



ANDREIA BUFALINO

**“ATIVINA A REGULA EVENTOS IMPORTANTES PARA A
TUMORIGÊNESE ORAL E É UM FATOR PROGNÓSTICO DE
SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA PARA PACIENTES COM
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL”**

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANDREIA BUFALINO

“Ativina A regula eventos importantes para a tumorigênese oral e é um fator prognóstico de sobrevida livre de doença para pacientes com carcinoma espinocelular oral”

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
ESTOMATOPATOLOGIA NA ÁREA DE PATOLOGIA.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ANDREIA BUFALINO,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B863a Bufalino, Andreia, 1983-
Ativina A regula eventos importantes para a tumorigênese oral e é um fator prognóstico de sobrevida livre de doença para pacientes com carcinoma espinocelular oral / Andreia Bufalino. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Marcadores biológicos de tumor. 2. Fator de crescimento transformador beta. 3. Subunidades beta de Inibinas. 4. Folistatina. I. Della Coletta, Ricardo, 1972- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Activin A play important roles in oral tumorigenesis and is a prognostic factor for disease-free survival in patients with oral squamous cell carcinoma

Palavras-chave em Inglês:

Biological tumor markers

Transforming growth factor beta

Inhibin-beta subunit

Follistatin

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Carlos Rossa Júnior

Eliete Neves da Silva Guerra

Edgard Graner

Décio dos Santos Pinto Júnior

Data da defesa: 23-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 23 de Maio de 2013, considerou a candidata ANDREIA BUFALINO aprovada.

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Prof. Dr. CARLOS ROSSA JÚNIOR

Profa. Dra. ELIETE NEVES DA SILVA GUERRA

Prof. Dr. EDGARD GRANER

Prof. Dr. DÉCIO DOS SANTOS PINTO JÚNIOR

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, **Giuseppe Bufalino (*In Memoriam*)**, que mostrou a grande importância de amar aquilo que se faz e que a incansável dedicação é consequência deste amor a profissão.

A minha querida mãe, **Maria do Carmo Bradinuchi Bufalino**, pelo grande apoio e amor incondicionais que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com o apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. **Jacks Jorge Júnior**;

Ao Prof. Dr. **Alan Roger Santos Silva** coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela disponibilidade com que sempre me recebeu;

À **FAPESP** pelo financiamento deste estudo por meio do Projeto de Pesquisa (Processo nº 2011/00659-7) e da Bolsa de Doutorado (processo nº 2010/52541-7);

Aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida e Alan Roger Santos Silva**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo exemplo de dedicação a docência;

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ricardo Della Coletta**, pelos ensinamentos valiosos e pela grande competência como professor e orientador. Registro também toda a minha gratidão pela confiança, paciência, pelas oportunidades a mim concedidas e pelo exemplo de dedicação e competência profissional;

Aos meus queridos pais, **Giuseppe Bufalino (*In Memoriam*) e Maria do Carmo Bradinuchi Bufalino**, pelo imenso apoio e por todos os ensinamentos que me foram passados;

Aos meus irmãos, **Adriana, Ricardo, Alessandra e Marco**, pelo carinho e companheirismo;

Ao meu namorado, **Emmanuel** pelo carinho, conselhos e atenção integral durante estes dois anos juntos;

Às Profas. Dras. **Cláudia Maria Navarro, Elaine Maria Sgavioli Massucato e Mirian Aparecida Onofre** da Faculdade de Odontologia “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP – Araraquara, não somente por terem me guiado nas fases iniciais da minha formação acadêmica, mas principalmente, pela amizade construída, pelo exemplo de dedicação, pela competência como Estomatopatologistas e por terem me dado a oportunidade de descobrir a minha verdadeira vocação;

Às amigas, **Ana Paula Kovacs, Cássia B. Corrêa e Cássia Borges** pela nossa sincera amizade desde os tempos da faculdade e por estarem sempre presentes no bons e ruins;

Às amigas do laboratório, **Luciana, Sibele, Rose, Andreia, Fernanda, Elizabete e Isadora** pelo carinho, pela confiança, pelas risadas, pelo apoio e incentivo nos momentos em que eu precisei;

Aos amigos Profs Drs. **Michelle Agostini, Lays M. Sobral, Débora Bastos, Fabiana Seguin, Livia Paranaíba, Carolina Bitu, Mário José Romãach, Jorge Esquiche** pela amizade e por terem compartilhado o imenso conhecimento que vocês adquiriram. Espero poder fazer o mesmo e com a mesma capacidade quando essa responsabilidade me for concedida;

Aos meus amigos e colegas de turma da pós-graduação Profs. Drs. **Patrícia Feio, Bruno Benevenuto, Renato Hopp e Daniel Berreta** que desde o início da pós-graduação foram grandes companheiros de estudos e principalmente de risadas;

Às minhas *Roommates*, **Katya Pulido e Marianne Carvalho**, gostaria de deixar registrado o quanto foi bom morar com vocês que estavam sempre prontas para me ajudar e sempre juntas no estudo e nos momentos de diversão;

Ao amigo e colega de pós-graduação, **Wilfredo Gonzalez** pela grande ajuda com as análises imuno-histoquímicas e pelos momentos divertidos;

Aos amigos da pós-graduação **Camilla, Ana Camila, Felipe, Marisol, Alicia, Harim, Rodrigo, Karina, Renato, Estevão, Fernanda Basso, Victor, Sabino,**

Wagner, Sabrina, Lara e Priscila, pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

À bióloga Sra. **Geovania Almeida**, técnica do laboratório de Patologia, pela amizade e colaboração com a elaboração dos materiais histológicas, necessárias para a realização deste trabalho;

À bióloga Sra. **Fabiana Facco Casarotti**, técnica do laboratório de Patologia, pelo carinho e atenção, sempre estando muito disposta para ajudar-me com os trabalhos de imuno-histoquímica necessários para a realização deste trabalho;

Ao biólogo, Sr. **Adriano Luís Martins** funcionário do laboratório de Patologia pelos ensinamentos sobre os equipamentos e soluções do laboratório;

A secretária do departamento de diagnóstico oral, **Luana Ganhor Delafiori**, pela atenção e carinho com que sempre me recebeu;

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, Sr. **João Carlos Gomes da Silva Júnior** e aos funcionários do Orocentro Sra. **Aparecida Conceição Campion, Débora e Rogério**, pela colaboração e generosidade;

A **Deus** por me amparar nos momentos mais difíceis e guiar-me pelos caminhos incertos.

EPÍGRAFE

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

Ativina A é um membro da família dos fatores de crescimento transformante- β e sua expressão tem sido associada ao desenvolvimento tumoral. Contudo, sua expressão, função e mecanismos de regulação, por exemplo, via folistatina, no carcinoma espinocelular (CEC) oral são parcialmente conhecidas. Diante disto, nosso estudo teve como objetivo avaliar a participação de ativina A na tumorigênese dos CECs orais. Para alcançar este objetivo, a expressão imuno-histoquímica de ativina A foi analisada em 115 amostras de CEC oral e sua expressão foi correlacionada com características clínico-patológicas e de sobrevida. In vitro a influência de ativina A sobre os principais eventos biológicos relacionados à tumorigênese oral foi verificada por 3 abordagens: 1) exposição da linhagem celular HaCAT a ativina A recombinante nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ng/ml, 2) tratamento das linhagens tumorais LN2 com folistatina recombinante nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ng/ml e 3) silenciamento estável da expressão de ativina A na linhagem LN2 com RNA de interferência (shINHBA). A expressão aumentada de ativina A em CECs orais foi significativamente correlacionada com a presença de metástases regionais (estadio N, $p=0,034$), tumores classificados como pobremente diferenciados ($p=0,013$) e demonstrou ser preditiva de um menor período de sobrevida livre de doença em 5 anos (HR: 1,74; 95% CI: 1,39-2,97; $p=0,016$). Os resultados dos estudos in vitro revelaram que ativina A apresenta um efeito pleotrópico no controle dos principais eventos associados à tumorigênese oral. A exposição das células HaCAT a ativina A resultou em um significativo bloqueio da morte celular por apoptose e necrose, promoveu alteração do padrão de expressão dos marcadores da transição epitélio mesenquimal (TEM), aumentou a adesão celular aos componentes da matriz extracelular (MEC) e induziu a invasão e migração celular. Por outro lado, o tratamento das células LN2 com folistatina foi capaz de induzir significativamente a apoptose e a morte celular por necrose, reduzir a proliferação celular, alterar o padrão de expressão dos marcadores da TEM, além de reduzir a adesão celular

aos componentes da MEC e os potenciais invasivo e migratório. O bloqueio de ativina A com a transdução estável de shINHBA na linhagem tumoral LN2 promoveu significativamente a apoptose e a morte por necrose, alterou a expressão dos marcadores da TEM de maneira similar aos efeitos da folistatina e reduziu a proliferação, invasão, migração e motilidade celular, que foi avaliada por formação de filopódios e lamelipódios. Interessantemente, o bloqueio com shINHBA significativamente facilitou a adesão das células LN2 aos componentes da MEC, diferente do que foi observado no tratamento com folistatina. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que a ativina A regula eventos biológicos essenciais para a tumorigênese oral e é um fator prognóstico independente de sobrevida livre de doença em pacientes com CECs orais.

Palavras-chave: Marcadores biológicos de tumor, Fator de crescimento transformador beta, Subunidades beta de Inibinas, Folistatina.

ABSTRACT

Activin A is a member of the transforming growth factor- β family and its dysregulated expression has been described in different cancers. However, its expression, function and regulatory mechanisms, particularly via follistatin, in oral squamous cell carcinoma (OSCC) are partially known. The aim of the present study was to evaluate the role of activin A in the promotion of oral tumorigenesis. To achieve this goal, immunohistochemical expression of activin A was analyzed in 115 samples of OSCCs and its expression was correlated with clinicopathological features and outcome. In vitro, the influence of activin A on oral tumorigenesis was determined by 3 different approaches: 1) exposition of HaCaT cells to recombinant activin A in different concentrations (0, 1, 10 and 100 ng/ml), 2) treatment of LN2 tumor cells with recombinant follistatin in different concentrations (0, 1, 10 and 100 ng/ml) and 3) stable knockdown of activin A expression in the LN2 tumor cells by using interfering RNA (shINHBA). Increased activin A expression in OSCCs was significantly correlated with the presence of regional metastases (stage N, $p=0.034$), poorly differentiated tumors ($p=0.013$), and shown to be predictive of a shortened disease-free survival (HR: 1.74, 95% CI: 1.39-2.97, $p=0.016$). In vitro studies showed a pleotropic effect of activin A on control of key events associated with oral tumorigenesis. Activin A resulted in a reduction of cell death by apoptosis and necrosis, promoted changes in the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, increased cell adhesion to extracellular matrix (ECM) components and induced cell invasion and migration in HaCAT cells. On the other hand, the inhibition of activin A using follistatin induced apoptosis and cell death by necrosis, reduced cell proliferation, changed the expression of EMT markers, reduced cell adhesion to ECM components and reduced the cell invasion and migration in LN2 cells. The activin A knockdown with shINHBA stable transduction in the tumor cell line LN2 significantly promoted death by apoptosis and necrosis, changed the expression of EMT markers, and decreased cell proliferation, invasion, migration and motility evaluated by lamellipodia and filopodia formation.

Interestingly, knockdown with shINHBA significantly promoted the adhesion of cells to ECM components in LN2 cells, different to the results observed in the treatment with follistatin. In conclusion, our results suggest that activin A regulate biological events essential for oral tumorigenesis, and is an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with OSCCs.

Key-words: Biological tumor markers, Transforming growth factor beta, Inhibin-beta subunit, Follistatin.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTRI: *Type I activin receptor* – receptores de ativina tipo I

ACTRII: *Type II activin receptor* – receptores de ativina tipo II

ALK2: *type 2 activin receptor-like kinase* - receptor de ativina quinase-like 2

ALK4: *type 4 activin receptor-like kinase* - receptor de ativina quinase-like 2

ATCC: American Type Culture Collection

BAMBI: *Activin membrane-bound inhibitor* - Inibidor de ativina ligado à membrana

BMPs: *bone morphogenetic proteins* - Proteínas morfogenéticas ósseas

BSA: *bovine serum albumine* - albumina sérica bovina

CDK: Quinases dependentes de ciclina

CDKi: *cdk inhibitors* - proteínas inibidoras de cdks

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEC: Carcinoma espinocelular

CGH: *Comparative genomic hybridization* - Hibridização genômica comparativa

Co-Smads: *Common-mediator Smad* - Smads mediadores comuns

CRIPTO: *Teratocarcinoma-derived Growth Factor* - fator de crescimento derivado de teratocarcinoma

DAB: 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium e Ham's F-12 Nutrient Mixture

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Dithiothreitol

ECM: Extracellular matrix

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF-CFC: *epidermal growth factor-Cripto* – *Fato de crescimento epidérmico-Cripto*

ELISA: Ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

ERK: *Extracellular signal-regulated protein kinases* - Quinases reguladores de sinais extracelulares

FBS: Soro fetal bovino

FSH: Follicle-stimulating *hormone* - Hormônio folículo-estimulante

FSTL1: *Related protein follistatin like 1* - proteína relacionada à folistatina

FSTL3: *Follistatin-like 3* – Folistatina like 3

FTIC: *Fluorescein isothiocyanate* -Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDF: *Growth differentiation factor* - Fator de crescimento e diferenciação

GDNF: *Glial cell line-derived neurotrophic factor* - Fator neurotrófico derivado de células gliais

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone* - hormônio libertador de gonadotrofina

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* - ácido 4-2hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfônico

HPV: *Human papiloma virus* - Papiloma vírus humano

hTERT: *Human telomerase catalytic subunit* - Subunidade catalítica da telomerase humana

INCA: Instituto Nacional do Câncer

INHBA: *Inhibin-beta A subunit* - Subunidade beta A de Inibina

I-Smads: *Inhibitory Smads* - Smads inibidores

JNK: *c-Jun N-terminal kinases* - Quinase c-Jun N-terminal

kDa: Kilodalton

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* - Proteína quinase ativadora de mitose

MEC: Matriz extracelular

MIS: *Müllerian inhibiting substance* - Substância inibidora Mulleriana

MMP: *Matrix metalloproteinase* - Metaloproteinase de matriz

mRNA: RNA mensageiro

OD: *Optical density* - Densidade óptica

OSCC: *Oral squamous cell carcinoma*

P16: Proteína p16

P38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinase* - Proteína quinase ativadora de mitose 38 delta

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Rb: *retinoblastoma tumor suppressor protein* - proteína supressora de tumor retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: *RNA interference* - RNA de interferência

R-Smads: *Receptor-regulated Smads* - Smads receptor-reguladas

SARA: *Smad anchor for receptor activation* - smad âncora para a ativação do receptor

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida

TEM: Transição Epitélio Mesenquimal

TGF- β : *Transforming growth factor beta* - Fator de crescimento-beta

TMA: *Tissue microarray* - Microarranjos teciduais

TNM: Tumor Nódulo Metástase

UICC: União Internacional Contra o Câncer

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Carcinoma Espinocelular Oral	5
2.2 Isolamento e Caracterização das Ativinas	9
2.3 Função e Via de Sinalização das Ativinas	12
2.4 Regulação da Sinalização Celular de Ativina A por Antagonistas	18
2.4.1 Folistatina	21
2.5 Ativina A e o Câncer	22
2.6 Ativina A e o Câncer Oral	25
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Aprovação do Comitê de Ética	29
4.2 Amostras para a Análise Imuno-histoquímica	29
4.3 Imuno-histoquímica	30
4.3.1 Reação de Imuno-histoquímica	30
4.3.2 Digitalização e Análise da Marcação Imuno-histoquímica	30

4.4 Cultura de Células	31
4.5 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR Quantitativo (qRT-PCR)	33
4.5.1 Isolamento de RNA Total	33
4.5.2 Análise da Concentração e Integridade do RNA	33
4.5.3 Síntese de cDNA	34
4.5.4 Reação de qRT-PCR	35
4.6 Tratamento com Ativina A e Folistatina Recombinante	35
4.7 Transdução da Linhagem Celular LN2 com Partículas Lentivirais	37
4.8 Análise Morfológica das Culturas Celulares	37
4.9 Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA)	38
4.10 Análise da Apoptose e Necrose	38
4.11 Proliferação e Ciclo Celular	39
4.11.1 Incorporação de BrdU	39
4.11.2. Análise do ciclo celular	40
4.12 Análise dos Marcadores da Transição Epitélio Mesenquimal	41
4.13 Western Blot	41
4.14 Ensaio de Adesão Celular aos Componentes da Matriz Extracelular	42

4.15 Ensaio da Gota em Suspensão (<i>Hanging Drop Assay</i>)	43
4.16 Ensaio de Invasão e Migração Celular	45
4.17 Avaliação de Filopódios e Lamelipódios	45
4.18 Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	47
5.1 Correlação entre a Expressão de Ativina A e as Características Clínico-Patológicas dos CECs Orais	47
5.2 Análise da Expressão de INHBA nas Linhagens Celulares Queratinócitos Normais e Tumorais	54
5.3 Caracterização da Morfologia das Células Tratadas com Ativina A e Folistatina e das Células com Níveis Reduzidos de Expressão de Ativina A	55
5.4 Efeitos de Ativina A sobre a Apoptose e Necrose Celular	57
5.5 Efeitos de Ativina A sobre a Proliferação Celular	60
5.6 Influência de Ativina A sobre Marcadores da TEM	66
5.7 Efeito de Ativina A na Adesão Celular a Proteínas da Matriz Extracelular	71
5.8 Influência de Ativina A sobre a Motilidade e Invasão Celular	73
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÃO	89

REFERÊNCIAS	91
ANEXO	119
Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	119

1. INTRODUÇÃO

O CEC oral, também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral (Scully & Bagan, 2009). Esta neoplasia se desenvolve principalmente em homens com mais de 45 anos e expostos a fatores de risco como tabaco e álcool (Scully & Bagan, 2009). Contudo, um aumento na incidência de CEC oral em pacientes jovens e não expostos aos fatores de risco tradicionais tem sido observado em estudos recentes (Llewellyn *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009; Soudry *et al.*, 2010; Falaki *et al.*, 2011). Apesar dos recentes avanços nos protocolos de tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CEC oral permanece entre 50 e 60% (Bagan & Scully, 2008; Sklenicka *et al.*, 2010; Jerjes *et al.*, 2010). Este baixo índice de sobrevida é principalmente devido ao diagnóstico da doença normalmente em estágio avançado e à elevada propensão para a invasão local e a disseminação regional e à distância (Warnakulasuriya, 2009; Scully & Bagan, 2009). Então, prevenir e diagnosticar a doença nos estágios iniciais estão entre os principais desafios da atualidade. Somado a isso, ainda não existem marcadores biológicos que possam contribuir na orientação da melhor opção terapêutica dos pacientes e na predição do seu prognóstico. Embora nos últimos anos várias características histopatológicas e moleculares tenham sido propostas como fatores de prognóstico do CEC oral, nenhuma ainda é utilizada rotineiramente na clínica, fazendo com que o tradicional estadiamento clínico do paciente, o qual é baseado no sistema tumor nódulo metástase (TNM), ainda seja o principal fator utilizado para indicar o manejo e prognóstico do paciente. Entretanto, em muitos casos estes fatores são inadequados e incapazes de discriminar tumores com o mesmo estadiamento, fazendo com que a busca por novos marcadores biológicos, que possam refletir melhor a diversidade biológica da doença e prever com mais acurácia a resposta do paciente as terapias convencionalmente utilizadas, seja necessária.

O câncer é o resultado de um acúmulo progressivo de modificações genéticas e epigenéticas que leva as células normais a adquirirem características altamente específicas (Hanahan & Weinberg, 2011). Dentre estas características que coletivamente orquestram o crescimento tumoral, podem ser citadas: a capacidade de produzir independentemente sinais de crescimento celular, intensa produção de sinais anti-crescimento para o tecido hospedeiro, evasão dos sinais de morte celular programada, capacidade ilimitada de proliferação, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000). Contudo, recentemente foram propostos outros atributos distintos às células tumorais que são funcionalmente importantes para o desenvolvimento do câncer e incluem a reprogramação do metabolismo energético celular e a evasão ao controle imunológico (Hanahan & Weinberg, 2011). Ao longo da última década, os tumores têm sido identificados como estruturas cuja complexidade pode exceder a dos tecidos saudáveis normais, contrastando com anterior visão reducionista dos tumores como um conjunto relativamente homogêneo de células tumorais. Desta forma, a biologia de um tumor só pode ser entendida analisando os tipos celulares especializados que o constituem bem como o microambiente tumoral criado durante o processo de tumorigênese (Seyfried & Shelton, 2010). Portanto, o melhor conhecimento das alterações biológicas que ocorrem nas células neoplásicas e a caracterização de biomarcadores moleculares que controlem estas alterações podem contribuir para o entendimento da diversidade de comportamento biológico das neoplasias (Shiptzer *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2011) e para o desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas auxiliares para o uso clínico (Messadi *et al.*, 2009; Arellano-Garcia *et al.*, 2010).

As ativinas são proteínas diméricas pertencentes à superfamília de fatores de crescimento transformante- β (TGF- β). Três são as formas descritas de ativina: ativina A e ativina B, formadas respectivamente pelos homodímeros $\beta A\beta A$ e $\beta B\beta B$, e ativina AB, a forma heterodimérica $\beta A\beta B$ (Massagué, 1990; Vale *et al.*, 1986). No entanto, a mais abundante e amplamente estudada é a variante ativina A

(Antsiferova *et al.*, 2011). Ativina A controla muitos processos fisiológicos incluindo a proliferação e diferenciação celular, resposta imunológica, motilidade e adesão (Mason *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 2004). Dada a multiplicidade de ações deste fator de crescimento, existe uma biologia complexa que se relaciona com o seu controle e função (Kretser *et al.*, 2012). Folistatina, uma eficiente proteína de ligação, é o principal regulador das ações biológicas da ativina A. Folistatina se liga a ativina A com elevada afinidade e inibe todas as ações produzidas por ela (Nakamura *et al.*, 1990). A expressão desregulada de ativina A e folistatina tem sido implicada em diversas doenças, incluindo o câncer. Contudo, existe um número reduzido de estudos que avaliaram os efeitos biológicos da expressão de ativina A em CEC orais. Shimizu *et al.* (2007) foram os primeiros a demonstrarem que a amplificação de regiões genômicas responsáveis pela codificação da ativina A é significativamente maior em tumores de cabeça e pescoço quando comparados com tecido normal. Além disto, a expressão aumentada de ativina A parece estar associada a fatores clínico-patológicos que predizem um pior prognóstico e pode representar um fator de risco para a progressão tumoral (Ye *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010).

Devido à escassez de estudos que avaliam ativina A em cânceres orais, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel biológico de ativina A no controle dos principais eventos biológicos associados à tumorigênese oral e verificar o valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica de ativina A para pacientes com CEC oral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Espinocelular Oral

O CEC oral é uma neoplasia maligna derivada do epitélio pavimentoso estratificado e representa o oitavo câncer mais comum em todo o mundo (Cotrim *et al.*, 2001; Scully & Bagan, 2009; Alam *et al.*, 2012). No Brasil, representa a quinta e a décima primeira neoplasia maligna, respectivamente, em homens e mulheres com uma média 15.000 mil novos casos/ano (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2012). O CEC é responsável por mais de 90% dos casos de cânceres na cavidade oral, mas outras malignidades como neoplasias de glândulas salivares, sarcomas, tumores odontogênicos malignos, neoplasias hematopoiéticas e tumores metastáticos também podem ocorrer neste local (Epstein *et al.*, 2002; Daley & Darling, 2003). Além disto, esta neoplasia é frequentemente diagnosticada em estágios avançados, o que resulta em altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo considerada um problema de saúde pública (Parkin *et al.*, 2005; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). O perfil clássico dos pacientes com CEC oral é de homens, entre a sexta e sétima década de vida, fumantes e etilistas por muitos anos (Sturgis & Cinciripini, 2007; Petti, 2009; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). Entretanto, um aumento no número de casos de CEC oral em pacientes jovens, do sexo feminino e com associação limitada aos fatores de risco tradicionais tem sido observado nos últimos anos (Kuriakose *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2009; Soudry *et al.*, 2010; Falaki *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2011). Esta alteração no perfil epidemiológico dos CEC orais pode ser um indicativo de possíveis novos fatores de risco, tais como predisposição ou instabilidade genética (Westra, 2009; Santos-Silva *et al.*, 2011).

Um grande número de fatores etiológicos pode contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia, contudo, o consumo de cigarro e álcool são os dois fatores mais importantes. Interessantemente, existe uma relação entre dose e tempo de exposição dos carcinógenos encontrados no cigarro e álcool para o

desenvolvimento do CEC oral (Scully *et al.*, 2000; Bsoul *et al.*, 2005; Hoffmannová *et al.*, 2010). Além disto, a combinação destes dois fatores aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento do tumor (Brown *et al.*, 2012). O tabaco é de longe o principal fator de risco para o CEC oral e isso se aplica não só para o tabaco convencional, mas também em menor grau para o tabaco sem fumaça (Vigneswaran *et al.*, 1995; Johnson, 2001; Vallecillo Capilla *et al.*, 2007; Warnakulasuriya & Ralhan, 2007; Boffetta *et al.*, 2008; Hirota *et al.*, 2008). Embora o álcool não seja diretamente um agente carcinogênico, o seu metabolismo leva a liberação de substâncias citotóxicas capazes de produzir radicais livres ou outros compostos nocivos a célula e ao seu material genético (Pöschl & Seitz, 2004; Scully *et al.*, 2000). A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia dos CECs do lábio, principalmente inferior (Busick *et al.*, 2005). A associação do CEC oral com outros fatores etiológicos, como o papiloma vírus humano (HPV), o baixo nível socioeconômico associado a uma higiene oral precária e ao estado sistêmico do paciente, incluindo desnutrição, anemia ferropriva e deficiência de algumas vitaminas, tem sido sugerida (Pelucchi *et al.*, 2003; Sciubba, 2001; Hermesen *et al.*, 2001; Feller *et al.*, 2010; Hoffmannová *et al.*, 2010; Carnelio *et al.*, 2011; Gogilashvili *et al.*, 2012). Contudo, a real associação deste fatores com o risco de desenvolvimento de CEC oral ainda permanece controversa. Curiosamente, uma minoria de pacientes desenvolve CEC oral na ausência aparente de qualquer um destes fatores de risco (Johnson, 2001). Nestes casos, parece haver uma predileção pelo sexo feminino, especialmente mulheres mais velhas e o local mais acometido da cavidade oral é a gengiva vestibular e o rebordo alveolar superior (Rich & Radden, 1984; Hodge *et al.*, 1985; Jovanovic *et al.*, 1993).

Clinicamente, o CEC oral pode se apresentar como uma massa exofítica com ou sem ulceração, uma lesão branca (leucoplásica), avermelhada (eritroplásica) ou eritro-leucoplásica (Cotrim *et al.*, 2001; Regezi & Sciubba, 2000). No entanto, a

lesão mais comumente encontrada no momento do diagnóstico é uma lesão ulcerada assintomática de curso crônico com bordas elevadas e áreas de necrose central (Pontes *et al.*, 2012). O CEC oral também apresenta algumas variantes como o carcinoma escamoso verrucoso, o carcinoma escamoso papilífero, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma de células fusiformes e o carcinoma basalóide escamoso (Cotrim *et al.*, 2001). Entre as localizações de mais alto risco para o desenvolvimento do CEC oral estão o lábio inferior, as margens pósterolaterais e a base de língua e o assoalho bucal (Hoffmannová *et al.*, 2010; Dragomir *et al.*, 2012). O CEC oral é uma lesão que apresenta um curso clínico altamente variável no qual o atraso no diagnóstico contribui para o crescimento e disseminação tumoral e, conseqüentemente, piora no prognóstico do paciente gerando uma taxa de sobrevida global entre 50-60% em 5 anos (Scully & Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2009; Shah *et al.*, 2011, Bitu *et al.*, 2012). No momento do diagnóstico aproximadamente 36% dos indivíduos têm a doença localizada, 43% têm a doença regional e 17% apresentam metástases à distância (Sklenicka *et al.*, 2010). A incidência de metástases tende a aumentar com o tamanho do tumor primário e espessura do tumor, no entanto, pequenos tumores podem sofrer metástase rapidamente, enquanto alguns tumores grandes nunca irão metastatizar.

Histologicamente o CEC oral se caracteriza por uma proliferação epitelial com células pleomórficas de núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas atípicas. A proliferação epitelial frequentemente mostra um padrão invasivo ao tecido conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas de células epiteliais malignas (Regezi & Sciubba, 2000). Segundo o grau de diferenciação celular, os CECs orais podem ser classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado e indiferenciado. Esta graduação é feita de acordo com os graus de diferenciação, padrão de invasão, pleomorfismo celular, atividade mitótica e presença de processo inflamatório (Neville *et al.*, 2004). Brandwein-Gensler *et al.* (2005)

propuseram outro sistema de gradação para o CEC oral que leva em consideração aspectos histológicos como o padrão de invasão tumoral e a presença de invasão perineural e infiltrado linfocítico para classificar os tumores em 3 categorias de risco (baixo, intermediário ou alto grau) que auxiliam na determinação do tratamentos adjuvantes. Contudo, o tradicional estadiamento clínico do paciente, o qual é baseado no sistema TNM, ainda é o principal fator prognóstico do CEC oral utilizado para indicar o manejo adequado destes pacientes. O estadiamento do câncer é baseado no tamanho da lesão primária, em sua dispersão para linfonodos regionais e na presença ou ausência de metástases à distância. O sistema foi desenvolvido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e é denominado de sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. A letra T representa o tamanho e as características do tumor primário, N as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e M presença ou ausência de metástases à distância. O estadiamento TNM varia para cada forma específica de câncer, mas existem princípios gerais aonde estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1. Uma lesão in situ é classificada como Tis, e com o aumento no tamanho do tumor a classificação varia de T1 a T4. N0 indica que não há linfonodos afetados, enquanto N1 a N3 indicam um número crescente de linfonodos afetados por metástases. M0 representa a ausência de metástases à distância e M1 a presença de metástases (Cotran *et al.*, 2005). O símbolo “X” é utilizado, substituindo o número referente à graduação, quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada.

Embora o estadiamento e outras variáveis clínico-patológicas forneçam algumas informações sobre o prognóstico, existe uma clara necessidade de se identificar melhores marcadores biológicos que possam auxiliar na identificação de pacientes de alto risco e auxiliar na escolha da melhor opção terapêutica.

2.2 Isolamento e Caracterização das Ativinas

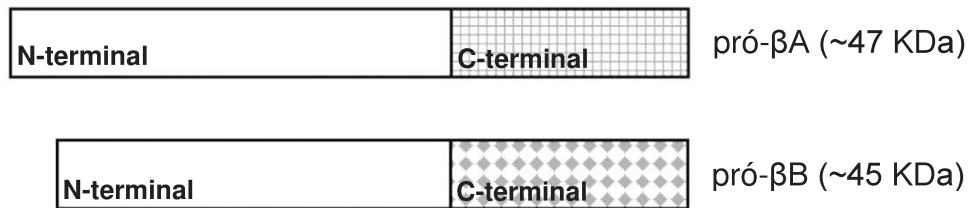
A descoberta, em 1972, de inibina como um hormônio reprodutivo capaz de inibir a liberação de hormônio folículo-estimulante (*follicle-stimulating hormone* - FSH) pela glândula pituitária despertou o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em desvendar a natureza e bioatividade deste peptídeo gonadal (Setchell & Sirinathsinghji, 1972). Inicialmente, o isolamento e purificação desta molécula a partir do fluido folicular suíno permitiram a identificação de uma subunidade α (18 KDa) e outra β (14 KDa) (Ling *et al.*, 1985; Miyamoto *et al.*, 1985; Rivier *et al.*, 1985). Subsequentemente, frações capazes de estimular a produção de FSH foram isoladas, permitindo a identificação de duas formas distintas da subunidade β , que consistem o tipo βA (14 KDa) e βB (14 KDa) (Mason *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1986). Tais substâncias estimuladoras de FSH receberam a denominação de ativinas e foram demonstradas em mamíferos, aves, anfíbios e peixes, sugerindo que os seus códigos genéticos tenham sido altamente conservados durante a evolução (Matzuk *et al.*, 1996).

Ativinas são membros da superfamília do fator de crescimento-beta (*Transforming growth factor beta* - TGF- β), formada por mais de 40 proteínas que incluem, além das ativinas, três tipos de TGF- β s (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ e TGF- $\beta 3$), inibinas, proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins* - BMPs), fator de crescimento e diferenciação (*growth differentiation factor* - GDF), fator neurotrófico derivado de células gliais (*glial cell line-derived neurotrophic factor* - GDNF), substância inibidora Mulleriana (*müllerian inhibiting substance* - MIS) e miostatina (Massagué, 1998; Lee & McPherron, 2001; Chen *et al.*, 2006). A biossíntese das ativinas é complexa e ocorre a partir da combinação de diferentes subunidades β monoméricas, sendo que o gene que codifica cada uma delas está localizado em um cromossomo diferente, resultando em padrões independentes de síntese (Matzuk *et al.*, 1996). Quatro genes que codificam as subunidades β foram caracterizados em humanos (βA , βB , βC e βE), mas os homodímeros ativina A ($\beta A/\beta A$) e ativina B ($\beta B/\beta B$) e o heterodímero ativina AB ($\beta A/\beta B$) são os

principais (Massagué, 1990; Vale *et al.*, 1986; Hötten *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 1996), e o homodímero ativina A é a variante mais abundante e comumente estudada em humanos (Antsiferova *et al.*, 2011). A variante ativina β E é expressa exclusivamente no fígado e a variante ativina β C foi descoberta a partir de uma biblioteca de cDNA, mas sua função definida ainda não foi esclarecida (Hötten *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 1996). Contudo, um estudo recente realizado por Gold e colaboradores (2009) demonstrou pela primeira vez que a variante ativina β C pode atuar como um antagonista da variante β A na próstata. Adicionalmente, outra subunidade de ativina, variante β D, foi identificada em *Xenopus laevis* (Oda *et al.*, 1995).

As subunidades formadoras de ativinas são traduzidas a partir de precursores inativos de grandes dimensões, os quais são posteriormente clivados para dar origem a forma bioativa das ativinas (Figura 1) (Mason *et al.*, 1996). Estas grandes proteínas precursoras são constituídas por um pró-domínio N-terminal e um domínio C-terminal bioativo (Mason *et al.*, 1996). Dentro deste domínio C-terminal maduro, existem nove resíduos de cisteína necessários para a formação de ligações dissulfeto intermolecular e intramolecular (Walton *et al.*, 2012). Por outro lado, o pró-domínio N-terminal é necessário para o dobramento correto, iniciação das ligações dissulfeto, exportação e ativação da ativina processada (Gray & Mason, 1990). Estas ligações covalentes garantem a dimerização das subunidades e criam uma estrutura altamente estável e resistente a ação de proteases (Pangas & Woodruff, 2000). Adicionalmente foi demonstrado recentemente que resíduos hidrofóbicos presentes entre os domínios N-terminal e C-terminal também auxiliam na dimerização covalente para formação da ativina A bioativa (Walton *et al.*, 2009). Interessantemente, a dimerização da subunidade β A também parece ser essencial para a localização da ativina A processada na matriz extracelular (Li *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2011; Gold & Risbridger, 2012).

PRECURSORES DAS SUBUNIDADES β



FORMA BIOATIVA DAS ATIVINAS

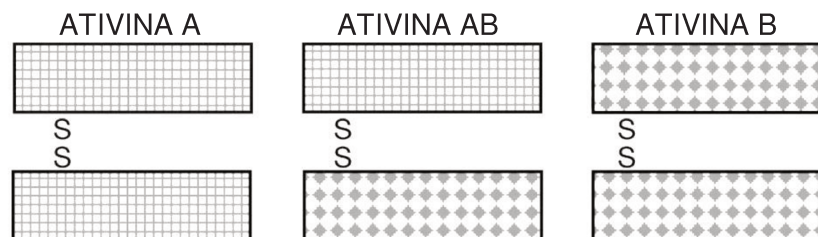


Figura 1. Esquema representativo dos precursores das subunidades β A e β B com seus diferentes padrões de dimerização. Proteínas precursoras das subunidades β A e β B formadas por um pró-domínio N-terminal e outro C-terminal bioativo. Os tamanhos em kilodaltons (KDa) estão indicados a direita de cada subunidade precursora. Os precursores pró- β A e pró- β B são clivados para gerar as subunidades bioativas β A e β B contendo apenas as porções C-terminal de cada homodímero. Os homodímeros e heterodímeros de subunidades β são ligados por pontes de dissulfeto (S) e formam as principais variantes de ativina (ativinas A, AB e B). Adaptado de Suresh *et al.* (2011).

Durante o processamento pós-traducional, os dímeros se formam e os pró-domínios são clivados por convertases, mas permanecem não covalentemente associados à ativina secretada para o meio extracelular (Walton *et al.*, 2010). A Figura 2 representa um esquema da conformação final da ativina após processamento intracelular. No meio extracelular, a alta afinidade com os receptores celulares faz com que o pró-domínio dissocie-se da porção bioativa da ativina e inicie a via de sinalização celular (Walton *et al.*, 2012). Tal facilidade de dissociação do pró-domínio não covalentemente associado ao domínio bioativo garante que a ativina A seja secretada na sua forma ativa (Walton *et al.*, 2009). Em contraste, as isoformas de TGF- β são secretadas para o meio extracelular associadas aos seus pró-domínios com alta afinidade, formando um complexo latente (Böttlinger *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2002; Thies *et al.*, 2001). O conhecimento dos mecanismos precisos que governam a biodisponibilidade e bioatividade da ativina A é imperativo para encontrar uma ferramenta adequada e específica para modular os efeitos produzidos por ela (Walton *et al.*, 2012).

2.3 Funções e Via de Sinalização das Ativinas A

Ativina A, a variante mais abundante das ativinas, tem sido associada a várias funções biológicas e sua expressão foi demonstrada em uma variedade de células e tecidos. Diversos estudos demonstraram a influência de ativina A na indução mesodérmica (McDowell & Gurdon, 1999), biologia das células tronco (Beattie *et al.*, 2005), reprodução (Kretser *et al.*, 2002), eritropoiese (Maguer-Satta *et al.*, 2003), inflamação (Jones *et al.*, 2004), apoptose (Chen *et al.*, 2006), cicatrização (Munz *et al.*, 1999) e fibrose (Werner *et al.*, 2006). Além disto, alterações na expressão de ativina A estão associadas com várias doenças humanas, incluindo o câncer (Steller *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2008; Seder *et al.*, 2009a; Seder *et al.*, 2009b; Chang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

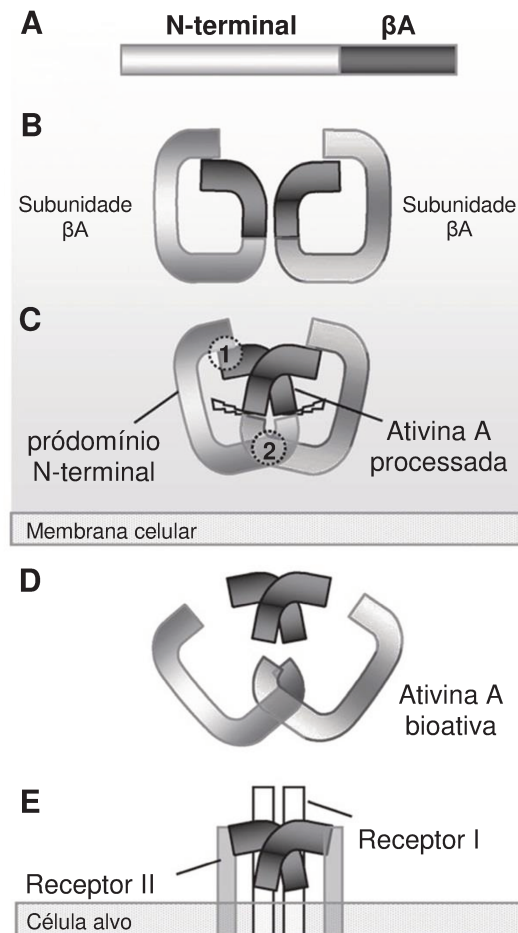


Figura 2. Esquemática da biossíntese e secreção da ativina A. (A) Ativinas são sintetizados a partir de grandes proteínas precursoras. (B) subunidade βA em conformação competente para a dimerização. (C) Dimerização por meio de interações do pró-domínio N-terminal com o domínio C-terminal (região 1) e entre os pró-domínios das subunidades βA (região 2). (D) Clivagem e secreção do complexo ativina A bioativa. (E) Interações de alta afinidade com receptores de células alvo promovem a dissociação dos pró-domínios. Adaptado de Walton *et al.* (2012).

Ao longo dos últimos anos o conhecimento sobre o papel biológico e os principais mecanismos de ação das ativinas A no desenvolvimento das gônadas masculinas e femininas, na foliculogênese, na luteólise (degradação estrutural e funcional do corpo lúteo) e na regulação da transcrição do gene FSH- β foram esclarecidos (Xia & Schneyer, 2009; Menke & Page, 2002). Estudos relacionados ao desenvolvimento do ovário sugerem que as ativinas A estão envolvidos na regulação da proliferação das células germinativas durante o período de desenvolvimento que conduz a formação de folículos primordiais (Martins da Silva *et al.*, 2004; Bristol-Gould *et al.*, 2006). Além disto, a biossíntese de FSH também é regulada transcricionalmente por esteróides sexuais, glicocorticóides e hormônio libertador de gonadotrofina (*Gonadotropin-releasing hormone* - GnRH) e estas ações são moduladas pela sinalização das ativinas A (Spady *et al.*, 2004; Thackray & Mellon, 2008).

Foi proposto durante algum tempo que as ativinas e outros membros relacionados à família TGF- β teriam uma importante ação na regulação da função e do número de células β do pâncreas. Resultados recentes confirmam estes conceitos, embora os ligantes específicos e as suas ações no pâncreas ainda permaneçam pouco conhecidos (Totsuka *et al.*, 1988; Verspohl *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1995; Florio *et al.*, 2000). Outra importante participação das ativinas esta relacionada com a indução da proliferação e concomitante manutenção da pluripotencialidade das células tronco embrionárias humanas (Beattie *et al.*, 2005; Sulzbacher *et al.*, 2009). As ativinas A e outros membros da família TGF- β por meio da via de sinalização dependente de Smads (Smad2 e Smad3) foram responsáveis por manter a pluripotência e auto-renovação das células tronco embrionárias humanas (Beattie *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Vallier *et al.*, 2005). Além disto, o bloqueio da sinalização de ativina A resultou em diferenciação destas células (Vallier *et al.* 2005, Wu *et al.* 2008).

As primeiras evidências da participação dos membros da família TGF no sistema imunológico foram demonstrados pelo estabelecimento de camundongos

mutantes para TGF- β 1, que resultou em uma inflamação intensa e multifocal (Shull *et al.*, 1992). Estudos subsequentes revelaram que as ativinas A (Jones *et al.*, 2004) e as BMPs também são importantes reguladores da resposta inflamatória em vários tipos de células e órgãos (Gould *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2003, Hagen *et al.*, 2007). A expressão de ativina A tem sido detectada em várias células imunológicas, incluindo monócitos (Erämaa *et al.*, 1992; Abe *et al.*, 2002), macrófagos (Ebert *et al.*, 2007), células dendríticas (Robson *et al.*, 2008), linfócitos T e B (Ogawa *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2008) e mastócitos (Cho *et al.*, 2003, Funaba *et al.*, 2003), onde a expressão aumentada nestas células é ativada por estímulos imunológicos e agonistas do receptor toll-like.

Hübner e colaboradores (1996) demonstraram um forte aumento na expressão de ativina A em processos de cicatrização de ferimentos na pele. Isto é funcionalmente relevante, assim como foi observado em camundongos transgênicos superexpressando o antagonista folistatina em queratinócitos que mostrou um retardo na cicatrização, enquanto que a superexpressão de INHBA em queratinócitos potencializou o processo de cicatrização (Wankell *et al.*, 2001). No entanto, as feridas cicatrizadas no animal superexpressando INHBA demonstraram uma hiperplasia e fibrose da epiderme neoformada.

Foi relatada ainda uma associação de ativina A com angiogênese via estimulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor* - VEGF) em hepatócitos humanos (Wagner *et al.*, 2004). A primeira evidência para um possível papel de ativina A na pele surgiu da avaliação do fenótipo observado em camundongos *knock out* que, além de vários defeitos responsáveis pela morte do animal em 24 h depois do nascimento, apresentaram ausência de vibrissas e folículos alterados (Matzuk *et al.*, 1995). Recentemente, um estudo com modelo animal superexpressando ativina A em queratinócitos mostrou que estes camundongos transgênicos apresentaram uma epiderme espessa e altamente desorganizada (Munz *et al.*, 1999). Além disto, a expressão tecido-específica de INHBA foi responsável pela alteração no padrão

de expressão das queratinas nos queratinócitos ao longo do epitélio e pela substituição de tecido gorduroso por tecido fibroso (Munz *et al.*, 1999).

O mecanismo clássico de ação celular das ativinas envolve a ligação aos seus receptores transmembrânicos que desencadeiam uma cascata de fosforilação protéica intracelular. A sinalização das ativinas inicia-se com a ligação e ativação de receptores serina/treonina quinase tipo II (*Type II activin receptor* - ActRII), ActRIIA ou ActRIIB (Mathews & Vale, 1991; Attisano *et al.*, 1992). O receptor ActRIIA foi inicialmente isolado a partir de células corticotrópicas de ratos marcadas com ativina A-I¹²⁵ (Mathews & Vale, 1991) e seu homólogo humano foi clonado pouco depois (Donaldson *et al.*, 1992). O receptor ActRIIB foi identificado utilizando uma sequência de primer universal hibridizada ao domínio quinase do receptor ActRIIA (Attisano *et al.*, 1992). Ambos os receptores do tipo II de ativina apresentam domínios extracelulares ricos em cisteína, domínios transmembrânicos helicoidais e regiões citoplasmáticas com atividade de quinase (Tsuchida *et al.*, 2004; Mathews & Vale, 1993). As duas formas de ActRII apresentam alta homologia entre os domínios citoplasmáticos (75%) e homologia moderada nas regiões extracelular (51%) e transmembrânica (42%). Embora exista grande homologia entre os receptores ActRIIA e ActRIIB, o receptor ActRIIA tem uma afinidade de 3 a 4 vezes mais baixa pelas ativinas do que o receptor ActRIIB (Attisano *et al.*, 1992). Após a ligação da ativina a um dos seus receptores do tipo II, ocorre o recrutamento e subsequentemente fosforilação do receptor do tipo I (*Type I activin receptor* - ActRI), também conhecido como receptor de ativina quinase-like 4 (*type I activin receptor-like kinase* - ALK) (Deli *et al.*, 2008). Semelhante aos receptores do tipo II, os receptores de ativina do tipo I contêm um domínio extracelular curto, mas rico em cisteína, um domínio transmembrânico e uma região citoplasmática, que abrange um domínio quinase funcional (Bondestam *et al.*, 2001; Tsuchida *et al.*, 1996; Attisano *et al.*, 1993). No entanto, os receptores do tipo I apresentam pouca homologia entre o seu domínio extracelular comparado com os receptores do tipo II, com a exceção da região rica

em cisteína (Walton *et al.*, 2012). Uma característica distintiva dos receptores de ativina do tipo I é que eles não são capazes de se ligar a ativina na ausência dos receptores do tipo II, sendo fundamentais para a formação do complexo ActRII com ActRI para o progressão do sinal induzido por ativina (Attisano *et al.*, 1993; Wrana *et al.*, 1992). Estudos já demonstraram que existem, pelo menos, 7 isoformas do receptor ActRI (ten Dijke *et al.*, 1993; Franzén *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1994; Tsuchida *et al.*, 1996; Rydén *et al.*, 1996). No entanto, somente ALK2 (ActRI) e ALK4 (ActRII) demonstram ser biologicamente funcionais (ten Dijke *et al.*, 1993). Além disto, ambos ActRI e ActRII são funcionalmente distintos e demonstram um padrão de expressão de mRNA diferente em vários tecidos (Verschuere *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1998). Após formação do complexo ligante-receptores (ativina-receptor tipo II-receptor tipo I) ocorre a ativação da cascata de sinalização mediada por proteínas Smads. Em adição a via Smad, ativina A pode ativar a cascata de proteínas quinase ativadora de mitose (*Mitogen-activated protein kinase* - MAPKs), com participação da quinase regulada de sinal extracelular (*Extracellular signal-regulated protein kinases* - ERK), Proteína quinase ativadora de mitose 38 delta (*p38 mitogen-activated protein kinase* - p38 MAPK) e quinase c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinases* - JNK) (Chen *et al.*, 2006).

As proteínas Smads constituem uma família de transdutores de sinal da superfamília TGF- β , sendo os únicos fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que se tornam diretamente ativos pela fosforilação dos aminoácidos serina em seus receptores cognatos (Ross & Hill, 2008; Kubiczkova *et al.*, 2012). Estas proteínas têm um amplo espectro de atuação e regulam desde a ativação de receptores, bem como a exportação e a importação nuclear de Smads até a atividade transcricional (Ross & Hill, 2008). As Smads podem ser classificados em três grupos com base na sua função: Smads receptor-reguladas (*receptor-regulated Smads* - R-Smads), incluindo Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8; Smads mediadores comuns (*common-mediator Smad* - Co-Smads), incluindo

Smad4 e Smads inibidores (*inhibitory Smads* - I-Smads), incluindo Smad6 e Smad7. (Kubiczkova *et al.*, 2012).

A ativação da cascata Smad inicia-se com a ativação e fosforilação do grupo de R-Smads, no caso das ativina será a Smad2/3 (Lagna *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 2005). O acesso aos R-Smads pelo receptor ActRI é facilitado pela proteína auxiliar conhecida como smad âncora para a ativação do receptor (*Smad anchor for receptor activation* - SARA). Por sua vez, estas proteínas facilitam a transdução de sinal pela formação de um heterocomplexo com Smad4 que promove o transporte do complexo de Smads para o núcleo estimulando ou suprimindo a transcrição dos genes-alvos (Lagna *et al.*, 1996; Derynck *et al.*, 1998; Mehra & Wrana, 2002). A Figura 3 ilustra a via de sinalização intracelular gerada pela ligação de ativinas ao seus receptores transmembrânicos.

2.4 Regulação da Sinalização Celular de Ativina A por Antagonistas

Como a ativina A regula eventos fundamentais para a homeostasia celular e tecidual de maneira irreversível, um controle rígido de sua ativação torna-se fundamental. Existem pelo menos 3 formas distintas de regulação da sinalização celular de ativina A, incluindo a ação de antagonistas extracelulares, co-receptores de membrana celular antagônicos e inibidores da via de sinalização intracelular (Nakamura *et al.*, 1990; Winter *et al.*, 1996; Deli *et al.*, 2008). A Figura 3 ilustra estas três possíveis alternativas de regulação das ativinas. Diversas proteínas são capazes de bloquear os efeitos das ativinas, como as inibinas, folistatina, I-Smad, proteína relacionada com a folistatina (também conhecida como *follistatin-like 3* - FSTL3), BMPs, inibidor de ativina ligado à membrana (*activin membrane-bound inhibitor* - BAMBI), proteína de membrana β -glicana e o co-receptor membro da família de fatores de crescimento epidermal (*teratocarcinoma-derived Growth Factor* - CRIPTO) (Harrison *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Razanajaona *et al.*, 2007; Tsuchida *et al.*, 2008; Tsuchida *et al.*, 2009). Recentemente, ativina C

também foi identificada como um antagonista da ativina A (Gold *et al.*, 2009). O equilíbrio entre a ativação e a inibição de ativina A é fundamental para a homeostasia celular, enquanto que desequilíbrios estão associados ao desenvolvimento de condições patológicas, incluindo doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide (Yu *et al.*, 1998; Gribi *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004), inflamação e fibrose hepática (Sugiyama *et al.*, 1998; Patella *et al.*, 2001; Yuen *et al.*, 2002; Patella *et al.*, 2006), doenças renais (Yamashita *et al.*, 2004), fibrose pancreática (Ohnishi *et al.*, 2003), diversas doenças pulmonares (Karagiannidis *et al.*, 2006; Yndestad *et al.*, 2009; Hardy *et al.*, 2010; Van Pottelberge *et al.*, 2010), obesidade (Dani, 2013), doença inflamatória do intestino (Hübner *et al.*, 1997; Dohi *et al.*, 2005), pré-eclâmpsia (Spencer *et al.*, 2006), doenças cardiovasculares (Wu *et al.*, 2012), diabetes mellitus tipo 2 (Ueland *et al.*, 2012) e o câncer (Thomas *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998; Kleeff *et al.*, 1998; Wildi *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2010).

A primeira frente de manutenção do equilíbrio é fornecida por proteínas presente no meio extracelular, as quais promovem o bloqueio da via de sinalização pela ligação direta com as ativinas. O melhor exemplo deste mecanismo de inibição de ativina A tem a participação das inibinas. Inibinas se ligam aos receptores ActRII antagonizando competitivamente a sinalização das ativinas A e inibindo o recrutamento dos receptores ActRI. Entretanto, tal antagonismo requer a presença de um co-receptor, o beta-glicano, que se liga à inibina com alta afinidade (Mathews & Vale, 1991; Lewis *et al.*, 2000). As inibinas atuam por meio de um *feedback* negativo, que pode ser melhor explicado por meio dos resultados observados em camundongos *knock out* para inibina α que desenvolveram tumores de medula com alta expressão de ativina A, levando a perda de peso intensa (caquexia) e ao desenvolvimento de câncer de próstata (Risbridger *et al.*, 2001a). A folistatina por sua vez possui a capacidade de promover uma ligação de alta afinidade com as ativinas A e em menor intensidade com as demais proteínas da superfamília TGF- β , neutralizando seus efeitos de

maneira eficaz (Nakamura *et al.*, 1990; Sugino *et al.*, 1993). Portanto, enquanto o antagonismo ativina-inibina é dependente de uma ligação competitiva com o receptor ActRII, a ação antagonista da folistatina - assim como da proteína relacionada à folistatina - ocorre por meio da ligação de alta afinidade com a ativina, prevenindo desta forma a ligação entre ativina e seus receptores de membrana (Maguer-Satta *et al.*, 2001; Bartholin *et al.*, 2002; Tsuchida *et al.*, 2004). Além da folistatina, existe outro regulador extracelular de ativina A chamado de proteína relacionada à folistatina (*related protein follistatin like 1* - FSTL1), também conhecida FSTL3 ou folistatina relacionada ao gene FLRG, que é capaz de inibir a bioatividade de ativina A *in vivo* (Hayette *et al.*, 1998; Tsuchida *et al.*, 2000; Schneyer *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2004). No entanto, a ausência de uma região de ligação à heparina confere uma fraca associação de FSTL3 à membrana celular e consequentemente uma fraca inibição da atividade de ativina A (Sidis *et al.*, 2002).

O bloqueio da sinalização das ativinas pode ocorrer ainda pela ação de proteínas associadas à membrana ou co-receptores, os quais regulam a ativação dos receptores de ativina. O fator CRIPTO é um membro da família de fatores de crescimento epidérmico-Cripto (*epidermal growth factor-Cripto* - EGF-CFC) que pode se fundir à membrana extracelular por meio de uma ligação glicosilfosfatidilinositol, funcionando como um co-receptor para a sinalização (Deli *et al.*, 2008). Este bloqueador de receptores foi encontrado superexpresso em um grande número de malignidades humanas, incluindo o câncer de mama, pâncreas, pulmão, cólon e bexiga (Bianco *et al.*, 2005). Tal atividade pró-tumorigênica tem sido sugerida como consequência da inibição das interações de TGF- β e ativinas A aos seus receptores (Gray *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2006). No entanto, foi relatada uma via de sinalização adicional independente dos receptores de ativina (Bianco *et al.*, 2005). O pseudorreceptor BAMBI atua ligando-se aos receptores de ativina tipo I e II impedindo a ligação de ativinas A aos seus receptores (Harrison *et al.*, 2005).

A jusante aos receptores de ativina, os sinais são transduzidos por Smads 2 e 3 que formam um complexo com co-Smad4. Este complexo pode ser bloqueado pela ação de I-Smads, como Smads 6 e 7, os quais não são fosforilados e promovem a inibição da transdução de sinal (Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997). Em resumo, numerosas evidências têm sugerido que a desregulação da sinalização das ativinas A frequentemente ocorre e pode contribuir para uma progressão tumoral em diferentes tipos de cânceres.

2.4.1 Folistatina

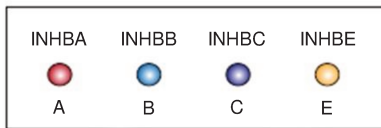
Folistatina é um dos antagonistas de ativina A no espaço extracelular mais bem caracterizado, sendo uma molécula rica em cisteína e resultante do *splicing* alternativo de dois transcritos de mRNA, FS-288 e FS-315 (Shimasaki *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1990; Dowling & Risbridger, 2000). A folistatina é estruturalmente distinta das ativinas (Dowling & Risbridger, 2000). No entanto, assim como as ativinas, a estrutura da folistatina foi conservada durante a evolução das espécies, com uma homologia gênica de aproximadamente 95% entre os mamíferos (Dowling & Risbridger, 2000). A isoforma FS-315 é a forma predominante circulante (Phillips e de Kretser, 1998), enquanto que a variante FS-288 associa-se com as ativinas na superfície da célula e facilita a internalização e degradação das mesmas (Hashimoto *et al.*, 1997). A isoforma FS-288 liga-se à superfície celular por meio de um sítio de ligação à heparina que permite a associação com o sulfato de heparina proteoglicano (Sidis *et al.*, 2005). Uma terceira isoforma (FS-303) foi identificada como um subproduto proteolítico de FS-315, mas suas funções não são conhecidas (Sugino *et al.*, 1993). Um estudo realizado por Thompson e colaboradores (2005b) elucidou a estrutura das duas isoformas de folistatina ligadas a ativina A, mostrando que ambas isoformas se ligam às ativinas A nos sítios de ligação ao receptor. O complexo ativina-folistatina formado geralmente consiste de um dímero de ativina A e duas moléculas de folistatina, ou

seja, cada subunidade β se liga a uma molécula de folistatina (Winter *et al.*, 1996; Shimonaka *et al.*, 1991). Folistatina também pode se ligar as inibinas (α/β A ou α/β B) por meio de suas subunidades β , porém com uma afinidade aparentemente menor (Funaba *et al.*, 1996; Krummen *et al.*, 1993; Schneyer *et al.*, 1994; Shimonaka *et al.*, 1991).

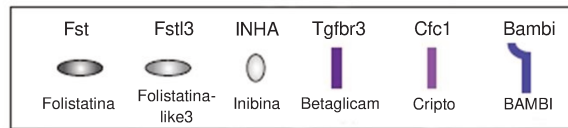
2.5 Ativina A e o Câncer

A superexpressão de ativina A foi observada em vários tipos de cânceres, mas o seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral são parcialmente conhecidos. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que ativina A induz crescimento, migração e invasão celular em vários tipos de neoplasias (Yoshinaga *et al.*, 2004; Yoshinaga *et al.*, 2008b). Em um estudo recente, Zhang *et al.* (2010) detectaram níveis elevados de ativina A em amostras de glioblastoma quando comparado com tecido normal. Este estudo também revelou que ativina A induz a proliferação celular e a regulação de Smad2/3 em linhagens celulares U87 e o tratamento destas células com folistatina resultou no bloqueio dos efeitos induzidos por ativina A. Níveis elevados de INHBA mRNA foram associados com um pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de pulmão e esôfago e o tratamento de diferentes linhagens celulares tumorais com ativina A exógena foi capaz de promover o aumento da proliferação celular (Seder *et al.*, 2009a; Seder *et al.*, 2009b). O tratamento com ativina A induziu significativamente a proliferação e invasão de linhagens celulares de câncer ovariano SKOV3, OCC1, OVCAR3 e A2780-s (Steller *et al.*, 2005). Imuno-expressão elevada de ativina A foi fortemente correlacionado com amostras de adenocarcinoma endometrial com padrão invasivo (Mylonas, 2010).

Subunidades β em mamíferos



Antagonistas endógenos de ativina



Principais variantes

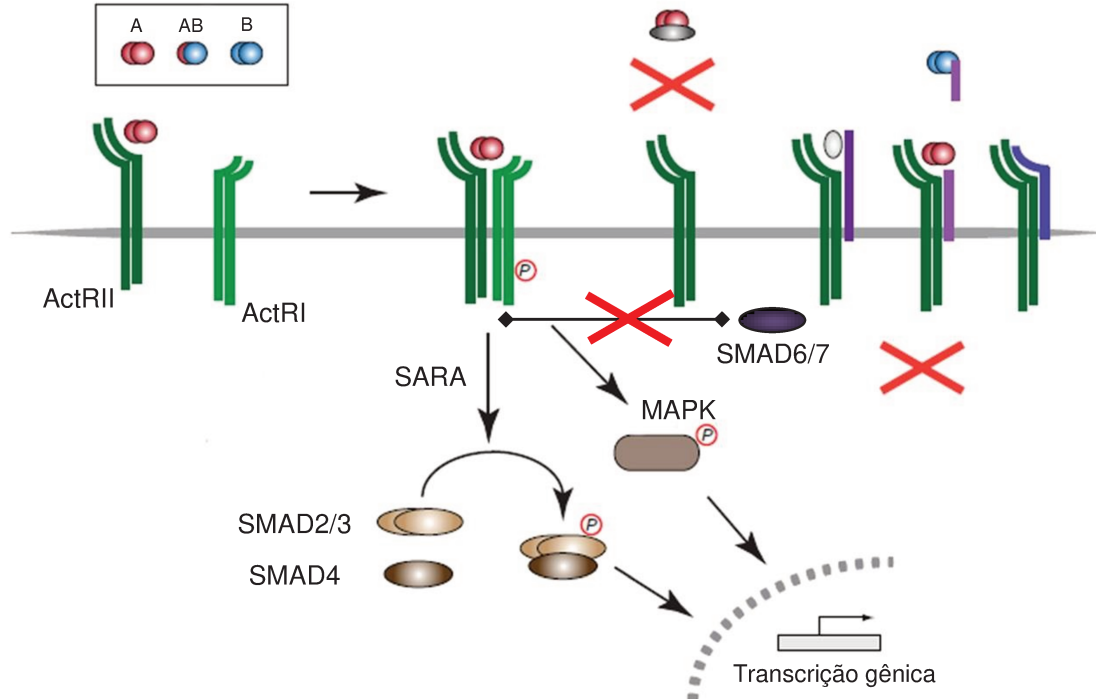
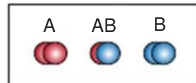


Figura 3. Representação esquemática da via de sinalização da ativina A e seus antagonistas. As quatro subunidades de ativina em mamíferos, incluindo as principais variantes formadas por homo ou heterodímeros, são mostradas à esquerda. Estas se ligam e ativam um receptor tipo II, o qual recruta e fosforila um receptor tipo I que inicia a cascata de sinalização via Smads ou MAPK. Proteínas solúveis e transmembrânicas conhecidas por inibir a sinalização de ativina A, são mostradas na parte superior direita. Adaptado de Antsiferova & Werner, 2012

A expressão elevada de ativina A em linhagens de carcinoma esofágico correlacionou com a capacidade invasiva das células tumorais, embora a inibição desta proteína não foi suficiente para suprimir o fenótipo tumoral (Yoshinaga *et al.*, 2008a). Contudo, alguns estudos demonstraram que dependendo da fase da oncogênese, níveis elevados de ativina A bloqueia o ciclo celular (Razanajaona *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006). Em células T47D de câncer de mama, ativina A promoveu a expressão de p15, que por sua vez reduziu à atividade de ciclina A e da proteína supressora de tumor retinoblastoma (*retinoblastoma tumor suppressor protein* - Rb) (Burdette *et al.*, 2005). Em adição, Zhang e colaboradores (1997) demonstraram que expressão de ativina A pode controlar apoptose. Mais recentemente, Katik e colaboradores (2009) revelaram que ativina A regula a atividade da enzima telomerase por meio de uma profunda inibição da expressão da subunidade catalítica da telomerase humana (*human telomerase catalytic subunit* - hTERT), sugerindo seu papel inibitório na tumorigênese. No entanto, o exato mecanismo pelo qual ativina A exerce este efeito inibitório ainda não é completamente entendido. Em conjunto, estes resultados sugerem que como acontece com TGF- β , dependendo da fase da carcinogênese, ativina A pode promover ou inibir a tumorigênese, em particular a proliferação das células tumorais. Contudo, o efeito de ativina A na promoção da invasão tumoral e disseminação parecem ser independentes do estágio do desenvolvimento tumoral (Leto, 2010).

Recentemente Antsiferova e colaboradores (2011) encontraram um grande aumento dos níveis de mRNA de INHBA em amostras de carcinoma de células basais e em amostras de CEC de pele comparado com o tecido epitelial normal. No entanto, os níveis de expressão de mRNA de folistatina nestas mesmas amostras não revelaram diferenças entre o epitélio normal e as amostra de câncer (Antsiferova *et al.*, 2011). Ativina A promove ainda angiogênese via indução de VEGF e seus receptores (Flt-1 e FIK-1) e estes efeitos são inibidos pelo tratamento com folistatina (Maeshima *et al.*, 2004). Em adição, ativina A parece

estar envolvida no processo de remodelação vascular (Maeshima *et al.*, 2004). Interessantemente, alguns estudos sugeriram que a estimulação de VEGF é provavelmente o mecanismo pelo qual ativina A promove tumorigênese (Wagner *et al.*, 2004; Poulaki *et al.*, 2004). Com relação aos efeitos pró-metastáticos, ativina A modula a expressão de moléculas de adesão (Yoshinaga *et al.*, 2004; Yoshinaga *et al.*, 2008b; Kang *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2010), interage com fatores de motilidade celular (Kang *et al.*, 2009), induz expressão de N-caderina, um marcador da transição epitélio mesenquimal (Yoshinaga *et al.*, 2004), e promove a expressão de enzimas proteolíticas (Yoshinaga *et al.*, 2008b; Simon *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009), favorecendo a invasão e metástase tumoral.

2.6 Ativina A e o Câncer Oral

Existe um número reduzido de estudos que avaliaram os efeitos biológicos da expressão de ativina A em CEC orais. Shimizu *et al.* (2007) identificaram por hibridização genômica comparativa (*Comparative genomic hybridization* - CGH) a superexpressão de INHBA localizada no braço curto do cromossomo 7 (7p14) em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço. Neste mesmo estudo demonstraram, por meio de RT-PCR quantitativo, que os níveis de expressão de INHBA foram significativamente maiores em tumores de cabeça e pescoço quando comparados com tecido normal e que esta expressão elevada correlacionou com presença de metástase regional e menor período livre de doença (Shimizu *et al.*, 2007). Posteriormente, Ye e colaboradores (2008) encontraram que o gene INHBA estava superexpresso em amostras de CEC de língua quando comparado com amostras de tecido normal. Resultados obtidos por Chang e colaboradores (2010) sugeriram que a expressão aumentada de ativina A em CEC oral é associada com pobre diferenciação celular e presença de invasão perineural e metástase regional, podendo ser um fator de risco para a progressão tumoral. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o silenciamento do gene INHBA por RNA de interferência (RNAi) foi capaz de atenuar a proliferação,

migração e invasão de células de CEC oral. Em um estudo prévio, nosso grupo demonstrou que ativina A é expressa em níveis elevados por miofibroblastos do estroma de CECs orais e esta expressão favorece a proliferação das células tumorais, revelando o papel de ativina A na interligação entre o microambiente e as células tumorais (Sobral *et al.*, 2011).

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Avaliar a participação do fator de crescimento ativina A na tumorigênese dos CECs orais.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão imuno-histoquímica de ativina A em CECs orais e correlacionar os seus níveis de expressão com as variáveis clínico-patológicas, de recorrência e sobrevida.
2. Estudar os efeitos biológicos produzidos pelos níveis aumentados de ativina A sobre a modulação da proliferação, apoptose, adesão, migração, invasão e transição epitélio mesenquimal na linhagem celular HACAT de queratinócitos imortalizados, mas não transformados.
3. Estudar os efeitos biológicos produzidos pela redução dos níveis celulares de ativina A sobre a modulação da proliferação, apoptose, adesão, migração, invasão e transição epitélio mesenquimal nas linhagens de CEC oral SCC-9 e LN2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos sob deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (protocolo nº 031/2011; anexo).

4.2 Amostras para a Análise Imuno-histoquímica

O presente estudo avaliou 115 amostras de CECs orais, distribuídas em 2 lâminas de microarranjos teciduais (*tissue microarray* - TMA) com 1 mm de diâmetro de área por amostra em duplicata. A construção dos TMAs e das lâminas (cortes de 4 µm de espessura) foi realizada como descrito em Coutinho-Camillo *et al.* (2010). Todos os pacientes foram diagnosticados e tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo. As informações clínicas, demográficas, de tratamento, recorrência e sobrevida foram coletadas dos prontuários médicos e as características histopatológicas, incluindo grau de diferenciação tumoral (Anneroth *et al.*, 1987), infiltração vascular e infiltração neural foram determinadas por meio da análise de todas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina disponíveis dos tumores. Todas as recorrências foram confirmadas histopatologicamente e a sobrevida livre de doença foi determinada como o período entre o tratamento inicial e a confirmação da recorrência, enquanto que a sobrevida global foi o período entre o diagnóstico do paciente e morte ou a última visita de acompanhamento.

4.3 Imuno-Histoquímica

4.3.1 Reação de Imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica foi realizada por meio da técnica estreptavidina-biotina-peroxidase. Inicialmente os cortes de TMA foram desparafinizados, hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e lavados. O procedimento para a recuperação antigênica foi realizado em solução aquosa de 10 mM ácido cítrico pH 6,0 e panela de pressão elétrica por 15 min após o início da pressão. Seguindo o resfriamento do material, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com a incubação com peróxido de hidrogênio 0,1% por 5 min. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS), os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti-ativina A (Human/Mouse/Rat Activin A Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG, R&D Systems, EUA) na diluição de 1:20 em câmara úmida por 18 h a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi então adicionado (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) durante 30 min a 37°C. Em seguida foi realizada a exposição ao sistema amplificação (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) por 30 min a 37°C. A revelação foi realizada em solução contendo 120 mg de 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em 200 ml de PBS, 2 ml de peróxido de hidrogênio (10 volumes) e 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C durante 3 min. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Carrazi durante 5 min.

4.3.2 Digitalização e Análise da Marcação Imuno-histoquímica

A análise da marcação imuno-histoquímica foi realizada com o auxílio do Aperio Scan Scope GL Slide Scanner (Aperio Technologies, EUA). O algoritmo “positive pixel count V9” foi utilizado para estabelecer uma pontuação qualitativa

(baixa e alta expressão) para a expressão citoplasmática de ativina A. Este método de pontuação levou em consideração a intensidade de pixels e a porcentagem de células marcadas. O cálculo da intensidade de marcação (IM) foi determinada segundo orientações fornecidas em estudo prévio realizado por Chang *et al.* (2010). Resumidamente, as intensidades de marcação forte, média, fraca e negativa foram pontuadas como 3, 2, 1 e 0, respectivamente, e a porcentagem de células para cada intensidade foi estimada a partir da intensidade total de pixels de cada marcação. A pontuação resultante foi calculada por meio das somas das porcentagens de células marcadas multiplicadas pela pontuação estabelecida para cada intensidade de marcação, obtendo-se uma pontuação mínima possível igual a 100 e máxima de 300. Por exemplo, um caso com 20% de marcação fraca, 30% de marcação moderada e 50% de marcação forte teria uma IM igual a 230 ($20 \times 1 + 30 \times 2 + 50 \times 3 = 230$). A fim de evitarmos qualquer influência da marcação gerada pelo estroma tumoral, somente as áreas de células epiteliais tumorais foram delimitadas e submetidas à análise (Figura 4). As amostras foram divididas em dois grupos (baixa e alta expressão de ativina A) a partir da mediana da pontuação (IM = 239).

4.4 Cultura de Células

Este estudo inicialmente utilizou as linhagens celulares HaCAT, SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25 e LN2. A HaCAT representa uma linhagem de queratinócitos imortalizados mas não transformados (BouKamp *et al.*, 1988). As linhagens SCC-4 (CRL-1624), SCC-9 (CRL-1629), SCC-15 (CRL-1623) e SCC-25 (CRL-1628) são provenientes de CECs de língua humanos e foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA).

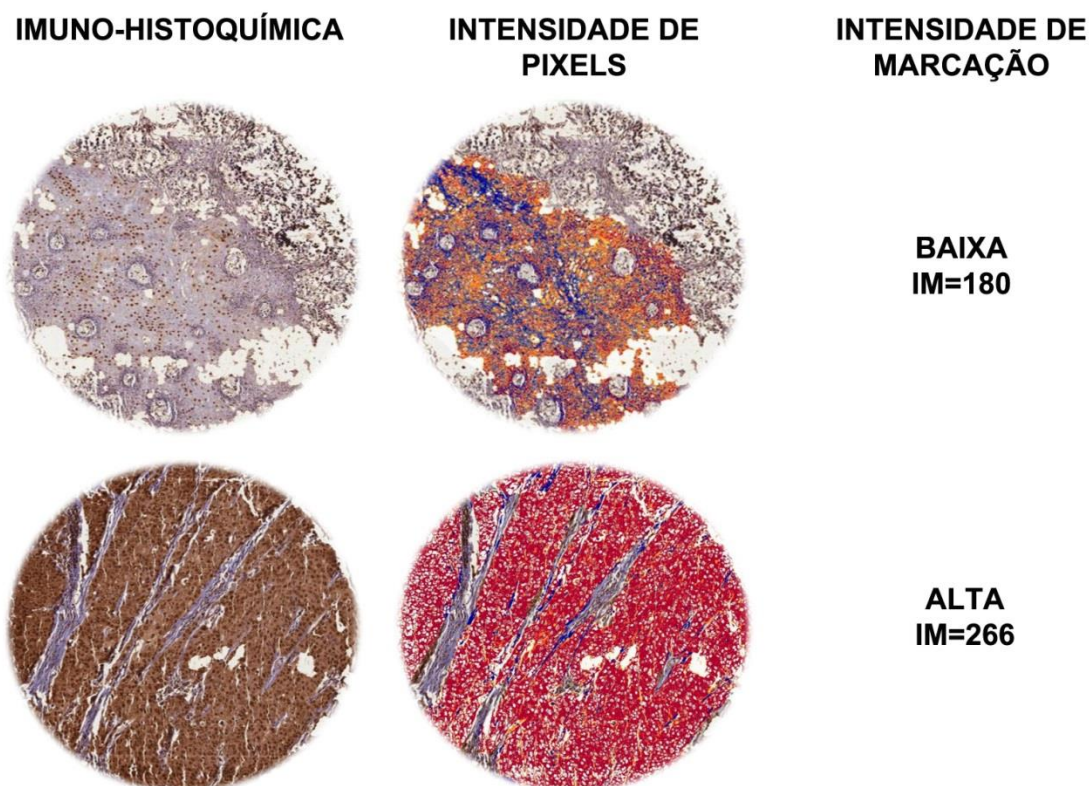


Figura 4. Imagem representativa de 2 amostras deste estudo apresentando amostras classificadas com fraca e alta expressão de ativina A. A intensidade de marcação (IM) foi calculada com o auxílio do software *positive pixel count V9* e a mediana dos valores de IM foi utilizada para dividir os grupos.

A linhagem metastática LN2, derivada das células SCC-9, foi estabelecida em nosso laboratório a partir de modelo xenográfico em camundongos nudes que desenvolveram metástases em linfonodos axilares após injeção ortotópica da linhagem tumoral SCC-9. Esta linhagem metastática foi estabelecida a partir de uma segunda geração de metástases e foi mantidas nas mesmas condições da linhagem parental. A linhagem HaCAT foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM; Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Cultilab Ltda, Brasil), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA) e antibióticos (Invitrogen, EUA). As linhagens celulares de CEC oral foram cultivadas

em meio de cultura composta por partes iguais de DMEM e meio Ham's F12 (DMEM/F-12; Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de FBS, 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, EUA) e antibióticos. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.5 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

4.5.1 Isolamento de RNA Total

Células cultivadas em frascos de 25 cm² com 60% de confluência foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 400 g por 3 min. Posteriormente, os precipitados celulares foram incubados com 700 µl do reagente TRIzol (Invitrogen, EUA) e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após adição de 140 µl de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 9000 g a temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 350 µl de álcool isopropano foi adicionado para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 9000 g a 4°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 700 µl de 75% etanol gelado. Após nova centrifugação a 6000 g a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuscitado em água livre de DNases e de RNases e estocados a temperatura de -80°C até o momento de sua utilização.

4.5.2 Análise da Concentração e Integridade do RNA

A concentração de RNA total foi determinada pelas absorvâncias (Abs) com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo que Abs_{260nm} igual a 1 foi equivalente a 40

µg/ml de RNA total e a razão Abs_{260nm}/Abs_{280nm} foi aproximadamente igual a 1,9. A pureza e integridade do RNA isolado foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% e 0,2 µg de brometo de etídio. Dois microgramas de RNA foram misturados com tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) e aquecidos durante 5 min a 65°C. Após a separação eletroforética o gel foi documentado com o sistema Kodak Digital Science™ equipado com a câmera digital DC40 (Eastman Kodak Co., EUA). Figura 5 representa um dos géis confeccionados durante a realização deste estudo.

4.5.3 Síntese de cDNA

Previamente à síntese do cDNA, 2 µg de RNA total foram incubados com 1 unidade da enzima desoxirribonuclease I (DNase I, Amp Grade; Invitrogen, EUA) por 10 min em temperatura ambiente para eliminação de contaminantes de DNA genômico. Inibição da DNase foi realizada pela adição de 1 µl de EDTA a 25 mM pH 8 (Invitrogen, EUA) e aquecimento a 65°C por 10 min. A síntese do cDNA foi realizada em 2 etapas. Na primeira etapa, foi adicionado 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen, EUA) e 1 µl da mistura de dNTPs a 10mM (Invitrogen, EUA). Após incubação por 5 min a 65°C e resfriamento da amostras em gelo por 1 min, foi adicionado uma mistura de 4 µl de tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 µl DTT a 0,1 M e 1 µl da enzima RNaseOUT (Invitrogen, EUA) que foi incubada por 2 min a 42°C. Ao final desta incubação foi adicionado 1 µl da enzima Superscript II RT (Invitrogen, EUA), seguida da incubação por 50 min a 42°C e por 15 min a 70°C.

4.5.4 Reação de qRT-PCR

Todas as reações de qRT-PCR realizadas neste estudo foram realizadas pelo método de quantificação relativa ao gene normalizador GAPDH. As reações foram preparadas em triplicatas usando o sistema de detecção SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra) no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) em um volume final de 25 µl. Um µl do cDNA resultante foi amplificado na reação contendo 12,5 µl de SYBR® Green, 9,5 µl de água livre de DNases e de RNases e 1 µl de cada primer em uma concentração final de 200 nM (Tabela 1). As condições de amplificação foram 2 min a 50°C para a ativação da enzima AmpErase, 10 min a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq gold DNA polymerase, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s e 1 min a 60°C para pareamento dos primers e extensão. Ao final da amplificação, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s, iniciando-se em 95°C) para a geração de uma curva de dissociação (curva de *melting*) necessária para confirmação da especificidade da amplificação.

4.6 Tratamento com Ativina A e Folistatina recombinante

Para acessar os efeitos biológicos produzidos pelos níveis aumentados de ativina A, a linhagem HaCAT foi incubada com a proteína recombinante ativina A (Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A; R&D Systems, EUA) em concentrações crescentes (0, 1, 10 e 100 ng/ml) em meio de cultura suplementado com 0,1% de FBS por um período de 24 h. Adicionalmente, a linhagem tumoral LN2 foi tratada com folistatina recombinante (Recombinant Human Follistatin 288; R&D Systems, EUA), o inibidor endógeno de ativina A, nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ng/ml em DMEM/F-12 (Invitrogen, EUA) suplementado com 0,1% de FBS por um período de 24 h. Os tratamentos foram realizados em triplicatas e as

concentrações testadas foram selecionadas a partir de estudo realizado previamente (Seder *et al.*, 2009a; Seder *et al.*, 2009b).

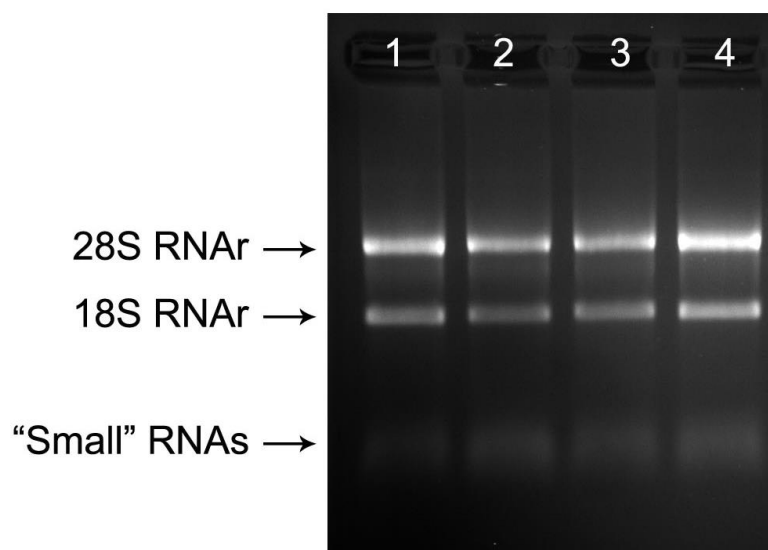


Figura 5. Gel de agarose corado com brometo de etídeo utilizado para avaliação da integridade das amostras de RNA total. Amostras representativas de RNA total purificado de células não tratada (canaleta 1) ou tratadas com ativina A por 24 h (canaletas 2, 3 e 4), demonstrando a proporção ideal das bandas referentes às subunidades maior (28S) e menor (18S) do RNA ribossômico e “small” RNAs.

Tabela 1. Pares de primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
INHBA	CCCCTTTGCCAACCTCAAA	CATGGACATGGGTCTCAGCTT
E-caderina	ACAGCCCCGCCTTATGATT	TCGGAACCGCTTCCTTCA
N-caderina	TGGGAATCCGACGAATGG	CGTACGGCGCTGGGTATC
Vimentina	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT	TCAATGTCAAGGGCCATCTTAA

4.7 Transdução da Linhagem Celular LN2 com Partículas Lentivirais

A neutralização estável e específica do mRNA de INHBA humano nas células LN2 foi obtida pela transdução de partículas lentivirais (MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles, Sigma-Aldrich, EUA). Lentivírus específicos, contendo uma construção para a expressão de oligonucleotídeos com estrutura de *short hairpin* contra o mRNA de ativina A (shRNA-INHBA), e inespecíficos, contendo a sequência embaralhada (shRNA-Scramble), foram utilizados. A sequência alvo de oligonucleotídeos para INHBA foi 5'AGACCCATGTCCATGTTGT3' (NM_002192).

Neste ensaio, as células LN2 foram cultivadas em placas de 12 poços até atingirem 50% de confluência. No momento da transdução viral, o meio foi removido completamente e substituído por meio DMEM/F-12 fresco, suplementado com 10% de FBS e acrescido de 8 µg/ml de polibrene para um volume final de 500 µl. Em seguida, as LN2 foram inoculadas com vetores lentivirais em multiplicidade de infecção igual a 1,5 (MOI = 1,5) e incubadas por 8 h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Completado o período de incubação foi adicionado 2 ml de meio DMEM/F-12 acrescido de 10% de FBS e as células foram incubadas por um período adicional de 16 h. As células foram então lavadas com PBS e cultivadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS por 48 h. A seleção das células transduzidas foi realizada com 1 µg/ml de puromicina (Invitrogen, EUA) por 10 dias para a geração de células estáveis. A eficiência da neutralização foi realizada por reações de qRT-PCR e ELISA.

4.8 Análise Morfológica das Culturas Celulares

A morfologia das células HaCAT tratadas com ativina A e folistatina e das células LN2 com níveis reduzidos de ativina A foi documentada periodicamente com o microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Japão).

4.9 Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA)

Para determinar a concentração de ativina A secretada pelas linhagens transduzidas, o ensaio indireto de ELISA foi utilizado. Meio de cultura DMEM/F-12 sem soro foi adicionado a um poço de uma placa de 24 poços contendo 1×10^5 células. Após 24 h o meio foi coletado e o número de células em cada poço foi contado. O meio de cultura foi utilizado para sensibilizar placas de ELISA de 96-poços por *overnight* a 4°C. Após a sensibilização os poços foram lavados e os sítios ligantes não específicos foram bloqueados com BSA a 3% em PBS por 2 h. Após 3 lavagens com solução de PBS contendo Tween 20 a 1%, foi adicionado o anticorpo primário monoclonal anti-ativina A (Human/Mouse/Rat Activin A (bA Subunit) MAb (Clone 69403), Mouse IgG1, R&D systems, EUA) na diluição de 1:100 por 2 h. Após outra etapa de lavagem, foi adicionado anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase na concentração de 1:1000 por 1 h. As reações foram reveladas pela adição de 200 µl da solução de 0,2 mg/ml de 0-fenilenodiamina em 0,1 M de tampão fosfato-citrato pH 5.0 contendo 0,05% H2O2. A reação foi finalizada pela adição de 2 N H2SO4 e a absorbância avaliada a 490 nm utilizando um leitor automático de ELISA (Ultramark™ Microplate Imaging System, Bio-Rad, EUA). A produção de ativina A foi normalizada pelo número de células de cada poço.

4.10 Análise da Apoptose e Necrose Celular

Para acessar as taxas de apoptose e morte por necrose, 3×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços. Posteriormente foram realizados os tratamentos descritos no item 4.6 ou exposição a 10% de FBS nas células transduzidas. Transcorrido o período de 24 h as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos estéreis e centrifugadas por 4 min a 400 g. As células precipitadas foram

resuspendidas em 100 µl de tampão de ligação (10 mM de HEPES pH 7,4, 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂) contendo 1 µl de anexina-V FITC e 0,5 µl de 7-AAD PerCP (BD Biosciences, EUA). A mistura foi incubada por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após incubação, o material foi centrifugado e lavado com tampão de ligação antes de fixar com 0,1% paraformaldeído. A porcentagem de células positivas para anexina-V ou 7-AAD foi determinada pela leitura de 10.000 eventos em citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Gráficos tipo *dot plot* foram utilizados para a quantificação de células exclusivamente positivas para anexina-V (apoptose) ou 7-AAD (necrose), excluindo da quantificação as células que apresentaram dupla marcação.

Adicionalmente, o potencial inibitório da ativina A foi verificado pela indução de apoptose com estaurosporina (Invitrogen, EUA). Para tanto, as células HaCAT foram plaqueadas e tratadas com ativina A nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Após 20 h de tratamento com a proteína recombinante foi adicionado 0,03 µM de estaurosporina em cada poço e as células foram novamente incubadas até completar as 24 h. Completada as 24 h, as células foram marcadas com anexina V-FITC e 7AAD.

4.11 Proliferação e Ciclo Celular

Proliferação celular foi avaliada por ensaios de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e distribuição celular nas fases do ciclo celular pela marcação com iodeto de propídeo (PI).

4.11.1 Incorporação de BrdU

Células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço em uma placa de cultura de 96 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida

contendo 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram cultivadas por 48 h na ausência de FBS para promoção do sincronismo celular. Transcorrido o período de 24 h dos tratamentos ou exposição a 10% de FBS nas células transduzidas, BrdU foi adicionado na concentração final de 10 µM por poço e as células foram incubadas por 2 h. Após o período de incubação, o meio contendo BrdU foi removido e as células foram fixadas por 30 min à temperatura ambiente com etanol 70% gelado. Em seguida, a incorporação de BrdU nas células em proliferação foi quantificada pelo ensaio de ELISA como descrito pelo fabricante (Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche, Alemanha). Após terminar a reação com 25 µl de 1 M H₂SO₄ por poço, absorbância foi lida em comprimento de onda de 450 nm (referência: 690 nm) em leitor de ELISA (UltramarkTM Microplate Imaging System, Bio-Rad, EUA).

4.11.2 Análise do Ciclo Celular

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação com PI. Para realizar o ensaio, 3x10⁵ células foram plaqueadas em placas de 6 poços com meio de cultura suplementado com 10% de FBS. Após 48 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco não suplementado com FBS para promover a sincronização das células. Transcorrido o período de 24 h para os tratamentos ou exposição a 1% de FBS nas células transduzidas, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e fixadas em etanol 70% gelado por 12 h a -20°C. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram coradas com 50 µg/ml de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas no escuro a 4°C por pelo menos 1 h. As amostras devidamente marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (BD Biosciences, EUA).

4.12 Análise dos Marcadores da Transição Epitélio Mesenquimal

Para avaliação da TEM a expressão de E-caderina, N-caderina e vimentina foram avaliadas por qRT-PCR e western blot. As reações de qRT-PCR foram realizadas como descrito no item 4.5 utilizando sequências de primers específicas (Tabela 1). A expressão das proteínas foi avaliada por western blot como descrito abaixo usando os anticorpos primárias relacionados na Tabela 2.

4.13 Western Blot

Para realização da análise protéica, placas 100 mm² contendo as células em 70% a 80% de confluência foram lavadas 2 vezes com PBS gelado. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de PBS gelado e as células foram destacadas das placas com o auxílio de um “cell scraper” (Costar, EUA) e transferidas para um tubo de 15 ml que foi centrifugado a 400 g por 5 min. Os precipitados celulares foram incubados com 100 µl de tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e inibidores de proteases (Roche, Alemanha) no gelo por 30 min, sendo homogeneizados a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados. As concentrações de proteína total foram quantificadas pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000c. Quantidades padronizadas de proteína total para as reações de cada anticorpo foram separadas eletroforéticamente em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) com tampão redutor e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2 h com 10% de leite desnatado em PBS contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas com um dos

anticorpos primários por 2 h. Após 3 lavagens consecutivas com solução de PBS com 0,01% de Tween-20, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h. Os anticorpos foram diluídos solução de 5% leite desnatado em PBS. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas usando o ECL kit de quimioluminescência para Western blot (GE Healthcare, Austria).

4.14 Ensaio de Adesão Celular aos Componentes da Matriz Extracelular

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina e laminina - BD Biosciences, EUA) em concentração de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ por 1 h em temperatura ambiente. Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e posteriormente bloqueadas com 1% BSA por 30 min em temperatura ambiente, para eliminar áreas que não foram eventualmente coberta pelas proteínas. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBS e 5×10^4 células resuspendidas em 50 μl de meio de cultura foram adicionadas a cada poço e incubadas por 2 h a 37°C em atmosfera a 5% de CO_2 . Após o período de incubação as células não aderentes foram removidas por sucessivas lavagens com PBS. As células que permaneceram aderidas foram fixadas com solução de 10% formalina por 30 min em temperatura ambiente. As células aderidas foram coradas com 1% azul de toluidina em solução aquosa de 1% bórax por 5 min. Após lavagem para remoção do excesso de corante, 100 μl da solução aquosa de 1% SDS foi adicionada e incubada por 5 min. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado e absorbância a 650 nm foi medida em leitor de ELISA. Foram realizados 3 ensaios independentes contendo 5 replicatas de cada uma das proteínas, 5 replicatas somente bloqueadas com 1% BSA como controle negativo de adesão e 5 replicatas sem qualquer tratamento e sem aplicação das células como branco da reação.

Tabela 2. Anticorpos primários usados nos experimentos de western blot.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
E-caderina	Sc-7860	Santa Cruz	1:2000
N-caderina	8C11	BD Biosciences	1:2500
Vimentina	3B4	DAKO	1:200
p21 ^{WAF1/Cip1}	C-19	Santa Cruz	1:200
p27 ^{Kip 1}	57	BD Biosciences	1:500
p16 ^{Ink4a}	G-6	Santa Cruz	1:100
Cdk2	M2	Santa Cruz	1:15000
Cdk4	C-22	Santa Cruz	1:25000
Cdk6	C-21	Santa Cruz	1:1000
Ciclina E	M-20	Santa Cruz	1:1000
Ciclina D1	DCS-6	Calbiochem	1:200
β -actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:30000

4.15 Ensaio da Gota em Suspensão (*Hanging Drop Assay*)

Alterações morfológicas observadas em microscópio de contraste de fase associadas aos resultados encontrados na análise dos marcadores da TEM sugeriram a possível participação de ativina A na regulação do contato célula-célula. Para confirmar esta hipótese foi realizado o ensaio da gota em suspensão

(*Hanging Drop Assay*) com o objetivo de comparar a formação de agregados celulares nas linhagens LN2-shControle e LN2-shRNA-INHBA, como descrito previamente (Alam *et al.*, 2012). Resumidamente, 2×10^4 células foram resuspendidas em uma gota de 27 μ l de meio de cultura suplementado com 10% de FBS que foi colocada sobre a tampa de uma placa de 35 mm. Em seguida, foi adicionado PBS no compartimento inferior da placa para manter a umidade e a tampa contendo as gotas foi adequadamente reposicionada. As suspensões foram incubadas por 16 h a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂ (Figura 6). Os agregados celulares formados em 5 diferentes gotas foram visualizados no microscópio confocal LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems) por meio de imagens sequenciais em Z (*Z-stack*).

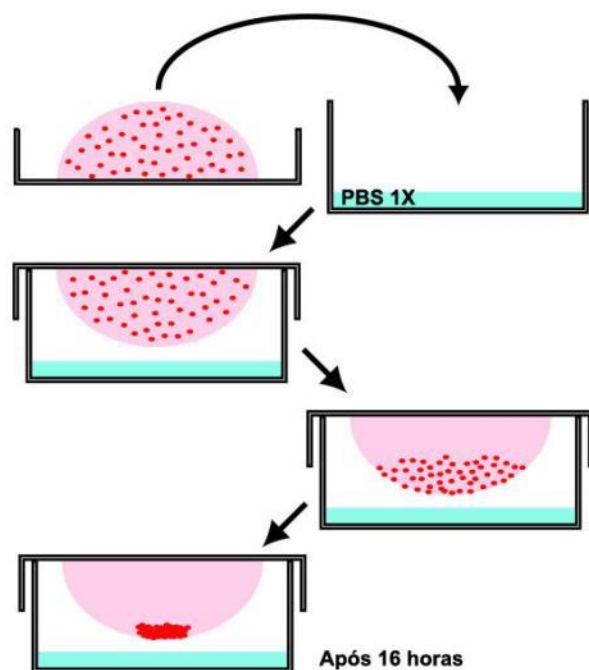


Figura 6. Esquema da preparação dos agregados celulares usando a técnica da gota em suspensão. Adaptado de Suzuki *et al.* (2012)

4.16 Ensaio de Invasão e Migração Celular

Os ensaios de invasão e migração foram realizados no sistema transwell com e sem Matrigel, respectivamente. Em essência, para avaliarmos o potencial de invasão os insertos de 6,5 mm de diâmetro com membrana de polycarbonato contendo poros de 8,0 μm (Transwell®; Corning, EUA) receberam uma fina camada de Matrigel diluído 1:1 em meio de cultura (50 μl ; BD Biosciences, EUA) e foram incubados a 37°C por 2 h. Durante este período, células cultivadas na ausência de FBS por 48 h foram tripsinizadas e levadas a uma suspensão de 8×10^4 células/200 μl de meio de cultura sem FBS. A câmara inferior do sistema recebeu 500 μl de meio de cultura acrescido de fator quimiotático, enquanto que a câmara superior recebeu 200 μl da solução de células. Quando o objetivo foi avaliar o efeito de ativina A ou folistatina, como fator quimiotático foi utilizado 10 ng/ml da proteína em associação a 10% de FBS na câmara inferior, enquanto que para as células transduzidas com as partículas virais receberam 10% de FBS como fator quimiotático. Após o período de 72 h, o número de células que invadiram o Matrigel e se localizaram na porção inferior da membrana de polycarbonato foi determinada por coloração com azul de toluidina. Os ensaio de migração foram realizados nas mesmas condições, no entanto, por um período de 24 h e sem cobertura de Matrigel.

4.17 Avaliação de Filopódios e Lamelipódios

Células (2×10^4 células por poço) foram plaqueadas em lâminas de cultura de 8 poços (Lab-Tek, Thermo Scientific, EUA) e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram fixadas em solução de 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 10 min à temperatura ambiente. A permeabilização foi realizada com 0,5% Triton X-100 (Acros Organics, New York, EUA) em tampão fosfato durante 10 min. Para a visualização dos filamentos de actina e núcleos celulares foram utilizados, respectivamente,

faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA) na diluição de 1:200 e DRAQ5TM (Biostatus Ltd, Inglaterra) na diluição de 1:1000. Após montagem de lamínula de vidro com meio de montagem contendo 40% glicerol, as marcações foram examinadas em microscópio confocal LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemanha) e a contagem de filopódios e lamelipódios foi realizada em 20 células.

4.18 Análise Estatística

Para determinar a correlação entre a positividade de ativina A e os parâmetros clínico-patológicos e de recorrência dos tumores, nós utilizamos o teste qui-quadrado. Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e o risco de ocorrência (hazard ratio, HR) foi avaliado por análise multivariada de Cox.

Todos os experimentos in vitro foram repetidos, pelo menos, 3 vezes e expressos como media \pm desvio padrão. Análise de variância complementada com o teste de Tukey foi utilizado para comparar os efeitos induzidos pelos tratamentos com ativina A e folistatina recombinantes e o teste T de Student no formato bicaudal foi aplicado para verificar os efeitos do silenciamento de INHBA nas células LN2.

O nível de significância empregado foi de 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

5. RESULTADOS

5.1 Correlação entre a Expressão de Ativina A e as Características Clínico-Patológicas dos CECs Orais

A marcação imuno-histoquímica de ativina A em amostras de CEC oral revelou uma intensa expressão citoplasmática nos queratinócitos tumorais. Em algumas amostras, uma fraca positividade nuclear pode ser observada nas células tumorais. Além disto, foi observada discreta marcação em algumas células do estroma, incluindo células inflamatórias, células mesenquimais fusiformes e células endoteliais. A especificidade do anticorpo foi certificada pela marcação imuno-histoquímica em uma amostra de CEC que não recebeu o anticorpo primário. O padrão de marcação imuno-histoquímica para ativina A encontrado neste estudo pode ser observado na Figura 7.

O perfil epidemiológico dos pacientes (n=115) deste estudo revelou que a maioria foi do sexo masculino (n=92, 80%), com idade média de 55 anos (variação de 30 a 90 anos) e apresentavam história de consumo de bebidas alcoólicas (91 pacientes, 79,13%) e de tabaco (106 pacientes, 92,17%). A região da cavidade oral acometida pelo tumor primário foi predominantemente a língua (n=82, 71,3%), seguida do assoalho da boca, gengiva, mucosa jugal, região retromolar e lábio (n=33; 28,7%). Os pacientes foram classificados segundo o sistema de estadiamento TNM e agrupados como se segue: T1 + T2 (n=42, 36,5%), T3 + T4 (n=73, 63,4%), assim como N0 (n=50, 43,4%) e N+ (n=65, 56,5%). Todos os pacientes foram estadiados como M0 no momento do diagnóstico. Os tumores foram classificados de acordo com o grau histológico de diferenciação (Anneroth *et al.*, 1987) e posteriormente agrupados em bem e moderadamente diferenciados (n=61, 53%) e pobremente diferenciados (n=54, 46,9%). Depois do tratamento, os pacientes foram acompanhados mensalmente para avaliação de recorrência da doença que foi observada em 50 casos (43,4%).

Os resultados da correlação entre a expressão imuno-histoquímica de ativina A e as características clínico-patológicas dos CECs orais estão descritos na Tabela 3. A alta expressão de ativina A correlacionou significativamente com estadio N, mostrando que ~67% dos casos com expressão aumentada de ativina A apresentavam linfonodo metastático no momento do diagnóstico comparado com ~47% dos casos com baixa expressão ($p=0,034$). Foi observada, ainda, uma correlação significativa entre a expressão aumentada de ativina A e o grau de diferenciação das células tumorais ($p=0,013$). Aproximadamente 60% dos pacientes com alta expressão de ativina A apresentaram tumores pobremente diferenciados, enquanto que 40 pacientes com baixa expressão de ativina A (63,5%) apresentaram tumores bem ou moderadamente diferenciados ($p=0,013$).

A expressão de ativina A elevada foi associada com menor sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com CECs orais, como pode ser observado pela curvas de Kaplan-Meier (Figura 8). A análise univariada revelou que 55,7% dos pacientes com CECs orais apresentando alta expressão de ativina A estavam vivos após 5 anos do tratamento comparados com 67,9% dos casos com baixa expressão ($p=0,01$). A mesma correlação foi observada entre a expressão aumentada de ativina A e a sobrevida livre de doença em 5 anos ($p=0,0039$).

Para confirmar o fator preditivo de ativina A foi aplicado a análise multivariada pelo método de regressão de Cox (Tabelas 4 e 5). Esta análise revelou que a expressão aumentada de ativina A é um fator independente associado com menor sobrevida livre de doença em 5 anos com um HR de 1,74 (95% IC: 1,39-2,97; $p=0,016$). No entanto, uma perda da significância foi observada quando a expressão de ativina A foi correlacionada com sobrevida global na análise multivariada (HR: 1,52; 95% IC: 0,32-1,86; $p=0,23$). Para sobrevida global, estadio N, infiltração vascular e recorrência foram indicadores independentes de prognóstico (Tabela 4), enquanto que para sobrevida livre de doença os fatores preditivos, além de expressão imuno-histoquímica de ativina A,

foram estadio T, estadio N, infiltração vascular, infiltração neural e recorrência (Tabela 5).

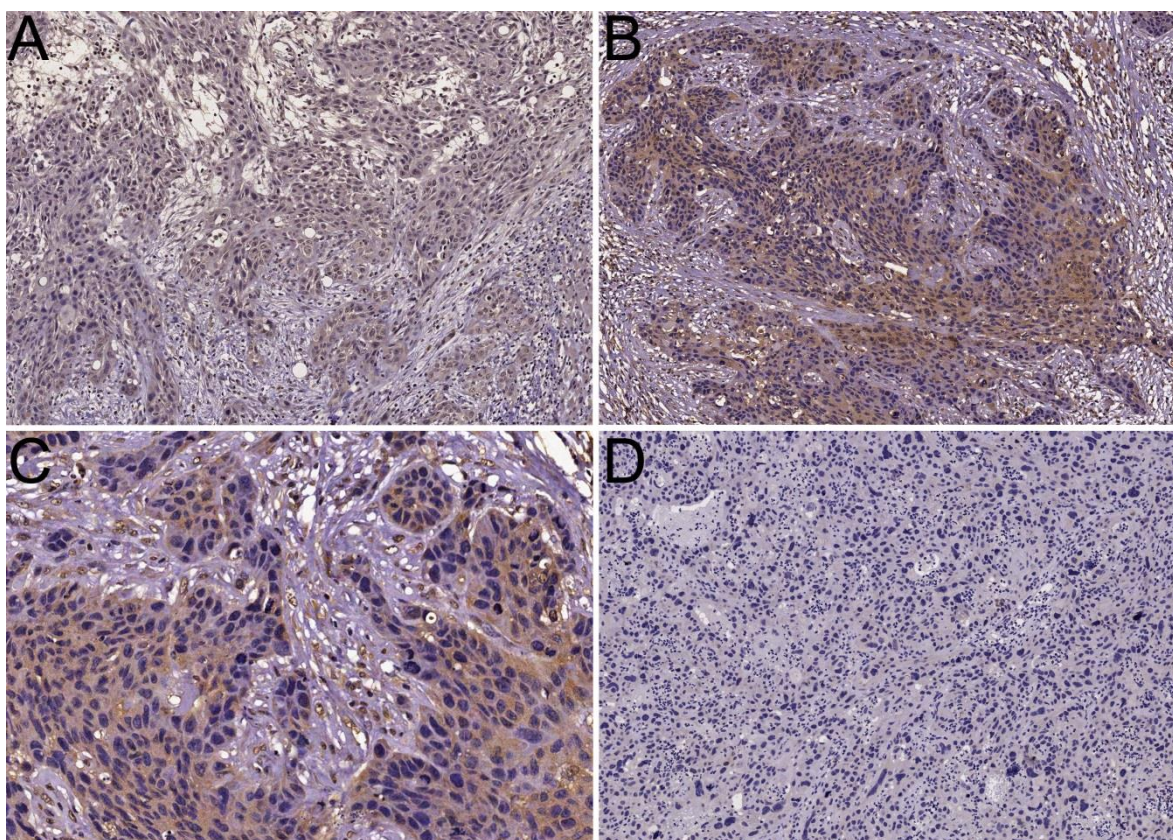


Figura 7. Imagens representativas da reação imuno-histoquímica para ativina A. A) Amostra representativa de CEC oral mostrando baixa intensidade de marcação (aumento 40X). B) Amostra representativa de CEC oral mostrando alta intensidade de marcação (aumento 40X). C) Maior aumento demonstrando a expressão de ativina A no estroma tumoral (aumento 100X). D) Amostra de CEC usada como controle negativo da reação (ausência do anticorpo anti-ativina A) (aumento 40X).

Tabela 3. Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de ativina A e as variáveis clínico-patológicas dos CECs orais.

Parâmetros	Expressão de ativina A		Valor de p
	Baixa n (%)	Alta n (%)	
Idade			
< 55 anos	33 (52,4)	27 (51,9)	0,96
≥ 55 anos	30 (47,6)	25 (48,1)	
Gênero			
Masculino	51 (80,9)	41 (78,8)	0,78
Feminino	12 (19,1)	11 (21,2)	
Etnia			
Caucasiano	54 (85,7)	47 (90,4)	0,44
Não caucasiano	9 (14,3)	5 (9,6)	
Hábito de fumar			
Não	4 (6,3)	5 (9,6)	0,51
Sim	59 (93,7)	47 (90,4)	
Hábito de beber			
Não	10 (15,9)	14 (26,9)	0,14
Sim	53 (84,1)	38 (73,1)	
Localização			
Língua	46 (73)	36 (69,2)	0,65
Outros	17 (27)	16 (30,8)	
Estadio T			
T1 + T2	23 (36,5)	19 (36,5)	0,99
T3 + T4	40 (63,5)	33 (63,5)	
Estadio N			
N0	33 (52,4)	17 (32,7)	0,034
N+	30 (47,6)	35 (67,3)	
Grau Histopatológico			
BD + MD	40 (63,5)	21 (40,4)	0,013
PD	23 (36,5)	31 (59,6)	
Infiltração Vascular			
Não	36 (59)	35 (67,3)	0,36
Sim	25 (41)	17 (32,7)	
Infiltração Neural			
Não	39 (62,9)	34 (65,4)	0,78
Sim	23 (37,1)	18 (34,6)	
Recorrência			
Não	36 (57,1)	29 (55,8)	0,88
Sim	27 (42,9)	23 (44,2)	

BD: Bem diferenciado, MD: Moderadamente diferenciado, PD: Pobremente diferenciado.

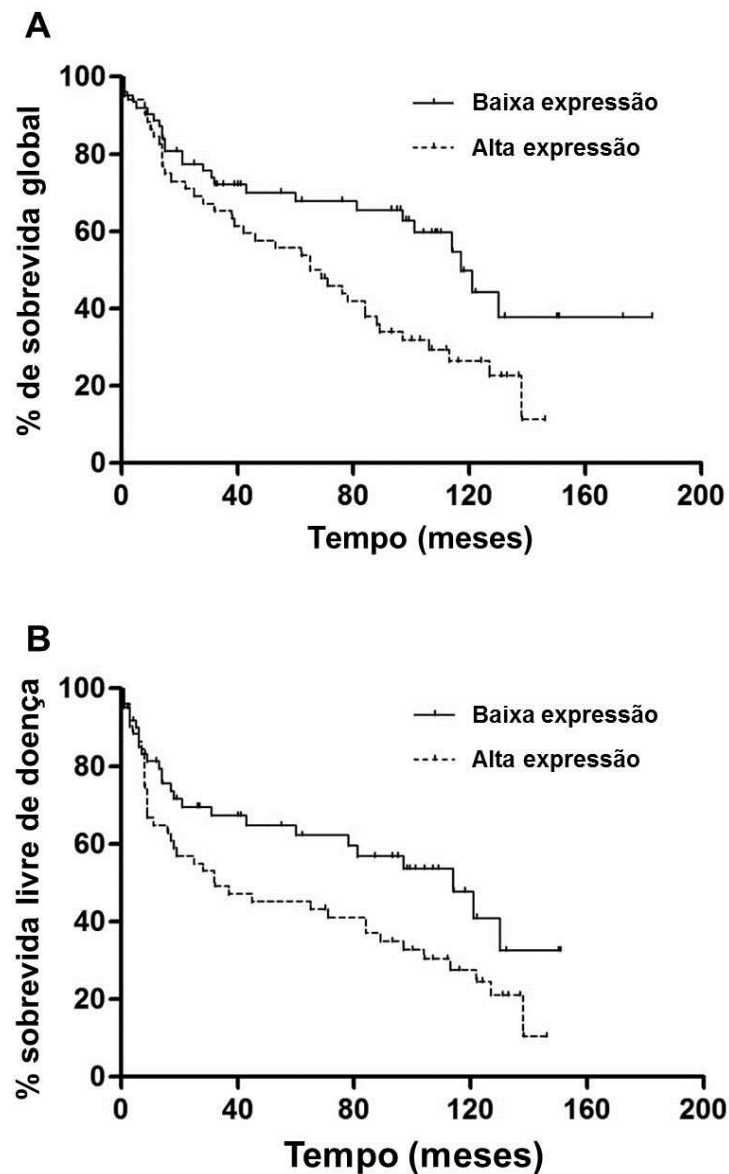


Figure 8. Curvas de Kaplan-Meier com estimativas da sobrevida global e livre de doença em 5 anos comparando os indivíduos com alta e baixa expressão. A) O período de sobrevida global após 5 anos dos pacientes com tumores apresentando baixa expressão de ativina A foi maior que a de pacientes com alta expressão ($p=0,01$). B) O período de sobrevida livre de doença foi igualmente maior em pacientes com tumores apresentando baixa expressão de ativina A comparado com tumores de alta expressão ($p=0,0039$).

Tabela 4. Análise multivariada da sobrevida global dos pacientes com CECs orais.

Parâmetros	Sobrevida global em 5 anos (%)	HR (IC de 95%) / valor de p	
		Univariada	Multivariada
Idade			
≤ 55 anos	60,9	Referência	Referência
> 55 anos	63,5	0,99 (0,61-1,63) / 0,99	1,00 (0,70-1,14) / 0,96
Sexo			
Masculino	59,1	Referência	Referência
Feminino	73,6	0,79 (0,26-1,33) / 0,45	0,92 (0,66-1,27) / 0,61
Etnia			
Caucasiano	63,6	Referência	Referência
Não caucasiano	52,1	1,49 (0,97-2,01) / 0,11	1,21 (0,72-1,38) / 0,98
Localização			
Língua	62,5	Referência	Referência
Outros	60,9	1,05 (0,60-1,82) / 0,86	0,98 (0,69-1,37) / 0,90
Estadio T			
T1/T2	77,6	Referência	Referência
T3/T4	53,1	1,55 (0,96-2,15) / 0,09	1,18 (0,72-1,61) / 0,37
Estadio N			
N0	70,8	Referência	Referência
N+	49,7	2,5 (1,89-4,10) / 0,002	1,76 (1,22-2,55) / 0,026
Grau histológico			
BD + MD	68,6	Referência	Referência
PD	55,2	1,6 (0,99-2,2) / 0,07	1,15 (0,66-1,37) / 0,81
Infiltração vascular			
Não	71,5	Referência	Referência
Sim	45,1	4,2 (3,61-4,84) / 0,0002	2,74 (1,84-4,09) / 0,001
Infiltração neural			
Não	62,7	Referência	Referência
Sim	58,8	1,26 (0,65-1,87) / 0,23	0,52 (0,14-1,20) / 0,48
Recorrência			
Não	74,9	Referência	Referência
Sim	43,5	2,88 (2,26-3,49) / 0,0004	2,37 (1,60-3,51) / 0,0001
Ativina A			
Baixa expressão	67,9	Referência	Referência
Alta expressão	55,7	1,74 (1,4-2,35) / 0,01	1,52 (0,32-1,86) / 0,23

BD: Bem diferenciado, MD: Moderadamente diferenciado, PD: Pobremente diferenciado.

Tabela 5. Análise multivariada da sobrevida livre de doença dos pacientes com CECs orais.

Parâmetros	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	HR (IC de 95%) / valor de p	
		Univariada	Multivariada
Idade			
≤ 55 anos	53,8	Referência	Referência
> 55 anos	53,4	0,97 (0,59-1,59) / 0,92	0,78 (0,08-1,48) / 0,93
Sexo			
Masculino	50,8	Referência	Referência
Feminino	64,7	0,71 (0,62-2,31) / 0,40	0,99 (0,71-1,38) / 0,97
Etnia			
Caucasiano	56,7	Referência	Referência
Não caucasiano	37,4	2,27 (1,75-2,79) / 0,14	1,12 (0,78-1,62) / 0,53
Localização			
Língua	52,9	Referência	Referência
Outros	51,4	1,03 (0,46-1,61) / 0,92	0,87 (0,15-1,60) / 0,64
Estadio T			
T1/T2	70,9	Referência	Referência
T3/T4	43,7	3,03 (2,43-3,62) / 0,006	2,27 (1,85-4,89) / 0,023
Estadio N			
N0	65,1	Referência	Referência
N+	44,7	3,56 (2,96-4,16) / 0,003	1,95 (1,34-2,84) / 0,001
Grau histológico			
BD + MD	59,2	Referência	Referência
PD	48,6	1,62 (1,00-2,23) / 0,12	1,01 (0,70-1,45) / 0,95
Infiltração vascular			
Não	63,2	Referência	Referência
Sim	37,9	8,00 (7,38-8,61) / 0,0009	3,04 (2,03-4,57) / 0,001
Infiltração neural			
Não	58,6	Referência	Referência
Sim	45,8	2,62 (2,01-3,23) / 0,018	1,87 (1,05-4,64) / 0,042
Recorrência			
Não	74,9	Referência	Referência
Sim	12,7	9,31 (8,69-9,92) / <0,0001	3,56 (4,68-9,11) / <0,0001
Ativina A			
Baixa expressão	62,3	Referência	Referência
Alta expressão	45,2	3,56 (2,95-4,17) / 0,0039	1,74 (1,39-2,97) / 0,016

BD: Bem diferenciado, MD: Moderadamente diferenciado, PD: Pobremente diferenciado.

5.2 Análise da Expressão de INHBA nas linhagens celulares queratinócitos normais e tumorais

Inicialmente, por meio de qRT-PCR, nós caracterizamos a expressão de ativina A em linhagens celulares de CEC oral e na linhagem de queratinócitos HaCAT. A expressão de INHBA foi significativamente maior nas linhagens celulares de CEC oral em comparação a linhagem HaCAT, com exceção da linhagem SCC-4 (Figura 9). Embora a linhagem SCC-4 tenha demonstrado maior expressão que a linhagem HaCAT, a diferença não foi estatisticamente significativa. Interessantemente, a linhagem celular metastática LN2 revelou uma expressão de ativina A de aproximadamente 2,5 vezes maior que a sua linhagem parental SCC-9 ($p=0,02$). A partir destes resultados, nós escolhemos as linhagens HaCAT e LN2 por apresentarem os menores e os maiores níveis de expressão de ativina A, respectivamente, para realização dos ensaios funcionais.

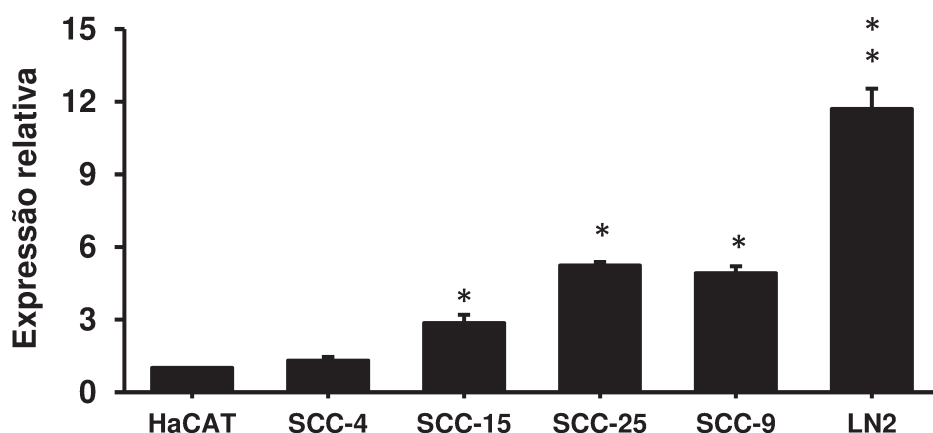


Figura 9. Expressão de INHBA nas linhagens celulares de queratinócito normal (HaCAT) e CEC oral (SCC-4, SCC-15, SCC-25, SCC-9 e LN2 metastática). As linhagens celulares de CEC apresentaram uma expressão significativamente maior de INHBA comparado com HaCAT, com exceção da linhagem SCC-4. Os valores foram normalizados pelos níveis de GAPDH e são expressos em relação aos níveis de HaCAT. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

5.3 Caracterização da Morfologia das Células Tratadas com Ativina A e Folistatina e das Células com Níveis Reduzidos de Expressão de Ativina A

Analisado a influência de ativina A sobre a morfologia celular, não foi possível observar nenhuma diferença entre as células HaCAT controle e tratadas com ativina A recombinante, independente da concentração. Similarmente, a linhagem LN2 tratada com folistatina não apresentou alterações morfológicas visíveis com 24 h de exposição (dados não mostrados). No entanto, as células LN2 que são compostas por células fusiformes, de citoplasma volumoso, prolongamentos citoplasmáticos evidentes e crescimento disperso, demonstraram alterações morfológicas após silenciamento estável de INHBA. Após a transdução das partículas lentivirais e aquisição de resistência ao antibiótico de seleção, as células LN2 adquiriram o formato mais arredondado com redução dos prolongamentos citoplasmáticos e tamanho aparentemente menor (Figura 10). A eficiência do silenciamento de ativina A foi avaliada pelo ensaio de qRT-PCR e ELISA. O ensaio de qRT-PCR demonstrou uma redução de aproximadamente 90% ($p < 0,001$) nos níveis de expressão de ativina A em relação às células LN2-shScramble, enquanto que a quantidade de proteína mostrou uma redução de ~80% em relação ao controle. A Figura 11 representa a média de três ensaios independentes de qRT-PCR e ELISA.

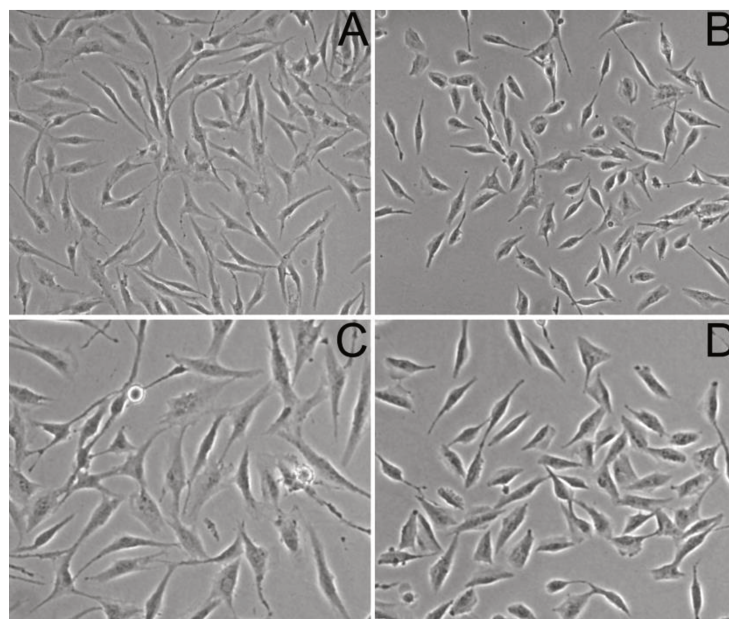


Figure 10. Alterações morfológicas das células LN2 após transdução estável de partículas lentivirais. Imagens em aumento de 40X da linhagem LN2 controle (A) e LN2 com reduzida expressão de INHBA (B). Imagem aproximada em aumento de 100X mostrando detalhes das linhagens LN2 controle (C) e silenciada (D).

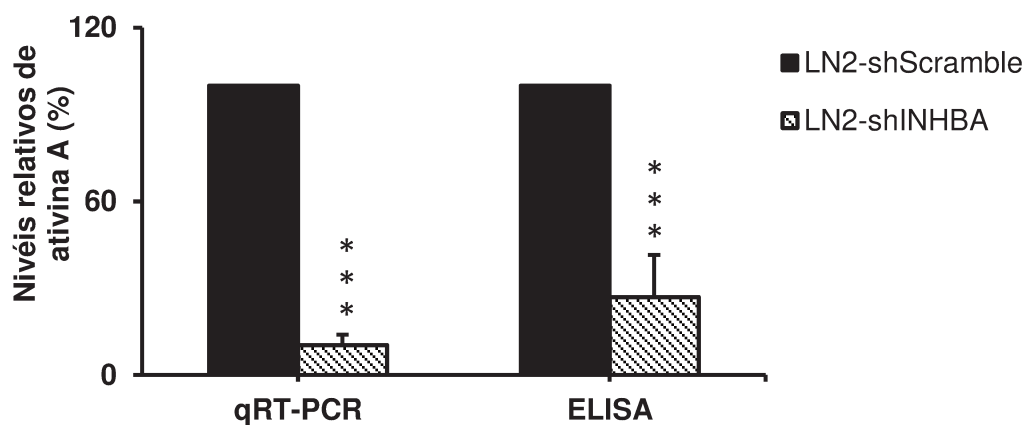


Figura 11. Análise da expressão de ativina A por qRT-PCR e ELISA. A linhagem LN2-shINHBA apresentou uma redução significativa de ativina A comparada com as células controle, em ambos os ensaios. *** $p < 0,001$

5.4 Efeitos de Ativina A sobre a Apoptose e Necrose Celular

As taxas de morte celular por apoptose e necrose foram investigadas por dupla marcação com anexina V-FITC/PE e 7AAD-PerCP com posterior detecção por citometria de fluxo. Os resultados revelaram que a ativina A recombinante foi capaz de inibir significativamente a apoptose das células HaCAT nas concentrações de 10 e 100 ng/ml em relação ao controle sem tratamento com ativina A (Figura 12A). Células na presença de 10 ng/ml de ativina A tiveram uma redução de 50,7% nas taxas de apoptose em relação às células controle ($p < 0,05$) e uma redução ainda mais significativa foi observada para as células na presença de 100 ng/ml de ativina A, sendo que a redução no número de células em apoptose foi de 71,6% ($p < 0,01$). Além disto, uma redução significativa na morte por necrose celular foi observada nas concentrações de 1 ng/ml (redução de 34,6%; $p < 0,01$), 10 ng/ml (redução de 39,3%; $p < 0,001$) e 100 ng/ml (redução de 62,6%; $p < 0,001$). A fim de confirmar o potencial inibitório de ativina A sobre as taxas de apoptose, nós realizamos o tratamento concomitante das células HaCAT com ativina A recombinante e estaurosporina (STS) na concentração de 0,03 μ M. Ativina A foi capaz de reduzir significativamente a apoptose promovida por STS em um padrão dose dependente (Figura 13).

Resultados opostos foram observados no tratamento da linhagem tumoral SCC-9 com folistatina. O bloqueio de ativina A via folistatina foi capaz de induzir a morte celular por apoptose (aumento de ~80%; $p < 0,01$) e por necrose (~220%; $p < 0,01$) na concentração de 100 ng (Figura 12B). Similarmente, as células tumorais com a expressão estável de shINHBA apresentaram um aumento significativo no número de células em apoptose (aumento de 76,3%; $p < 0,001$) e necrose (aumento de 59,3%; $p < 0,01$) (Figura 12C).

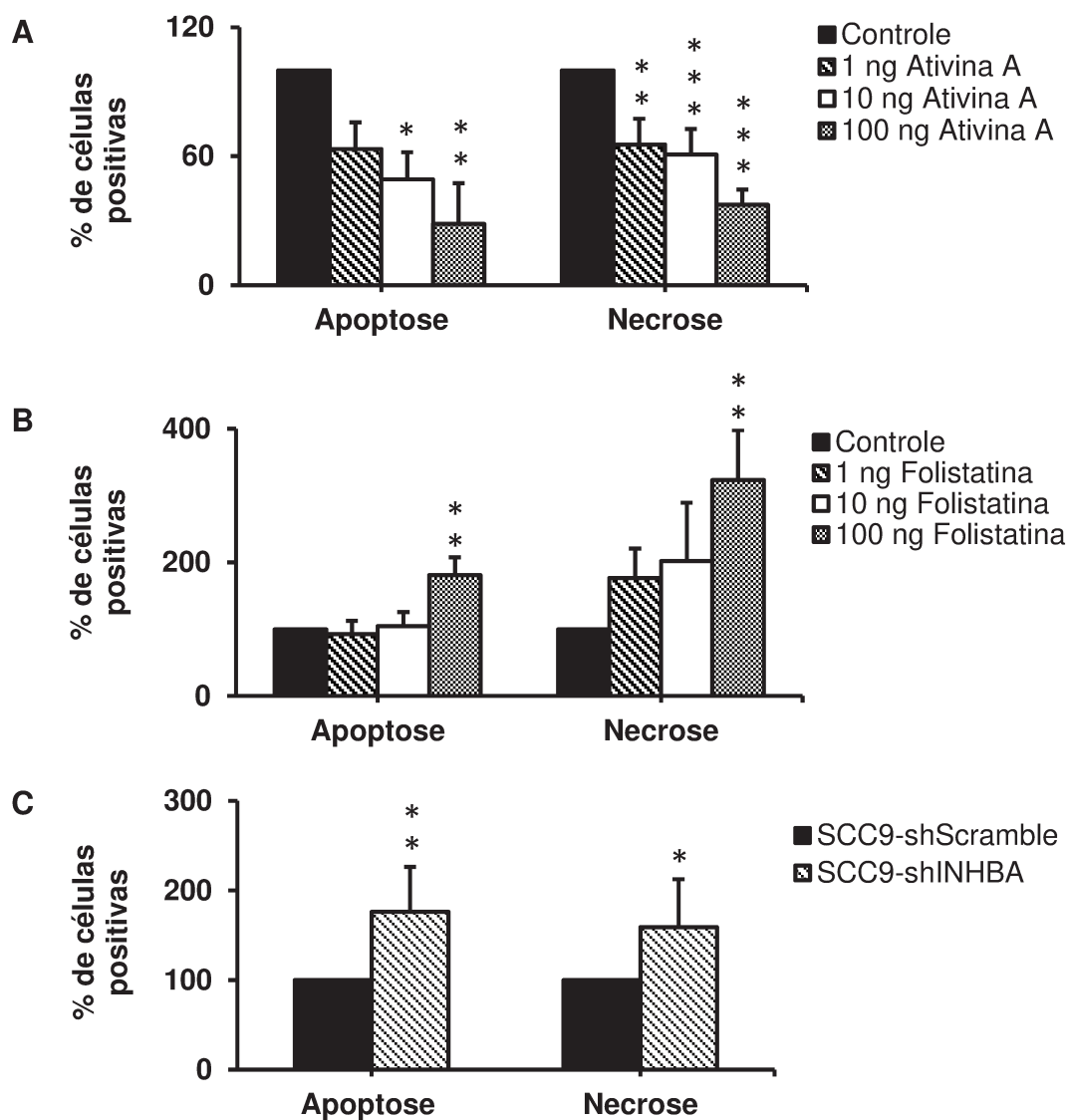


Figura 12. Determinação dos índices de apoptose e necrose pela marcação com anexina V e 7-AAD. A) Tratamento das HaCAT com ativina A recombinante promoveu o bloqueio da apoptose e necrose. B) Efeito oposto foi observado no tratamento da linhagem SCC-9 com 100 ng/ml de folistatina. C) As células SCC-9 com expressão reduzida de ativina A demonstraram um aumento significativo do número de células em apoptose e necrose. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

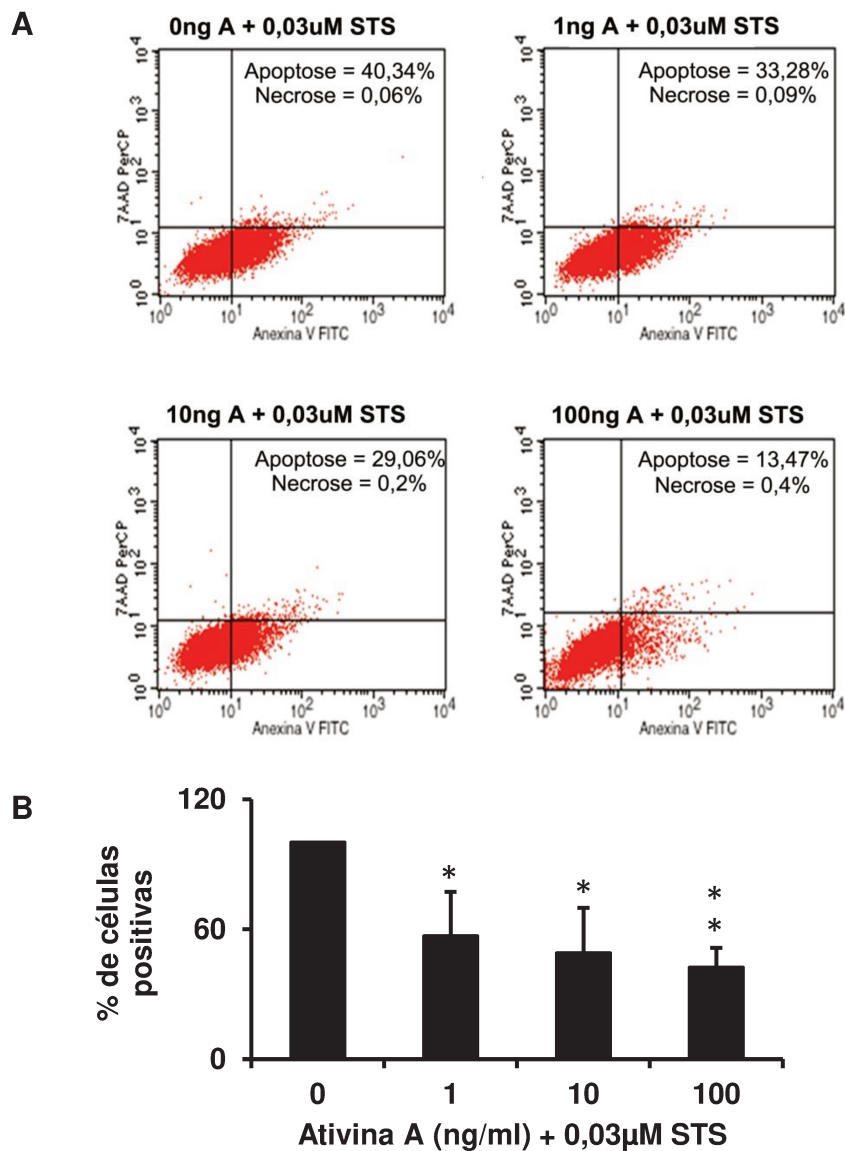


Figura 13. Confirmação do potencial inibitório da apoptose pela ativina A em células tratadas com estaurosporina (STS). A) Gráficos representativos destacando o bloqueio progressivo e dose dependente da apoptose em células HaCAT tratadas com ativina A. B) Média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes demonstrando uma redução significativa da apoptose pelo tratamento com ativina A em todas as concentrações. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.5 Efeitos de Ativina A sobre a Proliferação Celular

Com a finalidade de compreender a participação de ativina A na tumorigênese dos carcinomas orais, ensaios proliferativos, incluindo o índice de incorporação de BrdU e a distribuição das células nas fase do ciclo celular pela marcação com PI, foram realizados. O tratamento da linhagem HaCAT com ativina A recombinante não foi capaz de influenciar a proliferação desta linhagem em um período de 24 h (Figura 14A). Similarmente, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na distribuição das fases do ciclo celular entre as células controle e as tratadas com ativina A (Figura 15A).

Em contrapartida, o bloqueio de ativina com folistatina recombinante nas células LN2 foi capaz de reduzir significativamente o índice de incorporação de BrdU (Figura 14B). Houve uma redução de aproximadamente 30% da marcação pelo BrdU no grupo tratado com 100 ng/ml de folistatina comparado ao grupo controle ($p < 0,001$). No entanto, a avaliação da distribuição das fases do ciclo celular não indicou nenhuma alteração estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com folistatina (Figura 15B). A redução nos níveis de transcrito de INHBA também foi significativamente associada a uma redução na capacidade proliferativa das células LN2, como revelado pelo ensaio de incorporação de BrdU (Figura 14C). Em comparação com as células transduzidas com a sequência controle (shRNA scramble), o índice de incorporação de BrdU das células com níveis reduzidos de INHBA foi significativamente reduzido em ~60% ($p < 0,001$). O bloqueio da proliferação celular induzido pela silenciamento estável de INHBA levou a um aumento no número de células nas fases G0/G1 do ciclo celular (aumento de 21,1%; $p < 0,001$), que foi acompanhado por uma redução no número de células na fase S (redução de 16,7%; $p < 0,01$) (Figura 16).

Para caracterizar de que maneira a inibição de INHBA reduz a proliferação das células LN2-shINHBA, nós analisamos a expressão de diversas proteínas envolvidas na fase G1 do ciclo celular. O primeiro grupo de proteínas analisadas

foram as proteínas inibidoras de cdk (*cdk inhibitors* – cki) p16^{Ink4a}, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1}. Concordando com os dados mostrados na Figura 16, onde o silenciamento de INHBA resultou em inibição da proliferação celular, foi verificado aumento significativo nos níveis das 3 proteínas avaliadas. As quinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases* – cdks) são enzimas que agem na promoção a progressão do ciclo celular. Dentre as diversas cdks, avaliamos os efeitos da inibição de INHBA sobre cdk2, cdk4 e cdk6. Contudo, nenhuma alteração no conteúdo proteico das cdks estudadas foi identificada. As ciclinas constituem um grupo diverso de proteínas que se acumulam durante a interfase e são destruídas na mitose, sendo que a ciclina D e E são necessárias para a transição de G1 para S, por se ligarem as cdk4/cdk6 e cdk2, respectivamente. Diante deste contexto, era esperado uma redução nos níveis de ciclina D e E, visto o acúmulo de células LN2-shINHBA na fase G0/G1 do ciclo celular (Figura 16). No entanto, o silenciamento de INHBA promoveu um discreto aumento do conteúdo proteico de ciclina D e não alterou ciclina E. A Figura 17 apresenta imagens representativas de um ensaio de western blot para checagem do conteúdo proteico das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, utilizando extrato proteico total das linhagens LN2-shScramble e LN2-shINHBA.

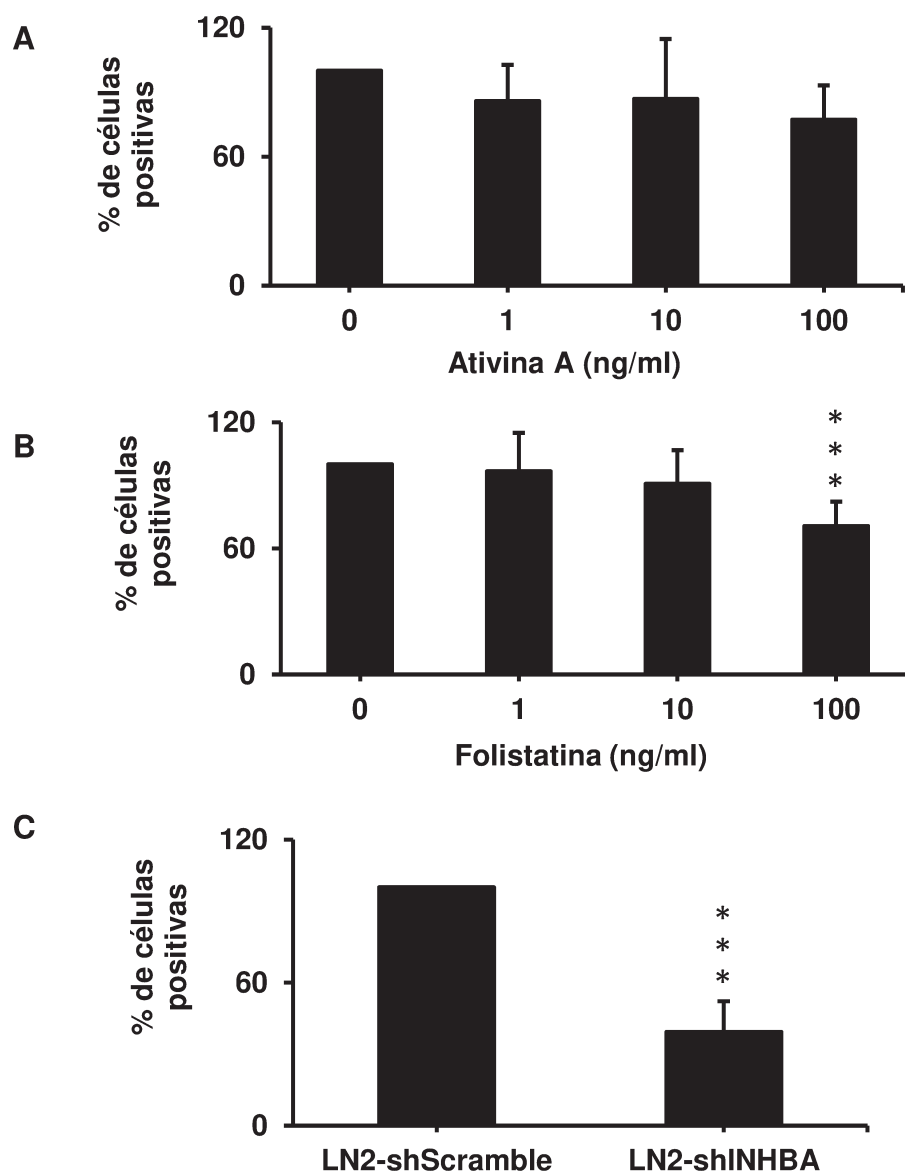


Figura 14. Efeito de ativina A sobre o índice de incorporação de BrdU. A) O tratamento com ativina A recombinante por um período de 24 h não foi capaz de alterar o potencial proliferativo das células HaCAT. B) Por outro lado, o tratamento com 100 ng/ml de folistatina recombinante promoveu uma redução na incorporação de BrdU pelas células LN2. C) O bloqueio estável de INHBA na linhagem LN2 inibiu significativamente a proliferação celular. *** $p < 0,001$

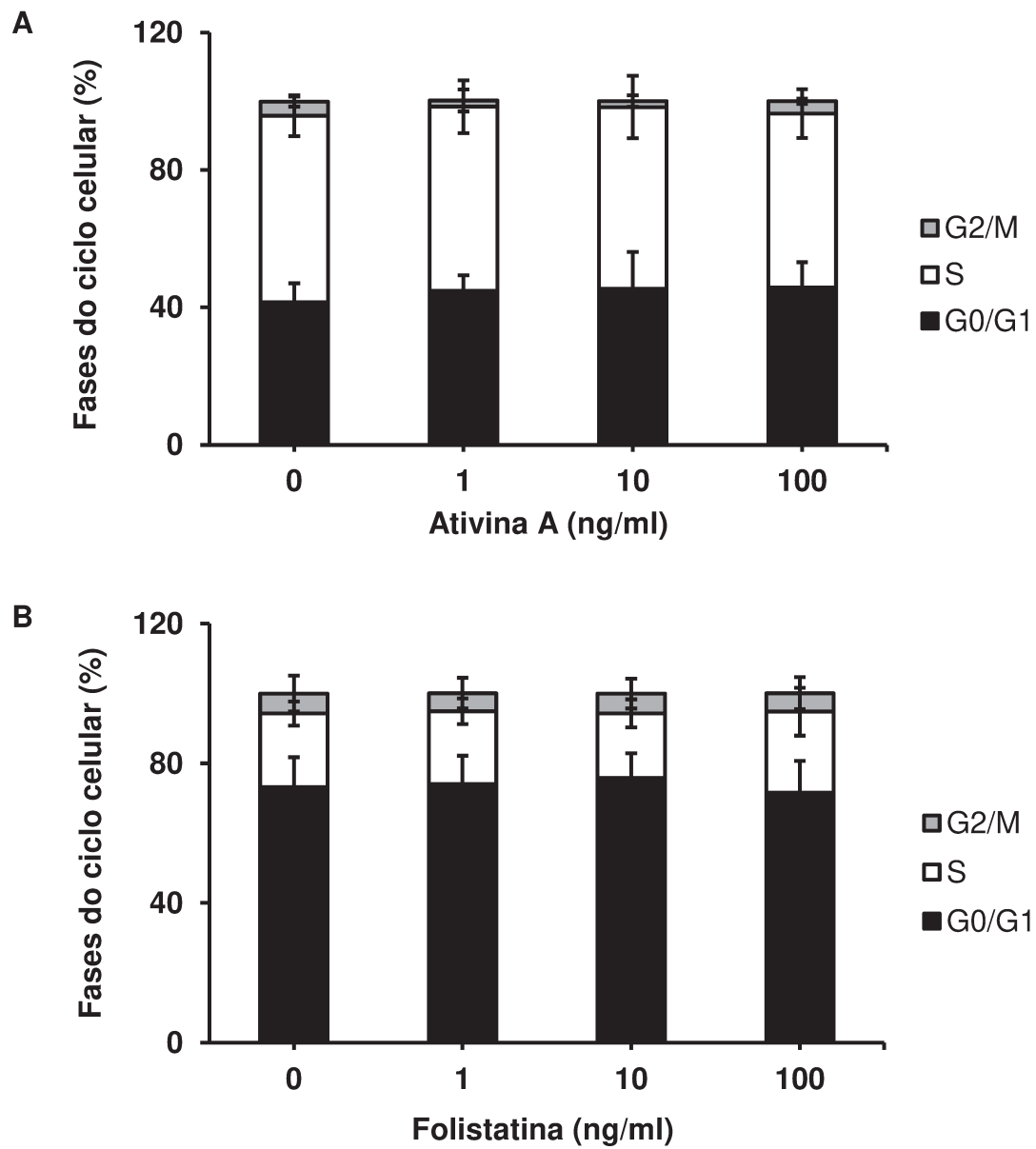


Figura 15. Influência de ativina A na distribuição celular nas fases do ciclo celular. Não houve influência significativa dos tratamentos na distribuição das células nas fases do ciclo celular. A) Tratamento com ativina A na linhagem HaCAT e B) tratamento com folistatina na linhagem LN2.

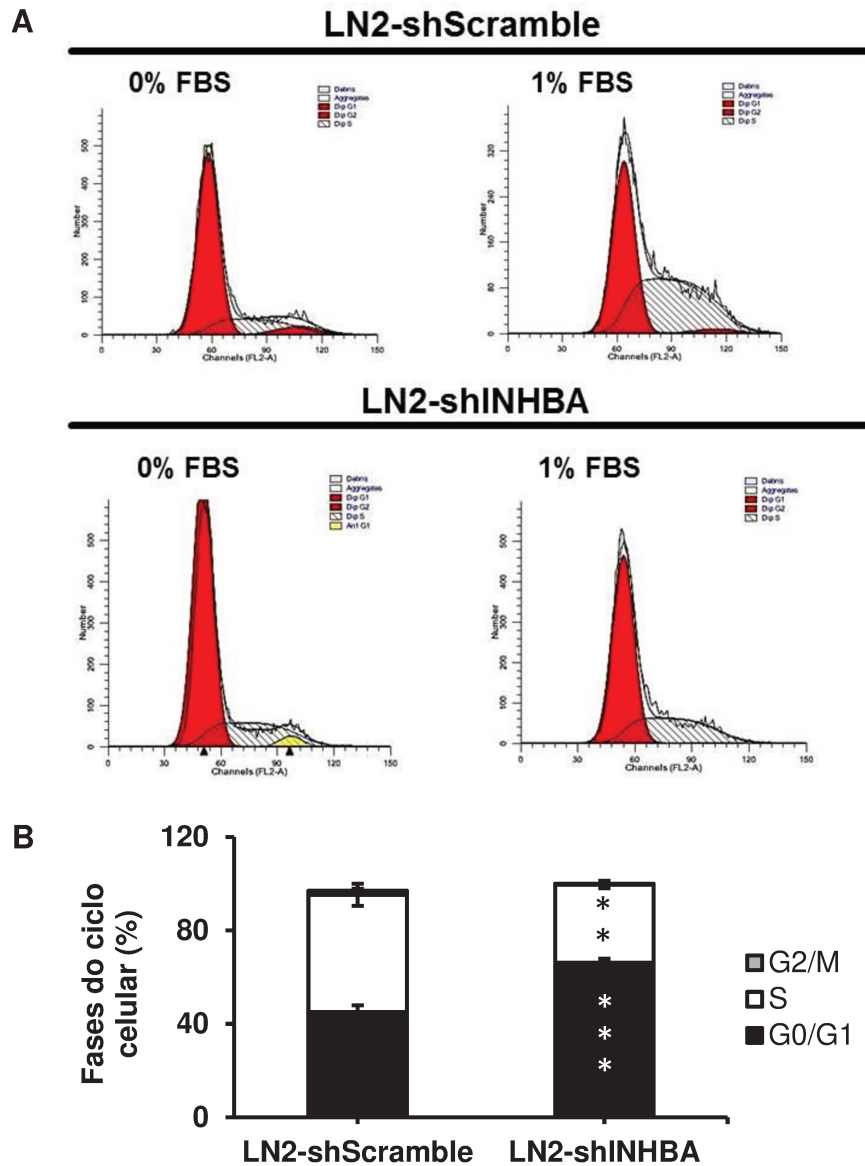


Figura 16. Análise do ciclo celular após silenciamento estável de INHBA na linhagem LN2. A) Imagens representativas das linhagens LN2-shScramble e LN2-shINHBA após 48 h de carenciamento (0% FBS) e 24 h de estímulo proliferativo (1% FBS). B) Média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes, demonstrando um significativo acúmulo (66,2%) de células nas fases G0/G1 do ciclo celular nas linhagens LN2-shINHBA com consequente redução (16,7%) no número de células na fase S do ciclo celular. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

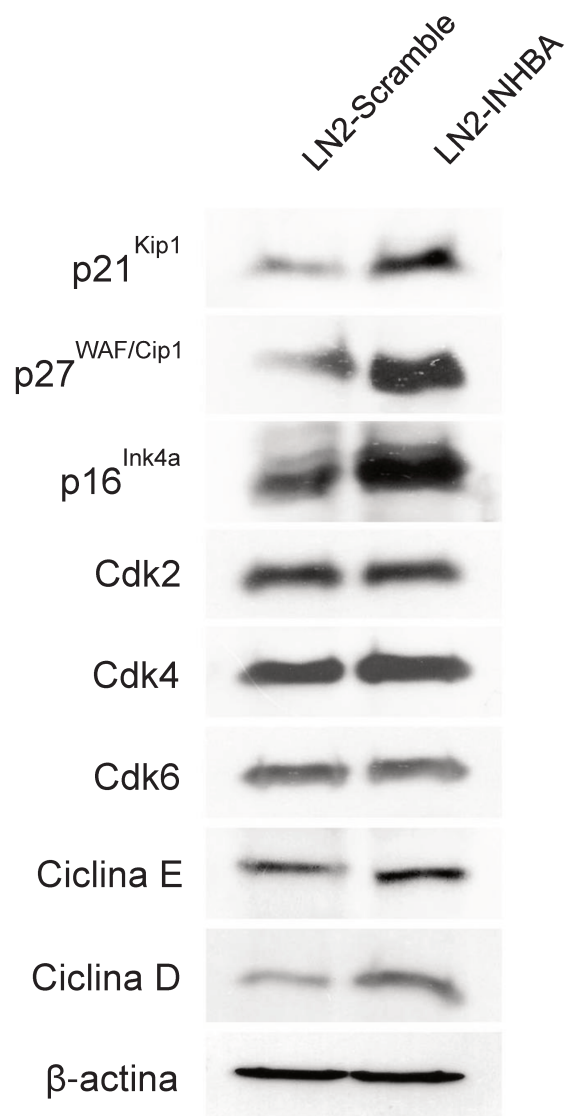


Figura 17. Ativina A controla a expressão de proteínas envolvidas na transição G1-S do ciclo celular. Imagens representativas das reações de western blot com extrato protéico de LN2-shScramble e LN2-shINHBA para os inibidores p16^{Ink4a}, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1}, e para os promotores da transição G1 para S, incluindo cdk2, ckd4, cdk6, ciclina E e ciclina D.

5.6 Influência de Ativina A sobre Marcadores da TEM

Para investigarmos a relação da perda de identidade epitelial induzida por ativina A, nós avaliamos a expressão de marcadores da TEM. A transição de células epiteliais para células mesenquimais, uma chave do programa embrionário, é evocado durante a invasão e metástase tumoral e várias moléculas capazes de regular TEM em células tumorais têm sido identificadas (Kalluri & Weinberg, 2009; Polyak & Weinberg, 2009; Dave *et al.*, 2012). Portanto, para verificar se ativina A induz TEM, reações de qRT-PCR e western blot para os principais marcados epiteliais e mesenquimais foram realizadas. As células HaCAT tratadas com ativina A recombinantes mostraram uma perda da identidade epitelial com uma redução significativa na expressão de E-caderina nas concentrações de 1 ng/ml (redução de ~40%) e 10 ng/ml (redução de ~22%) e um aumento na expressão dos marcadores mesenquimais N-caderina (aumento de ~34%) e vimentina (aumento de ~83%) na concentração de 100 ng/ml (Figura 18A). Análise de western blot confirmou o *switch* das caderinas especialmente na concentração de 100 ng/ml (Figura 18B). Em nenhuma das condições testadas, foi possível a detecção de vimentina nas células HaCAT por ensaios de western blot.

Interessantemente, o tratamento da linhagem tumoral LN2 com folistatina recombinante resultou em uma reversão do fenótipo mesenquimal observado nesta linhagem (Figura 19A). A expressão de E-caderina aumentou significativamente na presença de 1 e 10 ng/ml (aumento de ~100% e ~140%, respectivamente). Os marcadores mesenquimais N-caderina e vimentina em concentrações menores de folistatina demonstraram um aumento da expressão (1 ng/ml, $p < 0,001$), ao passo que uma redução significativa da expressão de N-caderina nas concentrações de 10 e 100 ng/ml (redução de ~30% e ~20% respectivamente) e vimentina na concentração de 10 ng/ml (~20% de redução, $< 0,01$) foram reveladas. Reações de western blot demonstraram apenas um discreto *switch* das caderina com 100 ng/ml de folistatina e uma perda significativa de vimentina em todas as concentrações (Figura 19B). O efeito do silenciamento

endógeno de INHBA na linhagem LN2 demonstrou resultados similares aos encontrados pelo tratamento com folistatina (Figura 20A).

Diante das alterações morfológicas e de expressão dos marcadores de TEM pela linhagem LN2-shINHBA, foi realizado o ensaio da gota em suspensão com o intuito de avaliar o ganho de adesão célula-célula induzido pelo silenciamento do gene INHBA. Neste ensaio foi possível observar a formação de pequenos agregados celulares no grupo controle (LN2-shScramble) comparado com a formação de um grande agregado celular formado pelas células LN2-shINHBA (Figura 20B). Estes achados são concordantes ao resultados encontrados na análise da TEM e da análise da alteração morfológica em cultura celular.

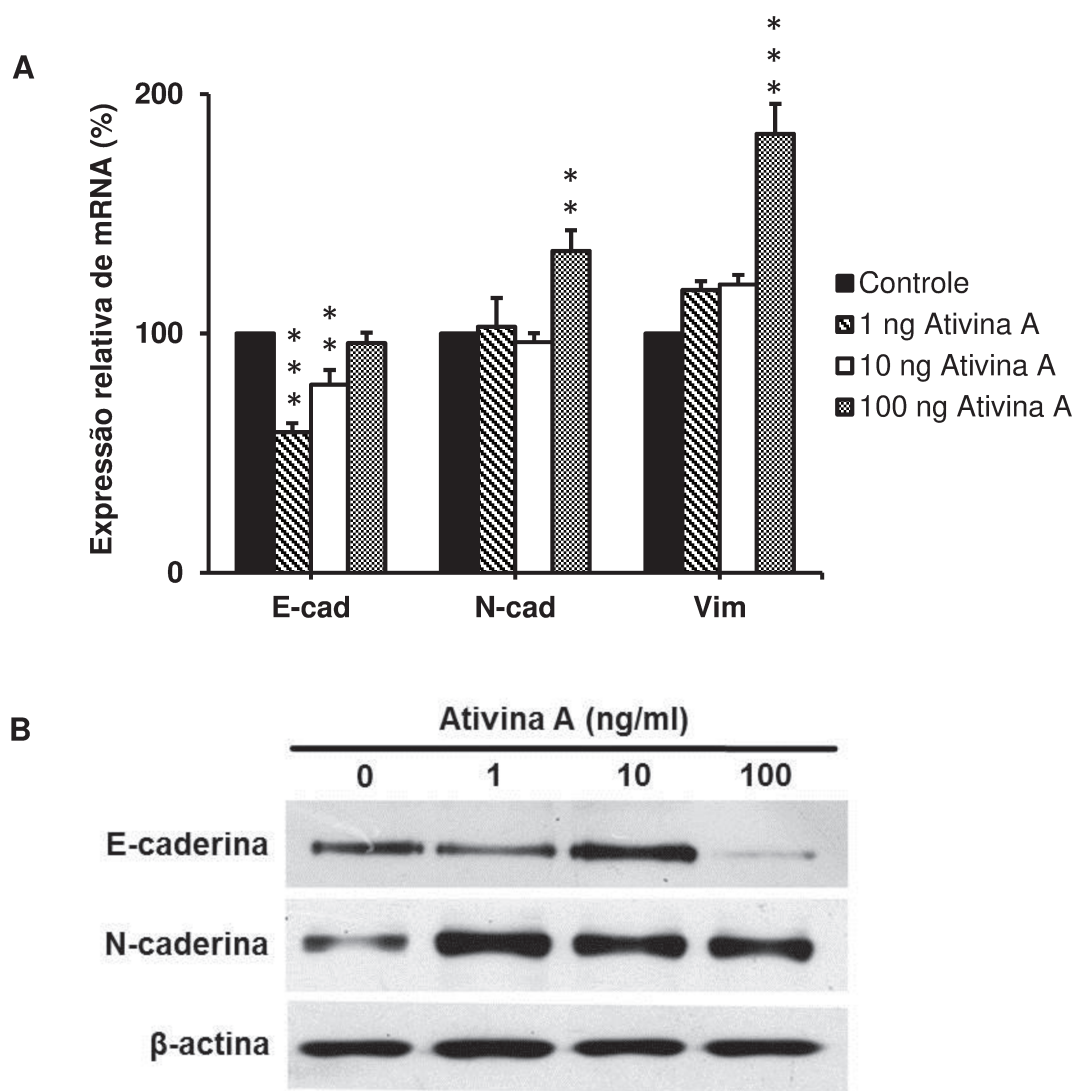


Figure 18. Ativina A induz a expressão de marcadores da transição epitélio mesenquimal nas células HaCAT. A) qRT-PCR demonstrando redução significativa de E-caderina nas concentrações de 1 e 10 ng/ml e aumento de N-caderina e vimentina nas concentrações de 100 ng/ml de ativina A recombinante. B) O *switch* das caderinas também foi observado em análise de western blot. **p<0,01; ***p<0,001

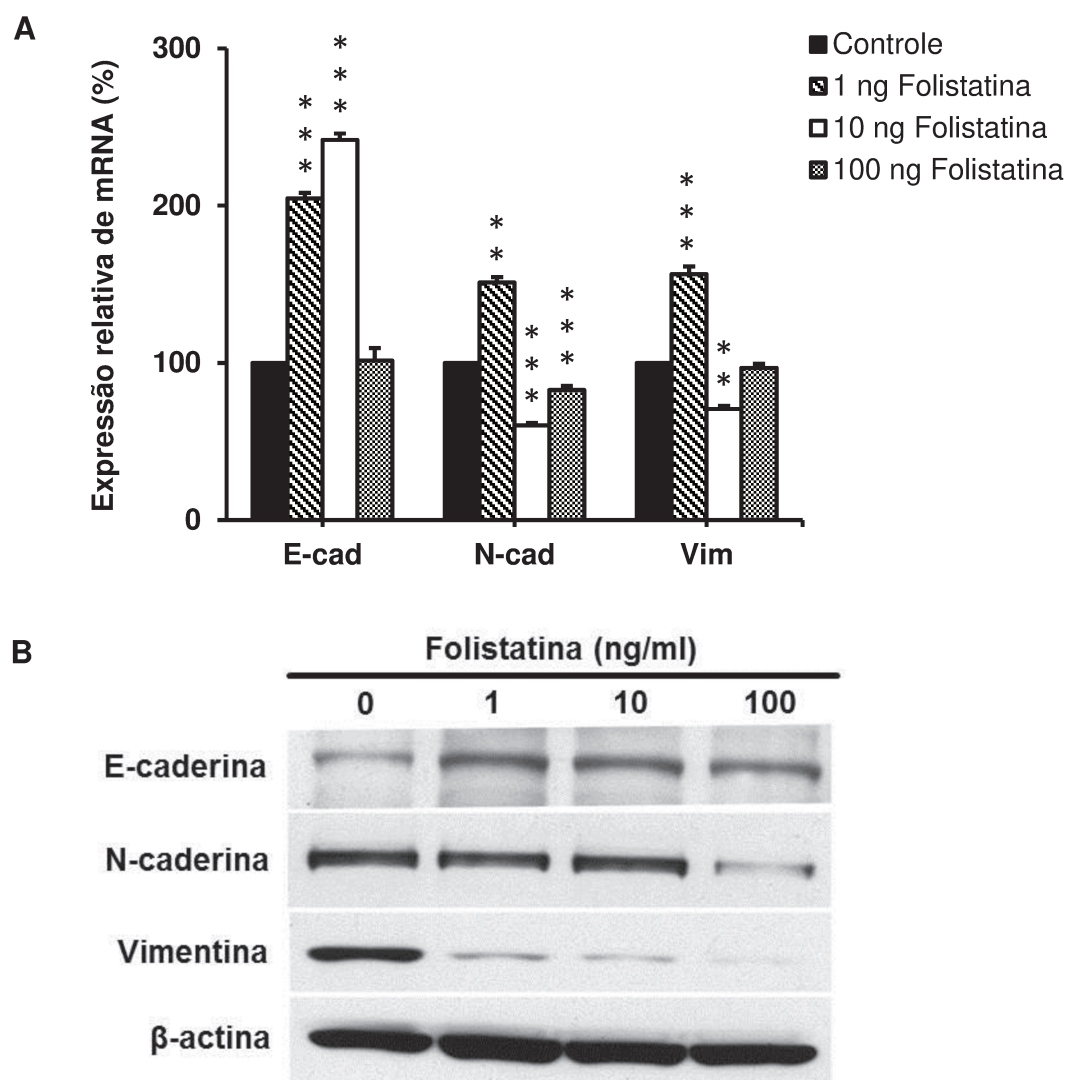


Figure 19. Bloqueio de ativina A com folistatina promove a transição epitélio mesenquimal das células LN2. A) Reação de qRT-PCR demonstrando que folistatina, o antagonista de ativina A, induziu a expressão de E-caderina e reduziu a expressão de N-caderina e vimentina. B) Western blot confirmando o switch das caderinas e redução de vimentina. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

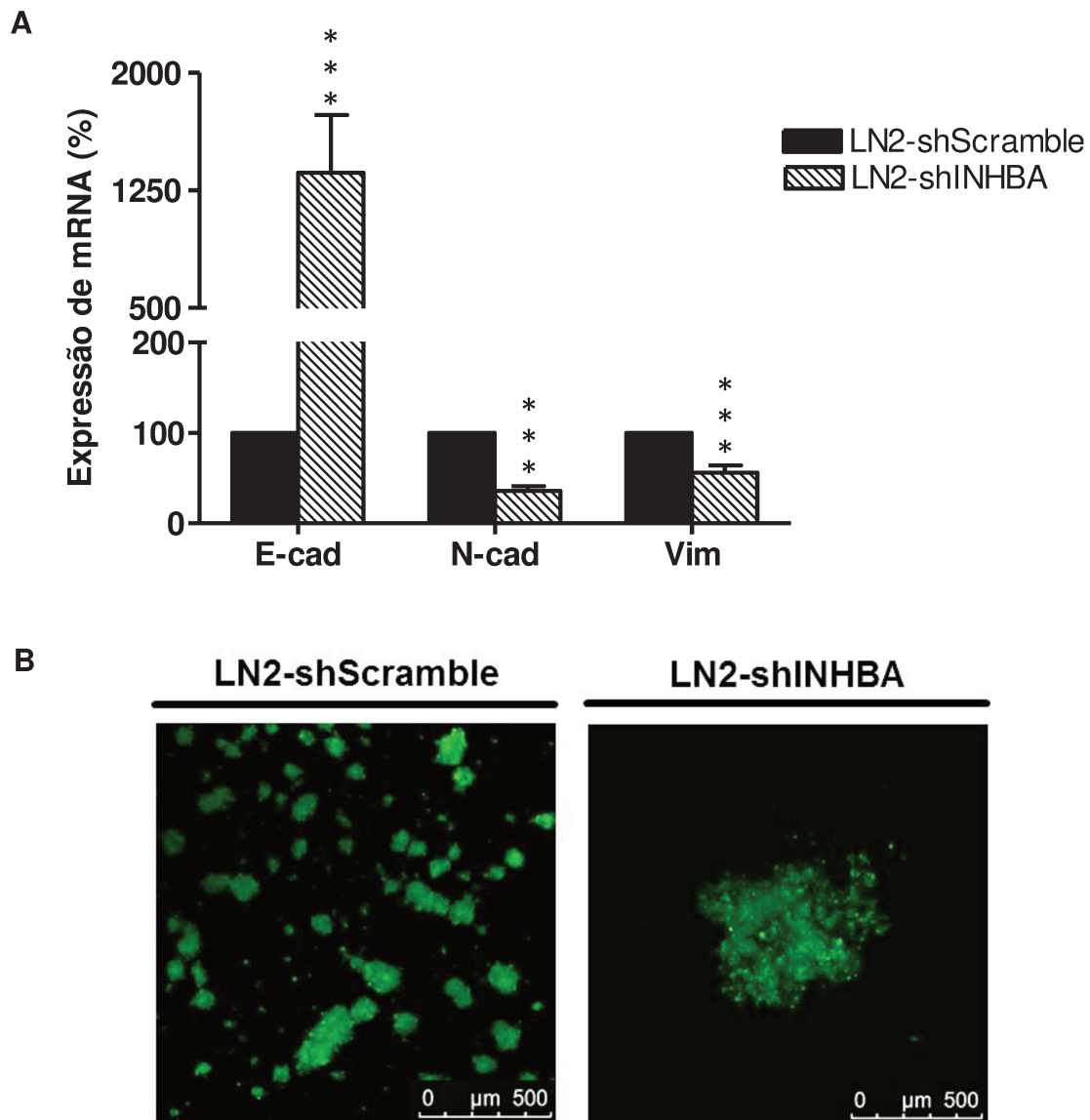


Figure 20. Silenciamento de ativina A nas células LN2 foi acompanhado por uma perda de marcadores de transição epitélio mesenquimal. A) Observa-se um aumento da expressão do marcador epitelial E-caderina e redução de marcadores mesenquimais na linhagem LN2-shINHBA em comparação a linhagem controle (LN2-shScramble). B) Ensaio da gota em suspensão mostrando formação de pequenos agregados celulares no controle e um único grande agregado nas células LN2-shINHBA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.7 Efeito de Ativina A na Adesão Celular a Proteínas da Matriz Extracelular

A influência de ativina A na adesão celular foram testadas em superfícies tratadas com colágeno tipo I, fibronectina e laminina. Superfícies não tratadas foram utilizadas como controle negativo de adesão e seus valores foram descontados daqueles obtidos pela adesão à superfície tratada. A adesão celular foi facilitada na presença dos 3 componentes da matriz extracelular e um aumento significativo da adesão foi induzida por ativina A recombinante em relação às células HaCAT não tratadas (Figura 21A). Ativina A promoveu um aumento da adesão ao colágeno tipo I maior que 100% em todas as concentrações ($p < 0,001$). A adesão a fibronectina foi aumentada em ~60% e ~40% nas concentrações de 10 e 100 ng/ml de ativina A recombinante, respectivamente. Similarmente, a adesão a laminina foi significativamente aumentada nas concentrações de 10 e 100 ng/ml (~40%, $p < 0,05$ e ~90%, $p < 0,001$; respectivamente). Efeito antagonista foi observado pela linhagem LN2 tratada com folistatina, que apresentou uma redução significativa da adesão aos componentes da matriz extracelular (Figura 21B). Foi observado uma redução significativa da adesão celular ao colágeno tipo I e fibronectina nas concentrações de 10 e 100 ng/ml, enquanto que uma redução da adesão a laminina foi observada somente na concentração de 10 ng/ml (redução de ~20%, $p < 0,05$). Contudo, o silenciamento estável de INHBA revelou um aumento significativo na adesão aos 3 componentes da matriz extracelular (Figura 21C). A adesão da linhagem LN2-shINHBA foi ~35% maior para o colágeno tipo I ($p < 0,001$), ~55% maior para fibronectina ($p < 0,001$) e ~20% maior para laminina ($p < 0,01$).

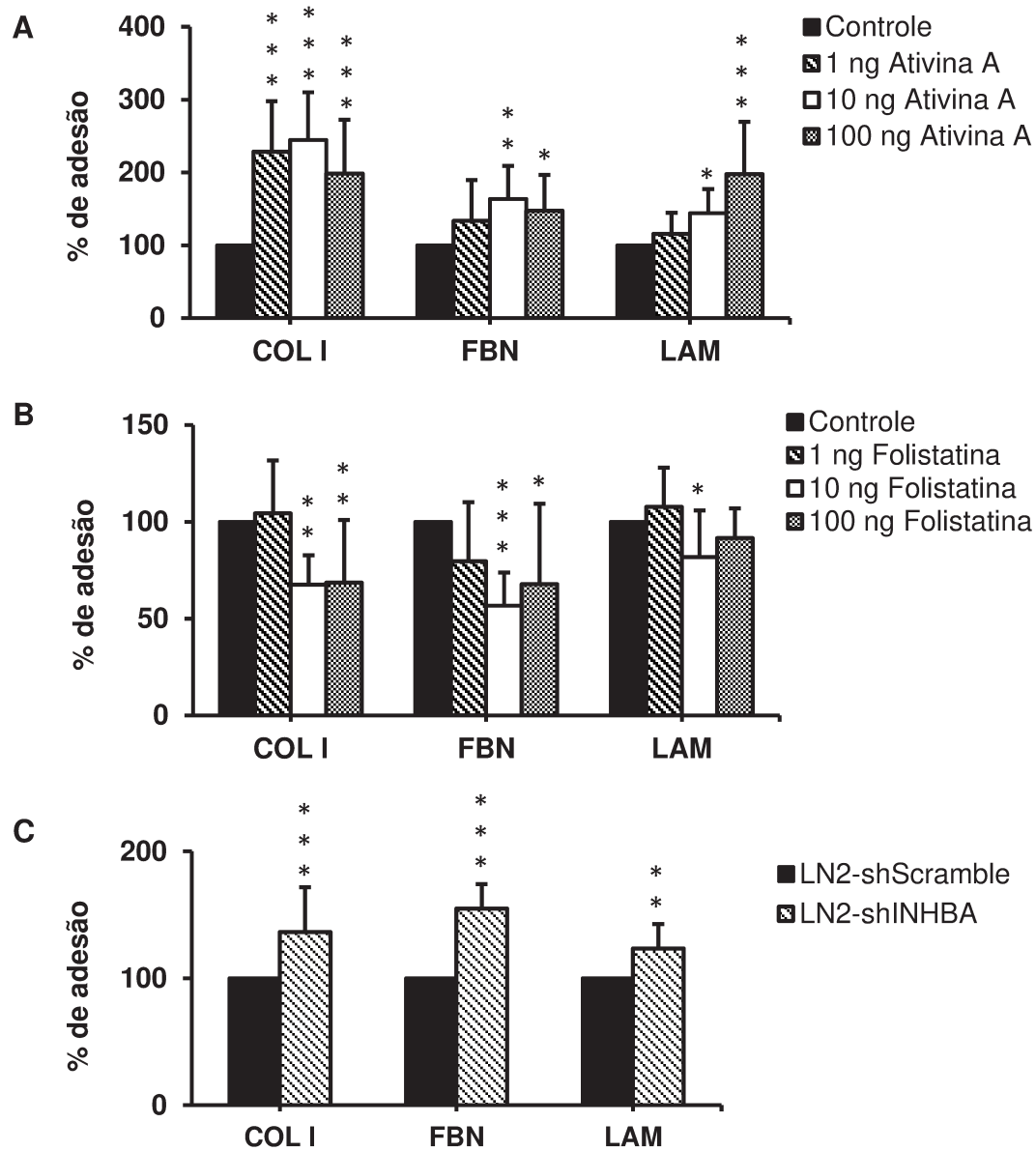


Figura 21. Ensaio de adesão celular aos componentes da matriz extracelular. A) Ativina A aumentou a adesão de células HaCAT ao colágeno tipo I (COL I), fibronectina (FBN) e laminina (LAM). B) Folistatina promoveu efeito antagonista nas linhagens LN2. C) Silenciamento do gene INHBA levou a um aumento significativo de adesão a todos os componentes da MEC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.8 Influência de Ativina A sobre a Motilidade e Invasão Celular

O potencial invasivo gerado pela ativina A foi determinado por meio do ensaio Transwell/Matrigel, enquanto que a avaliação do potencial migratório foi verificada usando o mesmo sistema sem a cobertura com Matrigel. Nestes ensaios a concentração intermediária de 10 ng/ml foi utilizada para gerar a influência quimiotática juntamente com 10% de FBS. Ativina A foi capaz de modular a capacidade invasiva e de migração das células HaCAT, aumentando em aproximadamente 120% a invasão e 40% a migração celular (Figura 22). Por outro lado, a linhagem LN2 demonstrou redução no potencial invasivo (~20% de redução; $p < 0,01$) e de migração (~10% de redução; $p < 0,01$) na presença de folistatina como agente quimiotático (Figura 22). Similarmente, as células LN2-shINHBA demonstraram redução significativa do potencial invasivo (~10% de redução; $p < 0,05$) e migratório (~25% de redução; $p < 0,001$) em relação às células LN2-shScramble (Figura 22).

Muitas células são capazes de mover-se sobre um substrato sólido por meio da extensão de uma camada fina de citoplasma, conhecida como lamelipódio, e prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, chamados de filopódios (estruturas temporárias formadas por filamento de actina). Existe uma íntima relação entre número de lamelipódios e filopódios a capacidade de mobilidade e invasão celular. Para confirmarmos que ativina A é capaz de induzir migração e invasão celular, o número de filopódios e lamelipódios nas linhagens celulares LN2-shScramble e LN2-shINHBA foi determinada (Figura 23A). As células LN2-shScramble apresentaram uma média de 35,8 filopódios por 20 células, enquanto que as LN2-shINHBA reduziram o número para 15,4 filopódios por 20 células (Figura 23B). Similarmente, as células LN2-shINHBA reduziram o número de lamelipódios de 9,7 para 5,0 em relação ao controle (Figura 23B). Estes resultados podem indicar uma redução da motilidade celular após silenciamento de ativina A.

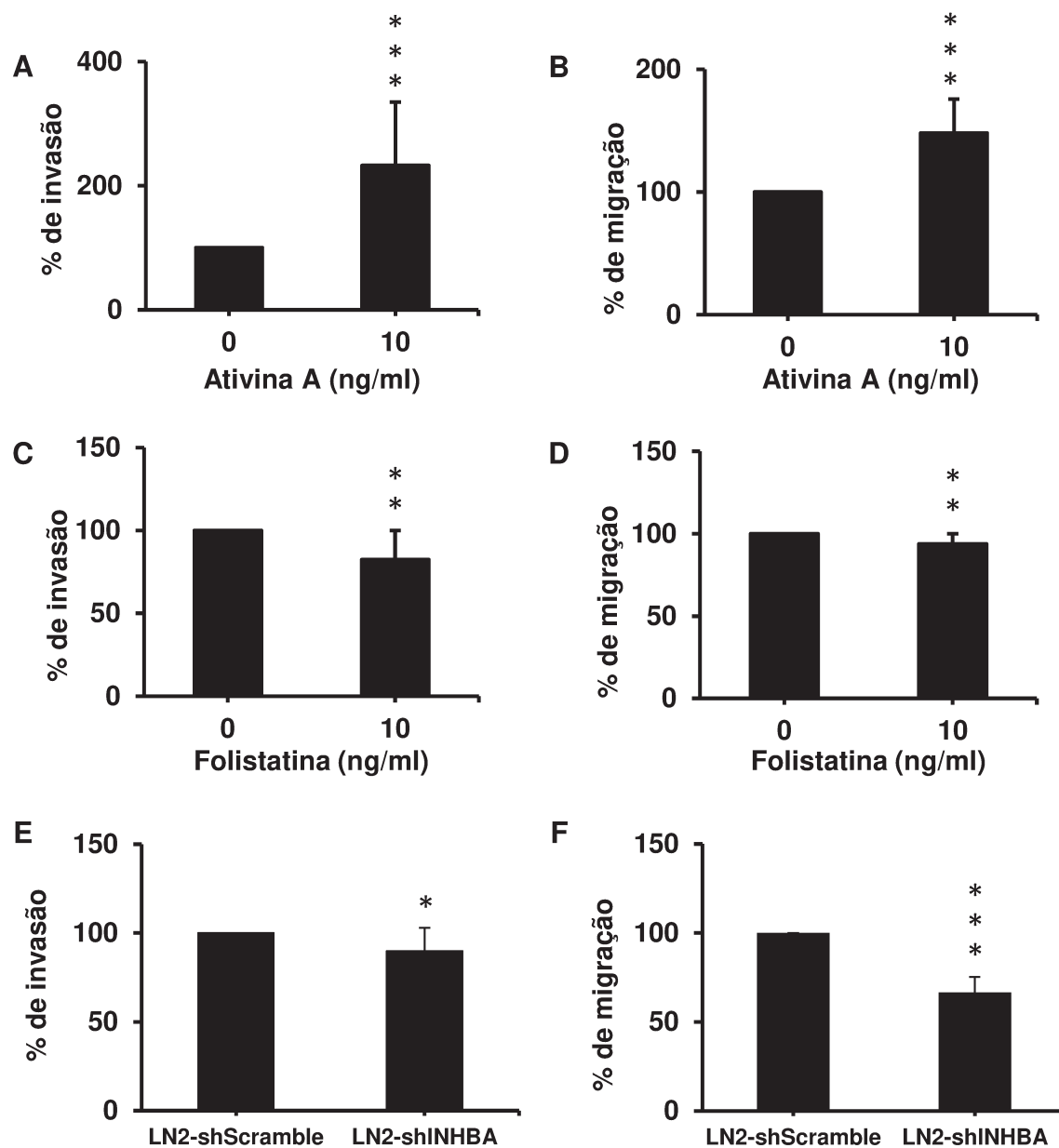


Figura 22. Ativina A foi capaz de induzir invasão e migração celular. Efeito de 10 ng/ml de ativina A na invasão (A) e migração (B) das células HaCAT. Em C é demonstrado o efeito de 10 ng/ml de folistatina sobre a invasão das células LN2, enquanto que D reporta o efeito de folistatina sobre a migração das células LN2. A linhagem LN2-shINHBA mostrou uma redução significativa na capacidade de invasão (E) e migração (F) em relação a linhagem controle LN2-shScramble.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

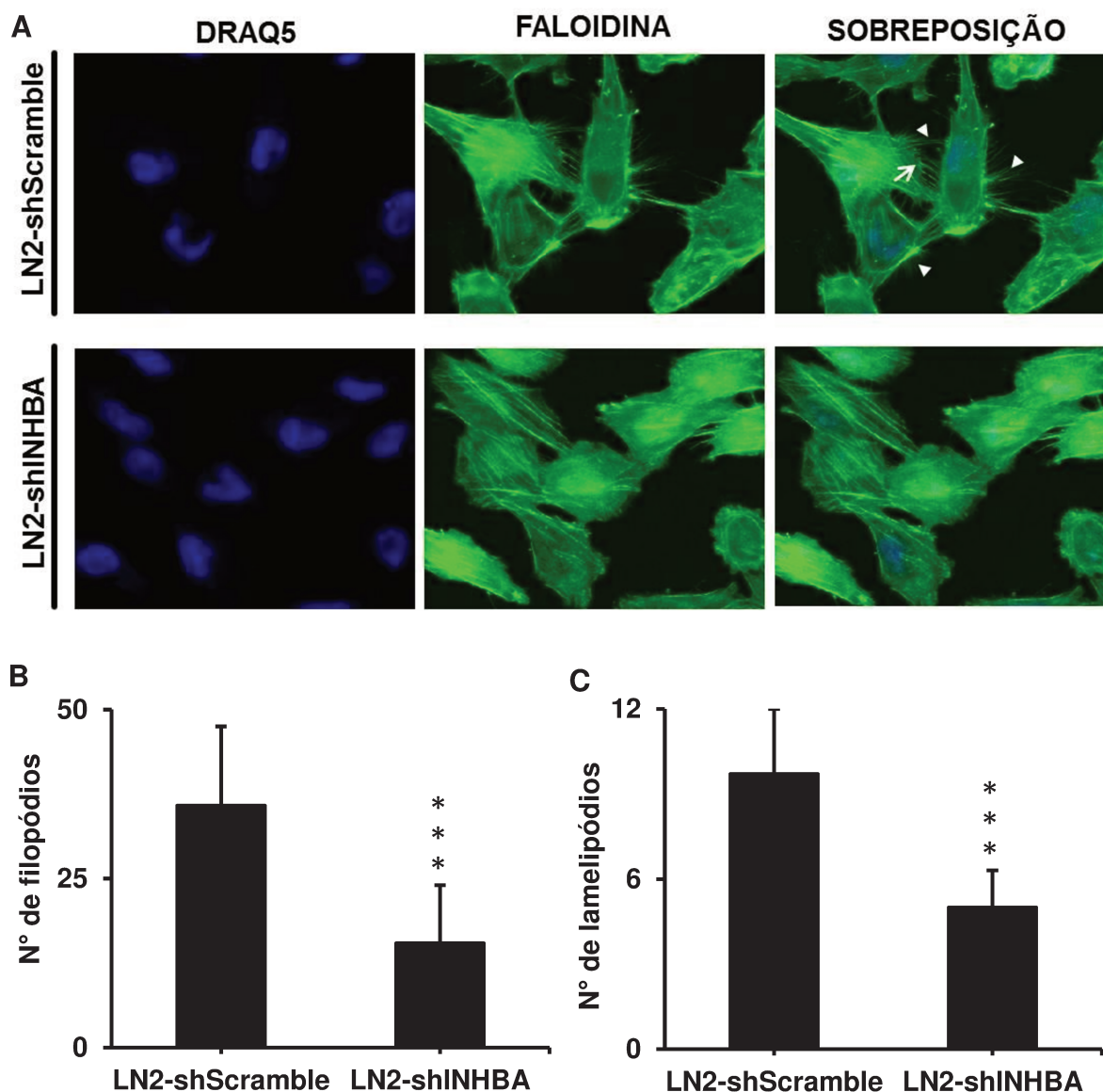


Figura 23. Avaliação da motilidade celular pela contagem de filopódios e lamelipódios. A) Imagem representativa da marcação pela faloidina conjugada com Alexa fluor 488 nas células LN2-shScramble e LN2-shINHBA. B) Contagem de filopódios (cabeça da seta) e lamelipódios (ponta da seta) revelou uma redução significativa nas células LN2-shINHBA em relação ao controle, confirmando a diminuição da motilidade celular. *** $p < 0,001$

6. DISCUSSÃO

O sistema de estadiamento TNM ainda é o principal marcador prognóstico para pacientes com CEC oral apesar de seu valor limitado, tendo em vista que muitos pacientes com o mesmo estadio da doença podem apresentar uma evolução clínica e um tempo de sobrevida distintos (Bitu *et al.*, 2012). Além disto, este sistema não permite a identificação das características biológicas das células tumorais e, portanto, não é capaz de individualizar o prognóstico (Oliveira & Ribeiro-Silva, 2011). Nos últimos anos progressos significativos foram obtidos na identificação e compreensão de biomarcadores prognósticos relacionados à grande maioria dos cânceres, incluindo os CECs orais. No entanto, nenhum biomarcador identificado, até o momento, em CECs orais é usado rotineiramente na prática clínica e a busca por novos marcadores ainda se faz necessária.

A superexpressão de ativina A foi descrita em vários tumores, mas o seu papel biológico nas células cancerosas e a contribuição para o desenvolvimento e progressão tumoral não foram elucidados. Os estudos que avaliam a expressão de ativina A no CEC oral são escassos e sugerem que esta proteína pode ser um marcador biológico promissor. Portanto, uma análise mais profunda e funcional de ativina A pode determinar se este fator é um potencial alvo diagnóstico ou terapêutico no CEC oral. Interessantemente, dependendo da origem do tumor, ativina A pode exercer tanto efeitos pró-tumorigênicos com anti-tumorigênicos. Assim, em tumores em que ativina A atua como inibidor do crescimento, as células tumorais provavelmente devem adquirir resistência para permitir a progressão tumoral. Ao passo que naqueles tumores em que ativina A atua na estimulação do crescimento, a sustentação da sua sinalização promove a tumorigênese (Risbridger *et al.*, 2001b). Por exemplo, ativina A exerce um efeito inibitório do crescimento em carcinomas de mama, fígado, próstata e pâncreas (Antsiferova & Werner, 2012). Contudo, ativina A é um fator mitogênico, favorecendo o crescimento e expansão tumoral, em tumores de testículo e ovário (Risbridger *et al.*, 2001b; Antsiferova *et al.*, 2011). Diante destes fatores, o presente estudo foi

desenvolvido para verificar o valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica de ativina A em amostras de CEC oral e avaliar os efeitos desta superexpressão na carcinogênese oral.

Shimizu e colaboradores (2007) foram os primeiros a demonstrarem níveis alterados de ativina A em CECs de cabeça e pescoço. Estes autores, por meio de CGH em linhagens celulares, demonstraram a amplificação de várias regiões cromossômicas, incluindo o locus 7p15-p13 que contém o gene que codifica as subunidades de ativina A. Este estudo demonstrou ainda que a expressão de ativina A é correlacionada com a presença de metástase regional e com uma menor sobrevida livre de doença. Por meio de reações imuno-histoquímicas, Chang e colaboradores (2010) demonstraram que ativina A é expressa principalmente no citoplasma das células tumorais, mas uma marcação nuclear foi evidente em algumas amostras. Curiosamente, além das células tumorais, células presentes no estroma tumoral apresentaram positividade para ativina A, incluindo células inflamatórias, endoteliais e mesenquimais com aspecto fusiforme (Chang *et al.*, 2010; Antsiferova *et al.*, 2011). As células mesenquimais fusiformes podem representar miofibroblastos (também chamados de fibroblastos associados ao carcinoma). Tal hipótese é amparada por um estudo prévio, o qual demonstrou que miofibroblastos presentes no estroma tumoral são capazes de regular a proliferação de células do CEC oral por meio da síntese de ativina A (Sobral *et al.*, 2011). Interessantemente, a imuno-marcação nuclear para ativina A foi relatada em células espermatogênicas durante as fases iniciais da espermatogênese de ratos (Bläuer *et al.*, 1999; Barakat *et al.*, 2008) e nas células epiteliais do tubo uterino humano (Bahathiq *et al.*, 2002). Este padrão distinto de marcação (citoplasmático e nuclear) sugere um pleomorfismo funcional para ativina A, que pode estar associado ao tipo celular ou a função específica da proteína.

Os resultados do presente estudo demonstraram que todas as amostras de CEC oral avaliadas (n=115) foram positivas para ativina A e a marcação citoplasmática foi a predominante. A expressão elevada de ativina A nas células

tumorais correlacionou significativamente com a presença de metástase regional (estadio N), tumores com um padrão histopatológico pobremente diferenciado e demonstrou ser um fator preditivo independente de um menor período de sobrevida livre de doença em 5 anos. Similarmente, Chang e colaboradores (2010) encontraram uma correlação significativa entre a expressão imuno-histoquímica de ativina A e as características clínico-patológicas, incluindo estadio N, padrão histopatológico e invasão perineural. Neste mesmo estudo, os pacientes com CECs orais cujos tumores superexpressavam ativina A demonstraram menor sobrevida global e livre de doença em análise univariada. Diferentemente dos resultados do presente estudo, a associação de ativina A com menor sobrevida global e livre de doença em 5 anos não resistiu à análise multivariada (Chang *et al.*, 2010). Adicionalmente, a superexpressão de ativina A também foi associada com cânceres de colo de útero em estágios avançados (estádio IV) (Wildi *et al.*, 2001) e com metástases linfonodais e prognóstico desfavorável de pacientes com carcinomas de células escamosas do esôfago (Yoshinaga *et al.*, 2003). Assim, os resultados deste estudo corroboram aos achados encontrados na literatura, os quais sugerem que ativina A é um potencial marcador de prognóstico independente em pacientes com CEC oral.

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que ativina A controla eventos biológicos importantes para a tumorigênese. No presente estudo, a participação de ativina A na morfologia, proliferação, morte celular, adesão, perda da identidade epitelial, migração e invasão foi verificada por meio de ensaios com ganho ou perda de função. O primeiro resultado *in vitro* deste estudo revelou a existência de um padrão distinto de expressão de entre a linhagem de queratinócito imortalizado, mas não transformado HaCAT e as linhagens oriundas de CECs orais (SCC-9, SCC-15, SCC-25 e LN2). Similar aos nossos resultados, diferenças no padrão de expressão de ativina A foram demonstradas por imuno-histoquímica em outras linhagens celulares tumorais, incluindo células de carcinoma cervical (HeLa), carcinoma hepatocelular (HepG2) e câncer de mama

(MCF-7, HS578T, MDA-MB436, MDA-MB231, MDA-MB453 e MDA-MB459) (Razanajaona *et al.*, 2007). Além disso, inúmeros estudos demonstraram que a expressão de ativina A no tecido sadio ou em linhagens celulares não tumorais é ausente ou reduzida (Yang *et al.*, 2007; Seder *et al.*, 2009a; Seder *et al.*, 2009b; Chang *et al.*, 2010). Esta diferença no padrão de expressão de ativina A é facilmente compreendida, tendo-se em vista que linhagens celulares tumorais provavelmente carregam alterações genéticas oriundas das lesões a partir das quais tiveram origem ou do próprio subcultivo no laboratório. Sendo assim, o acúmulo destas alterações provavelmente contribui para uma alterada expressão e para um descontrole nos mecanismos de regulação de ativina A. Interessantemente, a análise de western blot utilizando extratos celulares não foi capaz de detectar a proteína. Estudos anteriores relataram o mesmo insucesso (Razanajaona *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010). Esta ausência de marcação pode ser explicada pela conformação do dímero de ativina A, que quando no citoplasma celular ainda está covalentemente associado ao seu pró-domínio N-terminal, mascarando o sítio de ligação do anticorpo anti-ativina A. Por outro lado, as reações de ELISA funcionaram adequadamente quando usamos o sobrenadante contendo os fatores liberados no meio pelas células.

Simon e colaboradores (2009) observaram que o bloqueio da via de sinalização de ativina A induz significantes mudanças morfológicas em diferentes linhagens de células epiteliais de câncer de próstata. As células tornaram-se arredondadas com prolongamentos citoplasmáticos menores, tamanho aparentemente reduzido e de fácil destaque da placa (Simon *et al.*, 2009). Em nosso estudo, embora nenhuma alteração morfológica foi atribuída aos tratamentos com ativina A e folistatina recombinantes, o silenciamento estável de INHBA na linhagem LN2 revelou alterações morfológicas semelhantes às aquelas relatadas por Simon e colaboradores (2009). Isto indica que provavelmente a ausência de ativina A possa ser responsável por alterar o metabolismo celular ou o padrão de expressão de proteínas do citoesqueleto, alterando desta maneira a

estrutura celular. Tal mudança na morfologia celular pode sugerir uma alteração no padrão de interação destas células com moléculas do microambiente tumoral ou mesmo com outras células, interferindo na adesão e motilidade celular, como revelado neste estudo.

Durante a carcinogênese são evocados eventos biológicos normalmente ativos em processos fisiológicos. No entanto, diferentemente do que acontece nos processos fisiológicos, estes eventos não são autolimitados, resultando em um crescimento desordenado e eventual invasão dos tecidos adjacentes (Schäfer & Werner, 2008). Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à morte por apoptose ou morte por mecanismos não-apoptóticos são características marcantes da maioria dos tumores malignos (Okada & Mak, 2004). De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. É interessante notar que, dependendo do tipo celular, ativina A pode exercer um papel pró-apoptótico ou anti-apoptótico (Schwall *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Ishisaki *et al.*, 1998; Kanamaru *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Rosenberg *et al.*, 2010). Neste estudo, ativina A demonstrou bloquear a morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose. A exposição das células HaCAT à ativina A recombinante demonstrou uma redução significativa da morte celular por apoptose e necrose, sendo este efeito claramente controlado por folistatina e pelo silenciamento de ativina A na linhagem tumoral. Mais importante, o tratamento com ativina A foi capaz de proteger as células da morte celular induzida por estaurosporina, uma droga conhecida associada com a ativação das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose. Da mesma forma, Rosenberg e colaboradores (2010) demonstraram que ativina A na concentração de 100 ng/ml aumenta o número de osteoblastos em cultura por meio da redução da taxa de morte celular por apoptose e necrose sem afetar o índice de proliferação. No entanto, outros estudos têm demonstrado efeitos opostos aos encontrados neste

estudo, atribuindo um efeito anti-tumorigênico a ativina A (Schwall *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Kanamaru *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). Por exemplo, foi demonstrado que ativina A não apenas altera o equilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas (Bcl-Xs, Bad, Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2), mas também aumenta os níveis de expressão de caspase-3, PARP e pERK, resultando na apoptose de células de adenocarcinoma de pulmão (Wang *et al.*, 2009). Por outro lado, embora ativina A exerça um papel pró-apoptótico sobre hepatócitos, pacientes com hepatocarcinoma apresentam níveis elevados de ativina A circulante (Schwall *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994; Pirisi *et al.*, 2000; Yuen *et al.*, 2002). Esta divergência de resultados pode ser justificada pelo uso de metodologias distintas entre os estudos e pelo fato de ativina A apresentar efeitos biológicos variáveis nos diferentes tipos de tumores o que dificulta uma comparação entre os estudos.

É amplamente reconhecido que diferentes linhagens celulares necessitam de fatores de crescimento presentes no FBS para o crescimento *in vitro* e que fatores circulantes presentes no soro são fundamentais para o crescimento de células tumorais *in vivo*. Os resultados deste estudo demonstraram que ativina A recombinante associada a baixas concentrações de FBS não é capaz de aumentar o potencial proliferativo da linhagem não-tumorigênica HaCAT. Ao passo que a neutralização de ativina A, pela folistatina recombinante ou bloqueio estável com shINHBA, reduziu significativamente as taxas de proliferação celular. Estes achados indicam que ativina A é necessária, mas não suficiente para estimular a proliferação celular de células epiteliais. Igualmente, Simon e colaboradores (2009) demonstraram que ativina A isoladamente não é capaz de induzir a proliferação de células derivadas de adenocarcinoma de próstata; no entanto, o bloqueio da sinalização de ativina A é determinante para a redução da proliferação. Chang e colaboradores (2010) demonstraram que a capacidade de proliferação das linhagens tumorais orais OC-3 e SCC-4, após o silenciamento de ativina A por RNAi, foi significativamente reduzida. Efeito semelhante foi observado

em células de adenocarcinoma de pulmão (Seder *et al.*, 2009a; Seder *et al.*, 2009b). Além disto, foi demonstrado que RNAi contra proteínas a jusante da via de sinalização de ativina A, como Smad3, produzem uma redução da proliferação celular (Kang *et al.*, 2009). Portanto, é provável que os efeitos de ativina A sobre a proliferação celular ocorram via Smads, as quais são responsáveis pelo controle da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular. Contudo, outros estudos apontam ativina A como um supressor de tumor que pode inibir a proliferação celular em diversos tumores, incluindo aqueles derivados do fígado, pâncreas, mama e próstata (Schwall *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994; Takabe *et al.*, 1999; Cocolakis *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004). No estudo de Cocolakis e colaboradores (2001), por exemplo, ativina A induziu a inibição da proliferação em linhagens celulares de câncer de mama pela ativação da via p38 MAPK. Neste contexto, está bem reconhecido que membros da família TGF- β funcionam como supressores tumorais nos estágios iniciais da tumorigênese. No entanto, muitas células tumorais parecem escapar deste efeito inibitório por meio da aquisição de mutações nos genes de componentes da cascata de sinalização do TGF- β , incluindo seus receptores e Smads (Massagué, 1998). Provavelmente algumas células tumorais também desenvolvem mecanismos semelhantes para anular o efeito antiproliferativo de ativina A.

A progressão pelas fases do ciclo celular é resultado de uma sequência de ativações e inibições de cdk's, as quais são controladas pelos níveis e disponibilidade de ciclinas e cdk's (Carnero, 2002; Malumbres & Barbacid, 2001; Fecher *et al.*, 2009). Caso haja alguma alteração nesses parâmetros, as células podem interromper a proliferação e/ou entrar em morte por apoptose. Dois complexos principais são formados com a finalidade de dar início ao processo de progressão da fase G1 do ciclo celular e são constituído por ciclina D/cdk4/cdk6 e ciclina E/cdk2. Neste momento, p16^{Ink4a}, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1} são fatores que inibem a progressão do ciclo celular, pois formam complexos com cdk's (Li *et al.*, 2006; Masamha, 2009; van Riggelen & Felsner, 2010). No presente estudo

demonstramos que o silenciamento de ativina A na linhagem LN2 promoveu um aumento na expressão de p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} e p16^{Ink4a}, resultando no acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular. Concomitantemente, um discreto aumento de ciclina D pode ser notado, indicando que ainda existe uma estimulação da proliferação que parece estar sendo controlada pelos níveis aumentados de ckis. Estes resultados indicam que após o silenciamento estável de ativina A houve um controle da proliferação do ciclo celular pelo aumento de proteínas ckis.

A perda do contato célula-célula, reorganização do citoesqueleto de actina e expressão de várias proteases de degradação da membrana basal e tecido conjuntivo intersticial são eventos biológicos que ocorrem em queratinócitos durante a embriogênese e outros processos fisiológicos (Antsiferova & Werner, 2012). Estes eventos são coordenados pela reativação do processo de TEM que também é frequentemente visto em estágios avançados da carcinogênese. No entanto, durante eventos fisiológicos o processo de TEM é parcial e reversível, mostrando apenas uma perda parcial da identidade epitelial dos queratinócitos envolvidos (Schäfer & Werner, 2008). Em contraste, as células tumorais que sofrem TEM frequentemente adquirem uma morfologia fusiforme (fibroblastos-like), mostrando grande perda do contato célula-célula e um aumentando da expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina (Thiery *et al.*, 2009; Kalluri & Weinberg, 2009). Além disto, MMPs e outras enzimas proteolíticas produzidas por células epiteliais e do estroma são envolvidas na degradação da MEC, aumentando a motilidade celular e invasão no câncer (Thompson *et al.*, 2005a; Kalluri & Weinberg, 2009; Polyak & Weinberg, 2009; Lim & Thiery, 2012). Baseado nestas evidências, os resultados do presente estudo revelaram que o fator de crescimento ativina A é capaz de promover TEM, alterando a adesão célula-célula e adesão aos componentes da MEC, induzindo motilidade celular e consequentemente migração e invasão. A exposição da linhagem HaCAT à proteína recombinante ativina A foi responsável pela perda da identidade epitelial

desta linhagem celular, caracterizada pela alteração do padrão de expressão de alguns marcadores da TEM. Os níveis aumentados de ativina A foram relacionados com a redução da expressão de E-caderina e o aumento de N-caderina, processo conhecido como *switch* das caderinas, além de induzir o aumento da expressão do marcador mesenquimal vimentina. Interessantemente, a linhagem tumoral LN2 tratada com folistatina recombinante ou expressando níveis reduzidos de ativina A mostrou ser capaz de recuperar sua identidade epitelial. Tal reversão do fenótipo maligno da linhagem LN2 foi certificada pelo aumento da expressão do marcador epitelial E-caderina e concomitante redução da expressão de N-caderina e vimentina. Diante destas observações e das mudanças morfológicas observadas em cultura, foi demonstrado que a linhagem LN2 aumentou sua adesão célula-célula após o silenciamento estável de ativina A. Por tanto, podemos sugerir que o bloqueio de ativina A facilita a adesão entre as células, dificultando a migração e invasão das células tumorais como foi constatado neste estudo. Estudo anterior realizado por Yoshinaga e colaboradores (2004) demonstrou que as expressões de N-caderina e ativina A em tecidos de carcinoma esofágico são significativamente correlacionadas, sugerindo que ativina A pode mediar a expressão de N-caderina neste tecido. Por outro lado, a expressão de E-caderina foi fracamente correlacionada com a expressão de ativina A (Yoshinaga *et al.*, 2004). De fato, existem vários estudos que apontam a expressão de N-caderina como um fator independente e associado às características invasivas de células tumorais *in vitro*. No carcinoma de mama, por exemplo, níveis elevados de N-caderina promovem a migração de células de carcinoma, independentemente da presença ou ausência de E-caderina (Nieman *et al.*, 1999). Similarmente, o *switch* das caderinas e a promoção de migração celular pelo aumento da expressão de N-caderina foi relatado em melanomas e adenocarcinomas de mama e próstata (Tran *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Os resultados deste estudo mostraram ainda que o tratamento com ativina A foi capaz de facilitar a adesão celular ao colágeno tipo I, fibronectina e laminina. Este efeito pode explicar a redução nas taxas de apoptose observadas

no tratamento com ativina A recombinante nas células HaCAT. Adicionalmente, o estudo de Munz e colaboradores (1999) mostrou que ativina A é capaz de estimular a produção de proteínas da MEC, tais como fibronectina e colágeno do tipo I. Contudo, nós encontramos que o tratamento com folistatina recombinante tem um efeito oposto ao da ativina A, ao passo que o silenciamento estável igualmente induziu um aumento da adesão as componentes da MEC. Estes resultados contraditórios refletem um efeito inespecífico de ativina A sobre o controle da adesão aos componentes da MEC, dificultando uma conclusão concreta acerca deste fenótipo.

Uma característica importante revelada neste estudo é que ativina A é capaz de afetar a motilidade celular e induzir migração e invasão de queratinócitos normais. Estes achados *in vitro* são concordantes com os resultados observados na análise imuno-histoquímica para ativina A, que mostrou correlação significativa com estadio N. Além disto, os resultados demonstraram que a motilidade e invasão celular induzidas por ativina A foram reguladas pelo antagonista endógeno folistatina e pelo silenciamento estável na linhagem LN2. Um estudo recente realizado por Chang e colaboradores (2010) revelou resultados similares aos encontrados neste estudo, onde a migração e invasão das linhagens tumorais OC-3 e SCC-4 foram significativamente atenuadas pela transfecção de siLNHBA. Adicionalmente, ativina A induz a expressão de MMP-7, a qual é relatada como indutora de invasão celular no câncer esofágico (Yoshinaga *et al.*, 2004 Yoshinaga *et al.*, 2008b). O efeito regulador de folistatina sobre ativina A foi demonstrado pela redução de metástase em modelo de rato portador de câncer de pulmão tratado com folistatina recombinante (Ogino *et al.*, 2008). Curiosamente, a superexpressão de folistatina tem sido relatada em melanomas, hepatocarcinomas e CECs orais, mas a correlação entre os níveis de expressão de folistatina e a função de ativina A ainda não foi detalhadamente analisada (Rossmann *et al.*, 2002; Stove *et al.*, 2004; Grusch *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010). Contudo, foi demonstrado que um antagonismo diferencial de ativina A pode ocorrer por meio

da sua ligação com uma folistatina tipo selvagem ou mutante (Schneyer *et al.*, 2008). Esta descoberta pode ajudar a explicar por que a superexpressão de folistatina também foi associada com os estágios avançados dos carcinomas. Neste contexto, os dados da TEM e adesão célula-célula e a MEC suportam a regulação de MMPs e outros fatores controladores da migração e invasão, sugerindo um papel importante para a ativina A na progressão tumoral. No entanto, o verdadeiro mecanismo envolvido na superexpressão de ativina A ainda não foi completamente esclarecido e necessita de investigações mais profundas.

Vale a pena destacar que o presente estudo apresenta limitações. Uma delas é a não confirmação do estado de fosforilação de Smad2/3 após o tratamento com folistatina. Assumindo que o efeito de folistatina é associado com a inibição da via de sinalização da ativina A, é esperado uma redução nos níveis de fosforilação de Smad2/3 após o tratamento com folistatina e também nas células estavelmente silenciadas com as moléculas de shRNA. Outra deficiência deste estudo é a ausência de estudos *in vivo* que comprovem os achados *in vitro*, fortalecendo o papel de ativina A na tumorigênese oral.

Em conjunto, os resultados apresentados neste estudo demonstram que ativina A é capaz de orquestrar importantes eventos biológicos da tumorigênese dos CECs orais. Portanto, o melhor entendimento da participação de ativina A neste tumor pode ser de grande relevância na identificação de um possível alvo terapêutica ou indicador prognóstico.

7. CONCLUSÃO

7.1 A expressão imuno-histoquímica de ativina A foi correlacionada com estadio N, diferenciação histopatológica do tumor e menor sobrevida livre de doença dos pacientes com CEC oral.

7.2 Ativina A reduz a morte celular por apoptose e necrose e ameniza o efeito de estaurosporina na indução da morte celular por apoptose.

7.3 O bloqueio da expressão de ativina A resultou em uma redução da proliferação das células tumorais LN2, o qual foi associado com uma expressão aumentada dos inibidores de quinase (p21^{Kip1}, p27^{WAP/Cip1} e p16^{InK4a}) da fase G0/G1 do ciclo celular.

7.4 Ativina A é capaz de modular a adesão celular a moléculas da MEC e a expressão de marcadores da TEM, favorecendo a migração e invasão celular.

7.5 A relação entre a elevada expressão de ativina A em amostras de CEC e o pior prognóstico, associada aos achados *in vitro* deste estudo, sugerem que ativina A pode ser um potencial marcador tumoral.

REFERÊNCIAS

- Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Kosaka M, Matsumoto T. Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(2):347-52.
- Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L, *et al.* Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2012 Jan 20;12:32.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scan J Dent Res.* 1987; 95(3) 229-49.
- Antsiferova M, Huber M, Meyer M, Piwko-Czuchra A, Ramadan T, MacLeod AS, *et al.* Activin enhances skin tumorigenesis and malignant progression by inducing a pro-tumorigenic immune cell response. *Nat Commun.* 2011 Dec 6;2:576.
- Antsiferova M, Werner S. The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *J Cell Sci.* 2012; 1;125(Pt 17):3929-37.
- Asashima M, Ariizumi T, Malacinski GM. In vitro control of organogenesis and body patterning by activin during early amphibian development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2000;126(2):169-78.
- Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell.* 1993; 19;75(4):671-80.
- Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell.* 1992; 10;68(1):97-108.

- Bahathiq AO, Stewart RL, Wells M, Moore HD, Pacey AA, Ledger WL. Production of activins by the human endosalpinx. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5283-9.
- Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction.* 2008; 136(3):345-59.
- Bartholin L, Maguer-Satta V, Hayette S, Martel S, Gadoux M, Corbo L, *et al.* Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function. *Oncogene.* 2002; 28;21(14):2227-35.
- Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, *et al.* Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 2005; 23: 489-495
- Bianco C, Strizzi L, Normanno N, Khan N, Salomon DS. Cripto-1: an oncofetal gene with many faces. *Curr Top Dev Biol* 2005; 67: 85-133
- Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP *et al.* HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer.* 2012; 12: 146.
- Bläuer M, Husgafvel S, Syväälä H, Tuohimaa P, Ylikomi T. Identification of a nuclear localization signal in activin/inhibin betaA subunit; intranuclear betaA in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod.* 1999;60(3):588-93.
- Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol.* 2008 Jul;9(7):667-75.
- Bondestam J, Huotari MA, Morén A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, Kallio J, *et al.* cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C). *Cytogenet Cell Genet.* 2001; 95(3-4): 157-62.

- Böttinger EP, Factor VM, Tsang ML, Weatherbee JA, Kopp JB, Qian SW, *et al.* The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 11; 93(12): 5877-82.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988; 106(3): 761-71.
- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(2): 167-78.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, *et al.* Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol.* 2006; 1; 298(1): 132-48.
- Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *J Oncol.* 2012; 2012: 649498.
- Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract.* 2005; 6(4): 1-16.
- Burdette JE, Jeruss JS, Kurley SJ, Lee EJ, Woodruff TK. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 1; 65(17): 7968-75.
- Busick TL, Uchida T, Wagner FR Jr. Preventing ultraviolet light lip injury: beachgoer awareness about lip cancer risk factors and lip protection behavior. *Dermato Surg.* 2005; 31(2): 173-6.
- Butler C, Gold E, Risbridger G. Should activin β C be more than a fading snapshot in the activin/TGF β family album? *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2005; 16(4–5): 377–85.

- Carnelio S, Rodrigues GS, Shenoy R, Fernandes D. A brief review of common oral premalignant lesions with emphasis on their management and cancer prevention. *Indian J Surg.* 2011; 73(4): 256-61.
- Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2002; 87(2): 129-33.
- Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, *et al.* Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(7): 1945-56.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006; 231(5): 534-44.
- Cho SH, Yao Z, Wang SW, Alban RF, Barbers RG, French SW, *et al.* Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2003; 15; 170(8): 4045-52.
- Cocolakis E, Lemay S, Ali S, Lebrun JJ. The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. *J Biol Chem.* 2001; 276(21): 18430-6.
- Cotran, Kumar, Robbins. *Patologia-Bases patológicas das doenças.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP, Colleta RD. Carcinoma espinocelular bucal e suas variantes. *BCI.* 2001; 32 (8):313-319.
- Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP, Colleta RD. Carcinoma espinocelular bucal e suas variantes. *BCI.* 2001; 32 (8):313-319.
- Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010; 57(2): 304-16.

- Daley T, Darling M: Nonsquamous cell malignant tumours of the oral cavity: and overview. J Can Dent Assoc 2003; 69: 577 – 582.
- Dani C. Activins in adipogenesis and obesity. Int J Obes (Lond). 2013; 37(2): 163-6.
- Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. Breast Cancer Res 2012; 14:202.
- Deli A, Kreidl E, Santifaller S, Trotter B, Seir K, Berger W, *et al.* Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2008; 14(11): 1699-709.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. Cell. 1998; 95(6): 737-40.
- Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, *et al.* Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. Gastroenterology. 2005; 128(2): 411-23.
- Donaldson CJ, Mathews LS, Vale WW. Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1992; 184(1): 310-6.
- Dowling C, Risbridger G. The role of inhibins and activins in prostate cancer pathogenesis. Endocrine-Related Cancer 2000; 7(4): 243.
- Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. Rom J Morphol Embryol. 2012; 53(1): 89-93.
- Ebert S, Zeretzke M, Nau R, Michel U. Microglial cells and peritoneal macrophages release activin A upon stimulation with Toll-like receptor agonists. Neurosci Lett. 2007; 413(3): 241-4.
- Epstein JB, Zhang L, Rosin M: Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. J Can Dent Assoc 2002; 68: 617 – 621.

- Erämaa M, Hurme M, Stenman UH, Ritvos O. Activin A/erythroid differentiation factor is induced during human monocyte activation. *J Exp Med*. 1992; 176(5): 1449-52.
- Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, *et al*. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(4): e473-7.
- Fang J, Yin W, Smiley E, Wang SQ, Bonadio J. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 228(3): 669-74.
- Fecher LA, Amaravadi RK, Schuchter LM, Flaherty KT. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23(3): 599-618.
- Feller L, Bouckaert M, Chikte UM, Wood NH, Khammissa RA, Meyerov R *et al*. A short account of cancer--specifically in relation to squamous cell carcinoma. *SADJ*. 2010; 65(7): 322-4.
- Florio P, Luisi S, Marchetti P, Lupi R, Cobellis L, Falaschi C, *et al*. Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. *J Endocrinol Invest*. 2000; 23(4): 231-4.
- Franzén P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, *et al*. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell*. 1993; 75(4): 681-92.
- Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. Role of activin A in murine mast cells: modulation of cell growth, differentiation, and migration. *J Leukoc Biol*. 2003; 73(6): 793-801.
- Funaba M, Murata T, Fujimura H, Murata E, Abe M, Takahashi M, *et al*. Unique recognition of activin and inhibin by polyclonal antibodies to inhibin subunits. *J Biochem* 1996; 119: 953–960.

- Furukawa M, Nobusawa R, Shibata H, Eto Y, Kojima I. Initiation of insulin secretion in glucose-free medium by activin A. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 113(1): 83-7.
- Ge G, Hopkins DR, Ho WB, Greenspan DS. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(14): 5846-58.
- Gogilashvili K, Shonia N, Burkadze G. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma (review). *Georgian Med News.* 2012; (213): 32-6.
- Gold E, Jetly N, O'Bryan MK, Meachem S, Srinivasan D, Behuria S, *et al.* Activin C antagonizes activin A in vitro and overexpression leads to pathologies in vivo. *American Journal of Pathology* 2009; 174(1): 184–95.
- Gold E, Risbridger G. Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 359(1-2): 107-12.
- Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2002; 61(1): 51-60.
- Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science.* 1990; 247(4948): 1328-30.
- Gray PC, Harrison CA, Vale W. Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5193-5198.
- Gray PC, Shani G, Aung K, Kelber J, Vale W. Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGFbeta signaling. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 9268-9278.

- Gribi R, Tanaka T, Harper-Summers R, Yu J. Expression of activin A in inflammatory arthropathies. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001; 180:163–7.
- Grusch M, Drucker C, Peter-Vörösmarty B, Erlach N, Lackner A, Losert A, *et al.* Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2006; 45(5):673-80.
- Hagen M, Fagan K, Steudel W, Carr M, Lane K, Rodman DM, *et al.* Interaction of interleukin-6 and the BMP pathway in pulmonary smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292(6):L1473-9.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100. 2000; 57–70.
- Hardy CL, Lemasurier JS, Olsson F, Dang T, Yao J, Yang M, *et al.* IL-13 regulates secretion of the tumor growth factor- β superfamily cytokine activin A in allergic airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2010; 42:667–75.
- Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands. *Growth Factors.* 2011; 29(5):174-86.
- Harrison CA, Gray PC, Vale WW, Robertson DM. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16(2):73-8.
- Hashimoto O, Yamato K, Koseki T, Ohguchi M, Ishisaki A, Shoji H, *et al.* The role of activin type I receptors in activin A-induced growth arrest and apoptosis in mouse B-cell hybridoma cells. *Cell Signal.* 1998; 10(10):743-9.
- Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y., Sugino, H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. *Endocytotic degradation of activin and its*

acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 13835–13842.

- Hayette S, Gadoux M, Martel S, Bertrand S, Tigaud I, Magaud JP, *et al.* FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene.* 1998; 16(22):2949-54.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Larry N, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; 148:779–90.
- Hermesen MAJA, Xie Y, Rooimans MA, Meijer JA, Baak JPA, Plukker JTM. Cytogenetic characteristics of oral squamous cell carcinomas in Fanconi anemia. *Fam Cancer.* 2001; 1(1):39-43.
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem.* 2002; 277(43):40735-41.
- Hirota SK, Braga FP, Penha SS, Sugaya NN, Migliari DA. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13(4):E227-31.
- Ho J, de Guise C, Kim C, Lemay S, Wang XF, Lebrun JJ. Activin induces hepatocyte cell growth arrest through induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B and Sp1. *Cell Signal.* 2004; 16(6):693-701.
- Hodge KM, Flynn MB, Drury T. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in nonusers of tobacco. *Cancer* 1985; 55: 1232 –1235.
- Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Sipos M, Horká E, Pavlíková G *et al.* Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39(6): 561-7.

- Hötten G, Neidhardt H, Schneider C, Pohl J. Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206(2):608-13.
- Hübner G, Brauchle M, Gregor M, Werner S. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? *Lab Invest.* 1997; 77(4):311-8.
- Hübner G, Hu Q, Smola H, Werner S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Biol.* 1996; 173(2):490-8.
- Hully JR, Chang L, Schwall RH, Widmer HR, Terrell TG, Gillett NA. Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* 1994; 20: 854-862
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, *et al.* Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997; 389: 622-626.
- INCA, Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil-Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. 2012-<http://www.inca.org.br>.
- Ishisaki A, Yamato K, Nakao A, Nonaka K, Ohguchi M, ten Dijke P, *et al.* Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(38):24293-6.
- James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development.* 2005; 132(6):1273-82.
- Johnson N: Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001; 65: 328 –339.
- Jones KL, de Kretser DM, Patella S, Phillips DJ. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225: 119-125.

- Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22(10):459-62.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420–8.
- Kanamaru C, Yasuda H, Fujita T. Involvement of Smad proteins in TGF-beta and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells. *Hepatol Res.* 2002; 23(3):211-219.
- Kang HY, Huang HY, Hsieh CY, Li CF, Shyr CR, Tsai MY, *et al.* Activin A enhances prostate cancer cell migration through activation of androgen receptor and is overexpressed in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res.* 2009; 24:1180–93.
- Karagiannidis C, Hense G, Martin C, Epstein M, Rückert B, Mantel PY, *et al.* Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(1):111-8.
- Katik I, Mackenzie-Kludas C, Nicholls C, Jiang FX, Zhou S, Li H, *et al.* Activin inhibits telomerase activity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 389(4):668-72.
- Kleeff J, Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, Korc M. Concomitant over-expression of activin/inhibin beta subunits and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1998; 77:860–8.
- Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 529-541
- Krummen, LA, Woodruff, TK, DeGuzman, G, Cox, ET, Baly, DL, Mann, E, Garg, S, Wong, W-L, Cossum, P, Mather, JP. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 1993; 132: 431–443.

- Kubiczekova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 2012; 10:183.
- Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C, *et al*. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1992; 28B(2):113-20.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*. 1996; 383(6603):832-6.
- Lee MJ, Yang CW, Jin DC, Chang YS, Bang BK, Kim YS. Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway. *J Immunol*. 2003; 170(5):2557-63.
- Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(16):9306-11.
- Leto G. Activin A and bone metastasis. *J Cell Physiol*. 2010; 225(2):302-9.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, *et al*. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 2000; 404(6776):411-4.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; 61:3819–25.
- Li S, Shimono C, Norioka N, Nakano I, Okubo T, Yagi Y, *et al*. Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate binding activity. *J Biol Chem*. 2010; 285(47):36645-55.
- Li W, Sanki RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW *et al*. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*. 2006; 38(4): 287-301.
- Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*. 2012; 139(19):3471-86.

- Ling N, Ying SY, Ueno N, Esch F, Denoroy L, Guillemin R. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(21):7217-21.
- Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33:525–32.
- Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, *et al*. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol*. 2000; 36(4):387-9.
- Maeshima K, Maeshima A, Hayashi Y, Kishi S, Kojima I. Crucial role of activin in tubulogenesis of endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 2004; 145(8):3739-45.
- Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, French M, Martel S, Magaud JP, *et al*. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp Cell Res* 2003; 282:110-120.
- Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, Gadoux M, Bertrand S, Martel S, *et al*. Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected]. *Exp Hematol*. 2001; 29(3):301-8.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3): 222-31.
- Martins da Silva SJ, Bayne RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS, Anderson RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol*. 2004; 266(2):334-45.
- Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 Degradation Is Sufficient to Induce G1 Cell Cycle Arrest despite Constitutive Expression of Cyclin E2 in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res*. 2009; 69(16): 6565-72.

- Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol*. 1996; 10(9):1055-65.
- Mason AJ, Niall HD, Seeburg PH. Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 135(3):957-64.
- Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67:753-91.
- Massagué J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem*. 1990; 265(35):21393-6.
- Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*. 1991; 65(6):973-82.
- Mathews LS, Vale WW. Molecular and functional characterization of activin receptors. *Receptor*. 1993; 3(3):173-81.
- Matzuk MM, Kumar TR, Shou W, Coerver KA, Lau AL, Behringer RR, *et al*. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Prog Horm Res*. 1996; 51:123-54
- Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, *et al*. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 1995; 374: 354-356
- McDowell N, Gurdon JB. Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 311-317
- Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol*. 2002; 80(5):605-22.
- Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns*. 2002; 2(3-4):359-67.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, *et al*. Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 129(2):396-403.

- Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, Lein I, *et al.* Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J* 1999; 18: 5205-5215.
- Murakami M, Suzuki M, Nishino Y, Funaba M. Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF-beta and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(3):1279-86.
- Mylonas I. Inhibin- β A subunit immunolabeling as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinomas: a matter of evaluation? *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 284(2):467-76.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.* 1990; 247(4944):836-8.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997; 389: 631-635.
- Neville BW, Dam, DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999; 147:631-43.
- Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, Ueno N. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 210(2):581-8.
- Ogawa K, Funaba M, Chen Y, Tsujimoto M. Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. *J Immunol.* 2006; 177(10):6787-94.
- Ogawa K, Funaba M, Tsujimoto M. A dual role of activin A in regulating immunoglobulin production of B cells. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(6):1451-8.

- Ogino H, Yano S, Kakiuchi S, Muguruma H, Ikuta K, Hanibuchi M, *et al.* Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(3):660-7.
- Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, Yasuda H, Tamada K, Ueda N, *et al.* Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut* 2003; 52:1487–93.
- Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(8):592-603.
- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40(3):298-307.
- Pangas SA, Woodruff TK. Activin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(8):309-14.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2): 74-108.
- Patella S, Phillips DJ, de Kretser DM, Evans LW, Groome NP, Sievert W. Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 576-583
- Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006; 290:G137–44.
- Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S *et al.* Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14(11):1677-81.
- Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 340-50.

- Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 1998; 19(4):287-322.
- Pirisi M, Fabris C, Luisi S, Santuz M, Toniutto P, Vitulli D, *et al.* Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 150-155
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265–73.
- Pontes HA, Paiva HB, de Freitas Silva BS, Fonseca FP, da Silva FB, Pontes FS *et al.* Oral candidiasis mimicking an oral squamous cell carcinoma: report of a case. *Gerodontology.* 2012; 29(1): 70-4.
- Pöschl & Seitz. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004; 39(3):155-65.
- Poulaki V, Mitsiades N, Kruse FE, Radetzky S, Iliaki E, Kirchhof B, *et al.* Activin a in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol.* 2004; 164(4):1293-302.
- Razanajaona D, Joguet S, Ay AS, Treilleux I, Goddard-Léon S, Bartholin L, *et al.* Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* 2007; 67(15):7223-9.
- Regezi JA, Sciubba JJ. *Oral Pathology-Clinical Pathologic Correlations.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 47(2):95-8.
- Rich AM, Radden BG: Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. *J Oral Pathol* 1984; 13: 459 –471.
- Risbridger GP, Mellor S, McPherson S, Schmitt J. The contribution of inhibins and activins to malignant prostate disease. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001a; 180(1–2):149–53.

- Risbridger GP, Schmitt JF, Robertson DM. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocr Rev.* 2001b; 22(6):836-58.
- Rivier J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 133(1):120-7.
- Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T, *et al.* Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood.* 2008; 111(5):2733-43.
- Rosenberg N, Soudry M, Rosenberg O, Blumenfeld I, Blumenfeld Z. The role of activin A in the human osteoblast cell cycle: a preliminary experimental in vitro study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010; 118(10):708-12.
- Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(3):383-408.
- Rossmanith W, Chabicovsky M, Grasl-Kraupp B, Peter B, Schausberger E, Schulte-Hermann R. Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control. *Mol Carcinog* 2002; 35:1–5.
- Rydén M, Imamura T, Jörnvall H, Belluardo N, Neveu I, Trupp M, *et al.* A novel type I receptor serine-threonine kinase predominantly expressed in the adult central nervous system. *J Biol Chem.* 1996; 271(48):30603-9.
- Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology.* 2011; 58(7): 1127-35.
- Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(8):628-38.

- Schneyer AL, Sidis Y, Gulati A, Sun JL, Keutmann H, Krasney PA. Differential antagonism of activin, myostatin and growth and differentiation factor 11 by wild-type and mutant follistatin. *Endocrinology* 2008; 149:4589–95.
- Schneyer, A., Tortoriello, D., Sidis, Y., Keutmann, H., Matsuzaki, T., Holmes, W. Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 180, 33–38.
- Schneyer, AL, Rzucidlo, DA, Sluss, PM, Crowley, WF Jr. Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. *Endocrinology* 1994; 135: 667–674.
- Schulz R, Vogel T, Dressel R, Kriegelstein K. TGF-beta superfamily members, ActivinA and TGF-beta1, induce apoptosis in oligodendrocytes by different pathways. *Cell Tissue Res.* 2008; 334(3):327-38.
- Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 1993; 18: 347-356
- Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2001; 2(4):239-51.
- Scully C, Bagan J: Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 2009; 15(6): 388-399.
- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol.* 2000; 36 (5): 404-13.
- Seder CW, Hartojo W, Lin L, Silvers AL, Wang Z, Thomas DG, *et al.* Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2009a; 11(4):388-96.
- Seder CW, Hartojo W, Lin L, Silvers AL, Wang Z, Thomas DG, *et al.* INHBA overexpression promotes cell proliferation and may be epigenetically regulated in esophageal adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2009b; 4(4):455-62.

- Setchell BP, Sirinathsinghji DJ. Antigonadotrophic activity in rete testis fluid, a possible 'inhibin'. *J Endocrinol.* 1972; 53(3):lx-lxi.
- Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN *et al.* A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2011; 26(4): 326-34.
- Shimasaki S, Koga M, Esch F, Cooksey K, Mercado M, Koba A, *et al.* Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(12):4218-22.
- Shimizu S, Seki N, Sugimoto T, Horiguchi S, Tanzawa H, Hanazawa T, *et al.* Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. *Oncol Rep.* 2007; 18(6):1489-97.
- Shimonaka, M, Inouye, S, Shimasaki, S, Ling, N. Follistatin binds to both activin and inhibin through the common beta-subunit. *Endocrinology* 1991; 128: 3313–3315.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992; 359(6397):693-9.
- Sidis Y, Schneyer AL, Keutmann HT. Heparin and activin-binding determinants in follistatin and FSTL3. *Endocrinology.* 2005; 146(1):130-6.
- Sidis Y, Tortoriello DV, Holmes WE, Pan Y, Keutmann HT, Schneyer AL. Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous vs. exogenous activin. *Endocrinology.* 2002; 143(5):1613-24.
- Simon DP, Vadakkadath Meethal S, Wilson AC, Gallego MJ, Weinecke SL, Bruce E, *et al.* Activin receptor signaling regulates prostatic epithelial cell adhesion and viability. *Neoplasia.* 2009; 11:365–76.
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(6):1270-5.

- Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol.* 2011; 47(9):840-6.
- Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol.* 2010; 35(4):307-12.
- Spady TJ, Shayya R, Thackray VG, Ehrensberger L, Bailey JS, Mellon PL. Androgen regulates follicle-stimulating hormone beta gene expression in an activin-dependent manner in immortalized gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 2004; 18(4):925-40.
- Spencer K, Yu CK, Savvidou M, Papageorgiou AT, Nicolaides KH. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler ultrasonography and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A, free beta-human chorionic gonadotropin, activin A and inhibin A at 22 + 0 to 24 + 6 weeks' gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2006; 27:658–63.
- Steller MD, Shaw TJ, Vanderhyden BC, Ethier JF. Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2005; 3(1):50-61.
- Stove C, Vanrobaeys F, Devreese B, Van BJ, Mareel M, Bracke M. Melanoma cells secrete follistatin, an antagonist of activin-mediated growth inhibition. *Oncogene* 2004; 23:5330–9
- Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer.* 2007; 110(7): 1429-35.
- Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, *et al.* Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem.* 1993; 268(21):15579-87.

- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsuda Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology*. 1998; 114(3):550-8.
- Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, Wobus AM. Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions. *Stem Cell Rev*. 2009; 5(2):159-73.
- Suresh PS, Rajan T, Tsutsumi R. New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. *Endocr J*. 2011; 58(4):223-35.
- Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, *et al*. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(3):R136.
- Takabe K, Lebrun JJ, Nagashima Y, Ichikawa Y, Mitsuhashi M, Momiyama N, *et al*. Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation. *Endocrinology* 1999; 140: 3125-3132
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, *et al*. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*. 1993; 8(10):2879-87.
- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, *et al*. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*. 1994; 264(5155):101-4.
- Thackray VG, Mellon PL. Synergistic induction of follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression by gonadal steroid hormone receptors and Smad proteins. *Endocrinology*. 2008; 149(3):1091-102.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871–90.

- Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, *et al.* GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*. 2001; 18(4):251-9.
- Thomas TZ, Wang H, Niclasen P, O'Bryan MK, Evans LW, Groome NP, *et al.* Expression and localization of activin subunits and follistatins in tissues from men with high grade prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(11):3851-8.
- Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005a; 65:5991–5.
- Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS. The structure of the follistatin: activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Developmental Cell* 2005b; 9(4):535–43.
- Totsuka Y, Tabuchi M, Kojima I, Shibai H, Ogata E. A novel action of activin A: stimulation of insulin secretion in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 156(1):335-9.
- Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL. N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1999; 155:787–98.
- Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, *et al.* Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal*. 2009; 7:15.
- Tsuchida K, Nakatani M, Matsuzaki T, Yamakawa N, Liu Z, Bao Y, *et al.* Novel factors in regulation of activin signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 225(1-2):1-8.
- Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T, Cui X. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J*. 2008; 55(1):11-21.
- Tsuchida K, Sawchenko PE, Nishikawa S, Vale WW. Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. *Mol Cell Neurosci*. 1996; 7(6):467-78.

- Tsuchida, K., Arai, K.Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y., Sugino, H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 40788–40796.
- Ueland T, Aukrust P, Aakhus S, Smith C, Endresen K, Birkeland KI, *et al.* Activin A and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2012; 9:234–7.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, *et al.* Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature.* 1986; 321(6072):776-9.
- Vale W, Wiater E, Gray P, Harrison C, Bilezikjian L, Choe S. Activins and inhibins and their signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1038:142-7.
- Vallecillo Capilla M, Romero Olid MN, Olmedo Gaya MV, Reyes Botella C, Bustos Ruiz V. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12(7):E518-23.
- Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 19):4495-509.
- Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, *et al.* Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respiratory Research* 2010; 11:35.
- van Riggelen J, Felsher DW. Myc and a Cdk2 senescence switch. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(1): 7-9.
- Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.* 2012; 23(5): 586-90.
- Verschueren K, Dewulf N, Goumans MJ, Lonnoy O, Feijen A, Grimsby S, *et al.* Expression of type I and type IB receptors for activin in midgestation mouse

embryos suggests distinct functions in organogenesis. *Mech Dev.* 1995; 52(1):109-23.

- Verspohl EJ, Ammon HP, Wahl MA. Activin A: its effects on rat pancreatic islets and the mechanism of action involved. *Life Sci.* 1993; 53(13):1069-78.
- Vigneswaran N, Tilashalski K, Rodu B, Cole P. Tobacco use and cancer. A reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995; 80(2):178-82.
- Wagner K, Peters M, Scholz A, Benckert C, Ruderisch HS, Wiedenmann B, *et al.* Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology.* 2004; 126(7):1828-43.
- Walton KL, Makanji Y, Chen J, Wilce MC, Chan KL, Robertson DM, *et al.* Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *J Biol Chem.* 2010; 285(22):17029-37.
- Walton KL, Makanji Y, Harrison CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 359(1-2):2-12.
- Walton KL, Makanji Y, Wilce MC, Chan KL, Robertson DM, Harrison CA. A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *J Biol Chem.* 2009; 284(14):9311-20.
- Wang B, Feng Y, Song X, Liu Q, Ning Y, Ou X, *et al.* Involvement of ERK, Bcl-2 family and caspase 3 in recombinant human activin A-induced apoptosis in A549. *Toxicology.* 2009; 258(2-3):176-83.
- Wang QF, Tilly KI, Tilly JL, Preffer F, Schneyer AL, Crowley WF Jr, *et al.* Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinology.* 1996; 137(12):5476-83.
- Wankell M, Munz B, Hübner G, Hans W, Wolf E, Goppelt A, *et al.* Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis. *EMBO J.* 2001; 20(19):5361-72.

- Warnakulasuriya KA, Ralhan R. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco-a review. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(2):63-77.
- Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009; 207(10):471-5.
- Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 157-171
- Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol.* 2009; 3(1): 78-81.
- Wildi S, Kleeff J, Maruyama H, Maurer CA, Büchler MW, Korc M. Overexpression of activin A in stage IV colorectal cancer. *Gut.* 2001; 49(3):409-17.
- Winter, JP, ten Dijke, P, de Vries, CJM, van Achterberg, TAE, Sugino, H, de Waele, P, *et al.* Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 105–114.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, *et al.* TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 1992; 71(6):1003-14.
- Wu H, Wu M, Chen Y, Allan CA, Phillips DJ, Hedger MP. Correlation between blood activin levels and clinical parameters of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:410579.
- Wu Z, Zhang W, Chen G, Cheng L, Liao J, Jia N, *et al.* Combinatorial signals of activin/nodal and bone morphogenic protein regulate the early lineage segregation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(36):24991-5002.
- Xia Y, Schneyer AL. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol.* 2009; 202(1):1-12.

- Xia, Y., Sidis, Y., Schneyer, A. Overexpression of follistatin-like 3 in gonads causes defects in gonadal development and function in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 2004; 18, 979–994.
- Yamashita S, Maeshima A, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15:91–101.
- Yang S, Shin J, Park KH, Jeung HC, Rha SY, Noh SH, *et al.* Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772(9):1033-40.
- Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, *et al.* Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics.* 2008; 9:69.
- Yndestad A, Larsen KO, Øie E, Ueland T, Smith C, Halvorsen B, *et al.* Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. *Journal of Applied Physiology* 2009; 106:1356–64.
- Yoshinaga K, Inoue H, Utsunomiya T, Sonoda H, Masuda T, Mimori K, *et al.* N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(17):5702-7.
- Yoshinaga K, Mimori K, Inoue H, Kamohara Y, Yamashita K, Tanaka F, *et al.* Activin A enhances MMP-7 activity via the transcription factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol.* 2008b; 33(3):453-9.
- Yoshinaga K, Mimori K, Yamashita K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M. Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma. *Int J Oncol.* 2003; 22:75–80.
- Yoshinaga K, Yamashita K, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M. Activin A causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Ann Surg Oncol.* 2008a; 15(1):96-103.
- Yu EW, Dolter KE, Shao LE, Yu J. Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. *Clinical and Experimental Immunology* 1998; 112:126–32.

- Yuen MF, Norris S, Evans LW, Langley PG, Hughes RD. Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 233-238
- Zhang DF, Li XG, Su LJ, Meng QL. Expression of activin A and follistatin in glioblastoma and their effects on U87 in vitro. *J Int Med Res.* 2010; 38(4):1343-53.
- Zhang Z, Zheng J, Zhao Y, Li G, Batres Y, Luo M, *et al.* Overexpression of activin A inhibits growth, induces apoptosis, and suppresses tumorigenicity in an androgen-sensitive human prostate cancer cell line LNCaP. *Int J Oncol.* 1997; 11(4):727-36.
- Zheng W, Luo MP, Welt C, Lambert-Messerlian G, Sung CJ, Zhang Z, *et al.* Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1998; 69(1):23-31.

ANEXO



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




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da participação de ativina A em carcinomas espinocelulares orais**", protocolo nº 031/2011, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta e Andreia Bufalino, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/07/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Analysis of the involvement of activins A in oral squamous cell carcinoma**", register number 031/2011, of Ricardo Della Coletta and Andreia Bufalino, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/02/2011.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


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

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