrientes e oxigênio ao tumor, aumentando sua disseminação. Assim, a angiogênese desempenha um papel fundamental na progressão do câncer e no surgimento de metástases.^(12,13, 14)

A formação de novos vasos é um processo complexo que envolve mais de 50 tipos de receptores, citocinas, enzimas e fatores de crescimento, muitos destes membros da família do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A ou VEGF).⁽¹²⁾ O VEGF-A é um potente mitógeno de células endoteliais que promove a angiogênese. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que o aumento da expressão de VEGF-A é associado com crescimento tumoral e metástase, enquanto a inibição da sinalização deste resulta em supressão da angiogênese e do crescimento do tumor.⁽¹⁵⁾

O VEGF-A atua na cicatrização de lesões,⁽¹⁶⁾ no ciclo reprodutor feminino,⁽¹⁷⁾ no processo de degeneração macular,⁽¹⁸⁾ na retinopatia diabética,⁽¹⁹⁾ em isquemia do miocárdio,⁽²⁰⁾ em pré-eclampsia,⁽²¹⁾ em artrite reumatóide⁽²²⁾, na formação de tumores, entre outras.⁽²³⁾ O processo de vascularização tumoral não é totalmente conhecido, mas VEGF-A parece ser o fator de crescimento vascular predominante na maioria dos tumores.⁽²⁴⁾ O aumento da expressão do VEGF é correlacionado com alguns tumores sólidos, tais como de mama,⁽²⁵⁾ colorretal⁽²⁶⁾ e carcinoma espinocelular da cavidade oral.^(27,28) Para este último, a expressão elevada de VEGF foi significativamente associada a um pior prognóstico^(27,28) e à redução na taxa de sobrevivência.⁽²⁸⁾

Pouco se sabe a respeito da regulação das diferentes isoformas de VEGF-A. A existência de um sítio alternativo de *splicing* na extremidade 3' do RNA mensageiro (RNAm) do *VEGF*, que resulta na expressão de isoformas com uma região C-terminal diferencial que podem ter efeitos inibidores e são pouco expressas em tumores, sugere que o controle de *splicing* pode ser um importante mecanismo regulatório da angiogênese em câncer.⁽²⁴⁾

O gene *VEGF* é constituído de oito éxons e sete íntrons e possui aproximadamente 14 kilobases de extensão.⁽²⁹⁾ O pré-RNAm de VEGF é diferencialmente agrupado para formação de duas famílias de proteínas, cada uma com múltiplas isoformas de números variados de aminoácidos de acordo com a inclusão alternativa dos éxons 6 e 7, os quais codificam domínios de ligação à heparina. As duas famílias são formadas por seleção alternativa do sítio de *splicing* resultando em duas sequências diferentes na região C-terminal. Como resultado, o domínio C-terminal é alterado, mas os domínios de ligação ao receptor tirosina kinase de VEGF permanecem

intactos.⁽³⁰⁾ As duas famílias são denominadas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b, e xxx indica o número de aminoácidos na cadeia polipeptídica (Figura 1).

Os membros da família VEGF_{xxx} são fatores conhecidamente pró-angiogênicos que desempenham importantes papéis na migração, proliferação e sobrevivência celular. Esses efeitos são mediados principalmente por ativação do receptor 2 de VEGF (VEGFR-2). Células endoteliais também expressam VEGFR-1, mas o papel deste receptor na fisiologia endotelial é pouco definido.^(15,31)

As principais isoformas da família VEGF_{xxx} são VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₂₁,⁽³²⁾ embora outras variantes também tenham sido descritas, tais como VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃ e VEGF₁₄₅.^(29,33,34,35) Alterações na expressão destas isoformas em câncer podem influenciar outros genes envolvidos nas alterações malignas e na cascata pró-angiogênica em particular.

A família de isoformas VEGF_{xxx}b resulta da seleção de um sítio de *splicing* distal do éxon 8 na região C-terminal do pré-mRNA de *VEGF*, o que determina a divisão em dois sub-éxons (éxon 8a e éxon 8b).^(24, 36) O evento de *splicing* distal (éxon 8b) resulta em uma região aberta de leitura com o mesmo número de nucleotídeos das variantes pró-angiogênicas; entretanto, a sequência de aminoácido traduzida é diferente, com implicações nas propriedades biológicas da proteína. Estudos mostram que além da isoforma dominante VEGF₁₆₅b, as isoformas VEGF₁₂₁b, VEGF₁₄₅b, VEGF₁₈₃b e VEGF₁₈₉b também já foram identificadas.^(24,37)

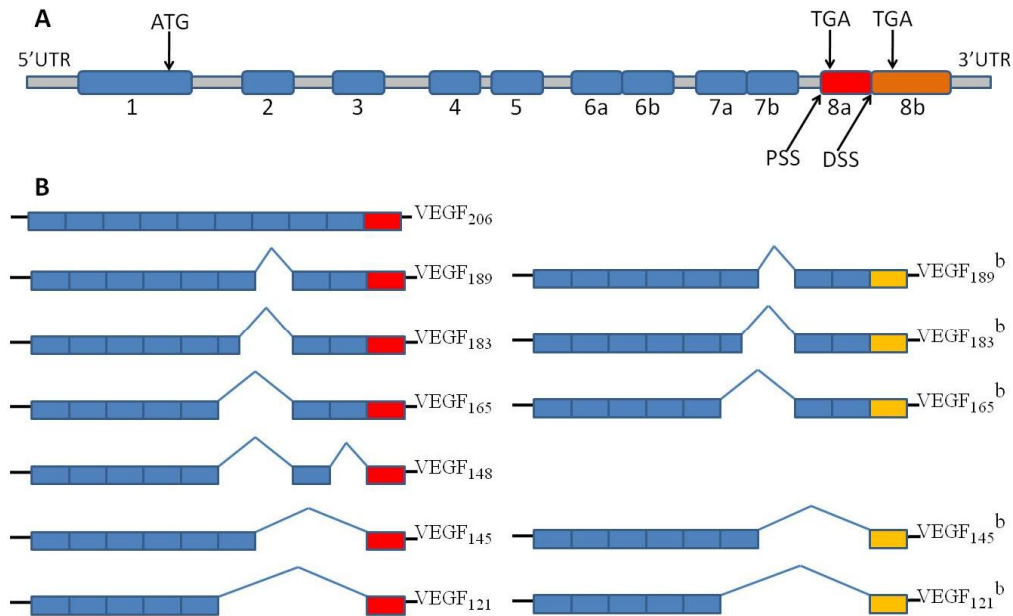


Figura 1. (A) Estrutura de éxons do gene *VEGF*. O gene *VEGF* consiste de oito éxons. A seleção do sítio de splicing proximal (PSS) resulta em isoformas da família VEGF_{xxx} e a seleção do sítio de splicing distal (DSS) resulta em isoformas da família VEGF_{xxx}^b. ATG: códon de início; TGA: códon de parada. (B) O splicing alternativo de *VEGF* resulta em duas famílias de isoformas que possuem diversas isoformas com números variados de aminoácidos. UTR: região não-traduzida.

Ambos os éxons 8a e 8b codificam seis aminoácidos. O éxon 8a codifica cisteína - ácido aspártico - lisina - prolina - arginina - arginina (CDKPRR); o éxon 8b codifica serina - leucina - treonina - arginina - lisina - ácido aspártico (SLTRKD). Como resultado, são formados peptídeos de mesmo tamanho, mas com sequências de aminoácidos diferentes na região C-terminal.^(30,38)

Os domínios de ligação aos receptores estão presentes na isoforma VEGF_{165b}, isoforma dominante da família VEGF_{xxx}b, uma vez que ela atua como um inibidor competitivo de VEGF₁₆₅. Estudo de ligação a receptores mostra que o VEGF_{165b} se liga aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 com a mesma afinidade do VEGF₁₆₅, mas parece não ativá-los completamente.^(36,39) A ligação do VEGF₁₆₅ aos receptores induz uma modificação conformacional no receptor VEGFR-2, resultando em rotação interna do domínio intracelular. Essa ligação, após resultar em dimerização do receptor, leva ao reposicionamento do domínio quinase por rotação para dentro do dímero e, então, induz a autofosforilação. Em contraste, supõe-se que o VEGF_{165b} não exerça esse efeito de rotação completa, resultando em rápido fechamento do sítio de ligação de ATP (adenosina trifosfato) e rápida inativação e, conseqüentemente, a autofosforilação não é eficiente.^(14,40)

A região C-terminal alterada do VEGF_{165b} parece inibir a proliferação endotelial, a migração e a vasodilatação induzidas pelo VEGF₁₆₅,⁽²⁴⁾ além da inibição da angiogênese fisiológica e crescimento tumoral.^(36, 39,41)

Apesar da evidência de que existe um desequilíbrio na quantidade de isoformas de VEGF em uma variedade de doenças,^(24,36,37,42,43) pouco é conhecido sobre as vias celulares e moleculares que regulam o *splicing* alternativo do pré-mRNA de *VEGF* em

geral e do sítio de *splicing* 3' dos éxons 8a / 8b em particular.⁽³⁸⁾ O mecanismo de *splicing* é influenciado por reguladores de *splicing* que incluem intensificadores de *splicing* exônicos e intrônicos (ESEs e ISEs, respectivamente) e silenciadores de *splicing* exônicos e intrônicos (ESSs e ISSs). Intensificadores de *splicing* são reconhecidos por fatores reguladores de *splicing* (SRFs), incluindo as partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas (hnRNP) e as proteínas SR, como 9G8, ASF/SF2, SRp40, SRp55, entre outras.⁽³⁰⁾

O *splicing* de éxons depende do equilíbrio das atividades das proteínas SR. Estudo recente sobre regulação de *splicing* das isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b observou que os fatores ASF/SF2 e SRp40 favorecem a seleção de sítio de *splicing* proximal do pré-RNA de *VEGF*, enquanto o fator SRp55 favorece a seleção distal, ou seja, a expressão de VEGF_{xxx}b. Esses resultados indicam que fatores como ASF/SF2, SRp40 e SRp55, regulam o *splicing* alternativo do pré-RNA de *VEGF*, o que determina a região C-terminal.⁽³⁸⁾ Outros reguladores importantes do processo de *splicing* incluem várias proteínas SR quinases que fosforilam os domínios serina-arginina encontrados uma variedade de fatores de *splicing*.⁽⁴⁴⁾ SRs podem ser regulados tanto diretamente por proteínas SR kinases, como Clk1 ou SRPKs, ou indiretamente por proteínas tirosina quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e proteínas quinases C (PKCs). SRPKs fosforilam ASF/SF2, o que favorece o *splicing* proximal; já Clk1 resulta na fosforilação tanto de ASF/SF2 quanto de SRp55 e SRp40.^(45,46)

Não existem dados na literatura sobre a investigação de isoformas de *VEGF* e controle de *splicing* em câncer de cabeça e pescoço. Assim, a investigação do evento de *splicing* alternativo de *VEGF* e de sua regulação em tumores de cabeça e pescoço contribuirá para o conhecimento de novos fatores envolvidos no processo de

tumorigênese e também para a elaboração de terapias mais eficientes para a supressão deste tipo de tumor.

1.2. Objetivos

1. Quantificar a expressão de RNAm das isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em amostras de HNSCC e em tecidos normais adjacentes.
2. Analisar a expressão de RNAm de proteínas reguladoras de *splicing* ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1 em tumores de cabeça e pescoço.
3. Avaliar a correlação entre expressão dos fatores reguladores de *splicing* e expressão das isoformas de VEGF.
4. Investigar o padrão de expressão das isoformas de VEGF em relação ao sítio anatômicos de ocorrência do tumor e progressão tumoral.
5. Investigar o padrão de expressão dos fatores reguladores de *splicing* em relação ao sítio anatômicos de ocorrência do tumor e progressão tumoral.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2. Casuística e Métodos

2.1. Casuística

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), foram incluídas na pesquisa 47 amostras tumorais de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) e 20 amostras de tecidos adjacentes normais. As amostras foram coletadas no Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e no Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, sob responsabilidade do Dr. José Francisco de Góis Filho, Dra. Érika Erina Fukuyama e Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva. Foram incluídos no estudo pacientes com resultado positivo para HNSCC, com indicação de cirurgia. Os pacientes foram incluídos aleatoriamente.

Na Tabela 1 estão apresentados os dados sociodemográficos dos pacientes. Dados como idade, sexo, cor da pele e hábitos tabagista e etilista foram coletados do prontuário médico. Informações sobre tabagismo e etilismo foram limitadas quanto ao uso ou não de tabaco e álcool.

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), parecer nº 210/2009 (Anexo 1), SISNEP CAAE-1788.0.000.140-09.

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço incluídos no estudo.

	Pacientes n (%)
Nº de indivíduos	47
Idade (média ±DP)	61±12,58
Tabagista	41 (87,2)
Etilista	33 (70,2)
Gênero	
Masculino	43 (91,5)
Feminino	04 (8,5)
Cor da pele	
Branca	40 (85,1)
Não branca*	07 (14,9)

*Incluindo negróides e orientais.

2.2. Classificação dos tumores malignos (TNM)

Os tumores foram classificados pela equipe médica participante do projeto de acordo com os parâmetros da *Union International Contre le Cancer (UICC)* e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)*⁽⁴⁷⁾ em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M) (Tabelas 2,3 e 4).

O diagnóstico e a classificação do TNM e demais informações clínicas foram obtidas por meio de prontuário médico do paciente. Em relação à presença de metástase a distância, apenas um paciente apresentou M+.

Para classificação em relação à progressão tumoral, os tumores foram grupados conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 2. Distribuição dos casos por sítio primário de ocorrência do tumor.

Sítio anatômico primário	n (%)
Cavidade oral	23 (48,9)
Laringe	13 (27,7)
Faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe)	11 (23,4)

Tabela 3. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T). Informação obtida para 43 pacientes.

Sítio primário do tumor	T1	T2	T3	T4	Tx
Cavidade oral	04	08	03	05	00
Laringe	03	00	01	07	01
Faringe	00	01	01	09	00

Tx – Não foi possível a avaliação o tamanho

Tabela 4. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N). Informação obtida para 43 pacientes.

Sítio primário do tumor	N0	N+	Nx
Cavidade oral	11	07	02
Laringe	02	05	07
Faringe	02	07	00

N0 – Ausência de linfonodos comprometidos

N+ – Presença de linfonodos comprometidos

Nx – Não foi possível a avaliação

Tabela 5. Classificação dos tumores de acordo com TNM.

Estadio	T	N	M
I	T1	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
IIB	T2b	N0	M0
	T1-T2b	N1	M0
III	T3	N0-1	M0
	T1-3	N2	M0
IVA	T4	N0-2	M0
IVB	T1-4	N3	M0
IVC	T1-4	N0-3	M1

2.3. Análises moleculares

2.3.1. Extração de RNA

Após a coleta, os tecidos foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido até o momento da extração. O RNA total foi extraído do tumor e tecido normal com *TRIzol® Reagent (Invitrogen)*, de acordo com instruções do fabricante. *TRIzol® Reagent* é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que promove a lise celular mantendo a integridade do RNA. A técnica consistiu inicialmente da maceração manual dos fragmentos de aproximadamente 100 mg de tecido em almofariz, com pistilo e adição de nitrogênio líquido. Para cada 10 mg de tecido, foi adicionado 1 mL de *TRIzol® Reagent*. O material foi, então, distribuído em microtubos de 1,5 mL e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. O próximo passo foi a adição de 200 µL de clorofórmio gelado para cada 1 mL de *TRIzol® Reagent*. O material foi agitado por aproximadamente 20 segundos e permaneceu por 3 minutos em temperatura ambiente sendo, em seguida, acondicionado em gelo. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C, para separação das fases aquosa (contendo RNA), interfase e fase orgânica. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de *TRIzol® Reagent* utilizado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram misturadas em vórtex e centrifugadas a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Após a evaporação do etanol, o *pellet* de RNA foi ressuscitado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (*Ambion®*) e incubado por 10 minutos a 60°C. As amostras de RNA extraídas foram estocadas em freezer – 80°C.

2.3.2. Quantificação das amostras de RNA por espectrofotometria

As quantificações das amostras de RNA foram determinadas por sua absorvância em comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)*. O grau de pureza foi verificado por meio da razão 260/280 sendo consideradas livres de contaminantes nocivos à amplificação “*in vitro*” as amostras que apresentaram entre 1.7 e 2.1 e razão 230/260 entre 1.8 e 2.0.

2.3.3. Análise da qualidade e integridade de RNA total

A qualidade e a integridade das amostras de RNA foram avaliadas pela visualização dos fragmentos correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após separação por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2). Um micrograma de RNA foi misturado a 10 μ L de corante (Uréia 7M, Glicerol 30%, tampão Tris-Acetato-EDTA - TAE 50X, Azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas em termociclador por 10 minutos a temperatura de 60°C e acondicionadas imediatamente em gelo. Foram, então, aplicadas em gel com tampão de corrida TAE 1X. O gel foi submetido à corrente elétrica de 90 volts por 30 minutos e, posteriormente, foi corado com brometo de etídeo. As amostras apresentaram integridade e boa qualidade.

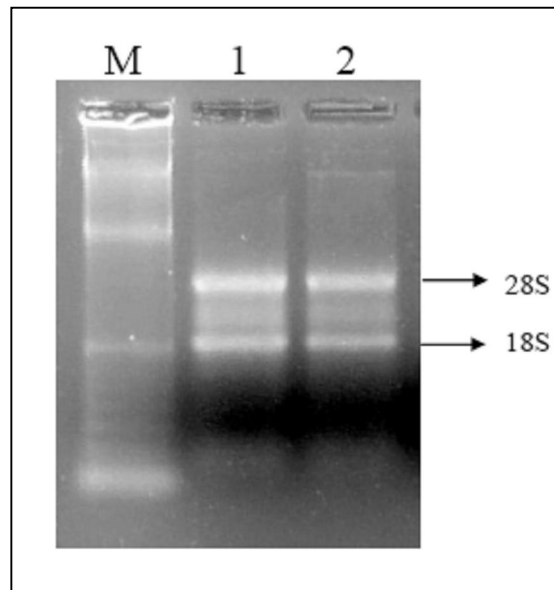


Figura 2. Gel de agarose 1% para análise de RNA total de duas amostras extraídas (1 e 2). M – Marcador de peso molecular de um quilobase. Os fragmentos 18S e 28S correspondem ao RNA ribossômico.

2.3.4. Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

DNA complementar (DNAC) foi sintetizado utilizando-se o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Em uma reação de 20µl, foram utilizados 2µg de RNA total, desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) *mix 1X*, RT random *primers 1X*, tampão 1X e 1 ul de *Multiscribe Reverse Transcriptase*. Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min.

2.3.5. Análise de expressão gênica por Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq)

As reações PCRq foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*, com a utilização de sondas *TaqMan MGB (Minor groove binder)* ligadas ao fluoróforo FAM (*Applied Biosystems*). As sondas *TaqMan MGB* contém o fluoróforo FAM ligado à extremidade 5' e um supressor (*quencher*) não fluorescente ligado à extremidade 3'. Durante a PCR, a sonda *TaqMan MGB* hibridiza-se especificamente à sua sequência complementar entre os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso. Quando a sonda está intacta, a proximidade entre o fluoróforo e o supressor resulta em supressão da fluorescência. Durante a amplificação da sequência de interesse, a DNA polimerase cliva as sondas hibridizadas aos seus alvos, separando o fluoróforo do supressor, o que resulta em emissão de fluorescência pelo fluoróforo. O aumento do sinal de fluorescência ocorre somente se a sequência alvo for complementar à sonda e for amplificada durante a PCR. Dessa forma, fragmentos amplificados de maneira inespecífica não são detectados.

A intensidade de fluorescência na reação foi determinada pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ corresponde a intensidade de emissão do fluoróforo FAM/ intensidade de emissão do ROX em determinado momento; e Rn^- corresponde a intensidade de emissão do fluoróforo FAM / intensidade de emissão do ROX antes da amplificação. O fluoróforo ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência emitida é constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > FAM). Na fase logarítmica, ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de ΔRn , correspondente à linha de corte (*threshold*) para a curva de amplificação de cada gene estudado. O número do ciclo em que o ΔRn cruza a linha de corte corresponde ao ciclo de quantificação (Cq) da amostra. O valor de Cq é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é a quantidade de RNAm presente. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen, em 2001⁽⁴⁸⁾. Amostras de tecido normal foram utilizadas como calibrador.

Os valores brutos de Cq foram calculados pelo programa SDS versão 2.0 (*Applied Biosystems*) após ajuste manual do sinal basal de fluorescência e da linha de corte para cada marcador analisado.

- Cálculo da Eficiência

O cálculo da eficiência de cada ensaio foi realizado como sugerido por Pfaffl *et al.*, em 2002⁽⁴⁹⁾. A avaliação da eficiência indica a cinética de amplificação da sequência-alvo. Foi, então, construída uma curva padrão de quantificação para os genes

avaliados (candidatos a genes de referência e genes-alvo). Foi feita diluição seriada de um *pool* de amostras de DNAc, nas concentrações de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min. As reações foram realizadas no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*).

Após a reação, as médias dos valores de Cq das triplicatas correspondentes a cada diluição foram utilizadas no cálculo de eficiência. O software SDS 2.0 apresentou gráficos com base nas diluições testadas (eixo X) e valores da média de Ct (eixo Y) para cada gene (Figura 3).

As sequências de *primers* e sondas para investigação dos genes *SRp55*, *SRp40* e *ASF/SF2* foram desenhadas pela empresa *Applied Biosystems* a partir das sequências de DNAc dos mesmos, disponibilizadas pelo *NCBI* (*SRp55*: NM_006275; *SRp40*: NM_001039465.1; *ASF/SF2*: NM_001078166.1). Para análise do gene *SRPK1*, foi adquirido o ensaio *TaqMan Gene Expression Assays - Assay-on-Demand* (*Applied Biosystems*, Assay ID Hs00177298_m1).

As sequências de *primers* e sondas para VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b foram desenhadas com auxílio do software *PrimerExpress versão 3.0* (*Applied Biosystems*). Para VEGF_{xxx}, foi utilizado o seguinte conjunto de *primers* e sonda: *primer* senso: 5' AACACAGACTCGCGTTGCAA 3'; *primer* anti-senso: 5' CGCCTCGGCTTGTCACAT 3'; e sonda: 5' AGCTTGAGTTAAACGAAC 3'.

As reações foram realizadas utilizando-se *TaqMan Gene Expression Master Mix 1X* (*Applied Biosystems*), 900nM de cada *primer* (senso e anti-senso) e 250nM de sonda *TaqMan MGB 6-FAM*. Para VEGF_{xxx}b foram utilizados o mesmo *primer* senso e sonda de VEGF_{xxx}. O *primer* anti-senso específico para VEGF_{xxx}b foi desenhado com auxílio

do software *PrimerExpress* versão 3.0 (*Applied Biosystems*): *primer* anti-senso: 5' TTCCTGGTGAGAGATCTGCAAGTA 3'. As reações de amplificação foram realizadas com 10ul de *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*), 900 nM de cada *primer* senso e anti-senso e 250 nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM.

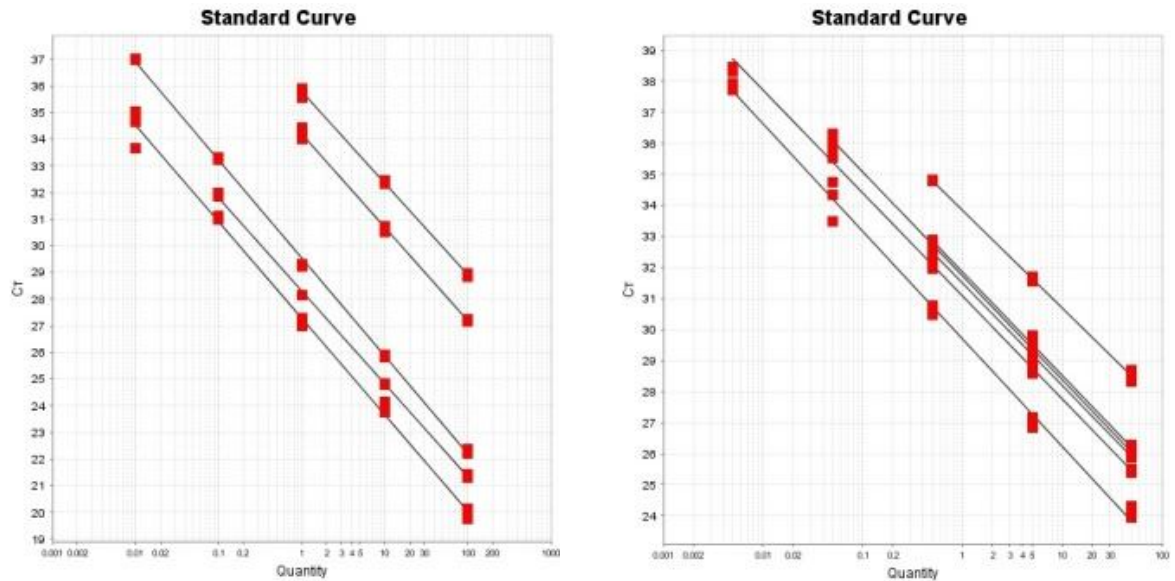


Figura 3. (A) Curva Padrão dos genes candidatos a genes de referência. (B) Curva Padrão dos genes alvos. Testes de Extensão Dinâmica. Eixo X – Ciclo de quantificação. Eixo Y – Quantidades das amostras.

Todos os ensaios apresentaram boa eficiência e a concentração das amostras escolhida para ser utilizada nas reações de PCRq foi 100 nanogramas (ng).

- Teste para avaliação e escolha dos genes de referência

Para normalizar a expressão de RNAm de VEGF e das proteínas reguladoras de *splicing* em relação às diferenças na quantidade e qualidade de RNA e eficiência da reação de transcrição reversa entre as amostras, foram avaliados 5 genes de referência (*GAPDH*, β -actina, *HPRT1*, *TBP* e *RPLPO*).

A medida da estabilidade da expressão de genes de referência baseia-se no princípio de que a razão da expressão de dois ou mais genes de referência ideais é idêntica em todas as amostras, independente do tipo celular ou condição experimental. Assim, a variação da expressão de dois ou mais genes de referência reflete o fato de que um (ou mais) gene não é constantemente expresso, o que aumenta a variação na razão correspondente à diminuição da estabilidade da expressão. A medida da estabilidade de genes de referência (M) é definida pela variação média pareada de um gene em particular com todos os outros genes de referência. Genes com o menor valor M apresentam a maior estabilidade de expressão.⁽⁵⁰⁾ O valor de M para um gene de referência ideal é $< 1,5$. Os gráficos da Figura 4 mostram os valores de Cq gerados para cada gene de referência nas amostras estudadas, bem como o valor M de cada gene de referência.

O DNAc de 5 amostras de tecido tumoral e 1 *pool* das 20 amostras de tecido normal foi amplificado no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*), com *TaqMan Gene Expression Master Mix 1X* (*Applied Biosystems*) e ensaio contendo *primers* e sonda *TaqMan MGB 6-FAM 1X* (*Applied Biosystems*: *GAPDH*

PN4333764F; β -actina PN4333762F; *HPRT1* PN4333768F; *TBP* PN4333769F; e *RPLPO* PN4333761F) . A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min. A análise dos dados para escolha de dois controles endógenos foi feita utilizando-se o programa *Data Assist v.3.0 (Applied Biosystems)* (Figura 4). Os genes de referência escolhidos foram *TBP* e *RPLPO*, pois apresentaram os melhores valores de estabilidade.

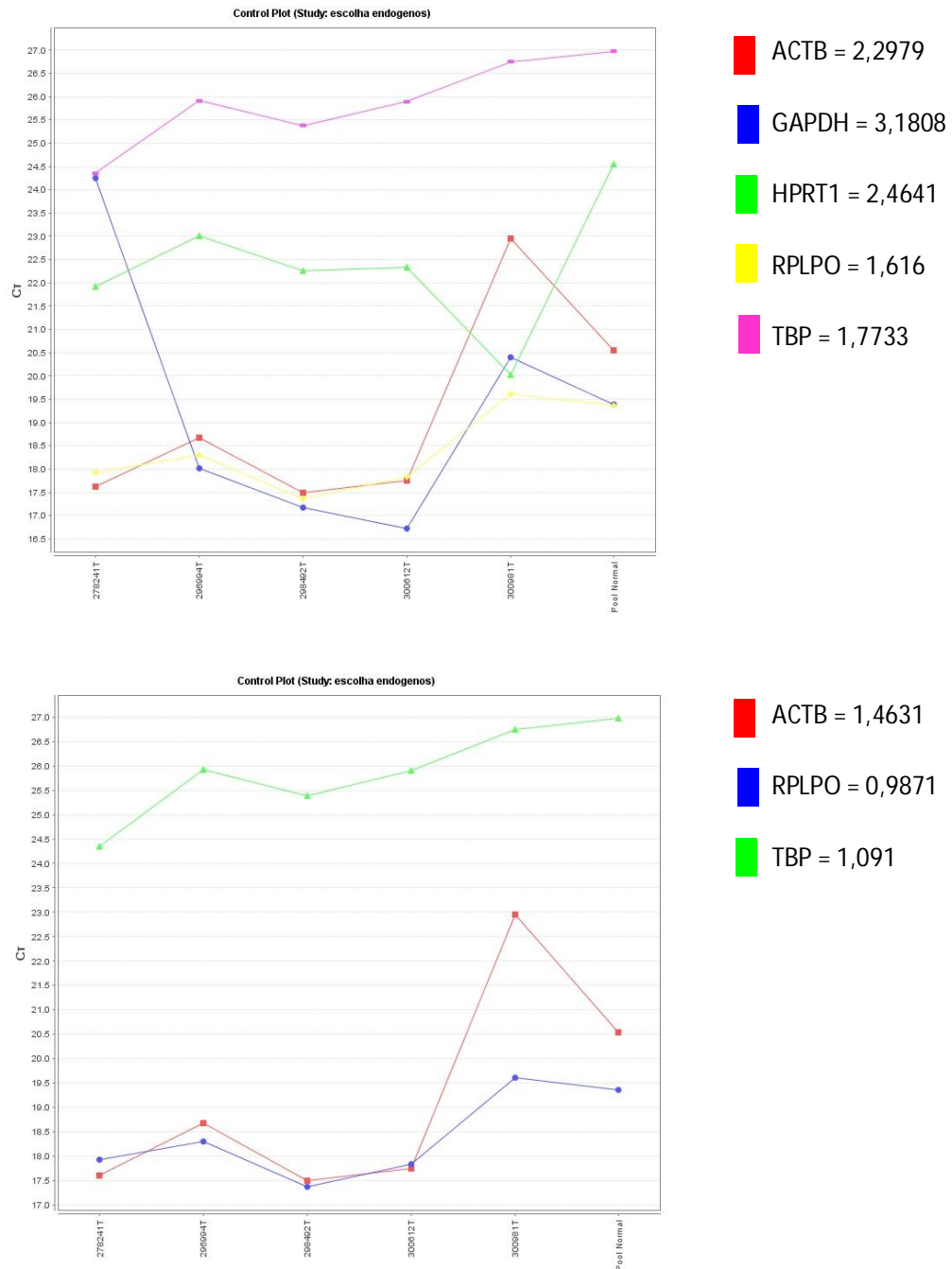


Figura 4. A. Análise realizada pelo Software *Data Assist v.3.0* (Applied Biosystems) mostrando a estabilidade dos cinco controles endógenos avaliados. **B.** Gráfico mostrando os valores de estabilidade após a exclusão dos dois genes com valores mais elevados de *M*.

Após obtenção dos valores de eficiência dos ensaios e escolha dos controles endógenos, foram realizadas as reações de PCRq utilizando amostras tumorais e normais.

- Análise de expressão da isoforma *VEGF_{xxx}*

Do total de amostras extraídas, 46 amostras de tumores e cinco *pools* de amostras de tecidos normais apresentaram amplificação para o gene *VEGF_{xxx}*. Para as amostras normais foram utilizados cinco *pools* contendo quantidades equivalentes das 20 amostras de tecido normal. O conjunto de *primers* utilizado detecta as isoformas 206, 189, 165 e 145 de *VEGF_{xxx}*. As reações foram realizadas utilizando-se *TaqMan Gene Expression Master Mix 1x (Applied Biosystems)*, 300nM de *primer* senso, 100nM de *primer* anti-senso e 250nM de sonda *TaqMan MGB 6-FAM*. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min.

A quantificação de *VEGF_{xxx}* das amostras tumorais foi analisada em relação aos *pools* de amostras normais (calibrador) e em relação aos genes de referência (*TBP* e *RPLPO*). As reações foram realizadas em triplicata, em placas de 96 poços, no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*. O software SDS versão 2.0 foi utilizado para analisar as curvas de expressão.

- Análise de expressão da isoforma *VEGF_{xxx}b*

Para análise de expressão do *VEGF_{xxx}b*, foram utilizados o mesmo *primer* senso e sonda de *VEGF_{xxx}*, conforme descrito acima. O *primer* anti-senso específico para a região 8b foi desenhado com auxílio do software *PrimerExpress* versão 3.0 (*Applied Biosystems*) e detecta somente a isoforma *VEGF_{165b}*. As reações de amplificação

incluíram 100ng de DNAc, *Gene Expression Master Mix* 1x (*Applied Biosystems*), 900 nM de cada *primer* senso e anti-senso e 250 nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 45°C por 1 min.

A quantificação de VEGF_{xxx}b das amostras tumorais foi analisada em relação aos *pools* de amostras normais (calibrador) e em relação aos genes de referência (*TBP* e *RPLPO*). As reações foram realizadas em triplicata, em placas de 96 poços, no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). O software SDS versão 2.0 foi utilizado para analisar as curvas de expressão.

- Análise de expressão dos fatores reguladores de *splicing*

As reações foram realizadas utilizando-se 100ng de DNAc, *TaqMan Gene Expression Master Mix* 1x (*Applied Biosystems*) e cada ensaio contendo os *primers* e as sondas específicas para cada gene alvo, na concentração final de 1X. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min. Para as amostras normais foram utilizados cinco *pools* contendo a quantidades equivalentes das 20 amostras de tecido normal. A quantificação das amostras tumorais foi analisada em relação aos *pools* de amostras normais (calibrador) e em relação aos genes de referência (*TBP* e *RPLPO*).

As reações foram realizadas em triplicata, em placas de 96 poços, no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). O software SDS versão 2.0 foi utilizado para analisar as curvas de expressão.

2.4.5. Análise Estatística

Anteriormente à realização de testes utilizando dados contínuos, os dados foram submetidos ao teste da normalidade de *D'Agostino e Pearson normality test* utilizando-se o programa *GraphPad Prism v.5*. Os valores de quantificação relativa de RNAm (RQ) das isoformas de VEGF e das proteínas reguladoras de *splicing* em tumores foi analisada por *One-sample T Test*, para dados com distribuição normal, ou *Wilcoxon Signed Rank Test*, para dados que não apresentaram distribuição normal. A expressão gênica nos diferentes sítios anatômicos foi avaliada por *Kruskal-Wallis Test*. Comparação entre expressão das isoformas de VEGF em tumores e análise dos valores de expressão das isoformas de VEGF e dos fatores de *splicing* em relação a progressão tumoral foram realizadas por *Two-sample T Test* ou *Mann-Whitney Test*. Correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre os níveis de expressão de RNAm das duas famílias de isoformas de VEGF, e entre as proteínas reguladoras e as isoformas de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Expressão de isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b

Para determinar a expressão de VEGF_{xxx}b e VEGF_{xxx} em HNSCC e tecidos normais, PCRq em tempo real utilizando *primers* que distinguem as duas famílias de isoformas foi realizada. Os fragmentos gerados foram 74 pares de bases para VEGF_{xxx} (consistente com as isoformas 206, 189, 165, 145) e 71 pares de bases para VEGF_{xxx}b (consistente com a isoforma 165b) (Figura 5). O conjunto de *primers* utilizado para amplificação de VEGF_{xxx}b, reconhece uma sequência específica que não contém o éxon 8a, presente somente nas isoformas VEGF_{xxx}. Expressão de RNAm de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b foi detectada em ambos os tecidos tumoral e normal.

Expressão significativamente elevada de ambas as isoformas VEGF_{xxx} (mediana de RQ = 1,8; P = 0,0004) e VEGF_{xxx}b (mediana de RQ = 2,1; P<0,0001) foi observada em tumores de cabeça e pescoço em relação aos tecidos normais adjacentes (Figura 6).

Para investigar qual das duas famílias de isoformas é mais expressa nos tumores, foram comparados os valores de expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b por meio do *Mann-Witney Test*. Não foi observada diferença significativa de expressão das isoformas em tumores (P=0,7224) (Figura 7).

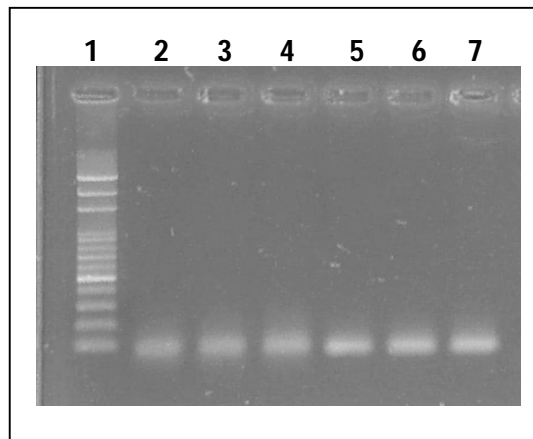


Figura 5. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os fragmentos correspondentes às isoformas VEGF_{xxx} (colunas 2, 3 e 4) com 74 pares de base, e VEGF_{xxx b} (colunas 5, 6 e 7) com 71 pares de base. Coluna 1: marcador de peso molecular de 100 pares de base.

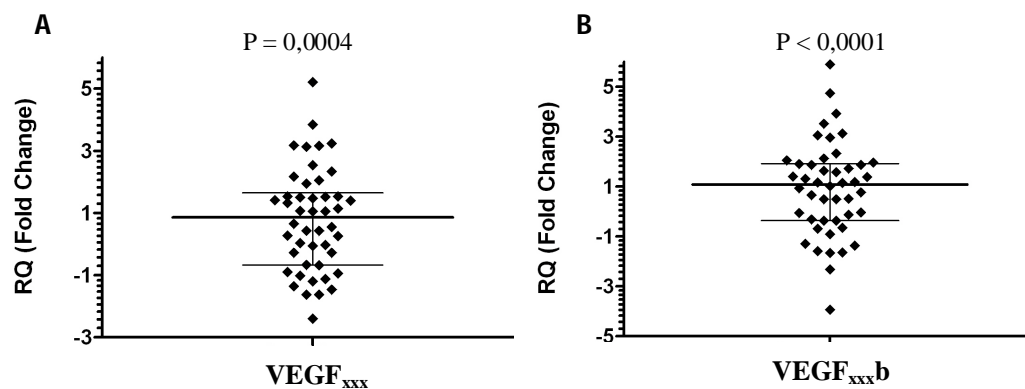


Figura 6. Expressão de VEGF_{xxx} (A) e VEGF_{xxx b} (B) em tumores de cabeça e pescoço em relação aos tecidos normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

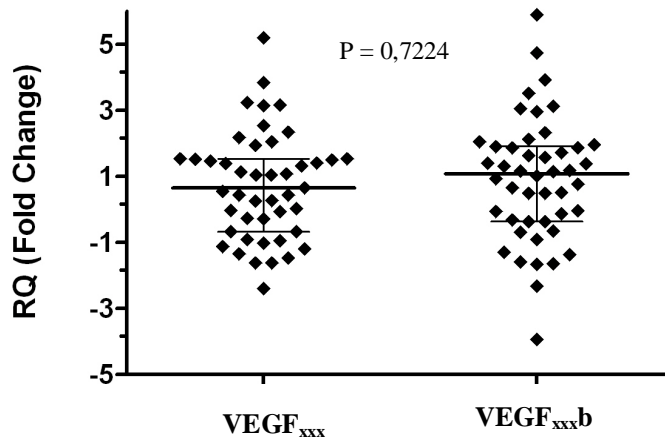


Figura 7. Expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). VEGF_{xxx} apresentou mediana de RQ de 1,8 e VEGF_{xxx}b, mediana de RQ de 2,1. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

A análise dos valores de expressão de VEGF nos tumores em relação aos tecidos normais nos diferentes sítios anatômicos de ocorrência (Figura 8) mostrou que, em cavidade oral, a expressão de VEGF_{xxx} não diferiu entre tumores e tecidos normais ($P=0,7454$). Em faringe, VEGF_{xxx} foi significativamente mais expresso nos tumores em relação às amostras normais ($P=0,0022$). Expressão mais elevada de VEGF_{xxx} também foi observada nos tumores de laringe em relação aos tecidos normais ($P=0,0126$).

A comparação entre a expressão da isoforma VEGF_{xxx} entre os três sítios anatômicos mostrou expressão mais elevada em tumores de faringe em relação aos outros sítios ($P=0,0026$) (Figura 9).

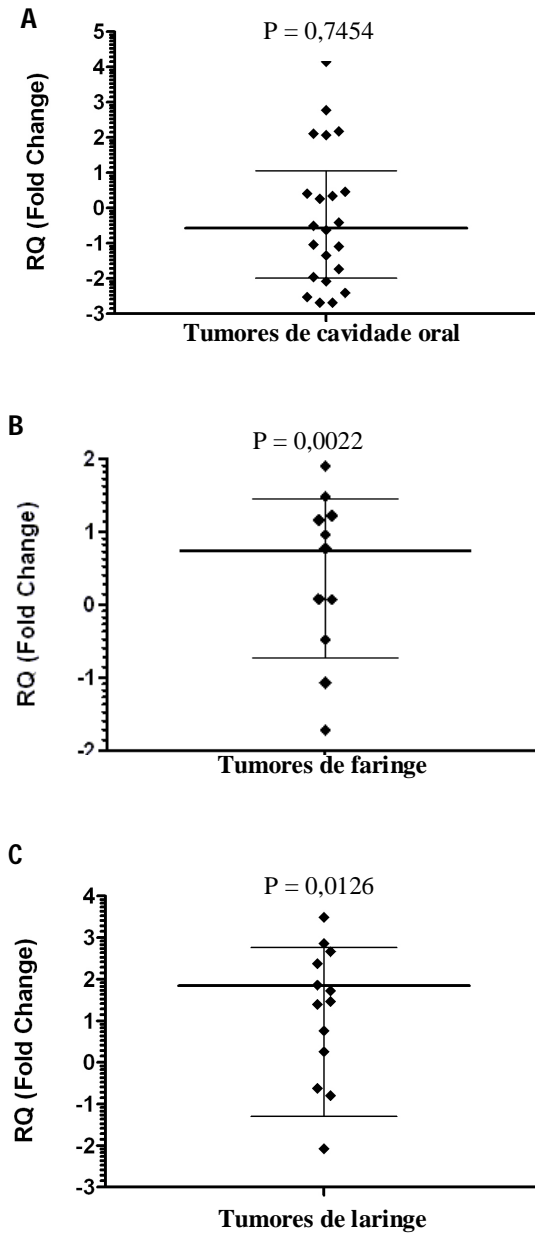


Figura 8. Expressão de VEGF_{xxx} em tumores de cavidade oral (mediana com variação interquartil) (A), faringe (média \pm DP) (B) e laringe (média \pm DP) (C) em relação às amostras normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

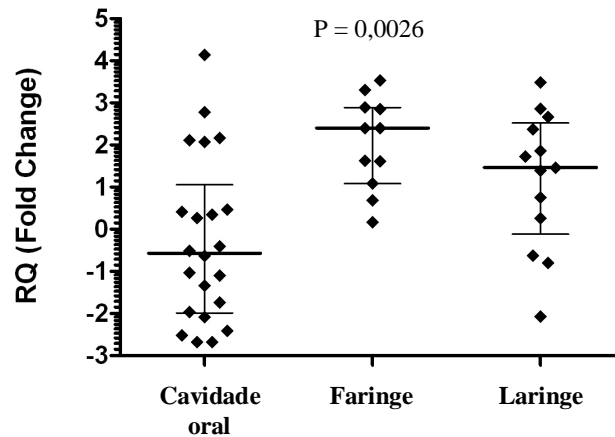


Figura 9. Expressão de RNAm de VEGF_{xxx} em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

VEGF_{xxx}b não apresentou diferença de expressão significativa entre tumores e tecidos normais considerando-se os sítios primários de tumor separadamente (Cavidade oral: P=0,2173; Faringe: P=0,0618; e Laringe: P=0,1011) (Figura 10). A comparação da expressão das isoformas de VEGF entre os sítios mostrou expressão menos elevada de VEGF_{xxx}b em tumores de cavidade oral (P=0,02) (Figura 11).

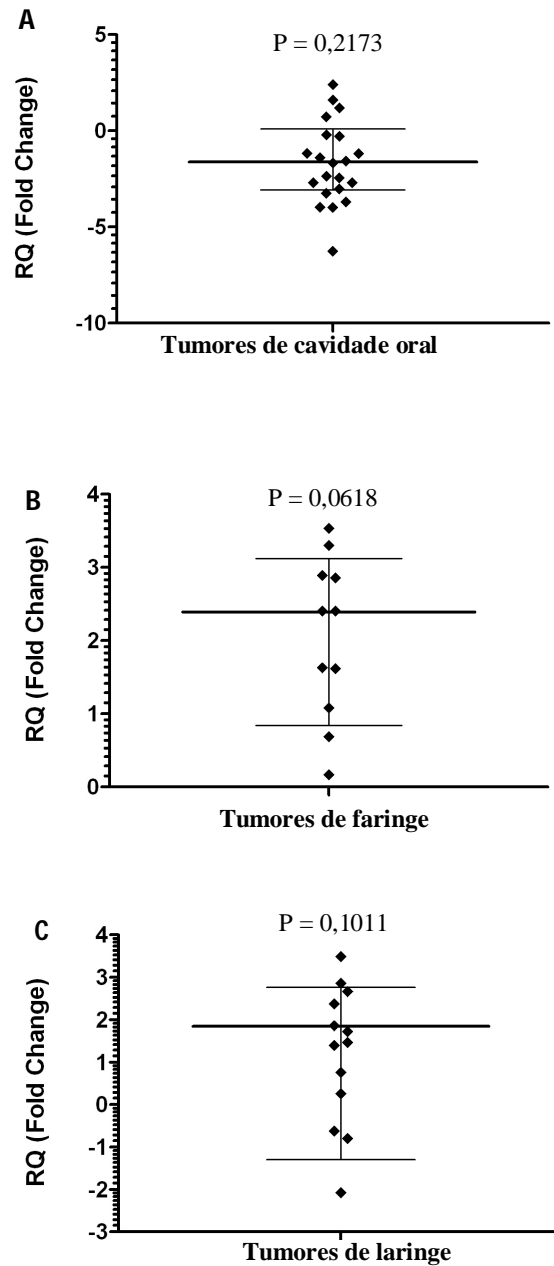


Figura 10. Expressão de VEGF_{xxx}b em tumor de cavidade oral (mediana com variação interquartil) (A), faringe (média \pm DP) (B) e laringe (média \pm DP) (C) em relação às amostras normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

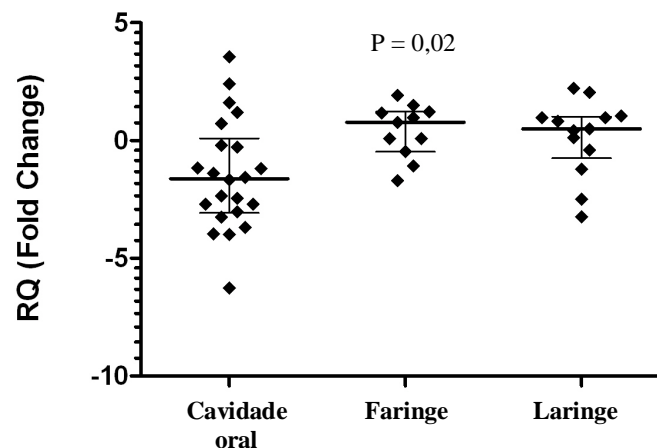


Figura 11. Expressão de RNAm de VEGF_{xxx}b em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

Tumores com estadios I e II foram agrupados em tumores menos avançados e aqueles com estadios III e IV foram agrupados em tumores avançados. Foi observada expressão elevada de ambas as isoformas em tumores avançados em relação aos tumores menos avançados, porém, sem significância estatística (VEGF_{xxx}: $P = 0,2351$; VEGF_{xxx}b: $P = 0,125$) (Figuras 12 e 13).

A comparação dos valores de expressão de VEGF nos tumores em relação aos tecidos normais de acordo com a progressão tumoral está apresentada nas Figuras 14 e 15. Em tumores mais avançados, a expressão de VEGF_{xxx} foi significativamente maior em relação aos tecidos normais ($P = 0,0004$). Em tumores menos avançados, VEGF_{xxx} não apresentou diferença de expressão ($P = 0,8077$). Expressão elevada de VEGF_{xxx}b também foi observada nos tumores mais avançados em relação aos tecidos normais ($P=0,0001$). Em tumores menos avançados, não houve diferença de expressão de VEGF_{xxx}b entre tecidos tumorais e normais ($P = 0,9032$).

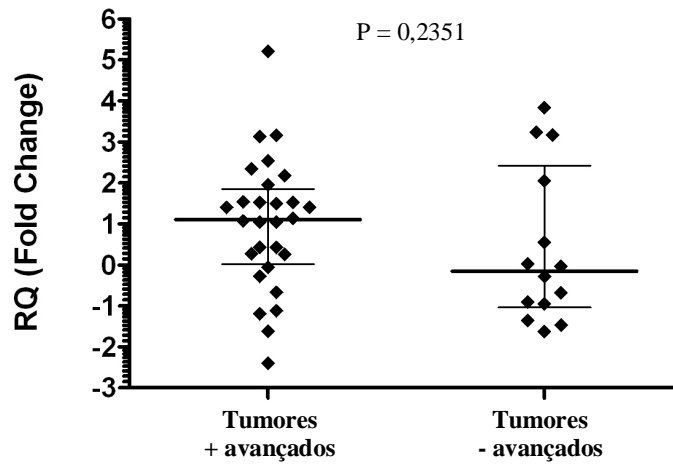


Figura 12. Expressão de VEGF_{xxx} em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

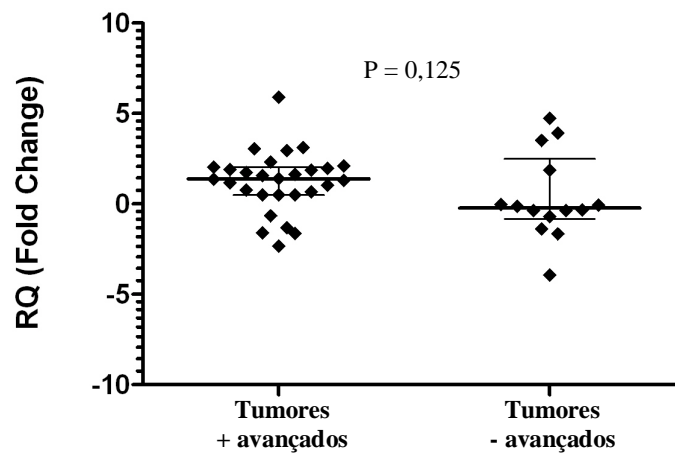


Figura 13. Expressão de VEGF_{xxx.b} em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

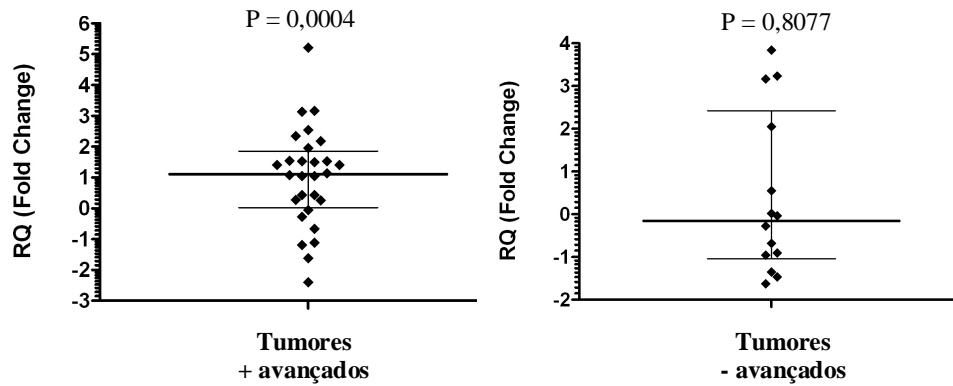


Figura 14. Expressão de VEGF_{xxx} em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

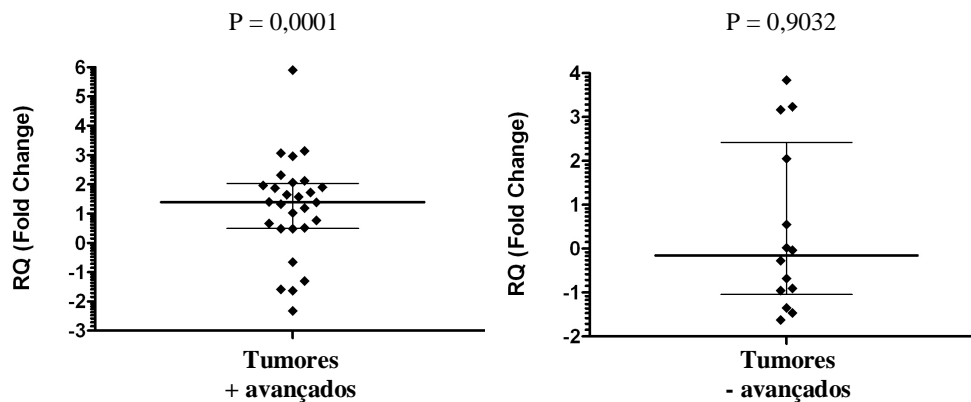


Figura 15. Expressão de VEGF_{xxx}b em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

3.2. Expressão de fatores reguladores de *splicing*

A expressão do RNAm da proteína ASF/SF2 foi significativamente elevada em tumores em relação aos tecidos normais ($P < 0,0001$). Para SRPK1, o RNAm apresentou expressão significativamente mais baixa nos tumores ($P = 0,0444$). Não foi observada diferença de expressão dos genes *SRp55* e *SRp40* entre os grupos (*SRp55*: $P = 0,8185$; *SRp40*: $P = 0,7932$) (Figura 16).

Em relação aos sítios anatômicos, não houve amplificação das amostras normais para ASF/SF2 e SRp40, portanto, não foi possível fazer a análise estatística para estes dois genes. SRp55 apresentou expressão significativamente reduzida em tumores em relação aos tecidos normais em cavidade oral ($P = 0,0401$) (Figura 17). Em faringe e laringe, não houve diferença significativa de expressão de SRp55 entre tumores e amostras normais ($P = 0,4131$ e $P = 0,5879$, respectivamente). Em relação à proteína SRPK1, esta apresentou expressão significativamente elevada nos tumores em relação às amostras normais em faringe e laringe ($P = 0,002$ e $P = 0,0007$, respectivamente). Em tumores de cavidade oral, SRPK1 apresentou expressão reduzida ($P = 0,0054$) (Figura 18).

Entre os diferentes sítios anatômicos de tumor, não houve diferença de expressão do fator regulador SRp55 ($P = 0,1717$) (Figura 19). A proteína SRPK1 apresentou expressão elevada em tumores de faringe em relação aos de cavidade oral ($P < 0,0001$) (Figura 20).

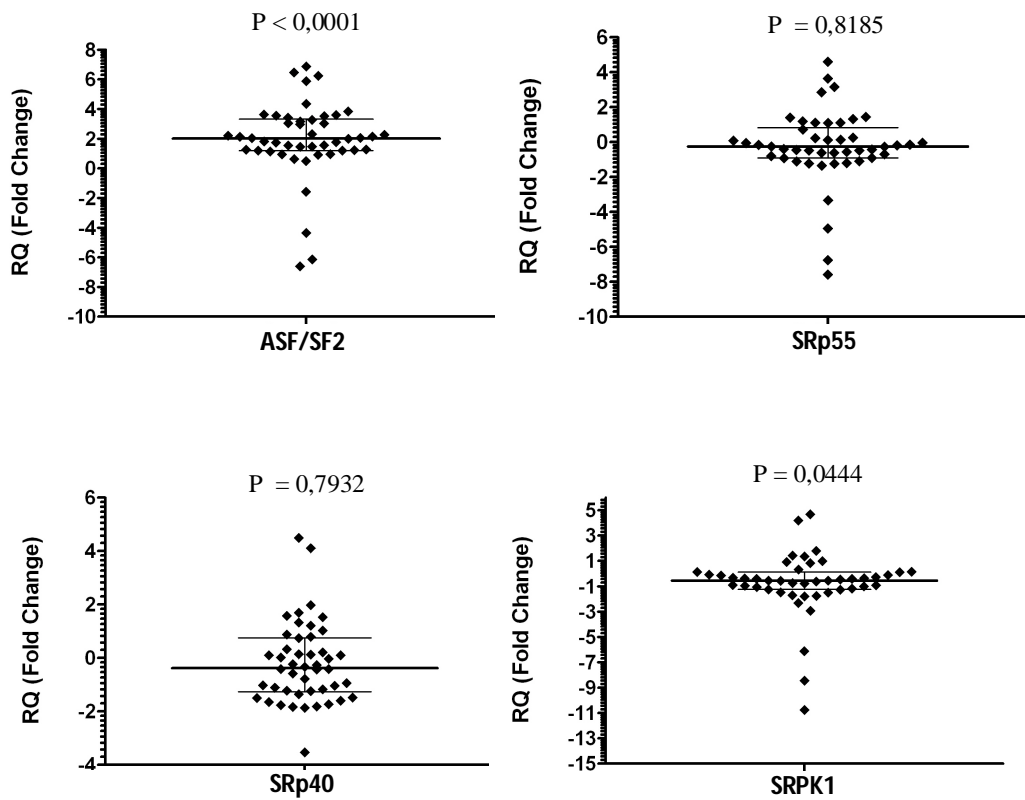


Figura 16. Expressão de RNAm de ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1 em tumores de cabeça em relação aos tecidos normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

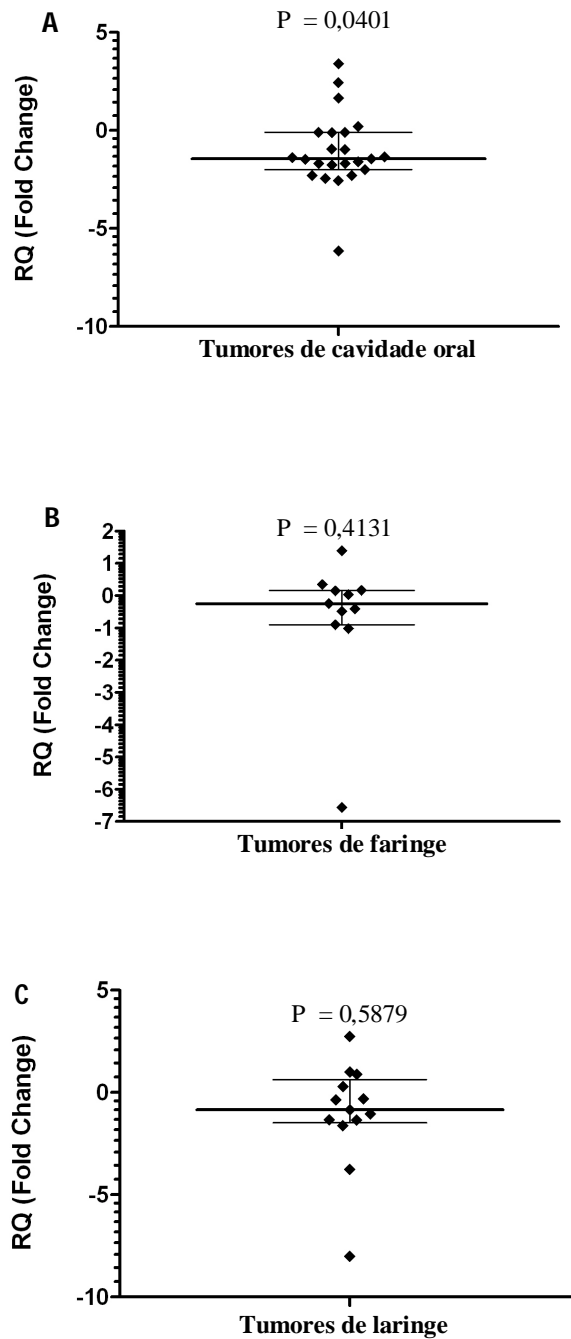


Figura 17. Expressão de SRp55 em tumor de cavidade oral (A), faringe (B) e laringe (C) em relação às amostras normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

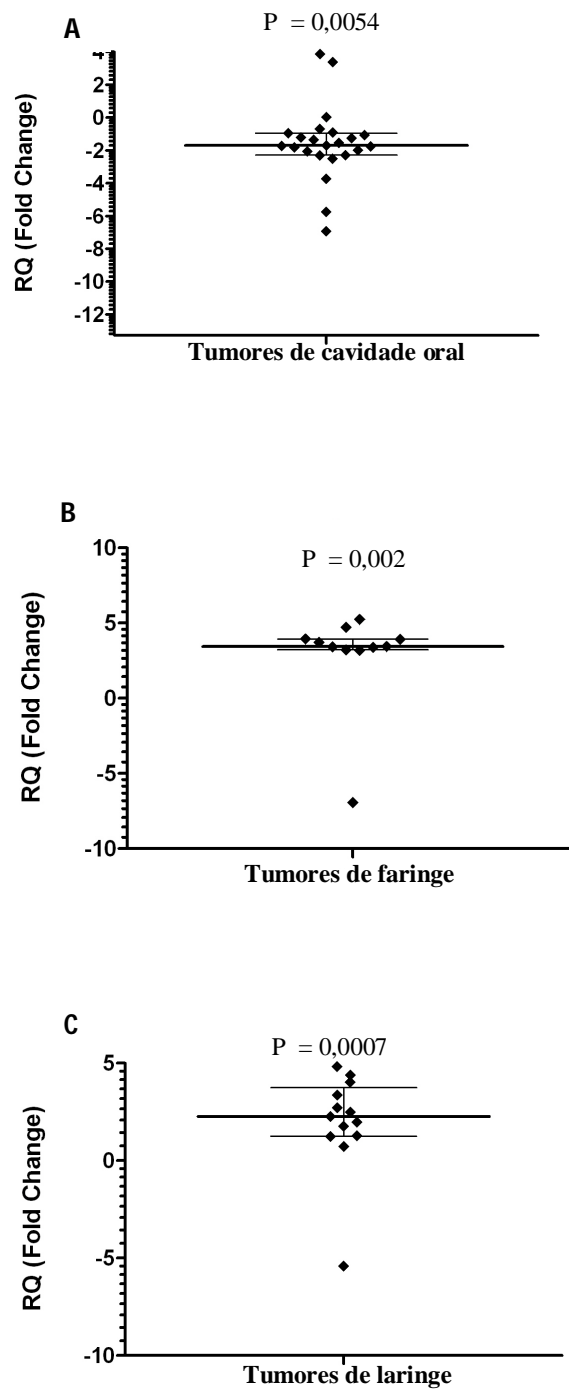


Figura 18. Expressão de SRPK1 em tumor de cavidade oral (A), faringe (B) e laringe (C) em relação às amostras normais. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

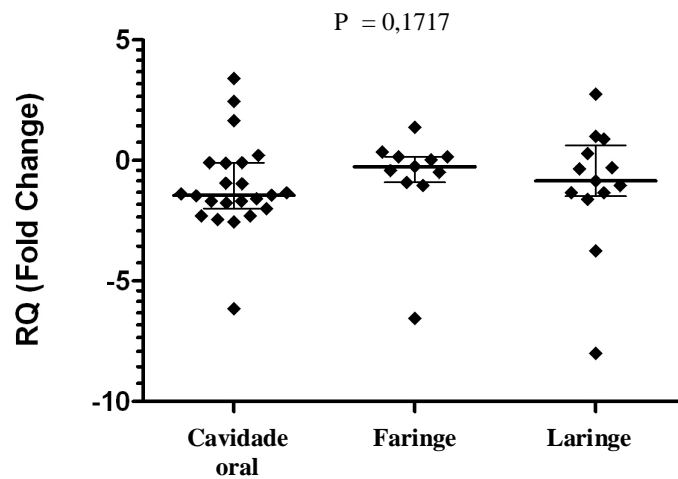


Figura 19. Expressão de RNAm de SRp55 em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

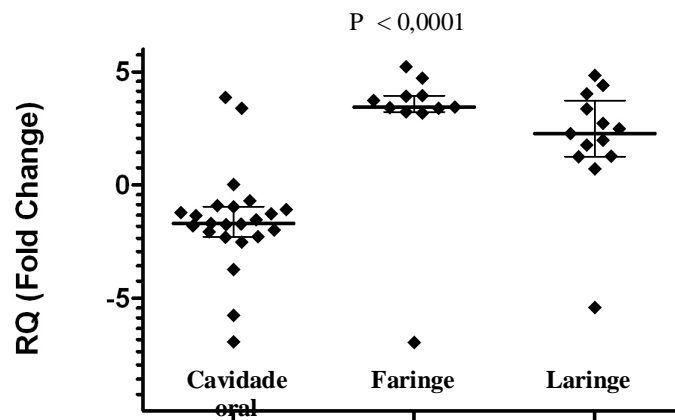


Figura 20. Expressão de RNAm de SRPK1 em relação aos sítios anatômicos de ocorrência do tumor. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

A expressão das proteínas ASF/SF2, SRp40, SRp55 e SRPK1 foi avaliada de acordo com a progressão tumoral. A expressão de SRp55 foi menor nos tumores mais avançados em relação aos menos avançados ($P = 0,0499$) (Figura 21). Os valores de expressão dos genes ASF/SF2, SRp40 e SRPK1 não diferiram significativamente de acordo com a progressão tumoral ($P > 0,05$) (Figuras 22, 23 e 24).

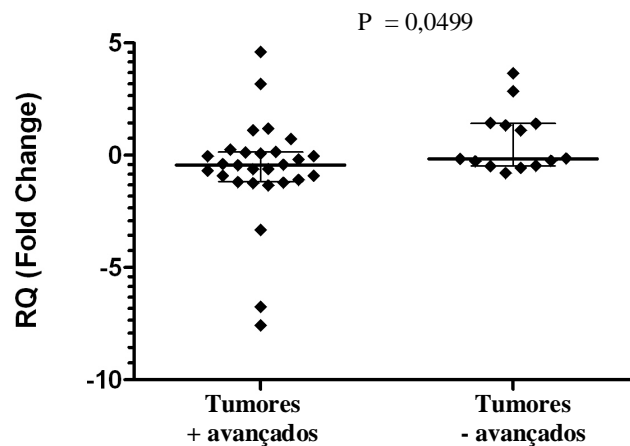


Figura 21. Expressão de SRp55 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

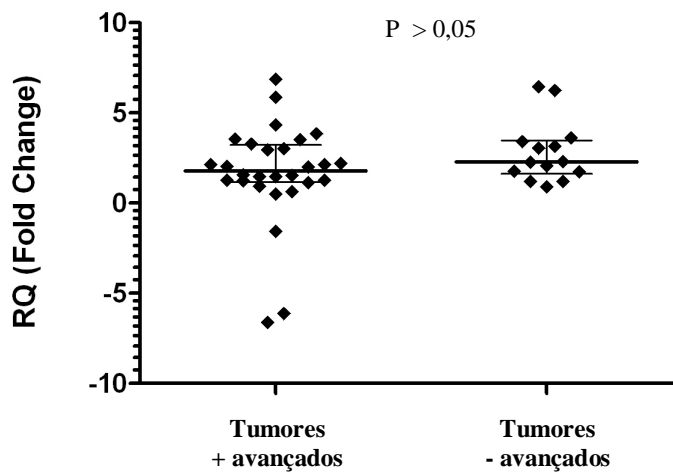


Figura 22. Expressão de ASF/SF2 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

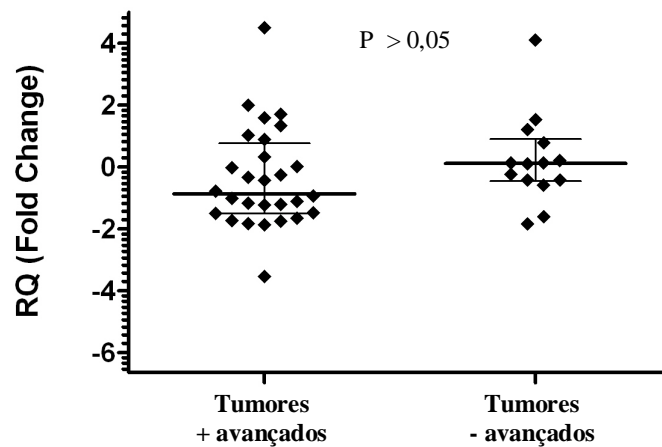


Figura 23. Expressão de SRp40 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

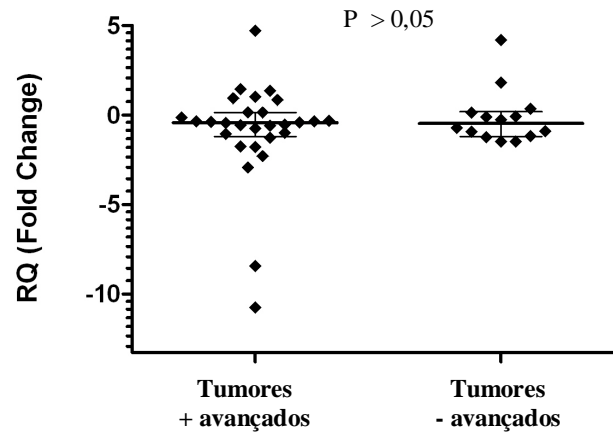


Figura 24. Expressão de SRPK1 em relação à progressão tumoral. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

A comparação dos valores de expressão das proteínas reguladoras de *splicing* nos tumores e tecidos normais de acordo com a progressão tumoral mostrou que a proteína ASF/SF2 apresentou expressão elevada em tumores mais avançados em relação aos tecidos normais ($P < 0,0001$) (Figura 25). Em tumores menos avançados, ASF/SF2 também foi mais expressa quando comparada às amostras normais ($P = 0,0001$). SRp55, SRp40 e SRPK1 não apresentaram diferença significativa de expressão tanto em tumores mais avançados quanto em tumores com menor progressão em relação aos tecidos normais ($P > 0,05$) (Figuras 26, 27 e 28).

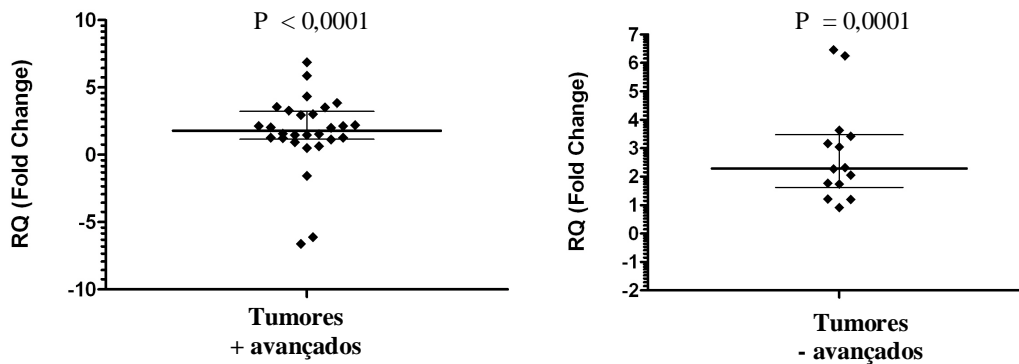


Figura 25. Expressão de ASF/SF2 em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

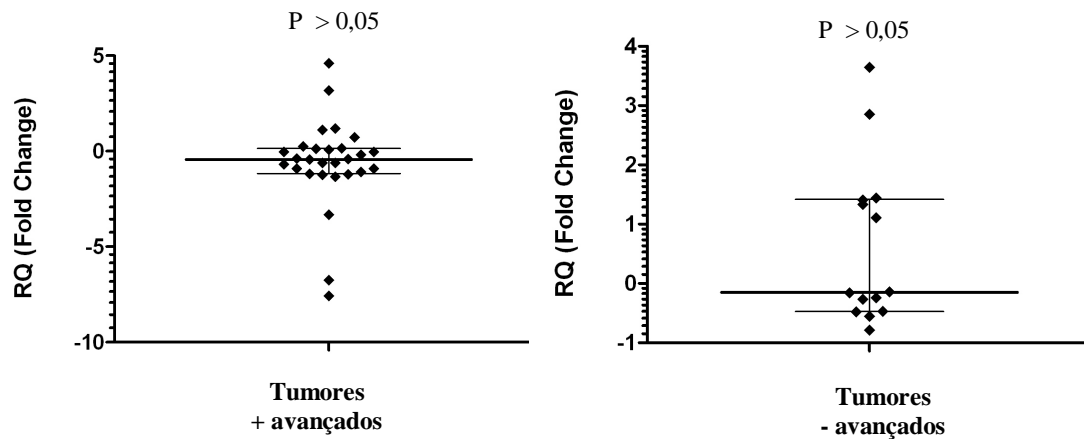


Figura 26. Expressão de SRp55 em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

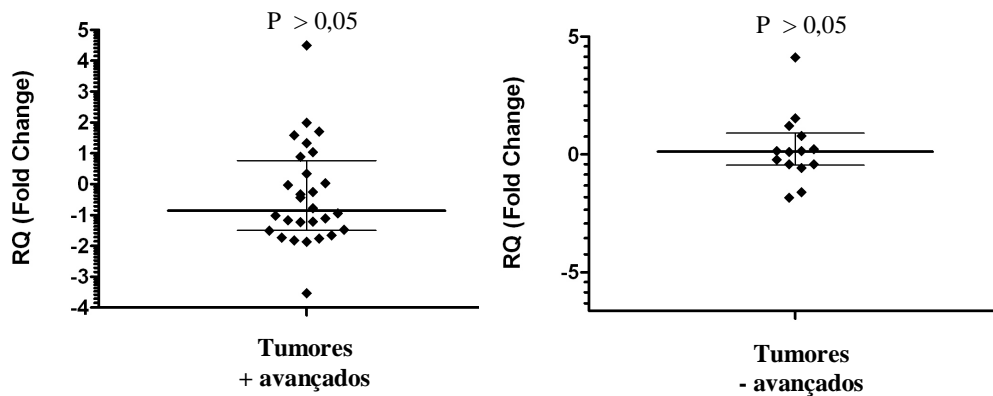


Figura 27. Expressão de SRp40 em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

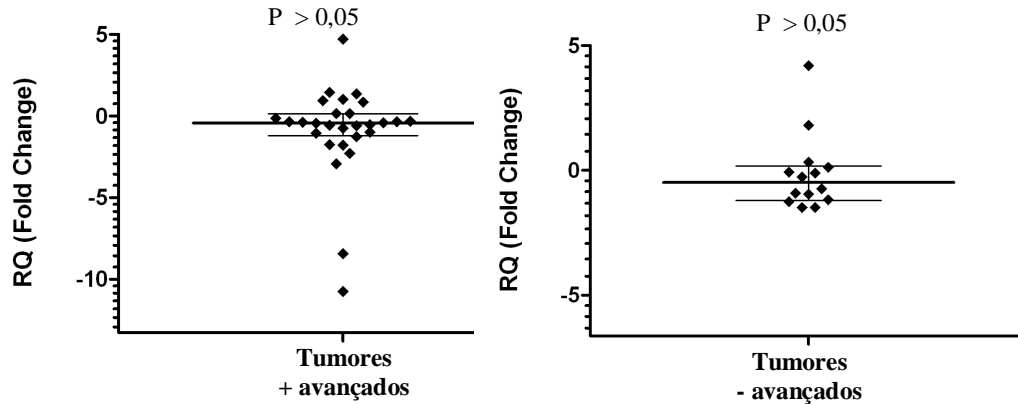


Figura 28. Expressão de SRPK1 em tumores mais avançados e menos avançados em relação às amostras de tecido normal. Os dados foram apresentados como mediana com variação interquartil (percentil 25% e percentil 75%). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2.

3.3. Correlação entre as isoformas de VEGF e entre fatores reguladores de *splicing* e VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b

Correlação positiva foi observada entre os valores de expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço ($P < 0,001$) (Figura 29). As proteínas ASF/SF2, SRp55 e SRp40 apresentaram correlação positiva com ambas as isoformas de VEGF (Tabela 6). A proteína SRPK1 foi correlacionada positivamente com ASF/SF2, SRp55 e SRp40 nos tecidos tumorais (Tabela 7).

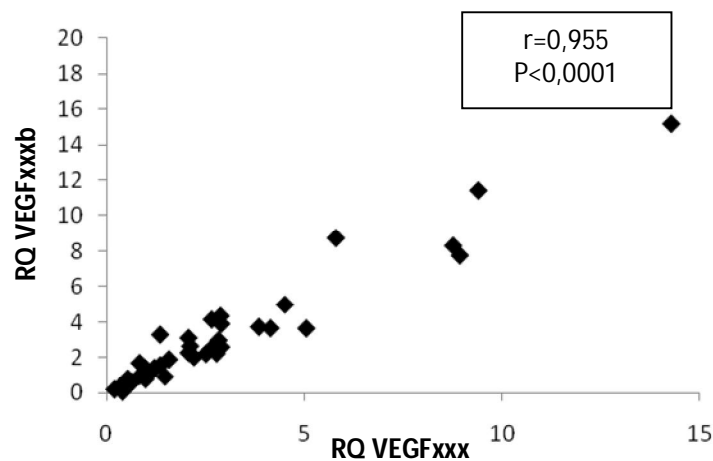


Figura 29. Correlação positiva entre os valores de expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço.

Tabela 6. Correlação entre os fatores reguladores de *splicing* e as isoformas de VEGF em tumores de cabeça e pescoço.

Fator regulador de <i>splicing</i>	VEGFxxx		VEGFxxx _b	
	r*	Valor de P	r*	Valor de P
ASF/SF2	0,506	0,0004	0,533	0,0001
SRp55	0,455	0,002	0,480	0,001
SRp40	0,519	0,0003	0,503	0,0004
SRPK1	0,202	0,183	0,262	0,078

*Fator de correlação de Sperman.

Tabela 7. Correlação entre o fator regulador de *splicing* SRPK1 e as proteínas SR (ASF/SF2, SRp55 e SRp40) em tumores de cabeça e pescoço.

Fator regulador de <i>splicing</i> (proteínas SR)	SRPK1	
	r*	Valor de P
ASF/SF2	0,526	0,0002
SRp55	0,579	<0,0001
SRp40	0,441	0,002

*Fator de correlação de Sperman.

4. DISCUSSÃO

Discussão

A importância da proteína VEGF-A no processo de angiogênese normal e patológico tem sido amplamente explorada e documentada nas últimas décadas.⁽⁵¹⁾ A expressão elevada de *VEGF-A* resulta em aumento da angiogênese, enquanto a expressão reduzida favorece a redução do processo angiogênico em estágios normais e patológicos.⁽⁵²⁾ O aumento da expressão de VEGF-A é associado ao crescimento tumoral e esta proteína tornou-se um dos principais alvos para terapias contra tumores sólidos. Drogas anti-VEGF-A, como bevacizumab e sunitinib, são frequentemente utilizadas em pacientes com câncer^(53,54,55) e a inibição de VEGF-A tem mostrado eficácia também na inibição da angiogênese ocular em retinopatia diabética.⁽⁵⁶⁾ Assim, a expressão deste gene é considerada um fator determinante na evolução tumoral. Embora a contribuição de VEGF-A para desenvolvimento do câncer esteja bem estabelecida, estudos sugerem que o *splicing* do gene *VEGF-A* pode também ser um fator importante para o desenvolvimento do tumor.

O processo de vascularização tumoral não é totalmente conhecido, mas VEGF-A parece ser o fator de crescimento vascular predominante na maioria dos tumores.⁽²⁴⁾ O aumento da expressão de VEGF é observado em tumores sólidos, tais como de mama,⁽²⁵⁾ colorretal⁽²⁶⁾ e carcinoma espinocelular da cavidade oral.^(27,28,57) Para este último, a imunoreatividade imunohistoquímica positiva de VEGF foi significativamente associada a um pior prognóstico^(27,28) e à redução na taxa de sobrevivência.⁽²⁷⁾

Embora a biologia das isoformas de VEGF-A geradas por *splicing* seja pouco conhecida, sabe-se que estas são, geralmente, co-expressas em todos os tecidos, sendo o VEGF₁₆₅ a forma predominante^(31,58,59). O gene *VEGF-A* contém oito éxons, que podem

dar origem às cinco principais isoformas: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆.⁽⁵¹⁾

Em 2002, uma nova família de isoformas de VEGF-A, gerada por *splicing* alternativo, foi relatada e denominada VEGF_{xxx}b.^(24,36) Esses transcritos incorporam um éxon diferente (chamado de éxon 8b, sequência SLTRKD) ao invés do clássico éxon 8a (sequência CDKPRR) encontrado nos transcritos angiogênicos.⁽²⁴⁾ Bates *et al.* (2002)⁽²⁴⁾ identificaram a isoforma VEGF_{165b} em carcinoma renal, a qual apresentou expressão reduzida, sendo, então, considerada como um fator anti-angiogênico.⁽⁵²⁾ Assim, informações quantitativas dos níveis de expressão de VEGF_{xxx}b em tumores se mostram necessários, não somente para o entendimento do papel biológico, mas também para aplicações clínicas.⁽⁵²⁾

A proteína VEGF_{165b} mostrou 96% de homologia com VEGF₁₆₅ e se liga aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 com a mesma afinidade; entretanto, possui um efeito diferencial. Os seis aminoácidos C terminais da proteína VEGF são importantes para ligação com o receptor VEGFR-1, que é necessário para a completa ativação de VEGFR-2. VEGF_{165b} não se liga a VEGFR-1 e isso ocorre provavelmente devido à sua estrutura 3D alterada, uma vez que possui sequência diferente de aminoácidos na região C terminal.^(39,40) Esses dados indicam que VEGF_{165b} não é capaz de promover a formação do complexo VEGFR-1/VEGFR-2,^(39,40) levando a uma rotação parcial do domínio intracelular de VEGFR-2.⁽⁶⁰⁾

Não existem dados na literatura sobre o papel da família VEGF_{xxx}b em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, mas outros tipos tumorais apresentaram expressão reduzida dessa isoforma, sugerindo um papel inibidor no processo angiogênico.^(24,36,61,62) Entre os tipos tumorais em que há expressão reduzida de

VEGF_{xxx}b destacam-se câncer de próstata,⁽³⁶⁾ carcinoma de células renais,⁽²⁴⁾ carcinoma colorretal⁽⁶¹⁾ e melanoma.⁽⁶²⁾ Além disso, VEGF_{xxx}b foi considerado um supressor de tumor e foi considerado um bom marcador para avaliação do prognóstico de pacientes com câncer de cólon.⁽⁶³⁾

Há evidências de que VEGF_{xxx}b não exerce efeito pró-angiogênico *in vivo*⁽³⁶⁾ e é capaz de inibir a migração e proliferação de células endoteliais mediadas por VEGF₁₆₅, além da vasodilatação *ex vivo*.^(24,64,65) Além disso, mostrou inibir a angiogênese fisiológica em tecido mamário de animais transgênicos e, também, a angiogênese patológica em seis diferentes modelos de tumores *in vivo* após administração de células transfectadas com VEGF_{xxx}b, construções adenovirais ou proteínas recombinantes humanas.^(36,61,64,65)

Além da isoforma VEGF₁₆₅b, a expressão elevada da isoforma VEGF₁₂₁b em células tumorais transplantadas em camundongos também mostrou resultar em inibição do crescimento.^(61,62, 64,65,66) Tais estudos reforçam a hipótese de que alterações no mecanismo de *splicing* poderiam favorecer o aumento de transcritos VEGF_{xxx} em algumas doenças relacionadas à angiogênese e reduzir a expressão de isoformas VEGF_{xxx}b, expressas principalmente em tecidos normais.

A grande maioria dos estudos sobre expressão de VEGF utilizam metodologias que não distinguem o VEGF₁₆₅b de outras isoformas, principalmente da isoforma VEGF₁₆₅.⁽²⁴⁾ Neste estudo foram utilizadas metodologias para diferenciar as duas famílias de isoformas de VEGF geradas por *splicing* alternativo e expressão elevada de ambas as isoformas de VEGF (VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b) foram observadas nas amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço quando comparadas às amostras de tecido normal. Esse resultado corrobora com estudo em carcinoma de bexiga, que também

mostrou expressão elevada da isoforma VEGF_{165b} nos tecidos tumorais,⁽⁵²⁾ sugerindo uma contribuição diferencial dessa isoforma nesse tipo de tumor em relação àquela observada em carcinoma de células renais e câncer de próstata.^(24,36)

A análise de expressão das isoformas VEGF_{xxx}b em biópsias de tecido tumoral de mama e tecidos normais por *microarray* mostrou que estas apresentam expressão elevada em câncer de mama quando comparadas ao tecido mamário normal, no qual a expressão de VEGF_{xxx}b não foi detectada.⁽⁶⁷⁾ Todos os tecidos analisados foram positivos para VEGF total, incluindo o epitélio normal. Análise semi-quantitativa mostrou que os níveis de proteínas de ambos VEGF total e VEGF_{xxx}b foram significativamente maiores no tumor em relação ao tecido normal.⁽⁶⁷⁾ Esses dados estão de acordo com o presente estudo, no qual ambas as isoformas de VEGF apresentaram expressão significativamente elevada nos tumores em relação aos tecidos normais.

A existência de correlação positiva entre a expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b em tumores de cabeça e pescoço, observada no presente estudo, indica que as duas famílias de VEGF são expressas de maneira significativa em tumores e sugere que ambas podem possuir propriedades angiogênicas. Catena e colaboradores (2010)⁽⁶⁷⁾ produziram proteínas VEGF_{121b} e VEGF_{165b} recombinantes em extrato de *Pichia pastoris*, para testar *in vitro* e *in vivo* seus efeitos anti-angiogênicos e suas propriedades anti-tumorais. Os autores observaram que ambas as isoformas induziram a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) e a fosforilação de VEGFR-2. O efeito das isoformas VEGF_{121/165b} foi mais brando em relação ao VEGF₁₆₅. A proliferação de HUVECs foi aproximadamente 50% menos estimulada pelas isoformas VEGF_{121/165b} em relação à utilização da proteína recombinante VEGF₁₆₅. Segundo os autores, os resultados deste estudo demonstram que VEGF_{121/165b} não são anti-

angiogênicos, mas isoformas do VEGF-A com menor eficiência no processo angiogênico.⁽⁶⁷⁾

Segundo Catena *et. al.* (2010),⁽⁶⁷⁾ ambas as isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b competem igualmente pela ligação com o receptor. Devido à isoforma VEGF_{xxx}b induzir a angiogênese de maneira menos efetiva, tumores que expressam quantidades elevadas de VEGF_{xxx}b apresentam tamanho menor quando comparados a tumores com alta expressão de VEGF_{xxx}.

No presente estudo, tumores de faringe apresentaram expressão mais elevada de VEGF_{xxx} em relação aos outros sítios anatômicos. Isso pode ser explicado pela baixa expressão deste gene em tecido normal de faringe,⁽⁶⁸⁾ que, em decorrência do desenvolvimento tumoral, passa a expressar esse fator de crescimento para garantir a manutenção do crescimento do tumor. Quando comparadas às amostras de tecido normal, amostras tumorais de faringe e laringe apresentaram maior expressão de VEGF_{xxx}. VEGF_{xxx}b apresentou expressão reduzida em tumores de cavidade oral em relação aos outros sítios anatômicos no presente estudo. É possível que VEGF_{xxx}b apresente expressão diferencial dependendo do sítio anatômico de ocorrência. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Elevada expressão de ambas as isoformas de VEGF foi observada em tumores mais avançados em relação aos menos avançados no presente estudo, embora sem significância estatística. Porém, quando os valores de expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b de tumores com maior progressão foram comparados aos tecidos normais, foi observada expressão significativamente elevada de ambas as isoformas em tumores mais avançados. Esses dados corroboram com outros estudos sobre progressão tumoral em cabeça e pescoço.^(69,70) Boonkitticharoen *et. al.* (2008)⁽⁶⁹⁾ observaram expressão elevada

de VEGF em tumores avançados (T3 e T4) e em metástase de linfonodos (N+) de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e faringe, quando comparados a tumores menos agressivos. Em carcinoma espinocelular de laringe, foi observada associação entre a expressão elevada de VEGF e tamanho do tumor e metástase de linfonodos. Há evidências de que a expressão de VEGF está intimamente associada com tumores de maiores dimensões, estadios mais avançados e metástase de linfonodo de carcinoma espinocelular de laringe.⁽⁷⁰⁾

VEGF-A também tem sido associado com linfangiogênese e metástase de linfonodos em outros modelos tumorais, como câncer de pele⁽⁷¹⁾ e fibrosarcoma.⁽⁷²⁾ Entretanto, em alguns modelos tumorais, como tumor de pâncreas, VEGF-A não foi associado com linfangiogênese ou metástase.^(73,74) As variáveis que determinam se VEGF-A é linfangiogênico provavelmente incluem a isoforma de VEGF-A, os níveis de expressão de VEGFR-2 no endotélio linfático e o recrutamento de monócitos e macrófagos que expressam VEGF-C/VEGF-D.⁽⁷⁵⁾

Expressão elevada de VEGF_{xxx}b também foi observada nos tumores mais avançados quando comparados aos tecidos normais. Os resultados obtidos até o presente em relação à expressão de VEGF-A e progressão tumoral, podem incluir a isoforma VEGF_{xxx}b, uma vez que as metodologias utilizadas podem não discriminar as duas famílias de isoformas. Além disso, se existe a possibilidade de VEGF_{xxx}b possuir propriedades pró-angiogênicas, embora menos efetivas do que VEGF_{xxx}, é esperado que essa isoforma também apresente expressão elevada em tumores mais avançados.

Estudo sobre regulação de *splicing* das isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b mostrou que fatores reguladores de *splicing*, como as proteínas SR ASF/SF2, SRp55 e SRp40, são capazes de regular o *splicing* alternativo do pré-RNAm de *VEGF*, o que determina a

região C-terminal da proteína produzida.⁽³⁸⁾ ASF/SF2 e SRp40 foram associados com a seleção de sítio de *splicing* proximal do pré-RNAm de *VEGF*, favorecendo a síntese de VEGF_{xxx}, enquanto o fator SRp55 foi relacionado com a seleção distal, ou seja, com a expressão de VEGF_{xxx}b. Para identificar o papel de SRp55 na regulação da seleção do sítio de *splicing* distal, experimentos de indução de sua expressão mostraram que a expressão elevada de SRp55 em células epiteliais pigmentadas de retina resultou em aumento da expressão de VEGF₁₆₅b.⁽³⁸⁾

No presente estudo, o fator de *splicing* ASF/SF2 apresentou maior expressão em tumores em relação aos tecidos normais, o que explica a expressão mais elevada de VEGF_{xxx} nestas amostras. O gene *SFRS1*, que codifica a proteína ASF/SF2, preenche todos os critérios de classificação de um proto-oncogene, tais como amplificação e ativação gênica em tumores.⁽⁷⁶⁾ Expressão elevada de ASF/SF2 em fibroblastos imortalizados de roedores resultou em formação de sarcomas após injeção em camundongo⁽⁷⁶⁾, enquanto a redução de sua expressão em carcinoma de pulmão inibiu a formação de tumores em modelos animais⁽⁷⁶⁾.

SRPK1 e SRPK2 são conhecidas por fosforilar o fator de *splicing* ASF/SF2 com alta especificidade.^(76,77,78) Foi comprovado que SRPK1 fosforila 12 serinas do domínio RS em ASF/SF2,⁽⁷⁷⁾ e SRPK2 está envolvida na localização de ASF/SF2 dentro do núcleo.⁽⁷⁹⁾ Entretanto, SRPK1 possui outros alvos, incluindo a proteína SRp55, conhecida por favorecer a síntese de VEGF_{xxx}b.⁽³⁸⁾ Assim, a expressão reduzida de SRPK1 nas amostras tumorais observada no presente estudo poderia explicar a baixa expressão, embora não significativa, de SRp55. Clk1, outra proteína SR quinase, também mostrou capacidade de fosforilar alguns fatores de *splicing* incluindo ASF/SF2, SRp55 e SRp40.^(45,46) Embora SRPK1 tenha apresentado expressão reduzida, a

expressão de Clk1/sty, não avaliada neste estudo, poderia estar intimamente relacionada com o aumento da expressão de VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b, uma vez que fosforila as proteínas reguladoras de ambas as isoformas.

Por outro lado, estudos em tumores de mama e cólon mostraram aumento da expressão de RNAm de SRPK1, associado à gravidade tumoral.⁽⁸⁰⁾ Além disso, sabe-se que drogas anti-câncer, como gemcitabina e cisplatina, aumentam a apoptose celular com muito mais eficácia quando a fosforilação de proteínas SR é inibida pelo uso de RNA de interferência (siRNA) contra SRPK1.⁽⁸¹⁾ Nota-se, no presente estudo, que SRPK1 apresentou expressão elevada em tumores de faringe em relação aos outros sítios, sugerindo uma expressão diferencial entre os tecidos.

A expressão de SRp55 está associada com a seleção do sítio de *splicing* distal, ou seja, com a expressão de VEGF_{xxx}b. VEGF_{xxx}b apresentou expressão elevada nos tumores de cabeça e pescoço no presente estudo, embora o mesmo não tenha sido observado para a proteína SRp55. Outros fatores podem estar associados à regulação de VEGF, como hipoxia,⁽⁸²⁾ interleucina 1 β (IL-1 β),⁽⁸³⁾ fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1),⁽⁸⁴⁾ fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1)⁽⁸⁵⁾ e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).⁽⁸⁶⁾ Além disso, sabe-se que VEGF pode ser inibido por hiperoxia,⁽⁸⁷⁾ IL-10 e IL-13.⁽⁸⁸⁾ Entretanto, o mecanismo de influência destes fatores na regulação de *splicing* das famílias VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b ainda é pouco conhecido.

Sabe-se que efeito semelhante ao ASF/SF2 na seleção de *splicing* proximal de VEGF é observado para a proteína IGF-1, também implicada no desenvolvimento de tumores e no processo angiogênico.⁽⁸⁹⁾ IGF-1 promove, indiretamente, o aumento da angiogênese, por favorecer a expressão de VEGF.^(90,91,92) Estudo mostrou que IGF-1 é

capaz de alterar o mecanismo de *splicing* em cultura de células epiteliais e promover a expressão de isoformas VEGF_{xxx}, ao invés de VEGF_{xxx}b.⁽³⁸⁾ O aumento das isoformas VEGF_{xxx} mediado por IGF-1, utilizando o sítio de *splicing* proximal, é inibido pelo bloqueio de SRPK1 e SRPK2, e isso pode ser revertido pela indução de expressão elevada de SRPK1. Esses dados confirmam que esta cascata está envolvida na seleção do sítio de *splicing* no gene *VEGF-A*.⁽⁷⁹⁾

A correlação positiva observada entre as proteínas ASF/SF2, SRp55 e SRp40 com ambas as isoformas de VEGF, no presente estudo, sugere que esses fatores podem apresentar interação para promover a expressão de ambas as isoformas, as quais parecem possuir efeito angiogênico, embora em diferentes intensidades.

A proteína quinase SRPK1 foi correlacionada positivamente com ASF/SF2, SRp55 e SRp40 nos tecidos tumorais. Até o presente, sabe-se que SRPK1 fosforila ASF/SF2, mas pode também fosforilar outros fatores, como SRp55. Sabe-se também que outras proteínas quinases, como Clk1, estão associadas com fosforilação tanto de ASF/ASF2, quanto de SRp55 e SRp40. Ainda, as proteínas SRs podem ser reguladas indiretamente por MAPKs e PKCs.^(45,46) Assim, outros fatores podem contribuir para a expressão dessas proteínas nas amostras tumorais.

Segundo Catena e colaboradores (2010),⁽⁶⁷⁾ é possível que terapias baseadas na administração de VEGF_{xxx}b sejam eficientes em tumores com alta expressão de VEGF_{xxx} endógeno, uma vez que as isoformas VEGF_{xxx}b competem com VEGF_{xxx} pela ligação ao receptor e não são capazes de induzir eficientemente o processo angiogênico. Entretanto, a utilização desta terapia em tumores com baixa expressão de VEGF_{xxx}, os quais podem contar com outros fatores angiogênicos para seu crescimento (como IL-8, fator de crescimento fibroblástico, entre outros), pode favorecer a evolução tumoral.

Assim, há dúvidas sobre a eficácia de terapias com VEGF_{xxx}b em pacientes não selecionados. É necessário definir critérios para a inclusão dos pacientes em tais terapias, estratificando, por exemplo, pela produção de VEGF_{xxx}.

O presente estudo não avaliou a expressão protéica das isoformas de VEGF-A e das proteínas reguladoras de *splicing*. É importante ressaltar a importância da realização de metodologias para confirmação da real expressão dessas proteínas, a despeito da expressão do RNAm, uma vez que existem diversos processos de regulação pós-transcricional, que podem influenciar na síntese protéica.

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

1. As expressões elevadas tanto de VEGF_{xxx} quanto VEGF_{xxx}b em tecidos tumorais sugere que ambas as isoformas podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço.

2. A proteína reguladora de *splicing* ASF/SF2 está envolvida na carcinogênese de cabeça e pescoço.

3. Em tumores de cabeça e pescoço, a expressão dos fatores reguladores de *splicing* ASF/SF2, SRp55 e SRp40 é positivamente correlacionada com a expressão de ambas as isoformas de VEGF. Por sua vez, a expressão da proteína SRPK1 é positivamente correlacionada com a expressão de ASF/SF2, SRp55 e SRp40.

4. VEGF_{xxx} contribui para o desenvolvimento de tumores de faringe e ambas as isoformas estão envolvidas com a progressão tumoral.

5. A proteína SRPK1 apresentou expressão diferencial entre os sítios anatômicos de tumor e a proteína SRp55, em relação à progressão tumoral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. Lee KJ. Essential Otolaryngology-Head & Neck Surgery. 8^a ed.; 2003. p.1136.
2. Rogin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a Human Papillomavirus. J Den Res 2007; 86: 104-14.
3. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. J Natl Cancer Inst 2004; 96: 99-106.
4. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc 2008; 83:489-501.
5. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. Lancet Oncol 2006; 7:149-56.
6. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International head and neck cancer epidemiology consortium. J Natl Cancer Inst 2007; 99: 777-89.
7. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H et al.. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. J Oral Pathol Med 2008; 37: 157-65.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 2011; 144:646-74.

10. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401-10.
11. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-60.
12. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
13. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:1207-25.
14. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008; 8:880-7.
15. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29:10-4.
16. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8915-9.
17. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 2000; 56:787-97.
18. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1419-31.
19. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-7.

20. Couffinhal T, Kearney M, Witzendichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997; 150: 1673-85.
21. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103:1191-6.
22. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994; 180:341-6.
23. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42.
24. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4123-31.
25. Schneider BP and Miller KD. Angiogenesis of breast cancer, *J Clin Oncol* 2005; 23: 1782-90.
26. Ferroni P, Spila A, Martini F, D'Alessandro R, Mariotti S, Del Monte G. et al., Prognostic value of vascular endothelial growth factor tumor tissue content of colorectal cancer. *Oncology* 2006; 69:145-53.
27. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell

- carcinoma: its association with tumor progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998; 51:771-5.
28. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, et al., Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40: 321-5.
29. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-14.
30. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007; 249:133-42.
31. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22.
32. Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25.
33. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Investig. Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:752-9.
34. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272:7151-8.
35. Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson PW, Harper SJ. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and

- receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci* 1999; 97:303-12.
36. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004; 64:7822-35.
37. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005; 48:2422-7.
38. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008; 121:3487-95.
39. Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:2067-77.
40. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 2008; 68:4683-92.

41. Qiu Y, Bevan H, Weeraperuma S, Wrating D, Murphy D, Neal CR, et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J* 2007; 22:1104-12.
42. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci* 2006; 110:575-85.
43. Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y, et al. Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:719-29.
44. Manley JL, Tacke R. SR proteins and splicing control. *Genes Dev* 1996; 10:1569-79.
45. Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6991-7000.
46. Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J* 2003; 371:937-45.
47. Greene FL, Balch CM, Page DL, et al, editors. *Penis*. In: American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual. 6th edition. New York: Springer-Verlag; 2002:303-8.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCt} Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

49. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 1:30-6.
50. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0034.
51. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611.
52. Das K, Zhao Y, Sugiono M, Lau W, Tan PH, Cheng C. Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2007; 25:317-21.
53. Jain RK: Lessons from multidisciplinary translational trials on antiangiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008, 8:309-316.
54. Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967-974.
55. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-49.
56. Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: The agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999; 48: 1899-906.
57. Jaiswal SG, Gadbail AR, Chaudhary MS, Jaiswal GR, Gawande M. Correlation Of Serum Levels Of Vascular Endothelial Growth Factor With TNM Staging, Histopathologic Grading, And Surgical Therapy For Oral Squamous Cell Carcinoma. *Quintessence Int* 2011; 42:771-9.

58. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, et al. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7282–91.
59. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:211-20.
60. Ruch C, Skiniotis G, Steinmetz MO, Walz T, Ballmer-Hofer K. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:249-50.
61. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008; 98:1366–79.
62. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007; 97:223-30.
63. Díaz R, Peña C, Silva J, Lorenzo Y, García V, García JM, Sánchez A, Espinosa P, Yuste R, Bonilla F, Domínguez G. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* 2008; 123:1060-7.
64. Rennel E, Waine E, Guan H, Schuler Y, Leenders W, Woolard J, Sugiono M, Gillatt D, Kleinerman E, Bates D, Harper S: The endogenous antiangiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008; 98:1250-7.

65. Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, Magnussen A, Schuler Y, Kelly SP, Finucane C, Ellison D, Cebe-Suarez S, Ballmer-Hofer K, Mather S, Stewart L, Bates DO, Harper SJ: Recombinant human VEGF_{165b} protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer* 2008; 44:1883-94.
66. Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ, Wheatley ER, Stewart L, Mather S, Bates DO, Harper SJ: VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* 2009; 101:1183-1193.
67. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 2010; 9:320.
68. EST Profile. Hs.73793 - VEGFA: Vascular endothelial growth factor A, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.73793>.
69. Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphibul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, Chintrakarn C, Pochanukul L. Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 134:1305-11.
70. Sullu Y, Gun S, Atmaca S, Karagoz F, Kandemir B. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Diagn Pathol* 2010; 5:35.

-
71. Hirakawa S, Kodama S, Kunsfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201:1089-99.
72. Björndahl MA, Cao R, Burton JB, et al. Vascular endothelial growth factor-A promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2005; 65:9261-9267.
73. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7:186-191.
74. Gannon G, Mandriota SJ, Cui L, Baetens D, Pepper MS, Christofori G. Overexpression of vascular endothelial growth factor-A 165 enhances tumor angiogenesis but not metastasis during α -cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:6038.
75. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread: new players begin to emerge. *Int J Cancer* 2006;119:1755-60.
76. Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D., and Krainer, A. R. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 185-93.
77. Ma CT, Velazquez-Dones A, Hagopian JC, Ghosh G, Fu XD, Adams JA. Ordered multi-site phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 by SRPK1. *J Mol Biol* 2008; 376:55-68.
78. Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Cáceres JF, Pawson T, Fu XD. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem* 1996; 271:24569-75.

79. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR, Bates DO. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285:5532-40.
80. Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 2007; 67:2072-80.
81. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66:3819-27.
82. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-5.
83. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270:308-12.
84. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH Jr, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1996;137:2262-8.

85. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:6271-4.
86. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 1997; 15:669–676.
87. Perkett EA, Klekamp JG. Vascular endothelial growth factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 hours of hyperoxia: implications for endothelial cell survival. *Chest* 1998;114:52S–53S.
88. Matsumoto K, Ohi H, Kanmatsuse K. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 1997;77:212-8.
89. Slomiany MG, Rosenzweig SA. IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 alpha expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2838-47.
90. Beckert S, Farrahi F, Perveen Ghani Q, Aslam R, Scheuenstuhl H, Coerper S, Königsrainer A, Hunt TK, Hussain MZ. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341:67-72
91. Slomiany, M.G., L.A. Black, M.M. Kibbey, T.A. Day, and S.A. Rosenzweig. IGF-1 induced vascular endothelial growth factor secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342:851-8.

93. Wang YZ, Wong YC. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate*. 1998; 35:165-77

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

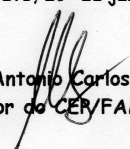
Parecer n.º 210/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3598/2009 sob a responsabilidade de Patrícia Matos Biselli Chicote, com o título "Mecanismos de splicing, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica em câncer de cabeça e pescoço" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 29 de junho de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CER/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: **Mecanismos de *splicing*, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica em câncer de cabeça e pescoço.**

Pesquisadora Responsável: _____

Eu.....RG.....
nascido(a) em/...../..... e domiciliado(a) à,
município deusuário (a) (ou responsável legal pelo
usuário).....,
declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa
“**Mecanismos de *splicing*, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica
em câncer de cabeça e pescoço**” e que também fui satisfatoriamente esclarecido(a)
que: A) o objetivo do estudo é investigar o material genético de tumores de pacientes
com câncer de cabeça e pescoço; B) durante a cirurgia, o médico irá remover o tumor e
um pedaço dele não será usado para diagnóstico e poderá ser congelado e
posteriormente utilizado para estudo genético/molecular. A obtenção deste fragmento
não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e não resultará em aumento no tempo
de operação ou na extensão da cirurgia; C) será utilizado um grupo controle com as
margens dos tumores (tecidos aparentemente normais); D) o material será identificado
no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e
identidade serão preservadas; E) todas as informações obtidas por meio da história
clínica e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes só serão utilizados para
divulgação em reuniões e revistas científicas; F) se eu concordar em participar desta
pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do material, do modo descrito acima,
não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados
decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, ou decidir retirar meu consentimento em
qualquer momento, minha decisão não influenciará, de modo algum, o meu tratamento;
G) esse estudo é importante porque pode colaborar para o conhecimento científico
dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor; H) Os resultados serão
divulgados após a conclusão do estudo em forma de artigos científicos ou trabalhos
apresentados em congressos.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto
em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a
qualquer tipo de pressão. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em
questão.

RG do prontuário médico:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e
benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas.
Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para
esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelo endereço abaixo indicado.

Pesquisador responsável:

Data:...../...../..... Assinatura:.....