



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DANIELLE BARBOSA BROTTTO

Análise do papel dos genes HOX na regulação de vias gênicas compartilhadas  
entre o desenvolvimento placentário e tumoral

Ribeirão Preto-SP

2019

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

DANIELLE BARBOSA BROTTTO

Análise do papel dos genes HOX na regulação de vias gênicas compartilhadas  
entre o desenvolvimento placentário e tumoral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção  
do título de **Doutora em Ciências**

Área de concentração: **Genética**.

**Orientador:** Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior

Ribeirão Preto-SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, **DESDE QUE CITADA A FONTE.**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Brotto, Danielle Barbosa.

Análise do papel dos genes HOX na regulação de vias gênicas compartilhadas entre o desenvolvimento placentário e tumoral. Ribeirão Preto, 2019.

Número de Páginas, 159p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Danielle Barbosa Brotto

---

**Análise do papel dos genes HOX na regulação de vias gênicas compartilhadas entre o desenvolvimento placentário e tumoral.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Genética

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

---

Dedico à Ligia e Marcos.  
Igor, Juninho, Rodrigo, vó Marlene e Donana.  
Meus alicerces.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus,

Aos meus pais, pelo amor incondicional e apoio inestimável, bem como à toda a minha família: meus irmãos Igor, Juninho e Rodrigo, minha avó Marlene e minha sobrinha Ana Carolina (donana), por todo o carinho e suporte, ainda que de longe.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, meu orientador, agradeço por me receber em seu laboratório, pela oportunidade de crescimento científico e pela valiosa orientação.

Agradeço aos meus principais colaboradores que tanto contribuíram para esse projeto e foram fundamentais para sua conclusão. Estes, acima de colaboradores, são grandes amigos que espero levar para a vida: Jéssica Praça, inestimável nas discussões de resultados, análises e aconselhamento em bioinformática, correção do texto, amizade, apoio e ombro amigo. Vitor Leão importantíssimo na incansável, porém, bem-sucedida(!) padronização do ChiP-seq, correção da tese e discussão dos dados, Isabela Ichihara pelo cultivo de células, correção de textos e apoio moral. Carlos Biagi e Ricardo Nociti pela ajuda em análises de bioinformática.

Agradeço às gestantes que aceitaram fazer parte deste estudo, à Clínica Mater e à enfermeira Maria Fernanda pela gentil instrução durante a coleta de amostras.

A todos os meus colegas de trabalho, por formarem um time (*Dream Team*): Simone Carvalho, Adamo Siena, Luiza Araújo, Bruna Muys, Isabela Ichihara, Diana, Greice Molfetta e Camila Araújo.

Às grandes amigas da Bio, em Cuiabá, também pelo apoio: Joisiane, Greice e Angélica.

Aos meus amigos do apartamento 602, Camila Brandão, Simone, Jéssica, Lucas e Bryan. Por todo o carinho, apoio e amizade que me ofereceram, sempre com reciprocidade.

A todos os membros e também aos colaboradores do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática que convivem comigo todos os dias. Aos ICs, pós docs e técnicas!

Aos amigos e colaboradores do laboratório de Biologia Funcional, orientado pelo Prof. Rodrigo Panepucci: Vitor, Felipe, Amanda, Hudson, Ildercílio e Josiane.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de avaliar o meu trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro e à Fundação Hemocentro pelo local e equipamentos de trabalho proporcionados.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

## Resumo

Brotto, D.B. **Análise do papel dos genes HOX na regulação de vias gênicas compartilhadas entre o desenvolvimento placentário e tumoral.** [Tese] Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2019; 159pgs.

Os genes HOX pertencem à classe de genes homeobox com 39 membros organizados em quatro clusters no genoma humano, mapeados em diferentes cromossomos. Essa família de genes homeóticos codifica fatores de transcrição que atuam especialmente no desenvolvimento embrionário, regulando a morfogênese e diferenciação celular. Sua expressão é também observada em tecidos adulto normais e em diferentes cânceres. Além disso, os genes HOX também desempenham função no desenvolvimento da placenta, sendo que alguns processos biológicos como, proliferação, invasão e migração celular, são ativados durante o desenvolvimento da placenta e dos tumores. Nesse contexto, o presente projeto visa avaliar os programas genéticos regulados por genes da família HOX na placenta humana e em células tumorais. Foram realizadas análises *in silico* com dados públicos para checar a expressão dos genes da família HOX na placenta e correlacionar com o tecido tumoral. Dentre os 19 tumores analisados na base de dados do TCGA, os genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* foram selecionados para identificação de alvos pela técnica de ChIP-seq, para entender quais vias gênicas os três HOX estão regulando na placenta e no tumor. Como resultado, identificamos 192 alvos em comum aos *Hoxa13*, *Hoxb2* e *Hoxb3* que são componentes da via do câncer no KEGG. Na análise de enriquecimento de vias biológicas, os alvos do *Hoxa13* aparecem envolvidos com vias de sinalização de cálcio, sinalização da molécula *Rap1* e *Mapk*. Do total de alvos identificados, encontramos genes com alta correlação de expressão com os HOX em tumores primários, estes, enriqueceram vias de regulação do ciclo celular e de manutenção da angiogênese, corroborando dados a respeito do seu papel na formação de vasos sanguíneos. Identificamos alvos do *Hoxb2* enriquecidos nas vias de regulação do ciclo celular e sinalização de componentes da via *Wnt*, esta última sugere papel na regulação de diferenciação e migração celular. O gene *Hoxb3* obteve o maior número de alvos totais e também com alta correlação de expressão em tumor. Do total, 359 genes se sobrepõem à lista dos 524 genes anotados na via *pathways in cancer* do KEGG, regulando genes efetores importantes, como *AKT1*, *CTNNB1*, *MAPK1* e *RAC1*. Identificamos 1949 alvos do *Hoxb3* com correlação em tumores primários e os dados indicam que exerça papel na regulação da via de adesão celular, com regulação de *ERBB2*, *ITGB1*, *ITGA5* e *FN1*, que por sua vez estão com alta expressão em células de placenta. Além disso, identificamos os genes *HOXA13* e *HOXB2* regulando um ao outro e os alvos em comum regulados por esses dois fatores de transcrição, estão fortemente envolvidos na regulação da apoptose, destacando-se membros da família caspase, *CASP6* e *CASP8*. Diante disso, concluímos que os genes HOX estão expressos em tecido placentário, regulando alvos que podem estar relacionados ao desenvolvimento tumoral, por meio da manutenção de vias de proliferação celular, adesão, migração, invasão e apoptose. Os genes selecionados nesse estudo, bem como as vias gênicas que foram enriquecidas, ajudam no melhor entendimento dos processos que ocorrem no desenvolvimento tumoral e, podem servir futuramente como biomarcadores para o tratamento e diagnóstico do câncer.

**Palavras-chave:** genes HOX, fatores de transcrição, placenta, câncer, ChIP-seq.

## Abstract

Brotto, D.B. **Analysis of HOX genes role regulating gene pathways shared between placental and tumor development.** [Thesis] Ribeirão Preto; University of Sao Paulo; Ribeirao Preto Medical School; 2019; 159pgs.

HOX genes belong to the 39-member homeobox gene class organized into four clusters in the human genome mapped on different chromosomes. This family of homeotic genes encodes transcription factors that act especially on embryonic development, regulating cell morphogenesis and differentiation. Its expression is also observed in normal adult tissues and in different cancers. HOX genes also play a role in the development of the placenta, and some biological processes, such as cell proliferation, invasion and migration, are activated during the development of the placenta and tumors. In this context, the present project aims to evaluate the genetic programs regulated by HOX family genes in the human placenta and tumor cells. In silico analyzes were performed in order to evaluate the expression of HOX genes in the placenta and its correlation to tumor tissues. Among the 19 tumors analyzed in the TCGA database, the *HOXA13*, *HOXB2* and *HOXB3* genes were selected because of their high expression in some tumors and placenta. We applied the ChIP-seq technique to understand which gene pathways the three HOX genes are regulating in the placenta and tumor. As a result, we identified 192 common targets for Hoxa13, Hoxb2, and Hoxb3 that are components of the KEGG cancer pathway. In the biological enrichment analysis, Hoxa13 targets are involved with calcium signaling pathways, Rap1 and Mapk signaling pathways. From the total of targets, we found genes with high expression correlation in primary tumors, which enriched cell cycle regulation and angiogenesis maintenance pathways, corroborating data regarding their role in blood vessel formation. We have identified Hoxb2 targets enriched in cell cycle regulation and Wnt signaling pathway, the latter suggesting a role in regulating cell differentiation and migration. Hoxb3 showed 359 genes overlapping the list of 524 genes annotated on the KEGG pathways in cancer, regulating important effector genes such as *AKT1*, *CTNNB1*, *MAPK1* and *RAC1*. We identified 1949 Hoxb3 targets with correlation in glioblastoma multiforme primary tumors and the data indicate an important role in the regulation of cell adhesion events, via *ERBB2*, *ITGB1*, *ITGA5* and *FNI*, which in turn are highly expressed in placenta cells. In addition, we identified the *HOXA13* and *HOXB2* genes targeting to each other and the common targets regulated by these two transcription factors are strongly involved in the regulation of apoptosis, highlighting the caspase family members *CASP6* and *CASP8*. Therefore, we conclude that HOX genes are expressed in placental tissue, regulating pathways related to tumorigenesis, such as cell proliferation, invasion and metastasis events. The genes selected in this study, as well as the gene pathways that have been enriched, help to better understand the processes that occur in tumor development and may serve as biomarkers for cancer treatment and diagnosis in the future.

**Keywords:** HOX genes, transcription factors, placenta, cancer, ChIP-seq.



# SUMÁRIO

---

1	Introdução .....	11
1.1	O desenvolvimento da placenta .....	11
1.2	Recapitulação de processos biológicos no desenvolvimento tumoral .....	12
1.3	Genes HOX .....	14
1.4	Genes HOX nos dois modelos biológicos: placenta e câncer .....	16
1.5	Justificativa .....	19
2	Objetivos .....	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos .....	20
3	Material e métodos.....	21
3.1	Material .....	21
3.1.1	Placenta humana.....	21
3.1.2	Amostras provenientes de bancos de dados públicos.....	22
3.2	Métodos.....	24
3.2.1	Extração de RNA.....	24
3.2.2	Abordagem <i>in silico</i> para identificação do perfil de expressão da família de genes HOX em placenta e linhagens tumorais .....	25
3.2.3	RNA-seq de placenta a termo - GSE66622 .....	25
3.2.4	RNA-seq de placenta de estágios iniciais e termo - GSE73017.....	26
3.2.5	Sequenciamento de RNA de células únicas de tecido placentário - GSE89497 .....	26
3.2.6	RNA-seq de tecido tumoral primário – TCGA .....	27
3.2.7	PCR quantitativa para análise da expressão gênica.....	27
3.2.8	Imunohistoquímica .....	28
3.2.9	Imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq) .....	28
3.2.10	Análise de enriquecimento de vias biológicas para os alvos totais identificados no ChIP-seq .....	34
3.2.11	Correlação da expressão dos genes HOX e seus alvos nos dados de RNA-seq dos tumores primários do TCGA e análise de enriquecimento para esse conjunto de alvos .....	34
3.2.12	Análises estatísticas gerais.....	35
4	Resultados .....	36
4.1	Padronização da técnica de extração de RNA a partir de tecido placentário congelado .....	36
4.2	Experimentos pilotos para avaliação inicial da expressão gênica e expressão proteica de membros da família HOX. ....	37
4.3	Perfil de expressão da família de genes HOX e seleção dos genes candidatos .....	39
4.3.1	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica em tecido placentário.....	39
4.3.2	Validação da expressão gênica por RT-qPCR.....	49
4.4	Identificação dos genes alvos regulados pelos HOX selecionados utilizando a técnica de ChIP-seq.....	50

4.4.1	Imunoprecipitação da cromatina (ChIP): padronização, preparação da cromatina e validação experimental .....	50
4.4.2	Análise bioinformática do ChIP-seq: processamento inicial dos dados.....	54
4.4.3	Análise bioinformática do ChIP-seq: Chamada e anotação de picos .....	57
4.4.4	Perfil de enriquecimento dos picos filtrados por IDR em relação ao sítio de início de transcrição	63
4.5	Envolvimento dos alvos dos genes HOX selecionados com vias e processos biológicos associados ao câncer.....	66
4.6	Correlação da expressão dos genes HOX e dos seus alvos em tumores primários .	73
4.7	Avaliação de alvos dos genes <i>HOXA13</i> , <i>HOXB2</i> e <i>HOXB3</i> na regulação de vias gênicas num cenário de transcriptoma de células únicas de placenta.....	85
5	Discussão.....	91
6	Conclusões .....	103
7	Considerações finais.....	104
8	Referências.....	105
9	Apêndice .....	118
9.1	Apêndice 1 .....	118
9.2	Apêndice 2 .....	119
9.3	Apêndice 3 .....	121
9.4	Apêndice 4 .....	123
10	ANEXOS.....	125
10.1	Anexo 1.....	125
10.2	Anexo 2.....	128
10.3	Anexo 3.....	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Organização dos 39 genes HOX no genoma humano de acordo com o mapeamento no cromossomo.	15
Tabela 2. Descrição das amostras de tecido placentário coletados para o estudo.	22
Tabela 3. Descrição das amostras utilizadas no presente estudo	23
Tabela 4. RNA-seq de 19 tumores primários e tecidos normais adjacentes (borda do tumor), disponibilizados pela base de dados do The Cancer Genome Atlas – TCGA ( <a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a> ) (Tabelas 3 e 4).	23
Tabela 5. Quantificação e razões de qualidade do RNA extraído das amostras.	24
Tabela 6. Descrição dos anticorpos utilizados na imunoprecipitação.	31
Tabela 7. Quantificação em fluorômetro das amostras que passaram por imunoprecipitação da cromatina e tamanho médio dos fragmentos avaliados por eletroforese capilar.	53
Tabela 8. Número de <i>reads</i> geradas e mapeadas, por amostras e total.	55
Tabela 9. Visão geral das métricas de qualidade e de filtragem do ChIP-seq.	58
Tabela 10. Enriquecimento de vias biológicas com os alvos dos três genes HOX selecionados que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastomas (GBM), câncer gástrico (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD).	76
Tabela 11. Genes alvos do <i>HOXA13</i> que aparecem nas vias de ciclo celular e sinalização de p53 e valor de correlação da expressão em adenocarcinoma de pulmão (R).	78
Tabela 12. Vias biológicas enriquecidas (FDR <0,05) com os genes alvos do HOXB2 com alta correlação em Glioblastoma multiforme (GBM).	80

# 1 Introdução

## 1.1 O desenvolvimento da placenta

A placenta é um órgão materno-fetal transitente, cujo crescimento é dirigido para a formação de um sistema de transporte de metabólitos e gases, um sistema excretor e um sistema endócrino, necessários para o desenvolvimento do embrião (F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010; GUDE et al., 2004). Além disso, ela também protege o feto contra uma série de fatores, desde moléculas nocivas, infecções e algumas doenças maternas (CROSS, 1998).

O desenvolvimento da placenta se inicia com a implantação do blastocisto no epitélio endometrial (parede uterina). Aproximadamente 4,5 dias após a concepção, as células da mórula (zigoto no estágio de 8 a 16 células) passam por uma redistribuição e diferenciação em dois grupos celulares: as células do trofoblasto (camada de células mais externas que formarão a parede do blastocisto), e o embrioblasto (massa de células internas que originarão o feto).

Oito dias após a fertilização do embrião, o blastocisto já penetrou parcialmente o tecido endometrial materno e essa implantação inicial dispara uma cascata de eventos que promovem o desenvolvimento da placenta e o remodelamento do endométrio, denominado decidualização (APLIN; RUANE, 2017; F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010).

Inicialmente, ocorre uma adesão entre o trofoblasto e as células epiteliais endometriais, dando início à invasão do blastocisto e a diferenciação do trofoblasto em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto.

O citotrofoblasto desempenha função invasiva e secretora, e por sua vez, diferencia-se em trofoblasto viloso, que origina as vilosidades coriônicas, e o trofoblasto extraviloso. Este, por sua vez, se divide em trofoblasto intersticial, que invade a decídua formando o leito placentário, e em trofoblasto endovascular, que invade e molda os vasos maternos para suprimento fetal (F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010).

O sinciotrofoblasto é um tecido diferenciado, caracterizado por uma camada de células contínuas, multinucleadas e amorfas, que também ajudam na invasão da decídua pelo blastocisto. Ao contrário do citotrofoblasto, o sinciotrofoblasto possui baixa capacidade proliferativa e sua formação é alimentada a partir de células do citotrofoblasto. Suas principais funções durante a etapa de implantação são a de formar lacunas no intermédio do miométrio, que serão preenchidas pelo sangue materno, e também a de secreção de hormônios, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010; MOORE, 2008).

A capacidade invasiva dos trofoblastos é decorrente da sua habilidade em secretar enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, pela ativação de proteinases do endométrio (F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010; LALA et al., 2002), que induzem a lise de junções apicais entre as células endometriais, abrindo caminho e permitindo a invasão e penetração do blastocisto (ACHACHE; REVEL, 2006; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). A erosão da decídua pelas células trofoblásticas forma um sistema de lacunas que, posteriormente serão preenchidas pelo sangue dos capilares maternos e, por sua vez, darão origem à circulação útero-placentária.

Com a evolução do desenvolvimento, a placenta se torna mais robusta para dar suporte ao feto, ancorando-se ao epitélio uterino por meio dos vilos secundários e terciários, formados pela invasão dos tecidos cito e sinciotrofoblasto. No início do quarto mês de gestação, a placenta já possui um sistema completo de suprimento de oxigênio e nutrientes ao feto (THOMAS W. SADLER, 2006).

## **1.2 Recapitulação de processos biológicos no desenvolvimento tumoral**

Em razão da dificuldade técnica e ética de se obter amostras nos estágios iniciais do desenvolvimento humano, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares atuantes durante todo o desenvolvimento da placenta. Entretanto, para suprir essa necessidade da investigação, o uso de modelos animais ajudam a elucidar quais vias gênicas são essenciais ao desenvolvimento embrionário humano (ROSSANT; CROSS; LUNENFELD, 2001).

Com isso, sabe-se que na formação da placenta, as vias de proliferação celular, diferenciação, invasão e morte celular são necessárias nos estágios iniciais de implantação do blastocisto (JURISICOVA; DETMAR; CANIGGIA, 2005), e neste contexto, a placenta é considerada uma estrutura invasiva semelhante ao microambiente de um tumor, uma vez que a placenta tem a capacidade de invadir o útero para extrair seu suprimento sanguíneo, na tentativa de estabelecer uma troca com os tecidos maternos (MOORE, 2008).

Existem estudos que apresentam aspectos moleculares análogos aos processos que ocorrem na placenta e em tumores (Figura 1). Já foram identificados genes que são críticos para o desenvolvimento normal da placenta ou do embrião, que apresentam expressão alterada nas células tumorais e contribuem para a carcinogênese (HEMBERGER; CROSS, 2001; NOVAKOVIC; SAFFERY, 2013). Dentre as principais características fisiológicas com grande similaridade entre placenta e câncer, estão a invasão de tecido adjacente e a evasão da resposta do sistema imune (HOLTAN et al., 2009).

As células do trofoblasto parecem ser as principais células que apresentam os mecanismos que são compartilhados pelo câncer, e apresentam um fenótipo característico do microambiente tumoral (LUNGI et al., 2007).

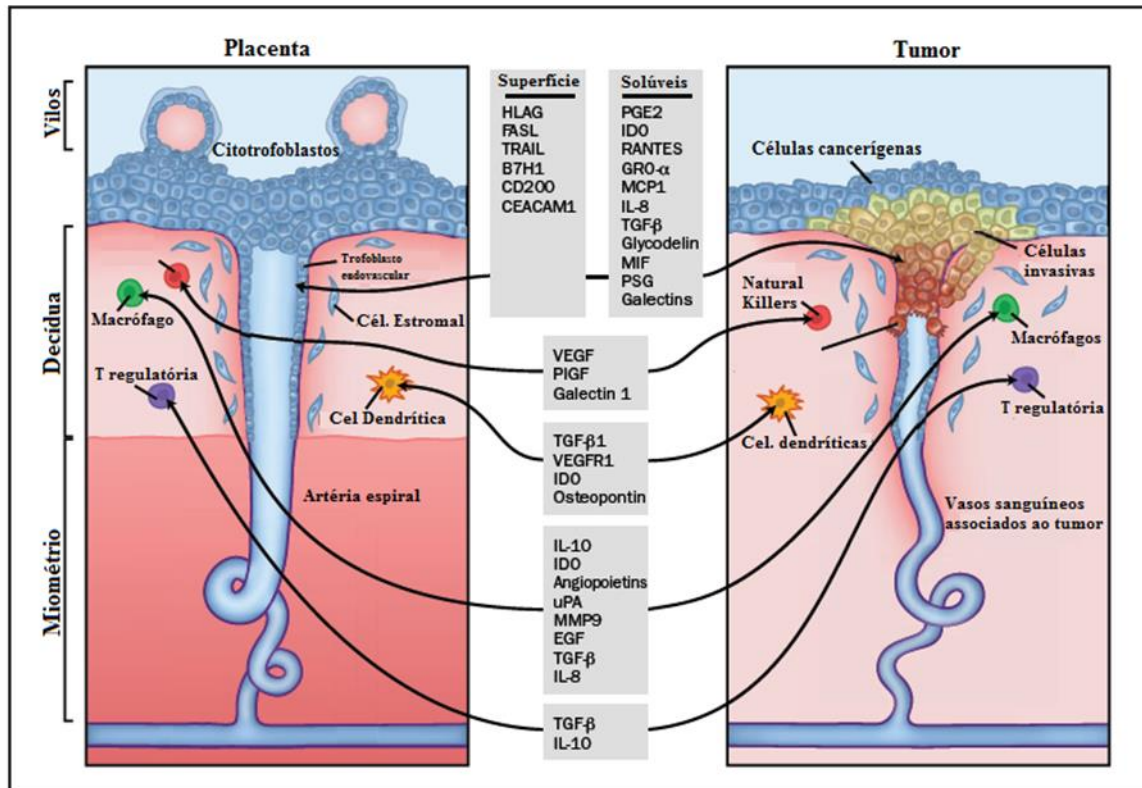
Alguns desses mecanismos incluem: uma alta taxa de proliferação e um aumento na atividade da telomerase (KYO et al., 1997); a regulação de genes que controlam a transição epitélio-mesênquima, como modificações na expressão de integrinas e E-caderinas, tais genes promovem a perda de adesão e ganho de motilidade celular (ACLOQUE et al., 2009; FLORIDON et al., 2000); a secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular, como dito anteriormente, necessário para a implantação do blastocisto e erosão das células trofoblásticas no tecido uterino; e por último, o estabelecimento e a manutenção de uma rede de novos vasos sanguíneos que irão suprir o feto e ativam genes envolvidos em funções pró-angiogênicas (GOEL; MERCURIO, 2013; LOUWEN et al., 2012). Os mesmos mecanismos citados acima, também são ativados em células tumorais (GOEL; MERCURIO, 2013; HOLTAN et al., 2009; LOUWEN et al., 2012).

Uma variedade de genes, como o gene PLAC8 e outros fatores expressos pela placenta também já foram associados como mediadores da progressão tumoral, facilitando migração e mobilidade de células tumorais (KAISTHA et al., 2016)., como por exemplo, a expressão do fator de crescimento placentário – PIGF, também detectado em tumores mamários (ESCUERO-ESPARZA et al., 2010) e a expressão de PLAC1 (placenta-specific protein 1), que está relacionado à ancoragem da placenta ao endométrio (DONG et al., 2008; SILVA et al., 2007) é descrito também em tumores sólidos.

Além disso, a descoberta de antígenos tumorais também faz conexão entre os eventos que são compartilhados no desenvolvimento de linhagens germinativas e em tumores. Essa classe de antígeno (*Cancer/Testis antigens*) aparece expresso apenas em células germinativas masculinas e tumores, o que levou a uma teoria de que a expressão aberrante desses antígenos no câncer reflete a ativação em células adultas de vias que deveriam estar expressas apenas durante o desenvolvimento do organismo, e portanto, isso poderia ser uma força em favor do tumor (SIMPSON et al., 2005).

O estudo do processo de organogênese como modelo para o entendimento do processo cancerígeno é bem explorado e rendeu a hipótese “oncogerminativa da formação do tumor”, que descreve os principais estágios que as células tumorais passam durante a progressão tumoral (VINNITSKY, 1993). O autor considera que a formação do tumor é um processo dinâmico e organizado que mimetiza a ordem dos processos de desenvolvimento embrionários, ocasionados pela perda da regulação de eventos genéticos e epigenéticos que levam à

reprogramação celular. Em consonância, John Beard em 1902, também estabeleceu comparações entre ambos os eventos, e por fim, Gurchot (1975), compilou a grande maioria das observações das propriedades das células trofoblásticas o levou a propor a “Teoria Trofoblástica do Câncer” (FISHER et al., 1989; GURCHOT, 1975).



**Figura 1.** Similaridades entre a interface placentária e o microambiente tumoral. Esta imagem é uma modificação da original de HOLTAN et al., 2009 protegida por [Danielle B. Brotto](HOLTAN et al., 2009).

### 1.3 Genes HOX

Os genes HOX formam um subgrupo da grande família de genes Homeobox. Esses genes, também denominados por genes homeóticos, constituem uma família de genes que codificam fatores de transcrição e desempenham função de reguladores transcricionais do desenvolvimento embrionário, atuando na morfogênese e diferenciação celular (GEHRING; HIROMI, 1986; PAPAGEORGIOU, 2007).

Os genes Homeobox foram descritos primeiramente em moscas do gênero *Drosophila*, e identificados por meio do estudo de mutações que resultavam em transformação de um segmento corporal em outro, denominadas mutações homeóticas (GARCÍA-BELLIDO, 1977; LEWIS, 1978)

São denominados homeobox, aqueles genes que contém em sua sequência, uma região de 183pb que codifica uma estrutura de 61 aminoácidos, denominada homeodomínio, o qual é

funcional e estruturalmente bem conservado entre as espécies que tem como função de um motivo de ligação ao DNA (MCGINNIS; KRUMLAUF, 1992). É por meio dessa especificidade da ligação entre o homeodomínio com sua região alvo no genoma, que tais fatores realizam a regulação transcricional, ativando ou reprimindo outros genes (LEVINE; HOEY, 1988).

No genoma humano, os 39 genes HOX estão distribuídos em quatro *clusters* e mapeados em diferentes cromossomos. O cluster HOXA está localizado no cromossomo 7, o cluster HOXB no cromossomo 17, o cluster HOXC no cromossomo 12 e o cluster HOXD no cromossomo 2 (GEHRING; HIROMI, 1986; HOLLAND; BOOTH; BRUFORD, 2007).

Acredita-se que esses clusters se originaram por eventos de duplicação gênica e diferenciação de um ancestral comum aos vertebrados. Com base na similaridade da sequência de nucleotídeos, os 39 genes HOX foram divididos em 13 grupos de genes parálogos (Tabela 1)(DUBOULE; DOLLÉ, 1989).

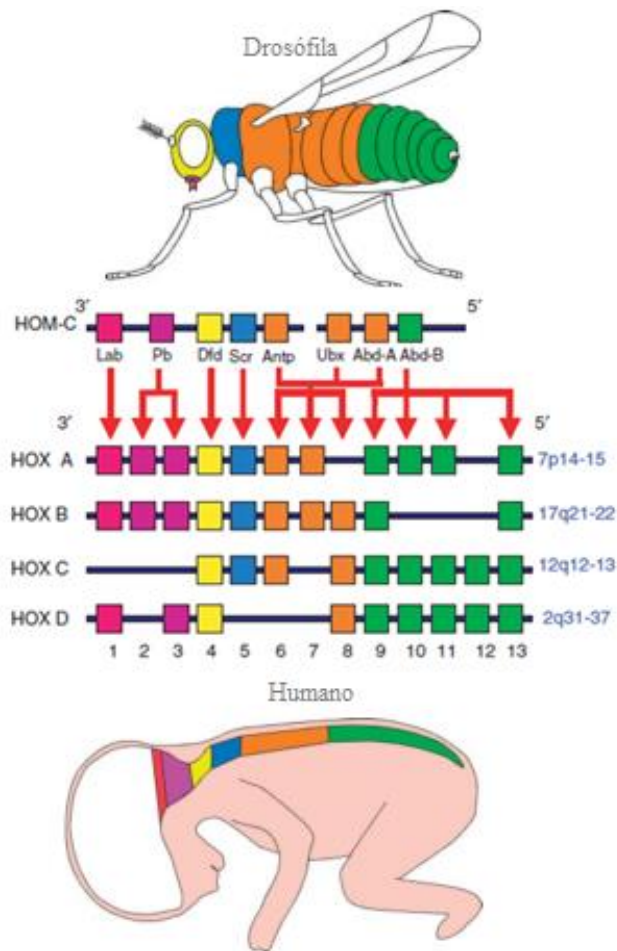
**Tabela 1. Organização dos 39 genes HOX no genoma humano de acordo com o mapeamento no cromossomo.**

<b>Grupos</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Genes</b>
<b>HOXA</b>	7	<i>HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXA11, HOXA13</i>
<b>HOXB</b>	17	<i>HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB4, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXB13</i>
<b>HOXC</b>	12	<i>HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXC10, HOXC11, HOXC12, HOXC13</i>
<b>HOXD</b>	2	<i>HOXD1, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9, HOXD10, HOXD11, HOXD12, HOXD13</i>

A descoberta dos genes homeobox foi fundamental para o entendimento do controle genético do desenvolvimento. A ativação transcricional coordenada desses 4 *clusters* pode ser observada com o início da gastrulação e garante a correta formação do plano corporal dos organismos bilaterais, fornecendo para as células sua identidade posicional, indicando a localização no eixo ântero-posterior do organismo (DUBOULE; MORATA, 1994).

Parte da versatilidade desses fatores de transcrição se deve à forma com que são regulados. A disposição dos genes dentro dos *clusters* está arranjada de forma que a posição de um gene no sentido 3' - 5' corresponde à sequência temporal e a ordem espacial da expressão dos genes no eixo ântero-posterior do organismo, colinearidade temporal e espacial, respectivamente (Figura 2) (DUBOULE; MORATA, 1994; LEWIS, 1978).





**Figura 2. Conservação estrutural e funcional entre o HOM-C em Drosófila e os clusters HOX em humanos.** Durante o desenvolvimento embrionário os genes possuem um padrão de expressão correlato com a localização dentro do cluster, identidade posicional demonstrada pelo padrão de cores. Esta imagem é uma modificação da original de GRIER et al., 2005 protegida por [Danielle B. Brotto] (GRIER et al., 2005).

Embora os genes HOX sejam bastante estudados no desenvolvimento embrionário, é importante ressaltar que esses fatores de transcrição apresentam uma ampla variedade funcional, uma vez que regulam vias em diferentes processos biológicos. Eles podem exercer funções distintas em contextos específicos ou redundantes, em parte devido à similaridade em suas regiões de ligação no DNA ou em razão da interação da proteína HOX com diversos cofatores em comum (MCINTYRE et al., 2007). Tais ligações podem induzir o aumento ou a diminuição da afinidade do fator de transcrição pelo seu alvo (SVINGEN; TONISSEN, 2006).

#### 1.4 Genes HOX nos dois modelos biológicos: placenta e câncer

Apesar de sua descrição original como reguladores do desenvolvimento embrionário, alguns estudos têm demonstrado que a expressão dos genes HOX também em tecido adulto normal, inclusive durante o desenvolvimento da placenta e do endométrio (AMESSE et al.,

2003; LU; HARDT; KIM, 2008; MORGAN, 2006; TAKAHASHI et al., 2004; ZAGOZEWSKI et al., 2014).

No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares regulados pelos genes HOX na placenta. Há relatos, porém, que revelam sua expressão tanto no tecido placentário como nos órgãos que compõem o sistema reprodutivo feminino. Taylor e colaboradores (1997), usando a técnica de análise *in situ*, observaram a expressão do HOXA9 nas tubas uterinas, e dos genes HOXA10 e HOXA11 no útero, assim como a do HOXA13 no epitélio da vagina (TAYLOR; VANDEN HEUVEL; IGARASHI, 1997).

Foi observado que o HOXA10 promove a proliferação celular, regulando uma variedade de genes durante o processo de decidualização (LU; HARDT; KIM, 2008). Na placenta, há relatos da expressão dos genes HOXB7, HOXA11, HOXB6 e HOXC6 (MURTHI et al., 2008; ZHANG et al., 2002). Foi observado também que o HOXA13 também está envolvido com o desenvolvimento da placenta, possivelmente regulando uma série de genes relacionados à vascularização e ramificação dos vasos, que por sua vez implica na adesão do órgão ao epitélio uterino (SHAUT et al., 2008).

A expressão em tecido adulto normal sugere que os genes HOX podem desempenhar funções nos mais diversos processos celulares, como no estudo de Takahashi e colaboradores (2004), onde foi analisada a expressão dos 39 genes HOX em um painel de 20 tecidos adultos normais, revelando que em alguns tecidos, todos os genes HOX estavam expressos, como: testículo, próstata, cólon, rim, útero e placenta (TAKAHASHI et al., 2004), além disso também foi observado a expressão dos genes HOX no tecido normal mamário e pulmonar (GOLPON et al., 2001; HUR et al., 2014).

A expressão nesses tecidos pode estar relacionada com diversos mecanismos, como a decidualização do endométrio (LU; HARDT; KIM, 2008), hematopoese (ARGIROPOULOS; HUMPHRIES, 2007), diferenciação celular para manutenção de tecidos adultos (SEIFERT, 2015) e também na regulação de genes envolvidos na proliferação, adesão, migração celular e apoptose (LIU et al., 2015b; SÁNCHEZ-HERRERO, 2013; STANLEY J. ULJASZEK, FRANCIS E. JOHNSTON, MICHAEL A. PREECE, 1998).

São esses mesmos processos que são principalmente recapitulados na tumorigênese. Assim como na definição consensual de que o câncer é uma doença de origem multifatorial e complexa, causada pelo acúmulo de alterações genéticas ao longo da vida de um indivíduo (SANDOVAL; ESTELLER, 2012), a principal distinção entre as células cancerosas e as células normais é a presença de um conjunto de habilidades (*hallmarks of cancer*) adquiridas pelas células tumorais que envolvem: a perda da regulação nas vias de sinalização de proliferação;

bloqueio da ação de genes supressores; evasão do sistema imune; resistência à morte celular; imortalidade replicativa; promoção da inflamação tumoral e angiogênese com início da invasão e, por fim, a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Ainda que as células cancerosas apresentem perda da regulação dos mecanismos citados acima, devido ao aumento da instabilidade genômica como um todo, a expressão elevada dos genes HOX pode promover a oncogênese e, conseqüentemente, reativar os mesmos processos biológicos regulados por eles na embriogênese (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2014).

Portanto, podemos inferir que os genes HOX apresentam um papel importante no desenvolvimento placentário assim como na tumorigênese, apresentando, no geral, a expressão tecido-específica ou mesmo conforme o sítio tumoral (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2014; SHAH; SUKUMAR, 2010). Como por exemplo, no câncer colorretal, que possui 10 genes HOX diferencialmente expressos em relação ao tecido normal do próprio intestino grosso (KANAI et al., 2010).

Em recente estudo do nosso grupo de pesquisa, foi observada um aumento na expressão de sete membros da família HOX (HOXA10, HOXC8, HOXC9, HOXC10, HOXC13, HOXD10 e HOXD11) em amostras tumorais de carcinoma espinocelular de laringe, quando comparados ao tecido normal adjacente. Além disso, foi demonstrado que o silenciamento dos genes HOXC8, HOXD10 e HOXD11, resultou na redução da taxa de proliferação e migração celular, sugerindo um papel importante dos genes HOX na progressão do câncer de laringe (DE BARROS E LIMA BUENO et al., 2016).

Em linhagens de câncer de próstata e mama, diversos estudos mostram a expressão elevada dos genes HOX do *cluster* C (AXLUND; LAMBERT; NORDEEN, 2010; HUR et al., 2014; MILLER et al., 2003; MORGAN et al., 2014; WALTREGNY et al., 2002). Assim como, na literatura, existe uma ampla análise correlacionando os genes HOX com diferentes tipos de tecidos malignos, como por exemplo, a relação inversa da expressão de genes HOX na progressão do câncer renal de células claras (LIU et al., 2015b), assim como a relação de HOX no carcinoma nasofaríngeo (JIANG et al., 2015), no câncer de ovário (KLAUSEN; LEUNG; AUERSPERG, 2009; TAIT et al., 2015), no melanoma (CANTILE et al., 2012) e no câncer gástrico (CAI et al., 2016).

Apesar do vasto conhecimento do papel dos genes HOX no desenvolvimento embrionário de diferentes organismos, pouco se sabe sobre sua função mecânica em cenários biológicos diferentes. Em estudo recente, o gene HOXB5 foi caracterizado, após análise de células tronco hematopoiéticas (HSCs) derivadas de medula óssea de murinos, como excelente marcador de

HSCs e capazes de se manter por longo tempo, garantindo assim o sucesso dos transplantes de medula óssea (CHEN et al., 2016b).

## **1.5 Justificativa**

Apesar do sólido conhecimento do papel dos genes conservados da família HOX no desenvolvimento embrionário, com o auxílio de modelos animais e estudos *in vitro*, pouco se sabe sobre o mecanismo exato que cada membro da família HOX pode exercer no cenário biológico de uma célula, tecidos e de órgãos de organismos adultos. Além disso, pouco foi abordado sobre o compartilhamento funcional dos genes HOX durante a tumorigênese e/ou no desenvolvimento placentário. Portanto, a análise do perfil transcricional dos genes HOX e de seus alvos, permitiu conhecer a relação da função dos genes HOX em cenários biológicos distintos.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o envolvimento dos genes da família HOX em mecanismos de regulação gênica e determinar as vias biológicas reguladas por eles na placenta humana e em células tumorais.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o perfil de expressão dos 39 genes HOX em amostras de placenta humana e células tumorais;
2. Selecionar genes candidatos utilizando assinaturas de expressão de genes HOX em amostras de placenta correlacionados com o perfil de expressão gênica encontrado em tumores primários.
3. Identificar em placenta humana, os genes alvos regulados pelos HOX selecionados no item anterior;
4. Investigar o papel dos genes HOX candidatos na regulação de processos biológicos críticos para a progressão tumoral com base na lista dos alvos identificados em tecido placentário, apresentados pelo item 3;
5. Avaliar os genes HOX candidatos como potenciais biomarcadores do câncer.

### 3 Material e métodos

Para responder aos objetivos estabelecidos, utilizamos um conjunto de materiais para fazer a análise de expressão dos membros da família HOX e selecionar os genes de interesse. Entram como material do estudo as amostras de placentas coletadas de gestantes e também os dados públicos para análises *in silico*. Os métodos para testar nossa hipótese foram aplicados nas amostras de placenta a termo, porém, integrando-os aos dados públicos (Figura 3).

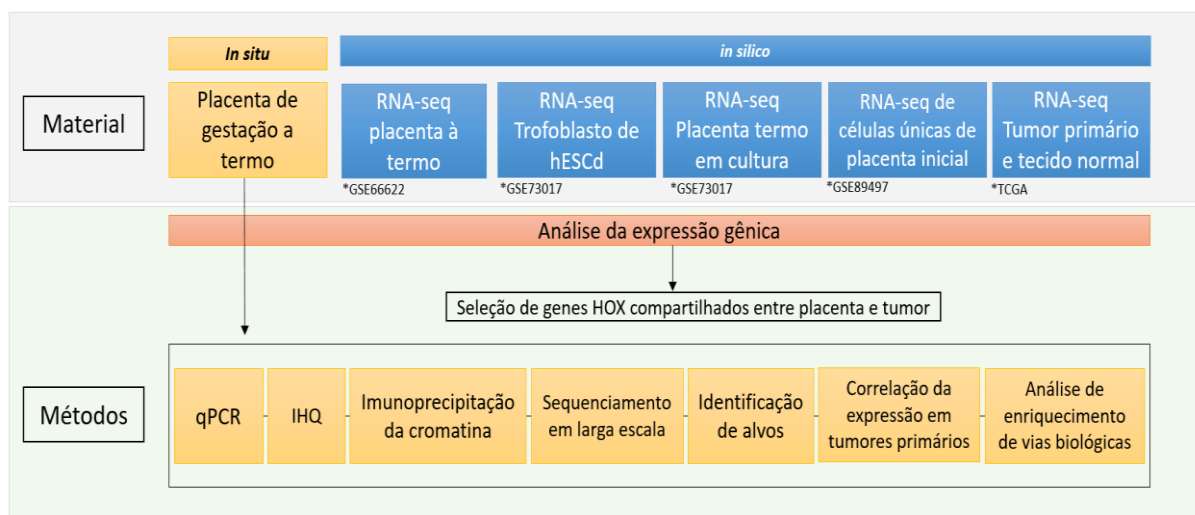


Figura 3. Representação esquemática simplificada do estudo. Visando a caracterização dos genes HOX em tecido placentário e tumoral. qPCR: PCR quantitativa em tempo real; IHQ. Imunohistoquímica (detalhes na metodologia).

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Placenta humana

Foram coletadas 14 amostras de tecido placentário, dentro do terceiro trimestre de gestação, obtidas em colaboração com o Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto – Mater (Tabela 2). O projeto teve aprovação do comitê de ética do HCFMRP/USP, Proc. Número CAAE: 53443416.0.0000.5440 (Anexo 1). Foram considerados como critérios de exclusão todos os casos em que a gestante fosse diagnosticada com: hipertensão arterial, pré-eclâmpsia, diabetes, doença autoimune, placenta prévia ou trabalho de parto pré-termo. Isso se faz necessário para evitarmos qualquer variação do padrão de expressão gênica nas placentas selecionadas para o estudo. Todas as coletas foram realizadas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido das gestantes (Anexo 2).

Imediatamente após a cirurgia cesariana e obtenção da placenta, foi realizado o corte e banho do tecido em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para remoção do excesso de sangue. Em seguida, as amostras foram acondicionadas por duas metodologias distintas: um fragmento de

placenta foi acondicionado em tubo criogênico e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para realizar a extração de RNA (descrito no item 3.2.1. Extração de RNA) e outro fragmento foi preservado em paraformaldeído 4% para inclusão em parafina para ensaio de Imunohistoquímica (descrito no item 3.2.8. Imunohistoquímica).

**Tabela 2. Descrição das amostras de tecido placentário coletados para o estudo.**

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Parto</b>	<b>Tempo de gestação</b>
P01	28	Cesárea	39s
P02	16	Cesárea	42s
P03	27	Cesárea	39s
P04	34	Cesárea	39s1d
P05	22	Cesárea	38s6d
P06	22	Cesárea	39s
P07	31	Cesárea	39s3d
P08	29	Cesárea	39s4d
P09	35	Cesárea	39s2d
P10	23	Cesárea	39s1d
P11	37	Cesárea	39s3d
P12	24	Cesárea	39s4d
P13	26	Cesárea	38s4d
P14	29	Cesárea	39s2d

\* Na coluna tempo de gestação: (s) semanas; (d) dias.

### **3.1.2 Amostras provenientes de bancos de dados públicos**

Foram incorporados ao estudo, os seguintes dados de expressão gênica em larga escala:

- 1) Amostras de placenta a termo, disponíveis na plataforma do *Gene Expression Omnibus* – GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sob número de acesso GSE66622. As amostras incluem 40 placentas a termo de gestantes americanas de diferentes ancestralidades, como descrito em Hughes et al., (2015) (Tabela 3) (HUGHES et al., 2015);
- 2) Transcriptomas de 9 trofoblastos diferenciados a partir de células tronco embrionárias (*hESCd*), 3 amostras controles de células tronco embrionárias não diferenciadas e 18 transcriptomas de placenta a termo. Os dados brutos foram disponibilizados pela base de dados do GEO que apresentam e podem ser encontrados sob o número de acesso: GSE73017. Esses dados foram publicados e disponibilizados por Yabe e colaboradores (2016) (tabela 3) (YABE et al., 2016).
- 3) Resultados brutos de RNA-seq de células únicas (*single-cell*) de amostras de placenta normal de 8 e 24 semanas. As células foram separadas pelos seus diferentes subtipos utilizando o método de isolamento magnético MACS (Cell Isolation Magnetic-activated cell sorting). Dado

publicado por Liu e colaboradores (2018) e disponibilizado na plataforma GEO sob o número de acesso: GSE89497

4) RNA-seq pré-analisado de 19 tumores primários e tecidos normais adjacentes (borda do tumor), disponibilizados pela base de dados do *The Cancer Genome Atlas* – TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) (tabelas 3 e 4).

**Tabela 3. Descrição das amostras utilizadas no presente estudo**

<b>Tecidos</b>	<b>Período</b>	<b>Análise</b>	<b>n</b>	<b>Origem*</b>
<b>Placenta</b>	38-42 semanas	RNA-seq	14	Presente estudo
<b>Placenta</b>	38-39 semanas	RNA-seq	40	GSE66622
<b>Trofoblastos diferenciados de hESC</b>	1º Trimestre	RNA-seq	9	GSE73017
<b>Células tronco embrionárias</b>	-	RNA-seq	3	GSE73017
<b>Placenta em cultura primária</b>	38-40 semanas	RNA-seq	18	GSE73017
<b>Placenta</b>	8 e 24 semanas	RNA-seq células únicas	764 células	GSE89497
<b>Tumor</b>	-	RNA-seq	8600	TCGA
<b>Normal adjacente</b>	-	RNA-seq	761	TCGA

\* Números seguidos das siglas GSE trata-se do código de acesso das amostras no GEO - *Gene Expression Omnibus*; TCGA-*The Cancer Genome Atlas*; hESC – *Human Embryonic Stem Cells*.

**Tabela 4. RNA-seq de 19 tumores primários e tecidos normais adjacentes (borda do tumor), disponibilizados pela base de dados do The Cancer Genome Atlas – TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) (Tabelas 3 e 4).**

<b>Sigla</b>	<b>Tipo Tumoral</b>	<b>Sítio primário</b>	<b>Amostras Normais</b>	<b>Amostras Tumerais</b>
BRCA	Breast Invasive Carcinoma	Mama	113	1102
GBM	Glioblastoma	Cérebro	5	156
LUAD	Lung Adenocarcinoma	Pulmão	59	533
UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma	Útero	35	551
KIRC	Kidney Renal Clear Cell Carcinoma	Rim	72	538
HNSC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	Cabeça/Pescoço	44	500
THCA	Thyroid Carcinoma	Tireóide	58	502
LUSC	Lung Squamous Cell Carcinoma	Pulmão	49	502
PRAD	Prostate Adenocarcinoma	Prostata	52	498
STAD	Stomach Adenocarcinoma	Estômago	32	375
COAD	Colon Adenocarcinoma	Colorretal	41	478
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma	Bexiga	19	414
LIHC	Liver Hepatocellular Carcinoma	Fígado	50	371



CECSC	Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma	Cérvix	35	551
KIRP	Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma	Rim	32	288
SARC	Sarcoma	Tecidos moles	2	259
PAAD	Pancreatic Adenocarcinoma	Pâncreas	4	177
ESCA	Esophageal Carcinoma	Esôfago	11	161
PCPG	Pheochromocytoma and Paraganglioma	Glândula Adrenal	3	178
READ	Rectum Adenocarcinoma	Colorretal	10	166
THYM	Thymoma	Timo	2	199
KICH	Kidney Chromophobe	Rim	24	65
CHOL	Cholangiocarcinoma	Ducto Biliar	9	36

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração de RNA

Para extração de RNA foi utilizado o reagente TRizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com protocolo modificado (HAIMOV-KOCHMAN; FISHER; WINN, 2006). Todo RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue CTC 1547 (GE, Fairfield, CT, USA). Avaliou-se a integridade das amostras por eletroforese em gel de agarose 1% e a ausência de bandas inespecíficas ou rastro de degradação para obtenção de resultados de alta qualidade na PCR quantitativa (Tabela 5).

**Tabela 5. Quantificação e razões de qualidade do RNA extraído das amostras.**

Amostra	Concentração	260/280
P01	86,4	1,8
P02	239,2	1,88
P03	129,6	1,87
P04	215,6	1,96
P05	385,2	1,97
P06	183,6	1,95
P07	204,4	1,93
P08	370	1,94
P09	129,2	2,06
P10	185,9	2,05
P11	74,7	1,98
P12	121,4	2,01
P13	139,4	1,98
P14	121,4	2,03

\*260/280 significa razão de absorvância nesses comprimentos de onda e indica contaminação por proteína ou fenol, sendo o esperado de ~2.0

### **3.2.2 Abordagem *in silico* para identificação do perfil de expressão da família de genes HOX em placenta e linhagens tumorais**

Todos as etapas deste projeto utilizaram a estrutura do Equipamento MultiUsuário (EMU) localizado no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A EMU é um sistema de lotes portátil (Portable Batch System - PBS), que permite o escalonamento dos processos. Esse sistema conta com 11 computadores, todos com o sistema operacional Linux, utilizando a distribuição CentOS Linux versão 7.6.1810 em todos os nós deste *cluster*, onde 10 dos 11 computadores possuem processadores AMD Opteron 6174, com um total de 20 cores e 64GB de memória RAM em cada nó. Para o armazenamento, a EMU conta com três *storages* sendo dois deles de 20TB e um de 32TB de armazenamento, totalizando 72TB de espaço.

Quanto à análise, para determinação do nível de expressão dos 39 membros da família de genes HOX nas amostras de placenta derivadas de dados *in silico*, foram baixados os arquivos brutos (.SRA) na plataforma do *Gene Expression Omnibus*, em cada um dos estudos citados no tópico 3.1.2.

A seleção dos genes mais expressos foi realizada com base na comparação com a média de expressão dos próprios genes HOX dentro do tecido placentário. Para a análise dos tecidos tumorais, a expressão dos genes HOX levou em consideração os níveis de expressão dos tecidos normais equivalentes. O objetivo desta abordagem é identificar os genes HOX com altos níveis de expressão em placenta e avaliar a expressão destes em tecido tumoral primário. Segue abaixo a descrição do método de análise realizado em cada conjunto de dados que foram utilizados para seleção dos genes HOX.

### **3.2.3 RNA-seq de placenta a termo - GSE66622**

Os dados de sequenciamento de RNA foram produzidos com a plataforma Illumina Genome Analyzer Iix. Foram baixados os arquivos com extensão SRA (*Sequence Read Archive*) que em seguida foram convertidos para o formato fastq, onde iniciou-se a análise com a filtragem de *reads* sequenciadas quanto à qualidade, com o uso da ferramenta FastQC (Andrews S., 2010). (FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

A qualidade da chamada de bases foi avaliada pela escala de qualidade Phred (valor Q). Em geral, o score Q foi avaliado acima de 20, o que expressa uma probabilidade de 99,9% de que a chamada de bases esteja correta. Para remoção de bases e *reads* de má qualidade, foi feito

o processo de trimagem utilizando a ferramenta Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). As *reads* filtradas foram mapeadas contra o genoma humano referência (GRCh37/hg19) com o algoritmo “Tophat” v.2.0.3 (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) que alinha as *reads* de RNA-Seq contra o genoma e analisa os resultados de mapeamento para identificar junções de splicing entre os éxons. Para a estimativa de abundância de transcritos, normalização e análise de expressão diferencial foi utilizado o Cufflinks, que apresentou valores de abundância relativa em FPKM – *Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped* (TRAPNELL et al., 2010).

#### **3.2.4 RNA-seq de placenta de estágios iniciais e termo - GSE73017**

O sequenciamento de RNA disponibilizado foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500. Os dados brutos foram baixados em arquivos com extensão SRA (*Sequence Read Archive*) que em seguida, foram convertidos para arquivos de formato fastq, com o SRA *toolkit* do NCBI. A qualidade das bases chamadas no sequenciamento também foi verificada com o software FastQC, como citado no tópico anterior. Para remover as *reads* ou bases com escore Q inferior a 20, foi utilizado o Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). O mapeamento e alinhamento contra o genoma referência (GRCh38/hg38) foi realizado utilizando-se o software STAR, que alinha as *reads* de RNA-Seq contra o genoma e analisa os resultados de mapeamento para identificar junções de splicing entre os éxons (DOBIN et al., 2013). Para a estimativa de abundância de transcritos, normalização e a análise de expressão diferencial entre os grupos biológicos, utilizamos o DESeq2 e o pacote Limma do R/Bioconductor (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014; RITCHIE et al., 2015).

#### **3.2.5 Sequenciamento de RNA de células únicas de tecido placentário - GSE89497**

As amostras de placenta foram isoladas utilizando a tecnologia MACS (magnetic-activated cell sorting) e sequenciadas em equipamento Illumina HiSeq4000 com *reads* de 150-bp no modo *paired-end*. O controle de qualidade foi realizado utilizando o FastQC e MultiQC, e foi realizada a passagem por filtro de qualidade, para capturar as *reads* com *Phred score* maior que 20, utilizando o *software* Trim Galore!. As *reads* filtradas foram mapeadas e alinhadas ao genoma de referência (GRCh38/hg38) e, por fim, foi realizada a quantificação das *reads*, gerando a tabela de contagem com o *software* STAR.

A partir do dado de contagem foi utilizado o pacote Seurat para realizar as análises de expressão diferencial (BUTLER et al., 2018). Os dados foram normalizados, escalonados,

foram encontrados os genes mais variáveis e realizada a redução de dimensão para uma melhor visualização da distribuição das células (UMAP - *Uniform Manifold Approximation and Projection*). Por fim, o *Heatmap* com os genes HOX foi feito utilizando o dado previamente normalizado pelo método de log.

### 3.2.6 RNA-seq de tecido tumoral primário – TCGA

Os dados de RNA-seq dos tecidos normais e tumorais primários foram coletados do banco de dados público TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) na versão *legacy* com referência genômica hg19. O sequenciamento de RNA foi realizado na plataforma Illumina HiSeq nível 3 - Illumina RNASeq V2 do TCGA que possui as contagens brutas de expressão gênica derivada do programa RSEM. Para cada tumor primário identificamos o perfil de alteração da expressão dos genes da família HOX em relação aos tecidos normais. Desta forma, foram realizadas as análises de expressão diferencial entre amostras normais adjacentes ao tumor e tumorais com o pacote R/Bioconductor EdgeR (Robinson et al., 2010) pelo método modelos lineares generalizados. Os genes com o p-valor ajustado ao *False Discovery Rate* (FDR) menor que 0,01 foram determinados como genes diferencialmente expressos. Os gráficos *heatmaps* foram gerados utilizando o pacote R/Bioconductor ComplexHeatmap com distância Correlação de Pearson e Clusterização Hierárquica ward.D2.

As informações de expressão gênica em tecido tumoral primário do TCGA foram feitas em colaboração com o projeto de mestrado da Bioinformata Jessica Rodrigues Praça que teve seu mestrado concluído no ano de 2017.

### 3.2.7 PCR quantitativa para análise da expressão gênica

Realizamos o método de PCR quantitativa em tempo real para validação da expressão dos genes HOX selecionados pelo critério descrito no item 3.2.1 e também para o experimento piloto que comprovasse a expressão dos genes HOX em tecido de placenta.

Na avaliação da expressão gênica feita por RT-qPCR, o RNA extraído das 14 amostras (Tabela 5) foi convertido em cDNA utilizando o Kit High Capacity (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) nas condições recomendadas pelo fabricante, em termociclador Verity (Applied Biosystems). O cDNA das amostras foi submetido à reação de PCR em tempo real, com sondas Taqman (Applied Biosystems) específicos para cada gene (número dos ensaios: HS.PT58.22565110 para o *HOXA13*, HS.PT58.21258578g para o *HOXB2*, HS.PT58.2090493 para o *HOXB3*). Todas as reações foram realizadas em triplicata, com cDNA diluído (1:5) em

equipamento de tempo real Applied Biosystems 7500 *Fast Real-Time PCR System*, com o seguinte ciclo: 94°C (5 min), seguidos de 35 ciclos de 95°C (1 min), 58°C (1 min), 72°C (1min).

Para o cálculo de expressão foi utilizado o índice  $2^{-\Delta Ct}$ , onde o  $\Delta Ct$  corresponde à diferença entre a média do Ct das replicatas do transcrito alvo e a média do Ct do transcrito normalizador (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). O controle endógeno foi escolhido com base em testes de 2 genes expressos constitutivamente, nas mesmas condições citadas acima.

### **3.2.8 Imunohistoquímica**

A análise imunohistoquímica foi realizada como teste piloto com a finalidade de avaliar o perfil de expressão de um membro da família HOX nos diferentes tipos celulares da placenta.

Resumidamente, os tecidos de placenta foram fixados em solução de formol e incluídos em parafina para a realização dos cortes histológicos e fixação em lâminas. Em seguida, os cortes foram incubados em solução com anticorpo primário e secundário da marca Abcam® (específico para o gene HOXD10 - ab172865) e posterior revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e análise em microscópio convencional.

### **3.2.9 Imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq)**

A ligação do HOX (fator de transcrição) aos seus alvos no genoma humano, em tecido placentário, foi avaliada por meio de ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) seguida de sequenciamento (Figura 4).

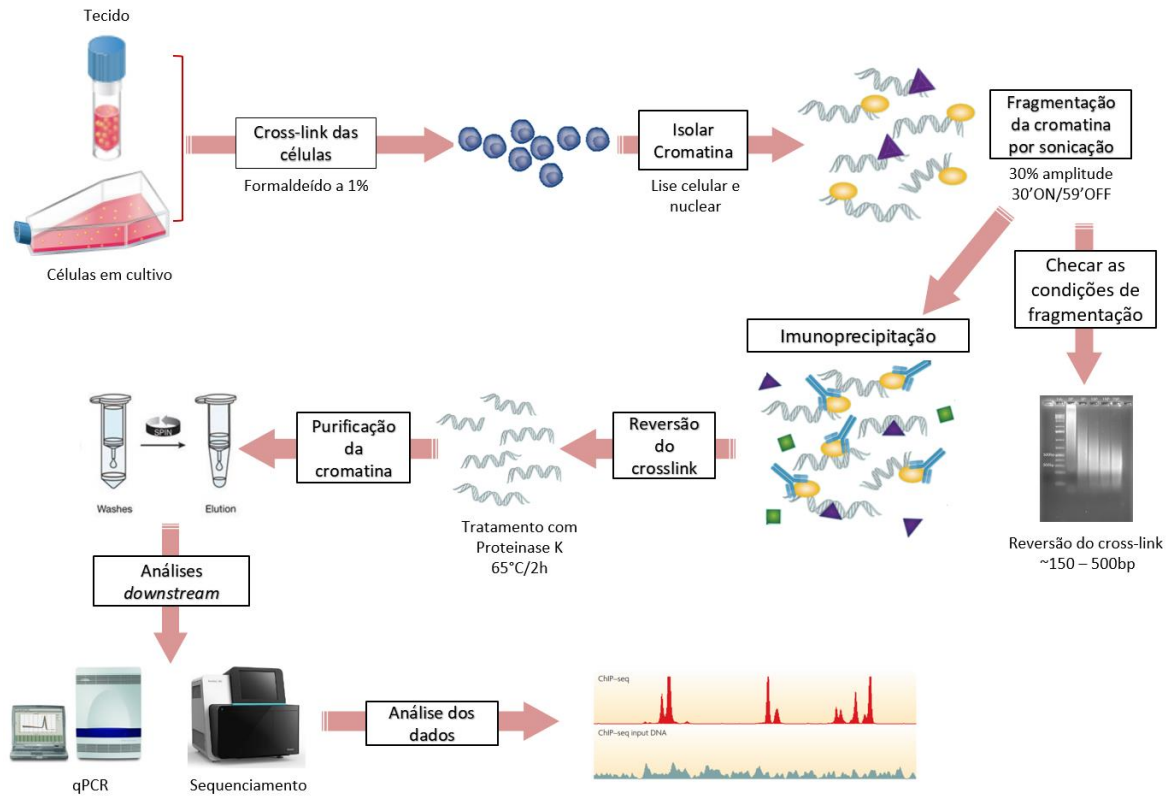


Figura 4. Etapas da metodologia de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq).

### 3.2.9.1 Preparação da cromatina

Inicialmente, 200 mg de tecido de placenta congelado foi macerado e homogeneizado em solução tampão fosfato-salino (PBS 1X) utilizando o homogeneizador Polytron® (Kinematica AG, modelo PT MR 2100). Em seguida, a amostra foi tratada com formaldeído (Sigma-Aldrich, Cat.No F8775, Steinhein, Alemanha) na concentração final de 1% (v/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. Dessa forma, ocorre a fixação das proteínas que estão associadas à cromatina, processo conhecido como *cross-link*. A neutralização das ligações covalentes é feita com a solução de glicina a 125 mM por 5 minutos em temperatura ambiente e com leve agitação.

Após este período, foram realizadas as etapas de lavagem em PBS 1X, com a adição da solução de Coquetel Inibidor de Protease (Sigma-Aldrich, Cat.No P2714) em proporção de 1/200 (v/v) seguido de centrifugação. O *pellet* de células foi congelado à -80°C.

Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão de lise celular (Millipore, Cat.No CS200634), com a adição do coquetel inibidor de protease II (1/200) por 30 minutos. Nesse intervalo de tempo utilizou-se na amostra um gradiente de seringas e agulhas (16G, 21G e 26G) para facilitar a desagregação das células e ação dos tampões. Depois, foram centrifugadas à 1000g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

O material foi eluído em 500uL de tampão de lise nuclear (Millipore, Cat.No CS200623) para que ocorra a liberação da cromatina. Após essas etapas, as amostras foram submetidas ao processo de fragmentação da cromatina por sonicação, no aparelho Vibra-Cell™ Ultrasonic modelo VCX-130 com 22 pulsos de 30 segundos (30% de amplitude), com intervalos de 59 segundos em descanso, sempre no gelo.

Os materiais fragmentados foram centrifugados a 10.000G por 7 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo. Após a sonicação, foi realizada uma etapa de checagem das condições da fragmentação, onde é feita a reversão do cross-link, em que um volume de 20ul de amostra é submetido ao processo de digestão com Proteinase K (20mg/mL) (Merck, Cat.No 539480) e aplicação em gel de agarose 2% em tampão TEB 1x (89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2 mM EDTA), corado com brometo de etídeo e corridos à 90 volts em cuba de eletroforese, para avaliar o tamanho dos fragmentos (Figura 17).

Para chegar ao resultado esperado do tamanho esperado dos fragmentos da cromatina, vários testes foram feitos, alterando variáveis, como por exemplo: quantidade de amostra e de reagentes, concentração de formaldeído e tempo de fixação, reagentes de lise e quantidade dos mesmos, equipamento, tempo e amplitude de sonicação.

Após a otimização do experimento, foram testados de 5 a 30 pulsos de sonicação para avaliar qual seria o ideal para o tamanho de fragmentos entre 200 e 500 pares de bases (Figura 17a).

### **3.2.9.2 Imunoprecipitação da cromatina**

A etapa de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) foi realizada com o kit comercial Magna ChIP™ G (Cat.No 17-611) e do kit EZ-Magna ChIP™ G (Cat.No 17-409) (Millipore) de acordo com as recomendações do fabricante (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Inicialmente, anticorpos foram incubados com as com *beads* magnéticas revestidas com proteína G, overnight a 4°C, em rotação. A imunoprecipitação foi realizada usando 6ug dos anticorpos específicos para capturar as proteínas *hoxa13*, *hoxb2* e *hoxb3* (Tabela 6). Também foi realizada a imunoprecipitação com 5ug de anticorpo para os controles positivo – anti-histona H3 e controle negativo – anti-IgG. Após a ligação da *bead* magnética com o anticorpo específico, foi adicionado 180ul de cromatina fragmentada e foi incubado overnight a 4°C em rotação.

Após essas incubações, forma-se um complexo de bead magnética, anticorpo e fragmento de DNA alvo. Com a ajuda de uma estante magnética (Dynal MPC®S Magnetic Particle

Concentrator, Prod.No 120.20), retirou-se o sobrenadante e em seguida foram realizadas quatro lavagens para remoção dos fragmentos que não se ligaram ao complexo anticorpo-bead. Seguindo as recomendações do fabricante, adicionou-se 500ul dos seguintes tampões: *Low Salt Immune Complex Wash Buffer*, *High Salt Immune Complex Wash Buffer*, *LiCl Immune Complex Wash Buffer* e por último, *TE Buffer*. Em seguida, adicionou-se 100ul de tampão de eluição acrescido de proteinase K (1ug/ul) e incubou-se a 65°C por 3 horas e 95°C por 10 minutos sob agitação. Com ajuda dos ciclos de temperatura, os fragmentos tiveram o *cross-link* “revertido” por ação enzimática da Proteinase K (20mg/mL) (Merck, Cat.No 539480), com a digestão de todas as proteínas que antes estavam ligadas aos seus sítios alvos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as esferas magnéticas foram separadas do sobrenadante com ajuda da estante magnética. Cada sobrenadante com os fragmentos de DNA imunoprecipitados (inclusive *inputs*), foi transferido para um novo microtubo. Para o passo seguinte, foi realizado a purificação e eluição do DNA resgatado com o uso de colunas (Spin Filters com Collection Tubes, Millipore, Cat.No 20-190 e Cat.No 20-291). Após a eluição do DNA, foram quantificadas as amostras em fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

**Tabela 6. Descrição dos anticorpos utilizados na imunoprecipitação.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nº catálogo</b>	<b>Clonalidade</b>	<b>Espécie</b>
Anti- <i>HOXA13</i>	Abcam	ab220390	Policlonal	Coelho
Anti- <i>HOXB2</i>	Abcam	ab83404	Policlonal	Coelho
Anti- <i>HOXB3</i>	Abcam	ab106503	Policlonal	Coelho
Anti-Trimetil-H3 (Lis4)	Merck	Cs200580	Policlonal	Coelho
Anti-Imunoglobulina G	Merck	Cs200581	Policlonal	Coelho

### 3.2.9.3 Preparação da biblioteca e sequenciamento em larga escala

A preparação da biblioteca foi realizada utilizando-se o TruSeq® *ChIP Sample Preparation Kit* (Illumina®) de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo de preparação da biblioteca é otimizado a trabalhar com 5 a 10ng de DNA imunoprecipitado, com fragmentos de 200 a 800 pares de bases.

Em nosso experimento, foram utilizados 5ng de cada amostra com fragmentos em torno de 400-500 pares de bases (Tabela 7 e Figura 17). A concentração das amostras fragmentadas foi quantificada com o uso do fluorômetro Qubit, utilizando o kit *Qubit dsDNA HS assay* (Thermofisher Inc.) (Tabela 7).

A primeira etapa da preparação da biblioteca consiste em fazer o *End Repair* desses fragmentos, que significa que as pontas soltas, resultantes do processo de sonicação, foram convertidas em pontas complementares. Em seguida, as pontas 3' desses fragmentos recebem



um único nucleotídeo adenina, em um processo denominado adenilação, que previne que esses fragmentos se liguem entre si durante a etapa seguinte, de ligação dos adaptadores. Os adaptadores, que são oligonucleotídeos que fazem a ligação de cada fragmento de DNA com a *flow cell*, possuem um nucleotídeo timina em uma de suas extremidades, para garantir a eficácia do pareamento.

Em seguida, os fragmentos de DNA que possuem uma molécula adaptadora em sua extremidade foram enriquecidos pelo processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para que isso ocorra, foi utilizado um coquetel de primers que se anelam ao final dos adaptadores. Aqueles fragmentos que não possuem adaptadores ligados ou que possuem adaptadores em apenas uma das pontas não foram hibridados na *flow cell* ou não formaram *clusters*, respectivamente. Além disso, esses fragmentos não foram enriquecidos pela PCR.

Para garantir que a biblioteca preparada possuía fragmentos do tamanho esperado (~350pb), foi avaiado o perfil dos fragmentos de cromatina com o sistema de microchip de eletroforese capilar AGILENT 2100 Bioanalyzer, com o kit *DNA 1000 Chip* (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) (Figura 18). Após a validação da biblioteca, foi realizada uma normalização para 10nM de cada biblioteca para então serem sequenciadas. O sequenciamento das amostras foi realizado no modo paired-end com 150 ciclos no equipamento NextSeq® 550 (Illumina) com o uso do Kit NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (300 cycles) (Illumina) que se fundamenta na tecnologia *sequencing by synthesis* (SBS). Resumidamente, o sequenciamento é composto por 3 etapas:

1. Ligação dos fragmentos de DNA à *flow cell*. A *flow cell* é uma lâmina de vidro onde os *clusters* são gerados e o sequenciamento é realizado. Neste substrato existem 4 canais (*lanes*) com milhares de óligos fixados que são complementares aos adaptadores que foram adicionados à biblioteca de DNA. O pool de bibliotecas é adicionado à um cartucho de sequenciamento e ocorre a transferência automática do pool às quatro *lanes* da *flow cell*, onde os fragmentos são hibridados;
2. Clusterização. Uma enzima polimerase cria um complemento do fragmento que foi hibridado e os fragmentos sofrem amplificação clonal por meio de amplificação em ponte, formando *clusters* de fragmentos idênticos;
3. Sequenciamento por síntese (*Sequencing By Synthesis* – SBS). O sequenciamento começa com a extensão do primeiro primer, para produzir a primeira read. A cada ciclo de sequenciamento, nucleotídeos marcados com fluorescência competem pela

incorporação à cadeia crescente, que utiliza como molde o fragmento hibridado anteriormente. Os dNTPs são adicionados um a um e, a cada adição, é captado um sinal de fluorescência característico, o que permite ao equipamento identificar a chamada de bases.

#### 3.2.9.4 Análise bioinformática do ChIP-seq

Após a obtenção dos dados brutos, o primeiro passo foi avaliar a qualidade do sequenciamento para cada *lane* do sequenciamento. Por meio da nuvem de gerenciamento de dados da plataforma Illumina (*BaseSpace*, disponível em: <https://basespace.illumina.com>), foi possível identificar algumas métricas de qualidade do sequenciamento. Além disso, utilizamos o programa FastQC, como ferramenta para o controle de qualidade dos dados de sequenciamento. As extremidades das *reads* que estavam com qualidade inferior foram trimadas utilizando o software Trim Galore! ([http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)), com uso do parâmetro “quality 30” que remove os adaptadores e aparas as extremidades, removendo as bases com um valor de Q (*Phred Score*) inferior a 30. Também foi aplicado o parâmetro “length 35”, que remove *reads* com tamanhos menores que o especificado. O mapeamento das *reads* ao genoma referência (versão GRCh38/hg38) foi realizada com o uso da ferramenta Burrows-Wheeler Alignment- BWA (LI; DURBIN, 2009). Com o arquivo de saída do BWA, foi avaliada a qualidade do mapeamento com a ferramenta Samtools (LI et al., 2009). Em seguida, os arquivos com as *reads* mapeadas foram convertidas ao formato binário “BAM”, que foram ordenados com a ferramenta Samtools e tiveram as duplicatas de PCR marcadas com a ferramenta MarkDuplicates do Picard. As *reads* consideradas como duplicadas podem surgir devido a problemas na preparação da biblioteca ou na geração dos *clusters* e são artefatos que subestimam a complexidade da biblioteca de DNA, portanto devem ser removidas da análise. A junção das lanes para cada amostra sequenciada foi feita com a ferramenta Samtools e após essa junção marcou-se as *reads* duplicatas de PCR novamente.

A chamada dos picos foi efetuada com o uso da ferramenta Model-based Analysis of ChIP-seq (MACS2), que visa identificar as regiões enriquecidas no sequenciamento levando em consideração a complexidade do genoma (ZHANG et al., 2008). As métricas de qualidade para o dado de ChIP-seq foram acessadas com o pacote CHIPQC (versão 1.18.2) do Bioconductor, que computa uma variedade de informações de qualidade e estatística, fornecendo um relatório e gráficos que permitem ter uma visão do comportamento dos dados (CARROLL et al., 2014).

Em seguida, foram realizados dois tipos de filtragens, de forma independente. Inicialmente, selecionamos apenas os picos que se sobrepunham à regiões de DNase, e em seguida, seguindo protocolo estabelecido pelo ENCODE, realizamos a análise de reprodutibilidade entre as réplicas biológicas (IDR – *Irreproducible Discovery Rate*) (LANDT et al., 2012) com o pacote ChIPpeakAnno do Bioconductor (ZHU et al., 2010). Para identificar as regiões alvos das proteínas de interesse, as coordenadas dos picos foram anotadas com o pacote ChIPseeker do R/Bioconductor (YU; WANG; HE, 2015) a partir do arquivo General Transfer Format (GTF) do Ensembl versão 97 com os parâmetros “-k 10” “-D b” “-a com os arquivos de extensão .narrowPeak” gerados com o MACS2.

### **3.2.10 Análise de enriquecimento de vias biológicas para os alvos totais identificados no ChIP-seq**

Com os alvos identificados no ChIP-seq foram realizadas análises de enriquecimento de vias biológicas segundo o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). As análises apresentadas nos resultados foram realizadas por plataformas online. Para a análise de enriquecimento dos alvos totais identificados, o enriquecimento de vias foi realizado com ajuda da ferramenta WebGestalt (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*), disponível em: <http://www.webgestalt.org/>. Os parâmetros utilizados na ferramenta foram: *Homo sapiens* (organismo), Over-representation analysis (Método), KEGG na função *Pathway* (banco de dados), *genome protein-coding* (Conjunto de referência) e foram filtrados os genes com  $FDR < 0,05$ .

### **3.2.11 Correlação da expressão dos genes HOX e seus alvos nos dados de RNA-seq dos tumores primários do TCGA e análise de enriquecimento para esse conjunto de alvos**

Para melhor caracterizar o papel dos genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* na tumorigênese, foi avaliada a correlação de expressão entre os genes HOX e seus alvos identificados no estudo em tumores onde esses genes estavam altamente expressos. Para essa avaliação, foi calculada o coeficiente de correlação de Pearson que mede o grau e a direção da correlação (representado pelo valor de R, variando entre -1 e 1). Consideramos como altamente correlacionados, os genes alvos com R menor que -0,5 e maior que 0,4. Os tumores selecionados e a quantidade de alvos correlacionados estão descritos nos resultados. A análise de enriquecimento para esse alvos correlacionados em tumor, foi realizada pela ferramenta NetworkAnalyst 3.0 (ZHOU et al.,

2019). Essa ferramenta permitiu a análise de enriquecimento com o banco de dados KEGG e a análise de interação de proteínas utilizando os bancos de dados IMEx interactome ou STRING interactome. Os filtros utilizados para as interações estão descritos nas legendas das redes. Além disso, algumas análises foram realizadas com genes com correlação acima do valor inicial estabelecido, na tentativa de filtrar aqueles que podem apresentar maior impacto na tumorigênese. Para isso, o coeficiente de correlação de Pearson utilizado foi menor que -0,6 ou maior que 0,6.

### **3.2.12 Análises estatísticas gerais**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico GraphPad Software (versão 8.0, para Windows, San Diego, CA, USA) ou com o Programa R, versão 3.5.2 (R *Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria). Quando  $p < 0,05$  a hipótese nula foi rejeitada.

## 4 Resultados

### 4.1 Padronização da técnica de extração de RNA a partir de tecido placentário congelado

As amostras de placenta coletadas para esse estudo passaram por uma padronização de extração de RNA para que possibilitasse uma menor degradação do material e contaminação por reagentes. Diferentes métodos de extração foram testados, incluindo extração por kit: illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) e com uso do reagente TRizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A extração com o KIT AllPrep (QIAGEN) foi o que apresentou os melhores resultados. Abaixo, segue a análise de integridade do RNA extraído de um conjunto de amostras.

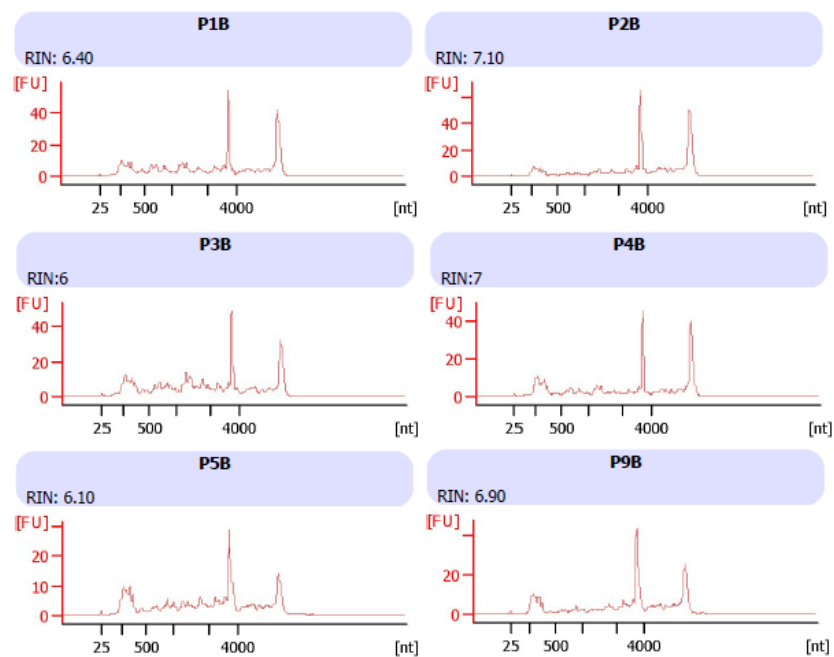


Figura 5. Análise de integridade do RNA extraído de amostras de placenta à termo. RIN: RNA integrity number.

## 4.2 Experimentos pilotos para avaliação inicial da expressão gênica e expressão proteica de membros da família HOX.

Com a finalidade de avaliar o perfil geral de expressão de membros da família HOX em tecido placentário para o melhor delineamento do projeto de pesquisa, realizamos análises iniciais do perfil de expressão dos transcritos de alguns genes da família HOX em tecido placentário a termo, foi realizado um teste piloto com 5 sondas para os genes HOXA10, HOXC8, HOXC9, HOXC13 e HOXD11 em 10 amostras de placenta. Os dados de Integridade do RNA utilizado e o teste para seleção do melhor controle endógeno estão descritos no apêndice 1 e figura 5, respectivamente. O gene TBP foi selecionado por apresentar menor variação entre as amostras (Figura 6).

Em análise inicial por RT-qPCR, confirmamos que há expressão dos genes HOX nos tecidos placentários. Foi observado que os genes *HOXC8* e *HOXA10* estão mais expressos nas amostras de placenta quando comparados aos *HOXC9*, *HOXC13* e *HOXD11* (Figura 7). Esse perfil se manteve quando avaliamos o padrão de expressão dos HOX por semana de gestação (Figura 8).

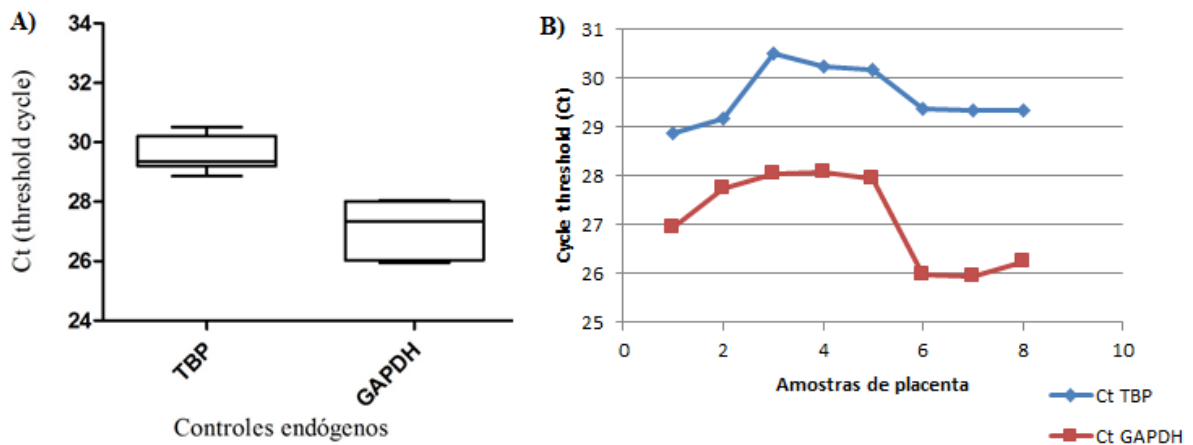
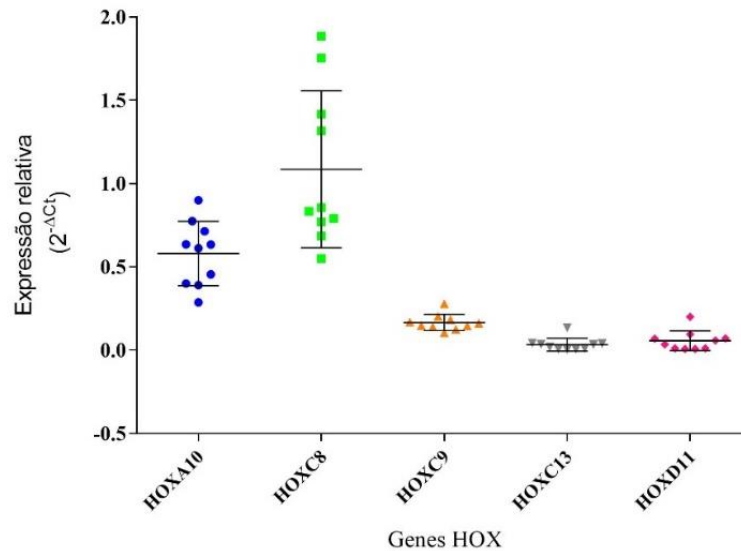
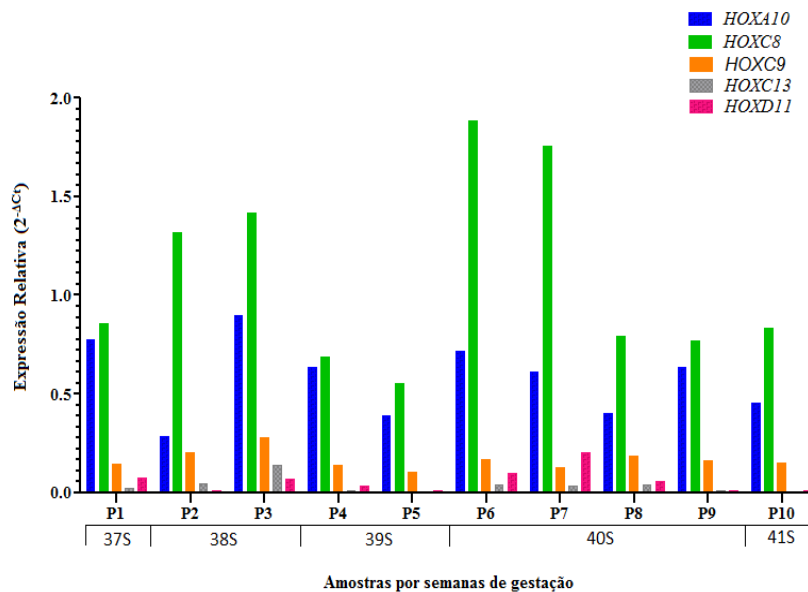


Figura 6. Teste de controles endógenos por RT-qPCR em amostras de placenta em formato boxplot. (A) e gráfico de pontos (B) para mostrar a variação entre as amostras.

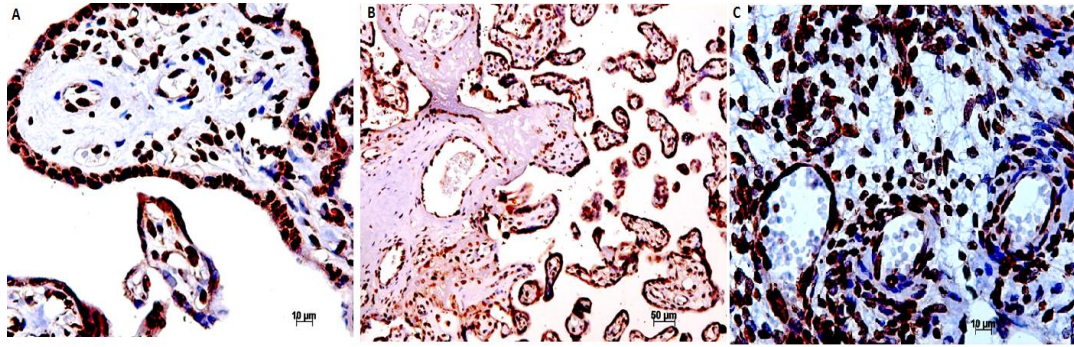


**Figura 7. Expressão relativa.** Piloto da análise de expressão de cinco genes HOX em 10 amostras de placenta a termo.



**Figura 8. Expressão relativa dos genes HOX.** Amostras de placenta separadas por semanas de gestação, 37 a 41 semanas (eixo x).

Para avaliar se a expressão do produto proteico do gene HOX ocorre em um subtipo específico de células que compõem a placenta, foi realizado um experimento piloto de imunohistoquímica com anticorpo específico para detectar expressão do gene HOXD10 em 3 amostras parafinadas, foram utilizadas as mesmas amostras de placenta das análises de expressão relativa, que haviam sido previamente incluídas em parafina. Utilizou-se tecido ovariano como controle positivo da reação. Ambos os tecidos apresentaram marcação positiva para o anticorpo utilizado nos diferentes subtipos celulares, não demonstrando especificidade (Figura 9).



**Figura 9. Teste piloto de imunohistoquímica.** Avaliação da expressão proteica do HOXD10 em amostras de placenta. (A e B) marcação imunorreativa positiva em amostras de placenta humana a termo fixada em parafina; (C) tecido ovariano fixado em parafina utilizado como controle positivo da reação (lentes objetivas de 10X, 10X, 40X respectivamente).

### 4.3 Perfil de expressão da família de genes HOX e seleção dos genes candidatos

A fim de compreender melhor a expressão dos genes HOX e obter dados para a seleção de genes envolvidos com o processo tumoral, dois conjuntos de amostras biológicas diferentes foram analisadas quanto à expressão transcricional: tecido placentário e tecido tumoral primário.

#### 4.3.1 Análise *in silico* da expressão gênica em tecido placentário

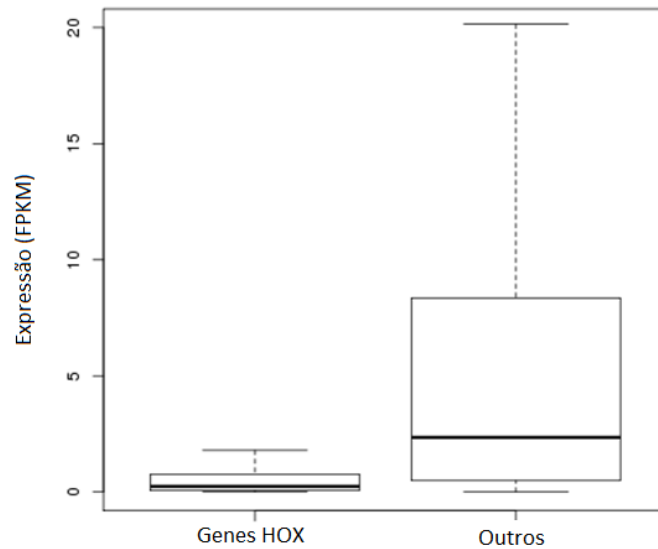
##### 4.3.1.1 Sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) de placenta a termo (GSE66622)

Nesse conjunto de dados, a análise de expressão dos genes HOX em amostras de placenta, foi realizada com o uso de resultados brutos do sequenciamento de RNA de 40 amostras, contidos no repositório do *Gene Expression Omnibus* – GEO (HUGHES et al., 2015).

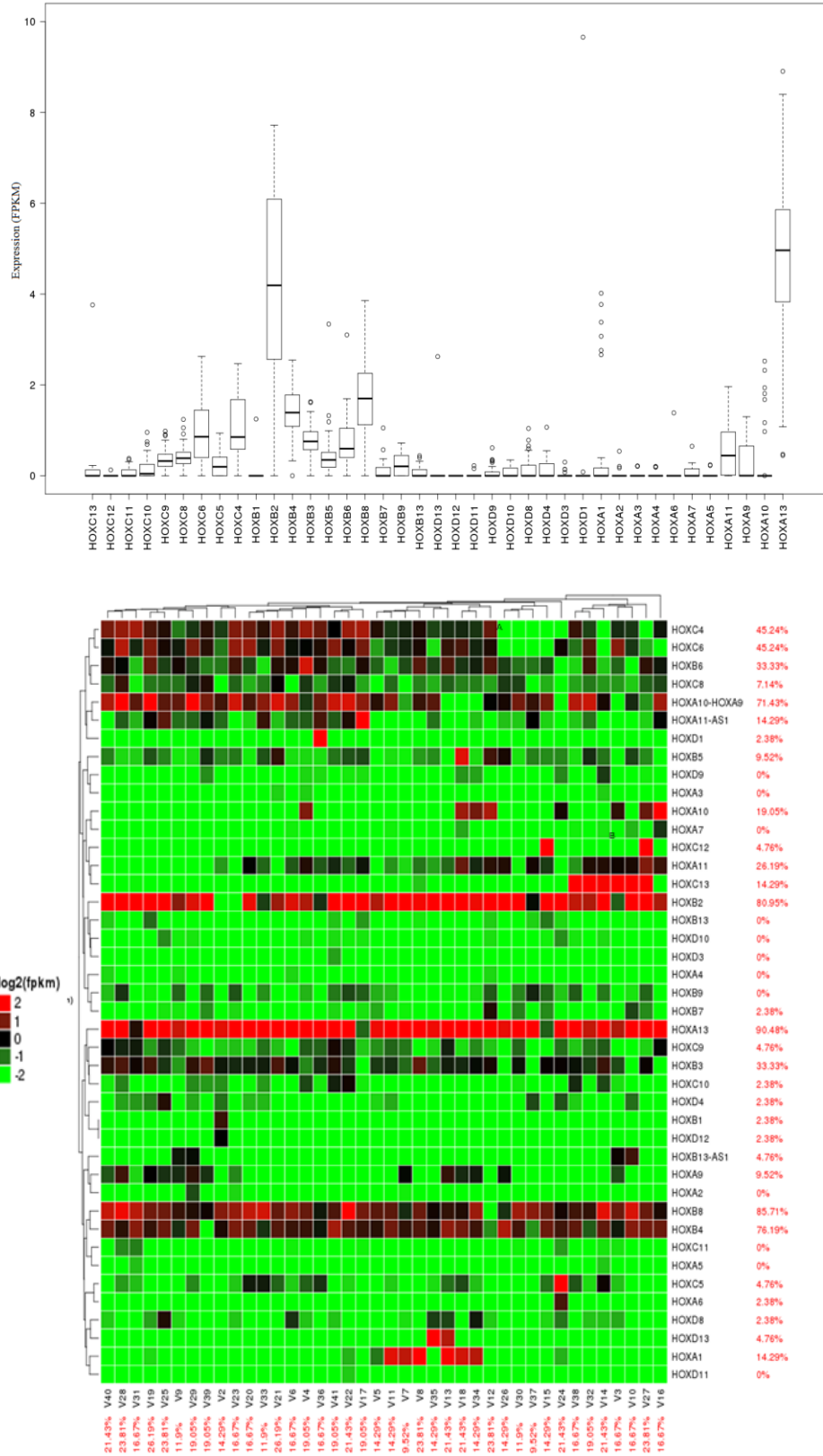
Em geral, o score Q estava acima de 30, o que expressa uma probabilidade de 99,9% de que a chamada de bases esteja correta. Foram obtidas 168 milhões de *reads* no total e em média 77,60% das *reads* foram mapeadas (apêndice 2). Na análise de expressão, a quantificação dos transcritos normalizada em FPKM, revelou que o perfil de expressão da família dos genes em estudo, comparamos o conjunto total de transcritos das amostras com os 39 membros, e constatamos que a expressão destes é mais baixo que a média de todos os outros transcritos (Figura 10). Além disso, dentre os 39 genes que compõem a subfamília de genes HOX, quatro deles apresentaram maior nível de expressão, com pelo menos 75% das amostras apresentando expressão com *fold change* positivo: *HOXA13* (90,48% das amostras), *HOXB2* (80,95% das amostras), *HOXB8* (85,71% das amostras), e *HOXB4* (76,16% das amostras) (Figura 11). A



seleção dos genes mais expressos foi realizada com base na comparação com a média de expressão dos próprios genes HOX dentro do tecido placentário. Do total de genes avaliados, nessa análise elegemos como possíveis candidatos, os genes com a mediana do FPKM  $> 4$  (*HOXA13* e *HOXB2*).



**Figura 10. Expressão gênica global em FPKM.** Boxplot da análise *in silico* obtida com dados de sequenciamento de RNA. Comparação entre a expressão dos genes HOX e todos os outros transcritos em 40 amostras de placenta a termo (Dados disponíveis no GEO: GSE66622).



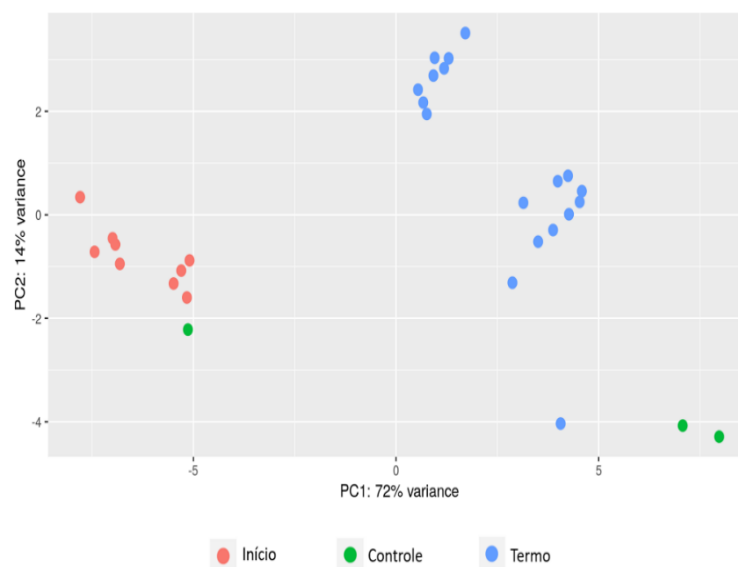
**Figura 11. Expressão gênica dos 39 HOX em 40 placentas humanas a termo.** (A) *Boxplot* e (B) *Heatmap* da expressão das amostras, ambas normalizadas em FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*). No *heatmap*, coluna vermelha significa porcentagem de amostras com alta expressão de genes HOX. Linha vermelha, porcentagem de genes *hox* com alta expressão naquela amostra. Análise *in silico* de RNA-seq disponível na base de dados do GEO - *Gene Expression Omnibus* (GEO: GSE66622).

#### 4.3.1.2 Sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) de placenta em estágio inicial e termo (GSE73017)

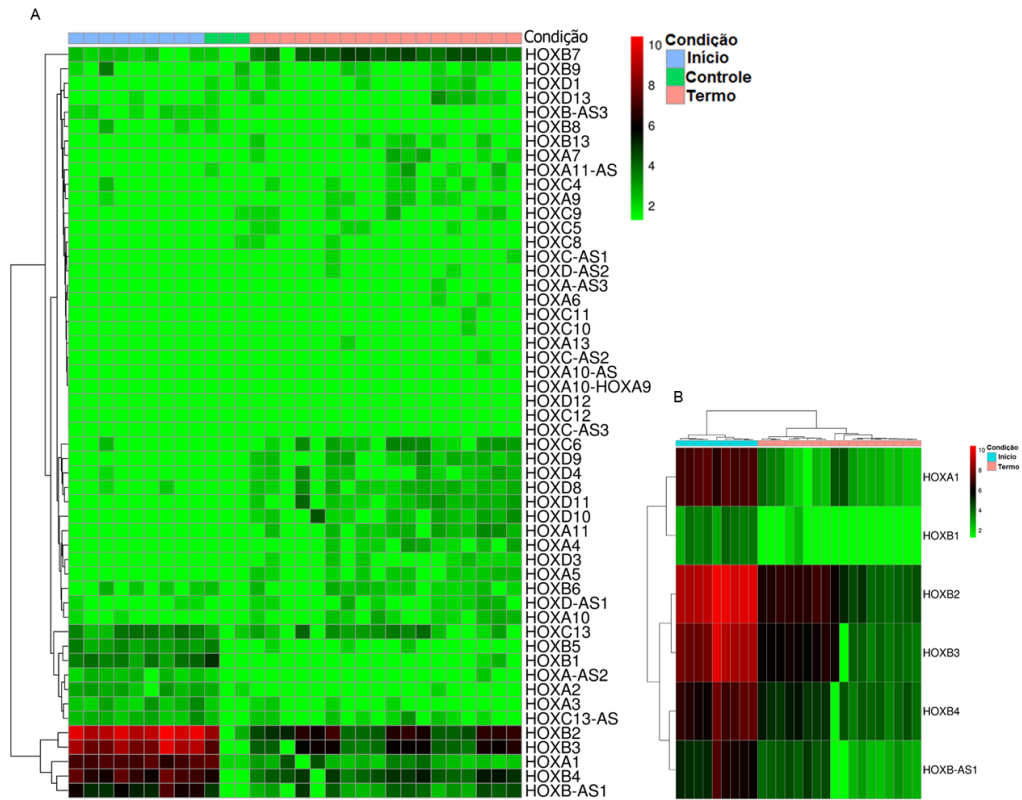
Para avaliar se a expressão dos genes HOX apresenta variação entre os estágios de desenvolvimento placentário e corroborar nossos dados de expressão gênica, foram utilizados dados de 30 transcriptomas retirados do repositório do *Gene Expression Omnibus* – GEO (tabela 3). Em uma análise de componentes principais com essas amostras, observamos que ocorreu uma segregação entre os grupos de trofoblasto a termo (Termo) e sinciciotrofoblasto inicial (Início), quanto ao valor de expressão dos genes HOX. Além disso, o grupo a termo apresenta-se com maior variação entre as amostras em comparação ao grupo de células do início do desenvolvimento placentário, separando-se em dois grupos (Figura 12)

A análise de expressão diferencial revelou que existe variação em genes HOX específicos, entre os grupos biológicos. Dentre os 39 genes HOX que compõem a família HOX, 5 deles estão com expressão aumentada nos sinciciotrofoblastos iniciais quando comparados às amostras de placenta à termo ( $p < 0,05$ ). São eles: *HOXA1*, *HOXB1*, *HOXB2*, *HOXB3* and *HOXB4*. Além desses, um antisenso do cluster B, *HOXB1-AS1* também apresentou expressão aumentada (Figuras 13 e 14). Dentre os 5 HOX diferencialmente expressos, os genes *HOXB2* e *HOXB3* se destacaram por apresentar expressão mais acentuada (Figuras 13b e 14).

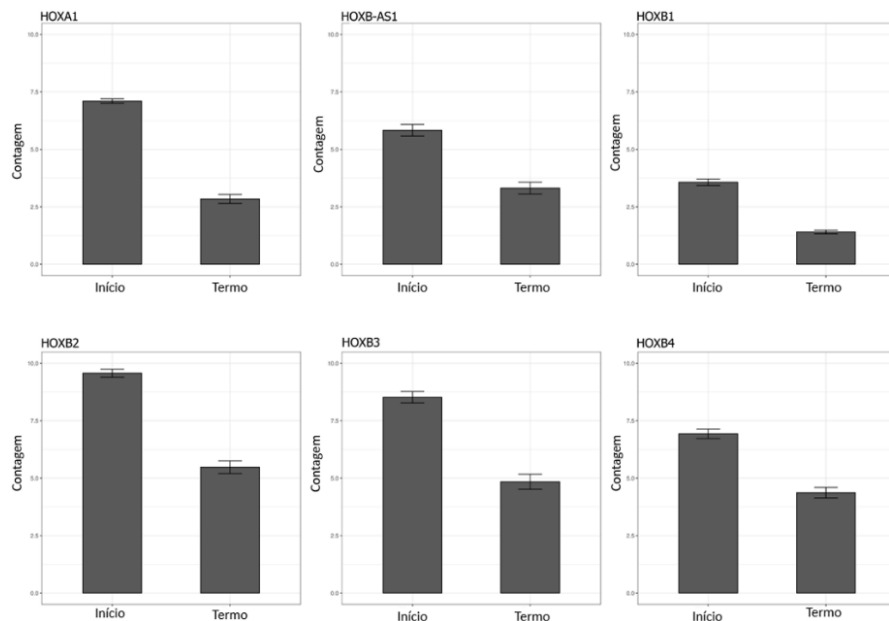
Tendo em vista os dois conjuntos de dados apresentados nos itens 4.3.1.1. e 4.3.1.2. (GSE66622 e GSE73017), os genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* se destacaram pelo nível de expressão e diferença entre estágios de desenvolvimento.



**Figura 12.** Análise de Componente principal da expressão dos genes HOX nas amostras do estudo GEO: GSE73017. PC1, componente principal 1 com 72% de variação; PC2 componente principal 2 com 14% de variação.



**Figura 13.** Heatmap com escore z do nível de expressão dos genes HOX em COM (contagens por milhão). (A) expressão dos 39 genes HOX e antisensos da família HOX em 18 transcriptomas de tecido de placenta a termo (Termo), 9 amostras de sinciotrofoblastos iniciais (Início) e três amostras de células-tronco embrionárias não diferenciadas (Controle). (B) Heatmap dos genes diferencialmente expressos entre início e termo ( $p < 0,05$ ). Dados provenientes de análise *in silico* de RNA-seq disponível no *Gene Expression Omnibus: GSE73017*.



**Figura 14.** Nível de expressão entre os sinciotrofoblastos iniciais (Início) e placenta a termo (Termo). Gráfico de barras dos genes HOX diferencialmente expressos em contagem por milhão - CPM (GEO: GSE73017).

#### 4.3.1.3 Sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq) em diferentes subtipos celulares de placenta em estágios iniciais do desenvolvimento (GSE89497)

Visando investigar e avaliar a expressão dos genes HOX em diferentes subtipos placentários foram utilizados dados brutos de sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq), que também foi útil para validação das análises de RNA-seq em tecido total. Obtivemos dados de um total de 764 células dos seguintes subtipos: citotrofoblastos (CTB), sinciotrofoblasto (STB), trofoblasto extraviloso (EVT) e células estromais (STRs).

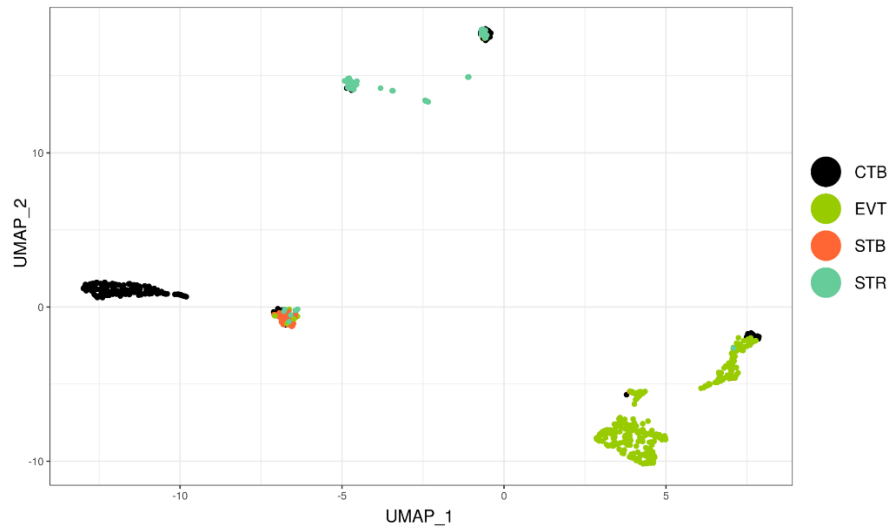
Para visualizar o agrupamento das células únicas de acordo com o perfil de expressão do transcriptoma, foi realizada uma metodologia de redução de dimensão, denominada UMAP (termo em inglês: *Uniform Manifold Approximation and Projection*) (Figura 15). Como mostrado na figura 15, nessa análise as células se separaram em cinco grupos principais e bem distintos, o tipo celular trofoblasto extraviloso (EVT) se subdividiu em dois grupos pequenos, porém próximos. O citotrofoblasto foi agrupado em um grande grupo e poucas células se juntando aos outros três subtipos, as células do sinciotrofoblasto se agruparam próximas às do citotrofoblasto e mais distante dos outros grupos (EVT e STR). As células estromais se separaram bem dos subtipos CTB, EVT e STB, porém ficaram mais desagregadas entre si e algumas células se agruparam com os sinciotrofoblastos.

Os dados de células únicas podem explicar o motivo pelo qual os genes HOX são pouco expressos na maioria dos tecidos. Avaliamos o perfil de expressão dos 39 membros entre os subtipos celulares para cada uma das células do estudo. Como esperado, o nível de expressão dos genes da família é baixo em grande parte das células avaliadas, no entanto, alguns subtipos de células expressam níveis altos de alguns HOX.

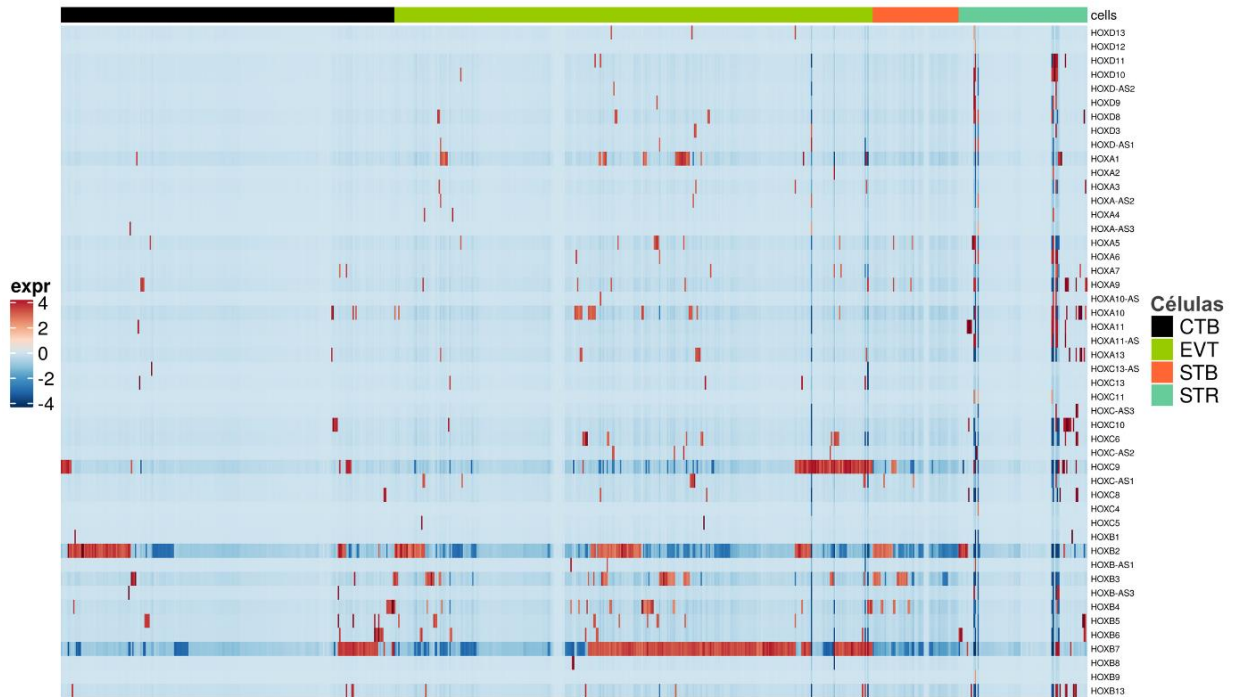
Destacaram-se os genes *HOXB7* e *HOXB2*, *HOXB3* e *HOXC9*. O gene *HOXB7* apresentou maior expressão no subtipo trofoblasto extraviloso e algumas células citotrofoblásticas. Os genes *HOXB2* e *HOXB3* apresentaram expressão em trofoblasto extraviloso, citotrofoblastos e sinciotrofoblastos. O gene *HOXC9* teve expressão principalmente em trofoblasto extraviloso e algumas células de citotrofoblastos e sinciotrofoblastos com alta expressão. Alguns outros genes também apresentaram alta expressão, como o *HOXA1*, *HOXA10*, *HOXB4*, *HOXB5* e *HOXB6*, porém em um menor número de células, em relação ao total analisado (Figura 16). Olhando especificamente para os genes HOX identificados com alta expressão no RNA-seq de tecido total, os genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* também estão expressos nesses dados de células únicas, em tipos celulares específicos, validando a seleção dos genes (Figura 17, b, d, f). Avaliando individualmente o transcriptoma das células com alta expressão desses três HOX, o nível de expressão tende a ser similar àqueles genes do transcriptoma total que possuem os

níveis mais altos, que são *GSTP1*, *SEMI* e *SKP1*. Sendo assim, o gene *HOXA13* (Figura 17a), está altamente expresso em 14 células do tipo EVT. O *HOXB2* (Figura 17b), está altamente expresso em 149 células, principalmente do tipo EVT e CTB. O *HOXB3* está com alta expressão em 60 células do tipo EVT e STB (Figura 17c).

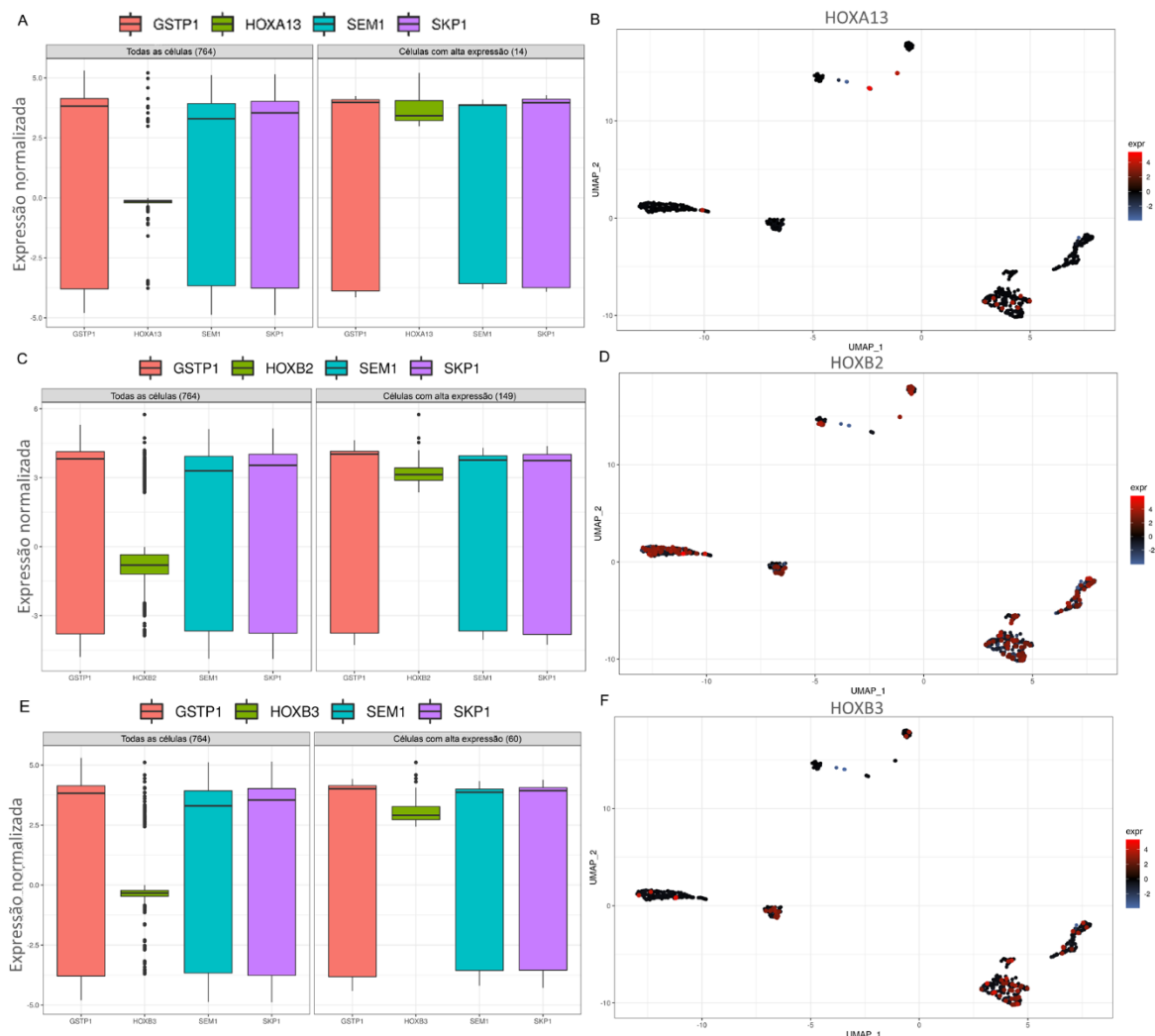
Dessa forma, os resultados indicam que os genes HOX possuem alta expressão em subtipos celulares específicos, que foi identificado apenas na análise individualizada.



**Figura 15. Análise de redução de dimensões por UMAP** (*Uniform manifold approximation and projection*) para células trofoblásticas mostrando a clusterização pelo subtipo celular (dados obtidos *in silico*, GEO: GSE89497). Na legenda, lateral direita é possível identificar os subtipos celulares utilizados na análise. CTB: Citotrofoblastos; EVT: Trofoblasto extraviloso; STB: Sinciciotrofoblasto; STR: Células estromais.



**Figura 16. Expressão gênica da família HOX em 764 células derivadas de placenta de 8 e 24 semanas de gestação.** Heatmap representando o nível de expressão dos genes HOX em valores normalizados (dado obtido *in silico* GEO: GSE89497). Na legenda: lateral esquerda encontra-se o nível de expressão e na lateral direita estão identificados os subtipos celulares utilizados na análise, as cores correspondem às faixas na parte superior do gráfico. As colunas do heatmap são as células e em cada linha encontra-se a expressão de um determinado gene HOX. CTB: Citotrofoblastos; EVT: Trofoblasto extraviloso; STB: Sinciotrofoblasto; STR: Células estromais.



**Figura 17. Expressão dos genes HOX em células únicas e comparação com genes com alta expressão.** (A), (C) e (E) comparação do nível de expressão dos três genes mais expressos nesse conjunto amostral (*GSTP1* em laranja, *SEM1* em azul, *SKP1* em roxo) e genes HOX (box verde) em todas as 764 células e apenas nas células em que o HOX avaliado tem alta expressão. (B), (D) e (F) Análise de redução de dimensões por UMAP (Uniform manifold approximation and projection) mostrando os subtipos de células em que o HOX apresenta expressão e entre parênteses o número de células que apresenta a alta expressão. *HOXA13* (14 células), *HOXB2* (149 células) e *HOXB3* (60 células).

#### 4.3.1.4 Análise in silico de expressão dos genes HOX em tumores primários – TCGA

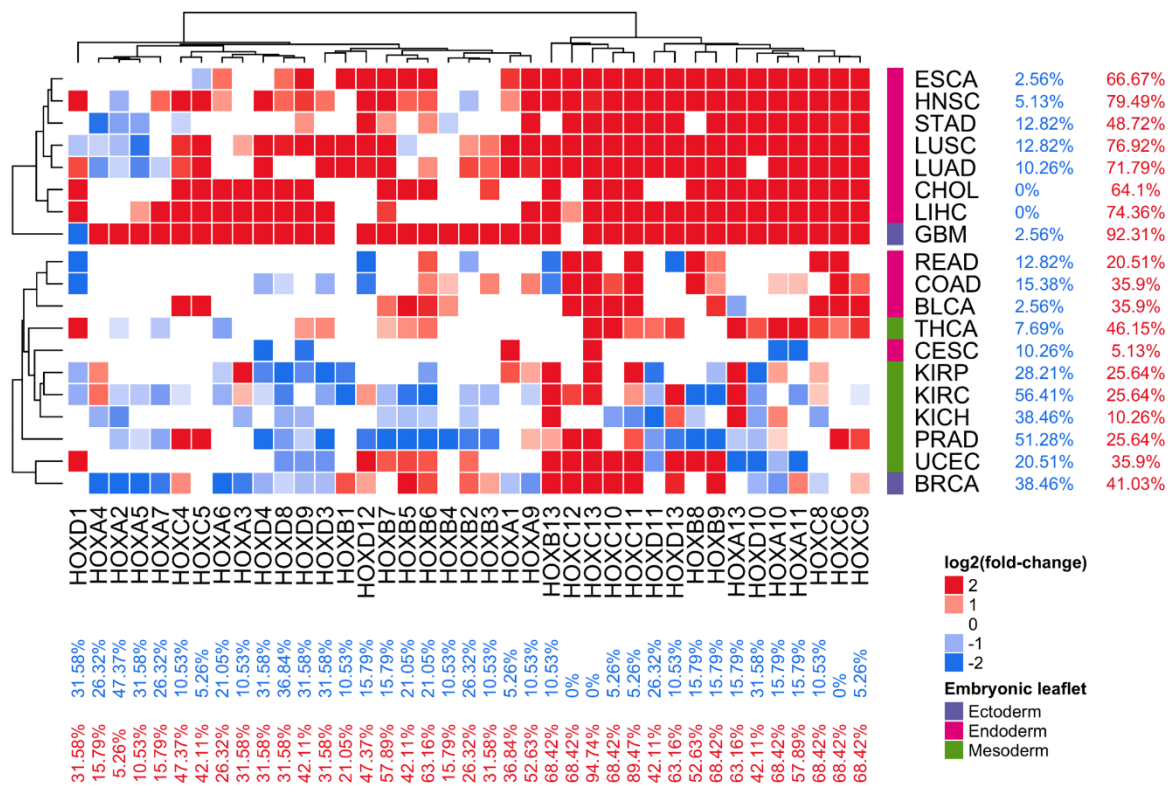
Os genes HOX pré-selecionados nas análises do tecido placentário foram avaliados também em tecido tumoral primário (Figura 18). Para associar a uma possível função biológica no desenvolvimento tumoral, utilizamos dados de sequenciamento de RNA disponíveis na base de dados do consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Dentro dos dois conjuntos de dados de RNA-seq em placenta, 3 deles chamaram atenção por apresentarem alta expressão, *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3*.

Os genes *HOXA13* e *HOXB2* apresentaram alta expressão na placenta a termo no estudo de código GSE66622. O primeiro está altamente expresso em 12 dos 19 tumores primários analisados (62,19% dos tumores) e baixo apenas em carcinoma urotelial de bexiga (BLCA),



adenocarcinoma de próstata (PRAD), carcinoma endometrial de corpo uterino (UCEC) e em outros 4 tipos tumorais não apresentou expressão diferencial; o *HOXB2* que também foi encontrado com grande diferença de expressão entre o estágio inicial e termo em amostras de placenta (GSE73017) encontra-se altamente expresso em 5 tipos tumorais (26,32% dos tumores), são eles: carcinoma de pulmão de células escamosas (LUSC), adenocarcinoma de pulmão (LUAD), glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma endometrial de corpo uterino (UCEC) e carcinoma invasivo de mama (BRCA). Além disso, apresentaram baixa expressão de *HOXB2* os tumores do tipo adenocarcinoma retal (READ), adenocarcinoma de próstata (PRAD), Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC) e em carcinomas renais (KICH e KIRC); em outros 9 tipos tumorais não apresentou expressão diferencial entre tumor e tecido normal adjacente.

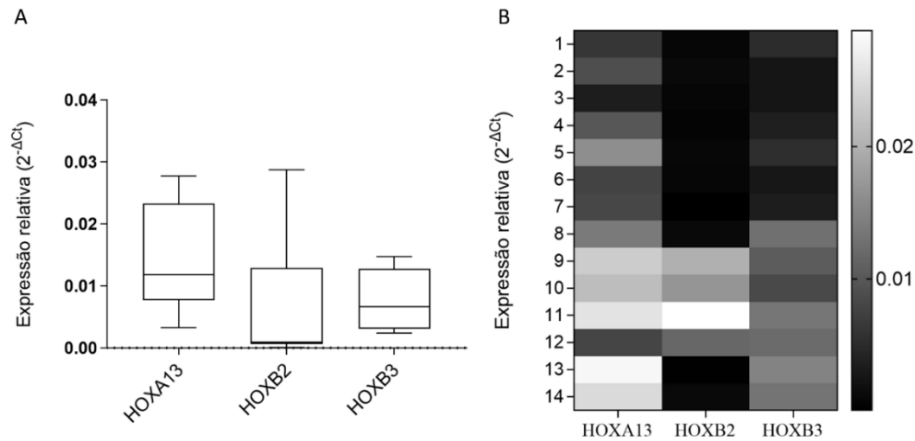
O gene *HOXB3*, que está expresso diferencialmente em placenta inicial quando comparado com placenta a termo, está com alta expressão em 6 tipos tumorais (31,58% dos tumores): carcinoma de pulmão de células escamosas (LUSC), adenocarcinoma de pulmão (LUAD), colangiocarcinoma (CHOL), glioblastoma multiforme (GBM), adenocarcinoma de cólon (COAD) e carcinoma invasivo de mama (BRCA). A baixa expressão é vista em 2 tipos de tumores: carcinoma renal de células claras (KIRC) e adenocarcinoma de próstata (PRAD) (GSE73017). Com esses dados, concluímos a etapa de seleção dos genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* que possuem expressão em placenta tanto na massa total de células quanto em células únicas, bem como apresentam expressão aberrante em tecido tumoral primário. No tópico seguinte, apresento a validação da expressão dos genes selecionados para as análises de identificação dos alvos regulados por esses genes *HOX* e o envolvimento com processos tumorais.



**Figura 18. Expressão gênica diferencial de tumor primário versus tecido normal adjacente.** Heatmap do fold change ( $\log_2$ ) em contagem por milhão - CPM (Counts per Million). Expressão diferencial da família de genes HOX em 15 tipos tumorais versus tecido normal adjacente pareado (dados de expressão disponíveis no TCGA, analisados em colaboração com a aluna de doutorado Jessica Rodrigues Praça). Na legenda é possível identificar o nível de expressão em relação ao tecido normal ( $\log_2$  fold change) e qual folheto embrionário origina o tumor em cada linha. Na lateral direita em azul estão indicadas as porcentagens de genes HOX com baixa (azul) e alta (vermelho) expressão em um tumor específico. Na parte inferior do gráfico indica-se a porcentagem de tumores com baixa (azul) e alta (vermelho) expressão do HOX de uma determinada coluna.

### 4.3.2 Validação da expressão gênica por RT-qPCR

Avaliamos a expressão dos genes HOX selecionados anteriormente, em tecidos de placenta a termo, para validar as informações obtidas com os dados *in silico*. Como apresentado na figura 19A, os 3 genes HOX possuem expressão transcricional nas amostras, embora seja uma expressão basal. O *HOXA13* se mostrou com a média da expressão mais elevada nas 14 amostras, seguido pelo *HOXB3* e pelo *HOXB2*. Este, por sua vez em níveis mais baixos entre as 14 amostras (Figura 19b).



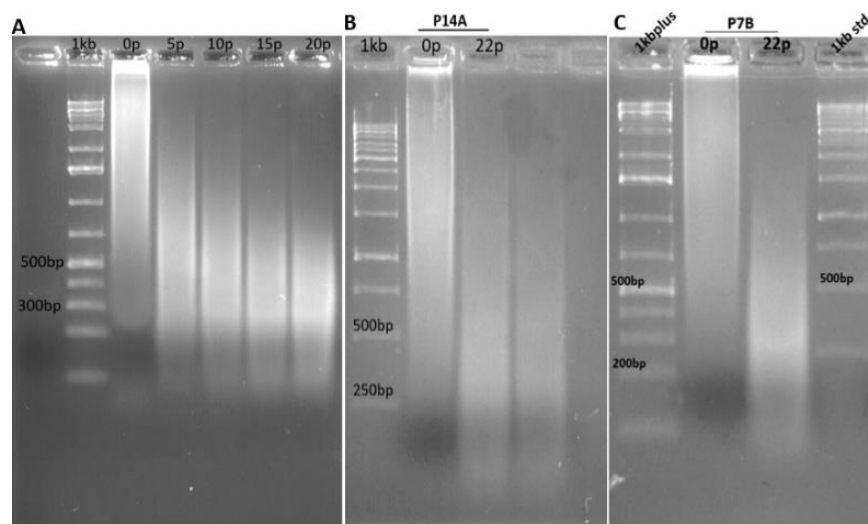
**Figura 19. Validação da expressão por PCR quantitativa em tempo real dos 3 genes HOX selecionados na análise in silico de RNA-seq em placenta e tumor primário.** (A) Boxplot com a mediana de expressão calculada com todas as amostras e (B) Heatmap mostrando a expressão dos genes HOX selecionados em cada uma das amostras avaliadas, eixo y refere-se às amostras de placenta: P1 a P14 (Tabela 2).

#### 4.4 Identificação dos genes alvos regulados pelos HOX selecionados utilizando a técnica de ChIP-seq.

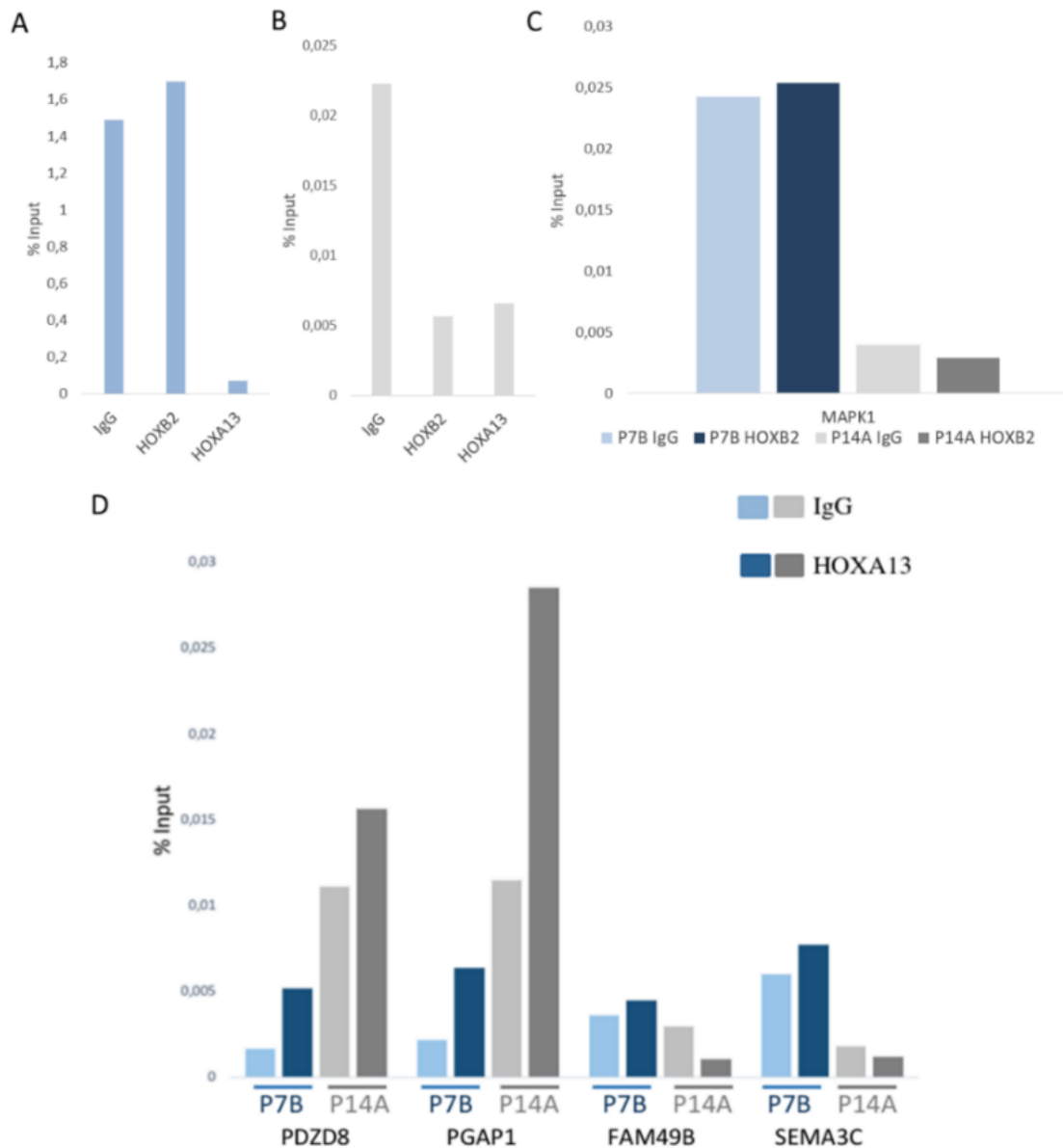
##### 4.4.1 Imunoprecipitação da cromatina (ChIP): padronização, preparação da cromatina e validação experimental

Para identificar de forma abrangente os sítios de ligação dos genes HOX selecionados ao longo do genoma, aplicamos a metodologia de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento em larga escala, realizada em amostras de tecido de placenta congelados (Tabela 5). Na figura 20, encontra-se o resultado da padronização citada na metodologia desta tese, necessária para a otimização das condições experimentais. Para otimizar a técnica de imunoprecipitação da cromatina, foram feitas inúmeras alterações no protocolo inicial. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos com 200mg de tecido por crosslink. O método de homogeneização do tecido passou de pulverização em nitrogênio líquido com a ajuda de pistilos para o uso de um homogeneizador de alta pressão (Polytron) em PBS com inibidor de protease e em seguida o uso de agulhas e seringas. No cross-link, a fixação foi testada com formaldeído a uma concentração de 0,8% e 1%, os resultados foram melhores com 1% de solução. Dentre os tempos de fixação de 5, 8 e 10 minutos, não foram observadas diferenças marcantes, porém foi escolhido o tempo de 10 minutos de cross-link por apresentar a melhor condição, segundo a literatura, para o estudo de fatores de transcrição. Para otimizar a lise celular, foram feitos testes com reagentes diferentes para a lise das membranas, o melhor reagente selecionado foi o que continha 1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio); a etapa de lise e liberação da cromatina foram otimizadas para 30 minutos de lise da membrana celular com homogeneização por agulhas e vórtex e a lise da membrana nuclear para 10 minutos. A fragmentação por sonicação

foi testada em diferentes condições, a condição adotada foi: 22 pulsos de sonicação com 30% de amplitude, 30 segundos ON e 59 segundos OFF. Esse é um passo crucial que garante que a cromatina tenha o tamanho desejado para o sequenciamento de nova geração e também que o material esteja íntegro para a etapa de imunoprecipitação. Ainda assim, a fragmentação enzimática não se mostrou efetiva em tecidos de placenta e não foi dado prosseguimento. Para testar a efetividade dos reagentes de lise na liberação da cromatina, testamos dois diferentes kits comerciais para ChIP: Magna ChIP HiSens *Chromatin Immunoprecipitation Kit* e Magna ChIP G *Chromatin Immunoprecipitation Kit*, ambos da empresa Merck Millipore. O primeiro (*Hisens*) não apresentou bons resultados e utilizamos o Magna G kit. Finalmente, o protocolo de preparação da cromatina foi otimizado também com reagentes *in house*, com uso de homogeneizador douncer e agulhas, aumento do tempo de reversão do cross-link de 2 horas para 4 horas, maior volume de proteinase K e RNase A.



**Figura 20. Fragmentação da cromatina de tecido placentário para o ensaio de ChIP.** (A) Etapa inicial de padronização experimental mostrando o perfil da fragmentação de tecido placentário fixado em formaldeído, após 5, 10, 15 e 20 pulsos de sonicação; (B) Confirmação da fragmentação da amostra P14A e (C) P7B utilizadas no estudo e que seguiram para imunoprecipitação e sequenciamento. Controles experimentais (0p) não passam pelo processo de fragmentação (Marcadores utilizados: GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder em A e C, GeneRuler 1 kb std DNA Ladder B)



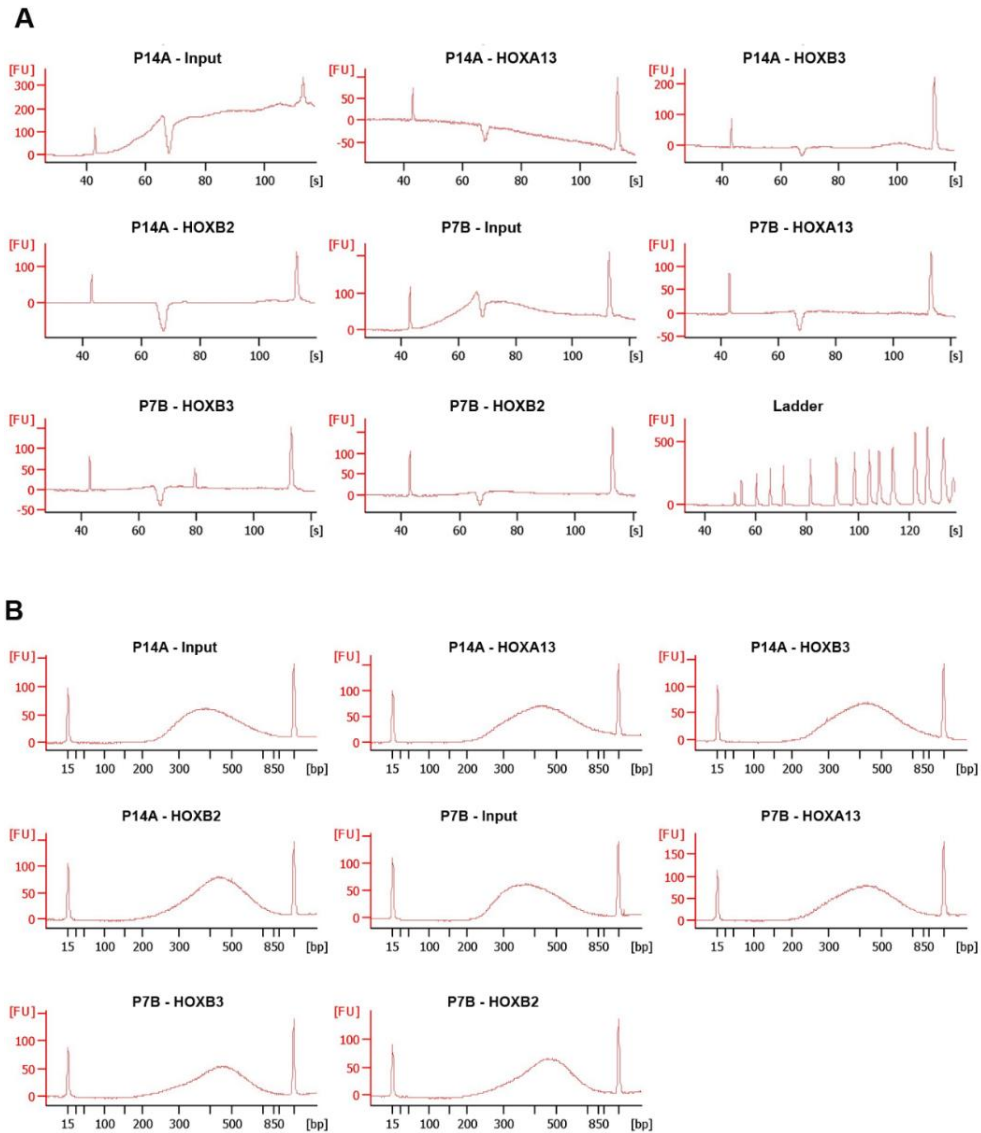
**Figura 21. Validação experimental da imunoprecipitação da cromatina por PCR quantitativa em tempo real.** Em azul apresentam-se os resultados para a amostra P7B e em cinza para a amostra P14A. (A) Porcentagem de enriquecimento com primers para B-actina com as amostras P7B e (B) P14A; (C) Porcentagem de enriquecimento do gene MAPK1 em imunoprecipitados de anti-IgG e anti-HOXB2; (D) Porcentagem de enriquecimento de alvos do *HOXA13* em imunoprecipitados de anti-IgG e anti-HOXB2.

Após a imunoprecipitação as amostras foram quantificadas em fluorômetro (tabela 7). Todas as amostras estavam acima de 5ng no volume total. A avaliação dos fragmentos por eletroforese capilar não apresentou resultados satisfatórios antes da amplificação por PCR (Figura 22a) e após a preparação da biblioteca foi feita uma nova checagem dos fragmentos e estavam entre 403 e 461 pares de bases (Figura 22b e Tabela 7).

**Tabela 7. Quantificação em fluorômetro das amostras que passaram por imunoprecipitação da cromatina e tamanho médio dos fragmentos avaliados por eletroforese capilar.**

<b>Amostra*</b>	<b>IP</b>	<b>Quantificação (ng/ul)</b>	<b>Tamanho médio dos fragmentos (pb)</b>
P14A	5% Input	6.40	417
	<i>HOXA13</i>	0.191	449
	HOXB3	0.458	448
	HOXB2	0.200	451
	IgG	0,249	-
	H3	0,201	-
P7B	5% Input	2.91	403
	<i>HOXA13</i>	0.284	434
	HOXB3	0.462	448
	HOXB2	0.264	461
	IgG	0,486	-
	H3	0.306	-

\* Tecido placentário utilizado. IP: Anticorpo utilizado na imunoprecipitação. As amostras H3 e IgG não seguem para análise do tamanho do fragmento em eletroforese capilar.



**Figura 22. Eletroferograma com a checagem do tamanho dos fragmentos de cromatina de cada amostra por eletroforese capilar (Bioanalyzer, Agilent) (A) Antes do preparo da biblioteca e (B) após amplificação do DNA e preparo de biblioteca. Eixo y é a intensidade do sinal de fluorescência enquanto o eixo x é o tamanho do fragmento em pares de bases. Picos no início e no fim do gráfico são os marcadores e entre eles encontra-se a curva com o tamanho dos fragmentos.**

#### 4.4.2 Análise bioinformática do ChIP-seq: processamento inicial dos dados

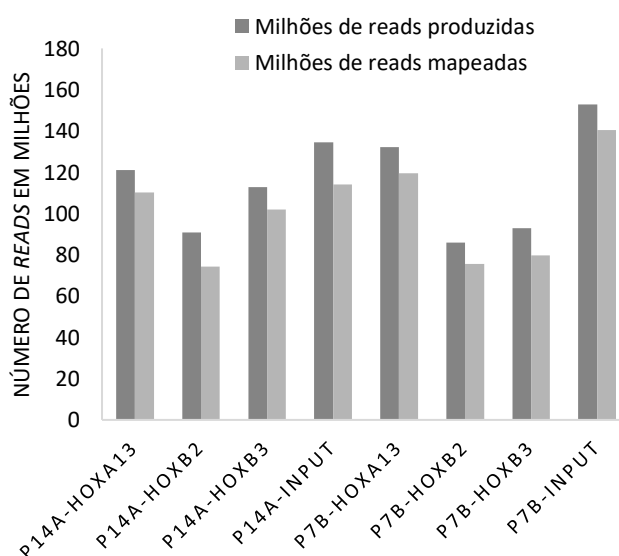
O sequenciamento gerou 922,8 milhões de *reads* totais, equivalente a 76,78 gigas de pares de bases (Tabela 8 e Figura 23). Destes, uma média de 84,52% passou nos filtros iniciais pré-estabelecidos pela illumina e uma média de 84,7% das bases estavam com escore Q (valor de Phred) maior ou igual a 30, o que equivale a 66,3 Gpb (Figura 24a). Do total de *reads* geradas, 815 milhões foram mapeadas ao genoma referência, equivalente a 88,4%. A quantidade de *reads* por amostra variou de 90,8 milhões para o HOXB2 da amostra P14 até 152,8 milhões

para o input de P7B. As duas réplicas do input tiveram número de *reads* superior às amostras com imunoprecipitação (Tabela 8).

A qualidade das bases chamadas foi avaliada pelo FastQC e embora a grande parte das *reads* tenha apresentado ótima qualidade, algumas apresentavam suas extremidades com bases de qualidade baixa (Figura 24A e 24B). Foi necessário fazer a trimagem de *reads* com qualidade inferior a um escore Q de 30 (Figura 24c). Com a ferramenta MultiQC avaliamos o número de *reads* duplicadas, que também foram removidas da análise (Figura 24d). A cujas porcentagens estão descritas no apêndice 4 desta tese.

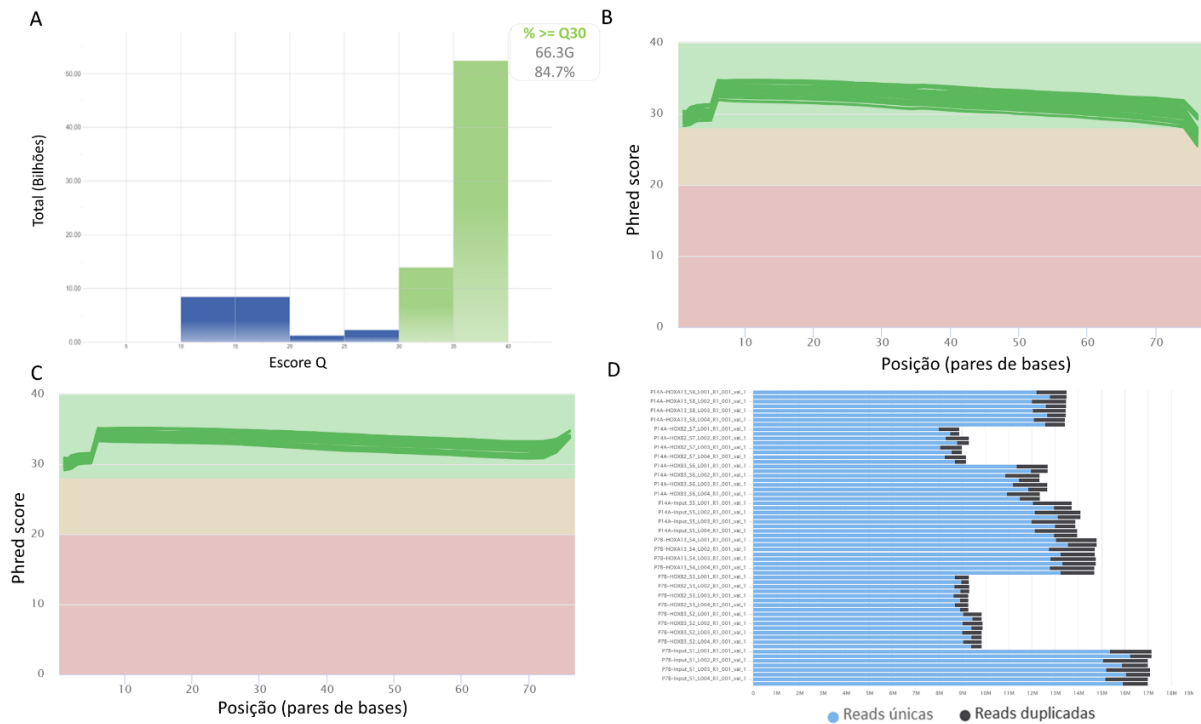
**Tabela 8. Número de reads geradas e mapeadas, por amostras e total.**

Amostra (ChIP)	Reads geradas (Milhões)	Reads mapeadas (Milhões)	% reads mapeadas
P14A-HOXA13	121	110,2	91,07
P14A-HOXB2	90,8	74,2	81,72
P14A-HOXB3	112,8	102	90,43
P14A-Input	134,4	114,1	84,90
P7B-HOXA13	132,2	119,6	90,47
P7B-HOXB2	86	75,5	87,79
P7B-HOXB3	92,8	79,7	85,88
P7B-Input	152,8	140,5	91,95
<b>TOTAL</b>	<b>922,8</b>	<b>815,8</b>	<b>88,40</b>

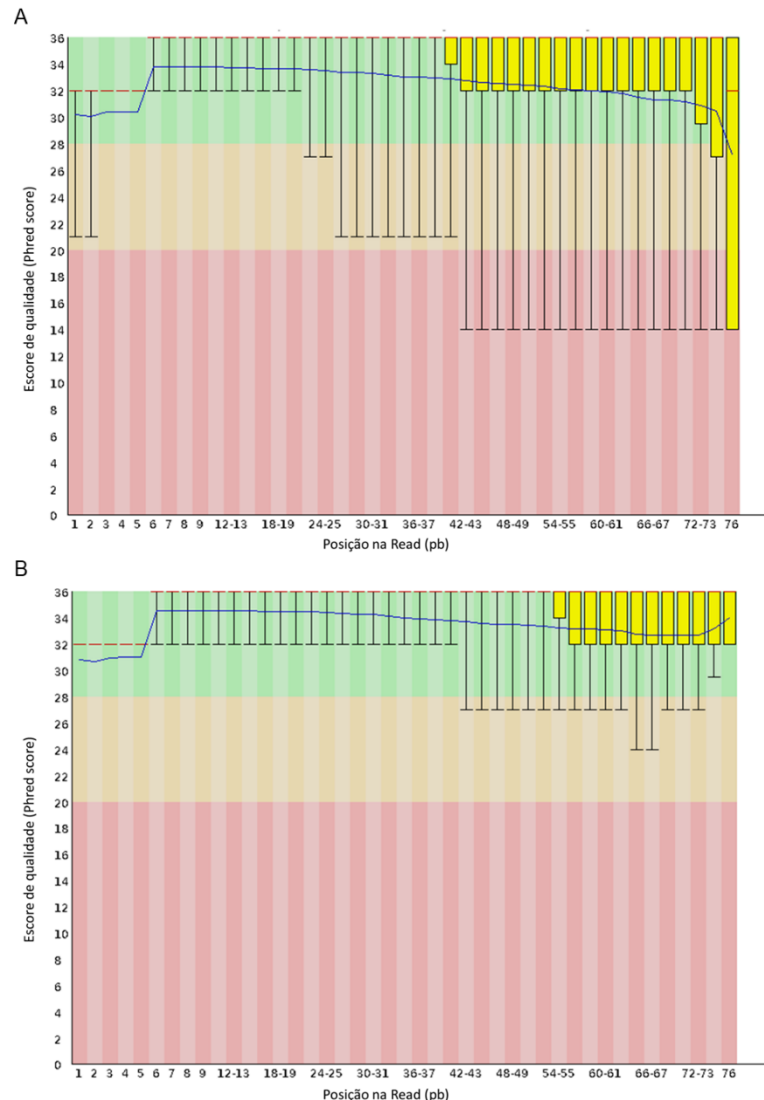


**Figura 23. Gráfico de barras do número de reads geradas e mapeadas entre as amostras.**





**Figura 24. Análise de qualidade do sequenciamento para todas as amostras.** (A) Barplot do número de *reads* (eixo y) por escore Q (eixo x) (gráfico retirado do sistema de armazenamento da empresa Illumina - basespace.illumina.com); (B) Relatório gerado pela ferramenta MultiQC da qualidade das *reads* para todas as amostras, antes da trimagem e (C) após a trimagem. O escore Q de 30 significa uma chance de 0,1% de uma base ter sido chamada erroneamente no sequenciamento, escore Q=20 significa uma chance de 1% de erro e Q=10 uma chance de 10% de erro. (D) Proporção de *reads* únicas e duplicadas que foram geradas no sequenciamento. Informação do multiQC para as 4 lanes (L001-L004).



**Figura 25. Visão geral da qualidade das bases geradas no sequenciamento (A) antes e (B) após a aplicação do filtro de qualidade (trimagem de reads).** O eixo y representa o valor de qualidade baseado no Phred score. O eixo x representa a posição de cada base em uma read de 76 pares de bases. Para cada posição nas *reads* sequenciadas de uma amostra, é possível ver o intervalo interquartil (box amarelo), a mediana (linha vermelha central) e a média (linha azul) dos valores de qualidade das bases. A amostra utilizada como exemplo nesta figura é a P14A-*HOXA13*.

#### 4.4.3 Análise bioinformática do ChIP-seq: Chamada e anotação de picos

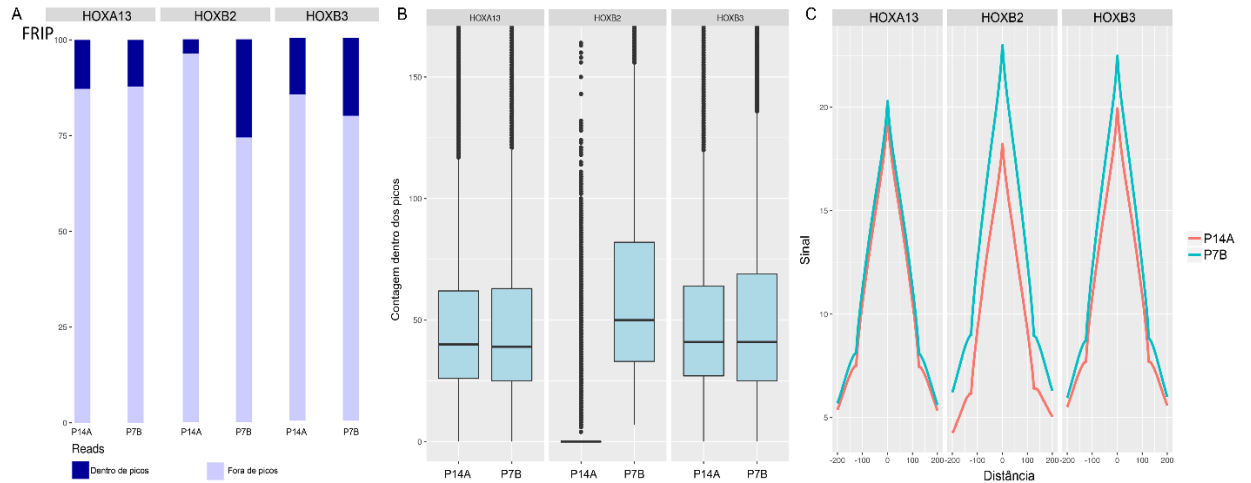
Após a chamada dos picos com o software MACS2, foram geradas métricas de qualidade mais específicas do ChIP-seq com o pacote ChIPQC do Bioconductor. Na tabela 9 estão descritos os resultados: o tamanho das *reads* variou de 70 a 72 pares de bases, com fragmentos variando de 255 a 263 pares de bases. A coluna RelCC da tabela se refere a um escore que mede a relação entre o que é sinal e ruído (*background*) e valores acima de 1 significam que a amostra possui uma boa razão de picos verdadeiros, nas amostras os valores variaram de 3,6 a 5,2. A coluna RIP% informa a porcentagem de *reads* que estão dentro de regiões enriquecidas identificadas na etapa de chamada de picos. O consórcio Encode recomenda que essa métrica esteja acima de 1%. As réplicas P14A e P7B do *HOXA13* tiveram 13% e 12% das *reads*

sobrepondo os picos chamados e foram incluídas na análise. A amostra P14A para o HOXB2 teve 3,7% das *reads* sobrepondo regiões de picos e enquanto que a amostra P7B teve 26% das *reads* em picos. Para o HOXB3, os valores foram de 15% e 20% para P14A e P7B, respectivamente (Figura 26 e Tabela 9). Na comparação entre as réplicas biológicas para os 3 fatores de transcrição, apesar de muito similar, a amostra P7B apresentou a melhor densidade de *reads* dentro de picos (Figura 26b) O ChIPQC também fornece informação sobre a porcentagem de *reads* que foram removidas por terem sido mapeadas em regiões problemáticas do genoma. Essas regiões são baseadas em classificações do ENCODE e do projeto 1000Genomes, que desenvolveu uma lista (blacklist) de sítios do genoma que apresentam sinais anômalos no sequenciamento de nova geração, como por exemplo regiões repetitivas. A coluna RiBL% (*Reads In Blacklist*) da tabela 9, lista para cada amostra a porcentagem de *reads* que foram removidas por estarem dentro dessas regiões, que deve ser uma porcentagem muito pequena. O *peak profile plot*, na figura 26C, representa a profundidade de leitura média em torno dos picos, em relação à cobertura vertical de *reads*. A amostra do HOXA13 ficou com melhor qualidade por estar mais similar entre as réplicas, seguido pelo HOXB3, e HOXB2 que possui uma leve diferença entre P7B e P14A.

**Tabela 9. Visão geral das métricas de qualidade e de filtragem do ChIP-seq.**

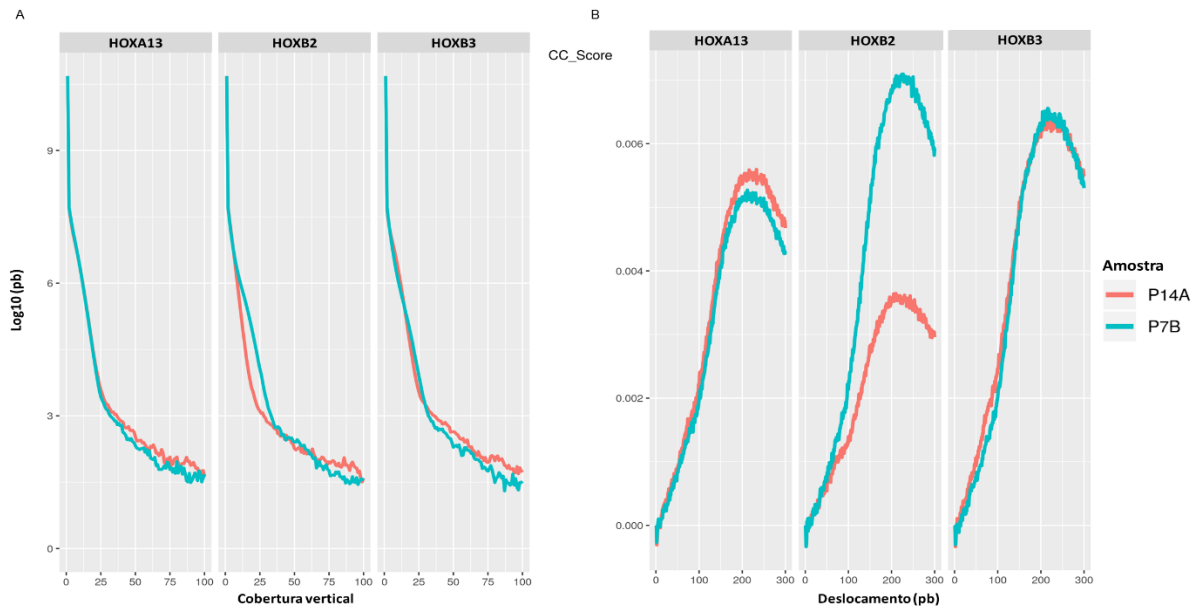
Identificação	Amostra	Proteína	Read	Fragmento	RelCC	RiP%	RiBL%
P14A.HOXA13	P14A	HOXA13	72	257	3.6	13	0.001
P14A.HOXB2	P14A	HOXB2	70	256	3.6	3.7	0.0008
P14A.HOXB3	P14A	HOXB3	72	262	3.7	15	0.0012
P7B.HOXA13	P7B	HOXA13	71	255	3.9	12	0.00038
P7B.HOXB2	P7B	HOXB2	72	263	5.1	26	0.00013
P7B.HOXB3	P7B	HOXB3	71	261	5.2	20	0.00029

\***Read**: Tamanho das *reads* em pares de bases; **Fragmento**: Tamanho estimado dos fragmentos em pares de bases; **RelCC**: (*Relative Cross-coverage*) métrica de qualidade do ChIP-seq que atribui um escore após uma análise da cobertura das *reads* em ambas as fitas do DNA (*Foward* e *Reverse*). **RelCC** > 1 indica um bom enriquecimento. **RiP%** *reads* mapeadas dentro de picos **RiBL%** *reads* mapeadas dentro de regiões que possuem sinais anômalos.



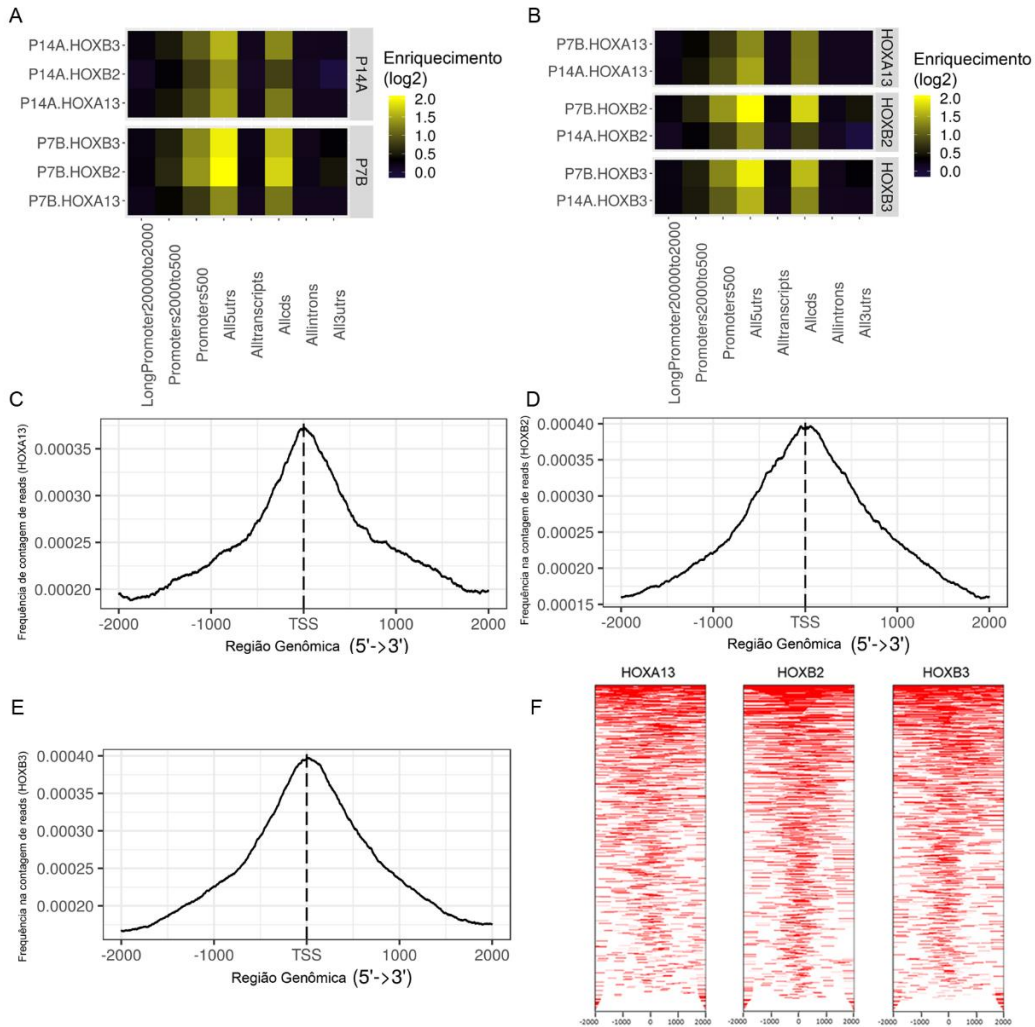
**Figura 26. Representação, por HOX e réplica biológica, das reads que sobrepõem os picos chamados.** Amostras que possuem bom enriquecimento terão uma alta proporção de *reads* sobrepondo as regiões dos picos chamados. (A) Barplot representando a porcentagem e (B) a densidade (Counts in peaks) de *reads* que sobrepõem os picos. Frip: valor que representa a frequência de *reads* dentro de picos; (C) Perfil médio de alinhamento das *reads* em torno do ponto mais alto dos picos (o ponto mais alto seria onde o maior número de *reads* se alinha, no gráfico é a distância zero do eixo x).

Em amostras imunoprecipitadas é esperado que se tenha áreas com maior enriquecimento que outras, o que significa que possuem maior cobertura vertical. Em nosso conjunto de dados, os 3 HOX apresentam-se com ótimo enriquecimento, com curvas acentuadas, indicando que grande parte das posições no genoma possuem grande cobertura vertical (Figura 27a). O desvio padrão observado pelas ondas no fim da curva é pequeno e mais uniforme o que atesta a qualidade do sinal, como verdadeiro e não como ruído (*noise*). O gráfico da figura 27, fornece uma importante medida do sucesso da imunoprecipitação, que é a medida em que as duas fitas (+ e -) correspondentes à uma determinada *read* se agrupam ao redor do centro do sítio de ligação do fator de transcrição. Para investigar esse agrupamento espacial, as leituras da fita + são alteradas em etapas de 1 pb e é atribuído um escore à proporção total do genoma agora coberto pelas duas cadeias combinadas. As réplicas estão bem semelhantes entre si, com exceção da amostra do *HOXB2* que teve um escore menor para a réplica P14A (Figura 27b).



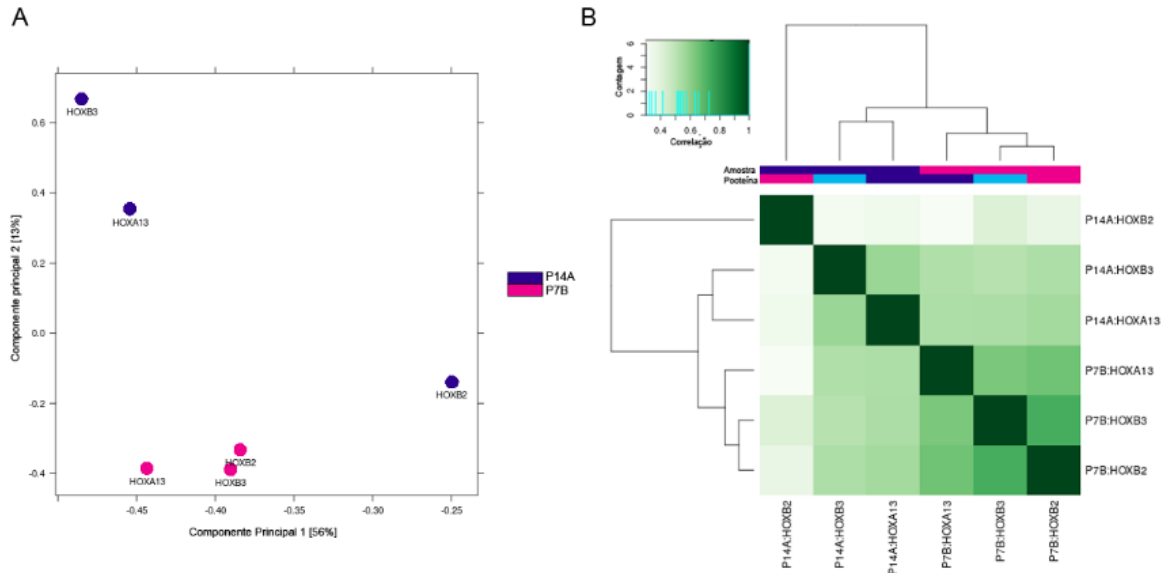
**Figura 27. Distribuição do sinal de imunoprecipitação dos 3 HOX em cada réplica biológica.** (A) avaliação do número de bases (eixo y) em diferentes coberturas do genoma (eixo x). (B) Gráfico CC score (cross-coverage) mostra como as *reads* se agrupam espacialmente em torno do sítio de ligação do Fator de transcrição.

Com a informação de anotação foi possível identificar as regiões genômicas onde as *reads* foram mapeadas, para avaliar o enriquecimento relativo de regiões específicas e entender qual o perfil de ligação do *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3*. Na figura 28, encontra-se o perfil dos picos chamados. No nosso conjunto de dados, observamos um enriquecimento nas categorias “All5utrs” e “Allcds”, que se referem a regiões 5’ não traduzidas e regiões codificadoras de genes, respectivamente. Esse enriquecimento se mantém, independente se avaliarmos por amostra (Figura 28a) ou por proteína HOX (figura 28b). Houve também um enriquecimento moderado na categoria “Promoter500” que se refere a regiões promotoras de até 500 pares de bases de distância. Além disso, foi analisado o perfil de ligação dos fatores de transcrição em relação aos sítios de início de transcrição (TSS). Para isso, indicamos no código do ChIPQC que as regiões promotoras correspondiam a uma distância de 2000 pares de bases. As três amostras apresentaram enriquecimento semelhante quanto à distância ao TSS. (Figura 28c-f).



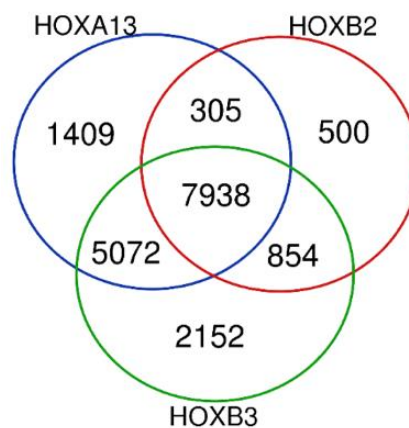
**Figura 28. Perfil do enriquecimento dos picos chamados** (A) Heatmap do enriquecimento dos picos em regiões genômicas específicas, por réplica biológica e (B) por HOX; (C) Frequência da contagem das *reads* (eixo y) em regiões flangeadoras dos Sítios de Início de Transcrição (-2000 a 2000 pares de bases de distância do TSS) para o *HOXA13*, o mesmo foi avaliado para (D) *HOXB2* e (E) *HOXB3* (identificado no eixo y); (F) Heatmap dos picos que sobrepõem as regiões de TSS nas diferentes amostras, cada traço vermelho corresponde a um pico e o eixo x representa a distância em relação ao TSS.

O passo seguinte à identificação do perfil de enriquecimento no genoma, foi realizada uma análise de agrupamento entre as amostras, de acordo com a correlação entre as réplicas biológicas. A análise de correlação é calculada de acordo com escores atribuídos para cada pico de uma réplica, esses escores são baseados em número de picos e perfil de enriquecimento no genoma. A correlação foi plotada no heatmap (Figura 29b) que ressalta a diferença entre a réplica P14A do *HOXB2* com as outras amostras do ChIP-seq. Na análise de componente principal (PCA), as réplicas biológicas, pontos que possuem a mesma cor no PCA, são plotadas principalmente próximas uma da outra. A amostra *HOXB2* da réplica P14A, com pontuações de pico mais baixas que o restante (como evidenciado por seus baixos valores de porcentagem de *reads* em picos %RiP), se separou das outras duas amostras do grupo (em azul) (Figura 29a).



**Figura 29. Agrupamento entre as amostras quanto ao número de reads e perfil de enriquecimento dos picos.** (A) Análise de componente principal demonstrando que a réplica P7B possui número e perfil de picos mais similares aos da réplica P14A; (B) Heatmap mostrando agrupamento dos picos entre amostras. Nessa análise, os picos são computados e utilizados para calcular a correlação.

A anotação dos picos chamados nas amostras sequenciadas foi realizada para os picos que passaram pela análise de reprodutibilidade (IDR – *Irreproducible Discovery Rate*). A filtragem realizada por IDR resultou em 1 lista de genes alvos para cada HOX, equivalentes às duas réplicas biológicas. Após a filtragem, foram anotados 14724 genes alvos regulados pelo *HOXA13*, 9527 alvos para o *HOXB2* e 16016 alvos para o *HOXB3*. Desses, 1409 genes são alvos exclusivos do *HOXA13*, 500 genes são exclusivos do *HOXB2* e 2152 exclusivos do *HOXB3*. Em comum aos três HOX selecionados, foram identificados 7938 genes alvos; 5072 genes em comum entre *HOXB3* e *HOXA13*, 305 genes em comum ao *HOXB2* e *HOXA13* e 854 alvos em comum entre *HOXB3* e *HOXB2* (Figura 30).



**Figura 30. Diagrama de Venn com a intersecção do número de picos após a anotação.** Anotação após a análise de reprodutibilidade entre réplicas biológicas (IDR – *Irreproducible Discovery Rate*).

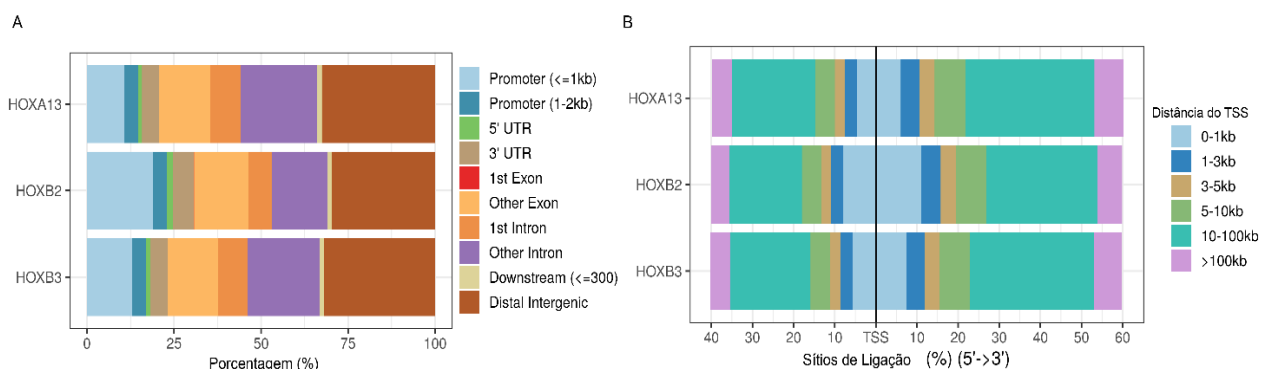
#### 4.4.4 Perfil de enriquecimento dos picos filtrados por IDR em relação ao sítio de início de transcrição

Os picos anotados foram mapeados quanto à região genômica, para interpretar as preferências de sítios de ligação dos fatores de transcrição. Os três fatores de transcrição avaliados tiveram o maior enriquecimento em regiões intergênicas distais (em marrom na figura 31a). Em *HOXA13* e *HOXB3*, a segunda região mais enriquecida foram as de íntrons (a partir do segundo íntron) (em roxo figura 31a), seguido por éxons, desconsiderando o primeiro éxon e regiões promotoras menores que 1 kilobase de distância do sítio de início de transcrição (TSS). O *HOXB2* se diferenciou no perfil de ligação, sendo que a segunda região mais enriquecida foram as regiões promotoras menores que 1 kilobase de distância do TSS (azul claro na figura 31a), seguida por outros íntrons (a partir do segundo íntron) e outros éxons.

As regiões genômicas com menor enriquecimento foram regiões à jusante dos genes, com distância menor ou igual à 300kb, e região 5' não traduzida (5'UTR, do inglês: *untranslated region*).

Avaliando o perfil de ligação dos HOX em relação ao sítio de início de transcrição (TSS), os três apresentaram maior enriquecimento em regiões de 10 a 100kb de distância de TSS, tanto à montante quanto à jusante (Figura 31b). O *HOXA13* e *HOXB3* também tiveram preferência por ligações em regiões de 5 a 10 kb de distância a jusante do TSS. Já o *HOXB2* apresentou uma preferência por enriquecimento próximo ao promotor (Figura 31b).

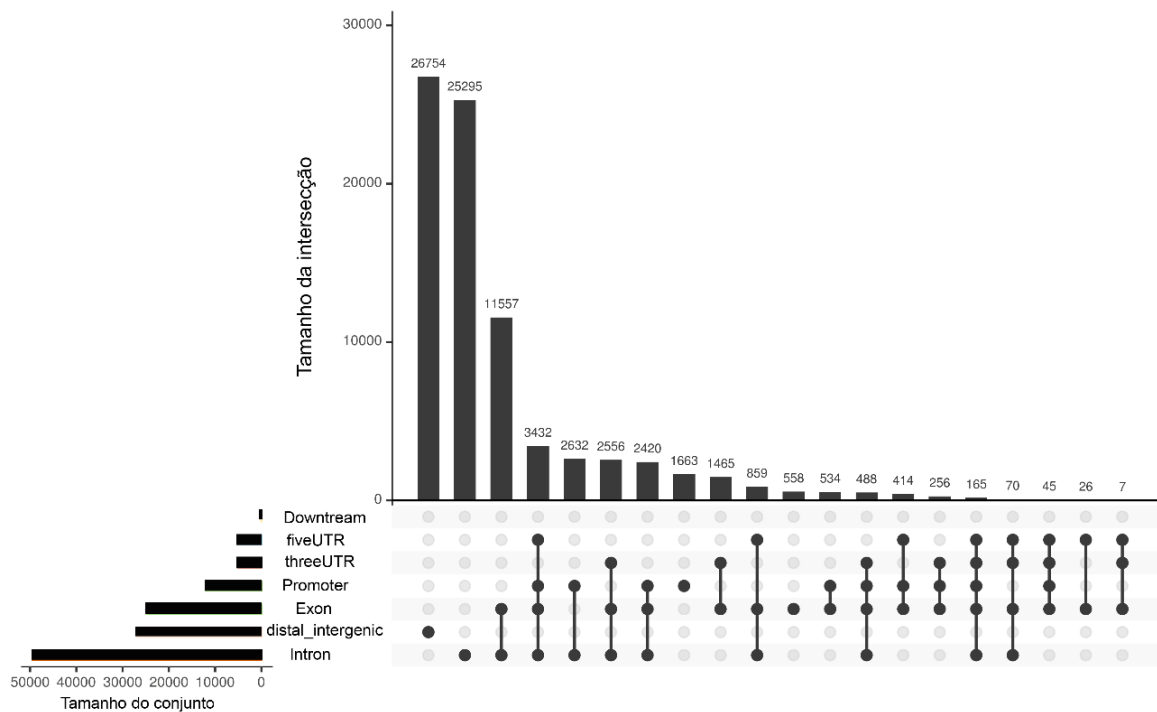
Visto que algumas anotações podem se sobrepor, devido a isoformas diferentes ou genes diferentes sobrepostos, nos interessamos em identificar para cada HOX, as regiões genômicas com essas sobreposições.



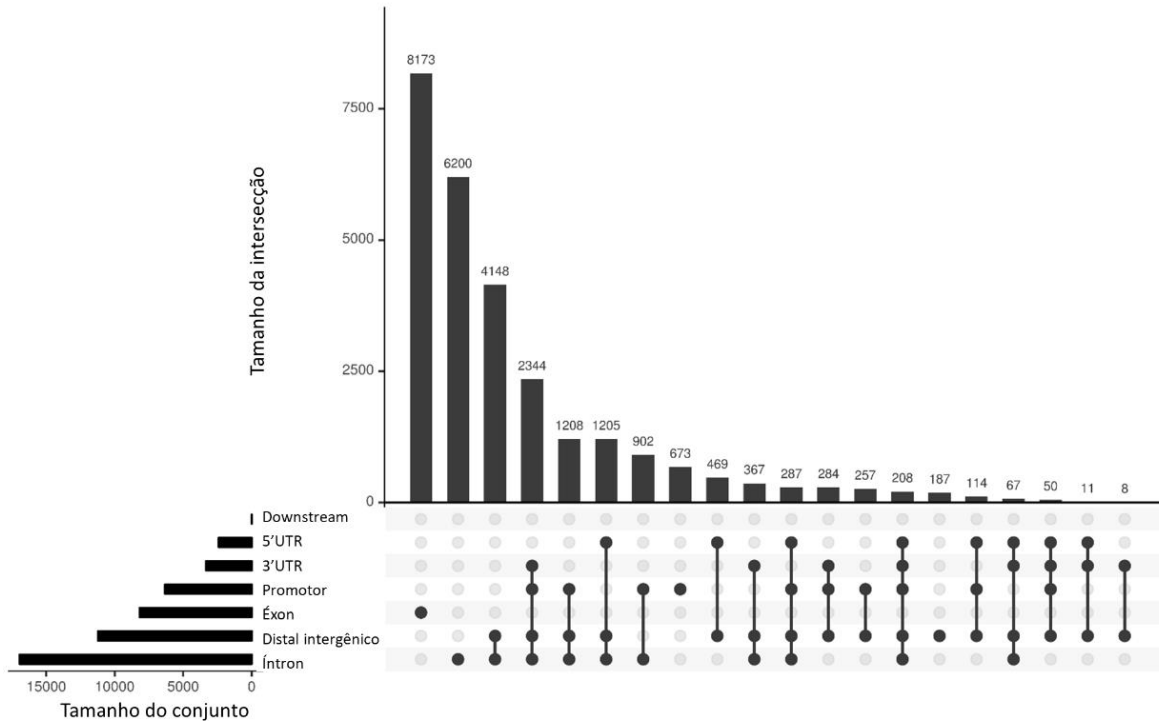
**Figura 31. Perfil de enriquecimento dos picos anotados de cada amostra sequenciada.** (A) Distribuição dos picos em porcentagem (eixo x) em relação às anotações genômicas; (B) Perfil de distribuição em porcentagem eixo (x) dos sítios de ligação do fator de transcrição à montante e à jusante do TSS dos genes mais próximos.



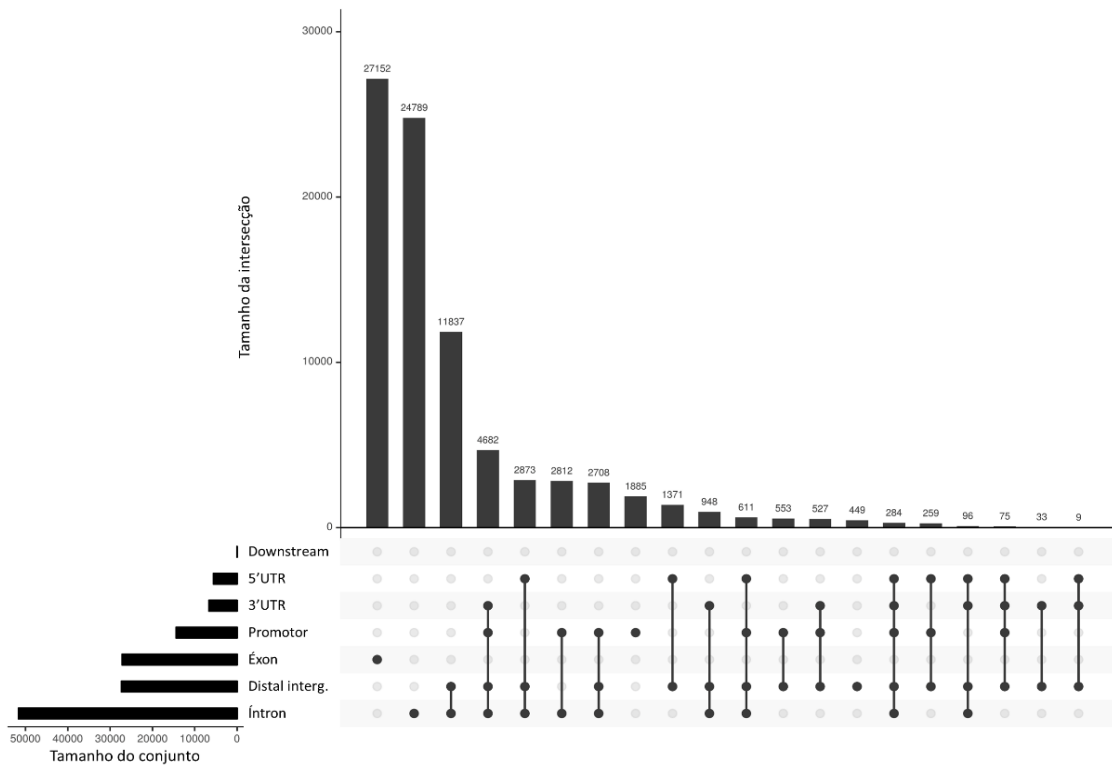
O *Hoxa13* teve maior número de intersecções entre éxons e íntrons, com 11557 sobreposições nessas regiões. Um menor número de intersecções foi identificado entre regiões 5' não traduzidas (5'UTR), promotores, éxons e íntrons, contabilizando 3432 eventos. A terceira maior sobreposição, com 2632 eventos, foi entre região promotora e íntrons. As menores sobreposições aconteceram entre 5'UTR e éxons e entre 5'UTR, 3'UTR e éxons (Figura 32). Os picos anotados para o *Hoxb2* apresentaram 4148 sobreposições entre regiões distais interagências e íntrons, 2344 entre região 3'UTR, promotor, distal intergênico e íntron. As menores intersecções foram entre 5'UTR, 3'UTR e distal intergênica, com 11 eventos e entre promotor e distal intergênico, com 8 eventos (Figura 33). A maior sobreposição para os picos do *HOXB3* foi entre regiões distais intergênicas e íntrons e foram 4682 intersecções entre 3'UTR, promotor, distal intergênico e íntron. Apenas 9 sobreposições ocorreram entre as regiões 5'UTR, 3'UTR e distal intergênica (Figura 34).



**Figura 32.** Upset plot para visualização de sobreposições na anotação quanto às regiões genômicas dos picos do **HOXA13**. O número de picos para cada região genômica está identificado na legenda em tamanho do conjunto e no eixo x e o número de intersecções.



**Figura 33. Upset plot para visualização de sobreposições na anotação quanto às regiões genômicas dos picos do HOXB2.** O número de picos para cada região genômica está identificado na legenda em tamanho do conjunto e no eixo x é o número de interseções.



**Figura 34. Upset plot para visualização de sobreposições na anotação quanto às regiões genômicas dos picos do HOXB3.** O número de picos para cada região genômica está identificado na legenda em tamanho do conjunto e no eixo x do gráfico de barras está o número de regiões sobrepostas.

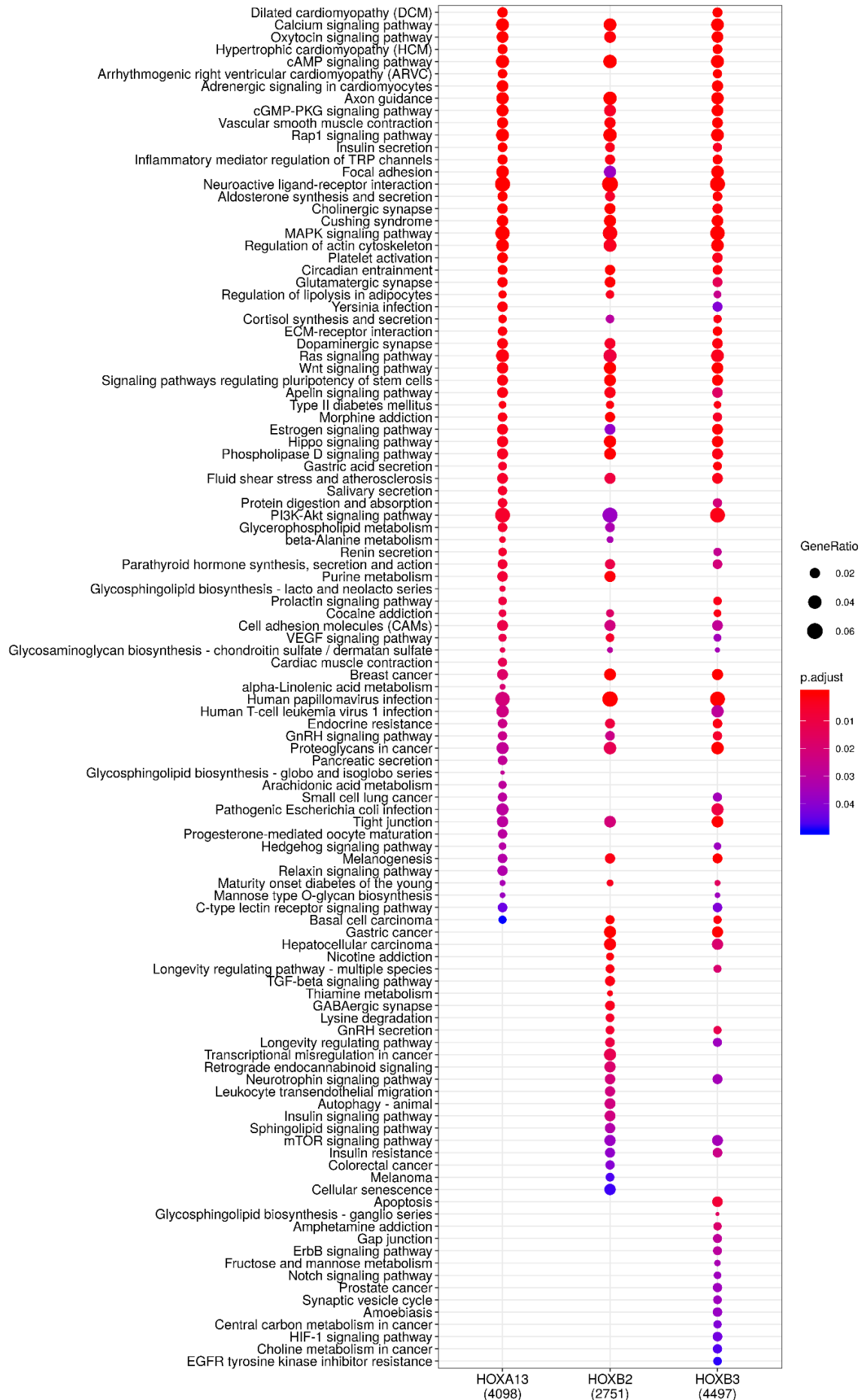
#### 4.5 Envolvimento dos alvos dos genes HOX selecionados com vias e processos biológicos associados ao câncer

Para associar o papel biológico dos genes HOX a processos que ocorrem no desenvolvimento ou progressão do câncer, foram realizadas análises de enriquecimento utilizando os alvos filtrados após a análise de IDR. Com a lista de alvos de cada um dos HOX selecionados, foi possível avaliar em quais redes gênicas esses alvos estão atuando e qual o envolvimento com processos relacionados ao câncer (Figura 35).

Individualmente, o *HOXA13* teve 14724 alvos, desses 4098 genes enriqueceram 75 vias biológicas do KEGG ( $FDR \leq 0,05$ ). Algumas vias se destacam por terem maior número de genes envolvidos (*gene ratio* > 0,04) e por maior significância estatística (valor de p ajustado < 0,02), dentre elas está a via de sinalização de cálcio, sinalização da via cAMP, orientação de axônio (*Axon guidance*), via de adesão focal, regulação de citoesqueleto de actina, sinalização das vias RAP1, MAPK, RAS, Wnt e PI3K-AKT. Para o *HOXB2*, foram identificados 9597 alvos, onde 2751 deles enriqueceram 71 vias biológicas, destacando-se sinalização de cálcio, sinalização da via cAMP, orientação de axônio, via cGMP, MAPK, regulação de citoesqueleto de actina, infecção por HPV (*human papillomavirus*), sinalização da via Hippo, vias do câncer de mama, câncer gástrico e carcinoma hepatocelular (Figura 35).

Dentre os 16016 alvos do *HOXB3*, 4497 genes enriqueceram 85 vias biológicas de forma significativa, as vias com maior impacto foram as vias de sinalização de cálcio, sinalização da via cAMP, via de adesão focal, MAPK, RAP1, estrogênio, Wnt, RAS, PI3K-AKT, via do câncer de mama, infecção por HPV, proteoglicanos em câncer, via de junção celular (*tight junction*), via do câncer gástrico e via de apoptose celular.

Em resumo, algumas vias se destacam por terem enriquecido para as três listas de alvos (*Gene ratio* > 0,05; valor de p ajustado < 0,02): sinalização de cálcio, sinalização da via cAMP, orientação de axônio (*Axon guidance*), sinalização de RAP1, interação neuronal de ligante-receptor, sinalização da via MAPK, regulação de citoesqueleto de actina, sinalização da via Wnt, vias de sinalização de pluripotência de células tronco e sinalização da via Hippo (Figura 35).

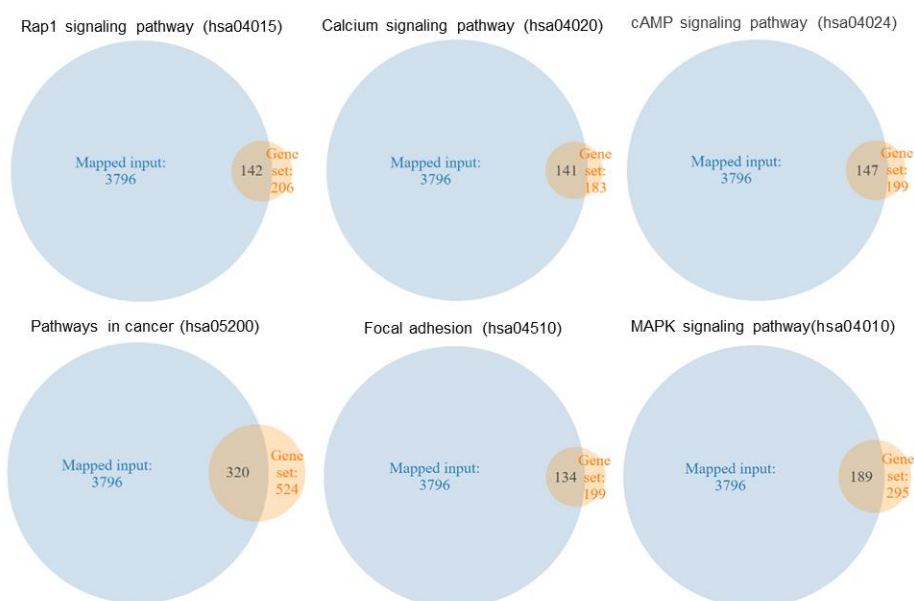


**Figura 35. Vias biológicas enriquecidas pelos alvos dos genes HOXA13, HOXB2 e HOXB3 pelo banco de dados KEGG.** A porcentagem de alvos enriquecidos em cada via, bem como o valor de p ajustado ao FDR estão representados pelo tamanho e coloração dos pontos, respectivamente. Na parte inferior do gráfico, está indicado entre parênteses o número de alvos totais de cada gene HOX utilizados na análise.

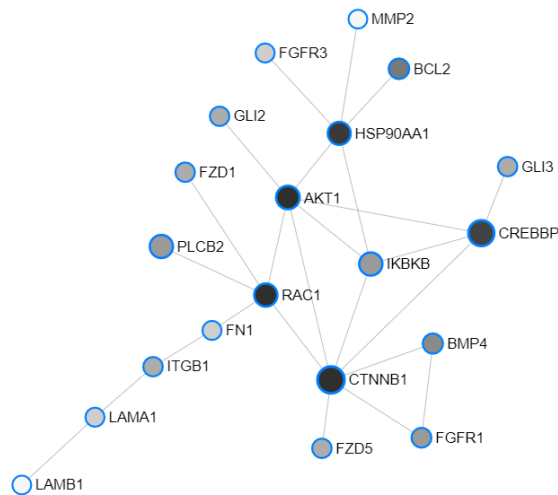
Além disso, os três conjuntos de alvos enriqueceram para vias relacionadas ao câncer (termo em inglês na base de dados KEGG: *pathways in cancer (hsa05200)*). Nessa via estão anotados 524 genes, sendo que 320 deles se sobrepõem à lista de alvos do *HOXA13*. Na figura 38 destacam-se o envolvimento desses alvos em vias de manutenção de angiogênese e regulação do ciclo celular e PPAR-gama.

Das vias com alto impacto no processo biológico de tumores, destacamos aquelas de sinalização de RAP1, com 142 genes sobrepondo à lista de 206 genes anotados; sinalização de cálcio (141/183); cAMP (147/199); adesão focal (134/199) e MAPK (189/295) (Figura 36).

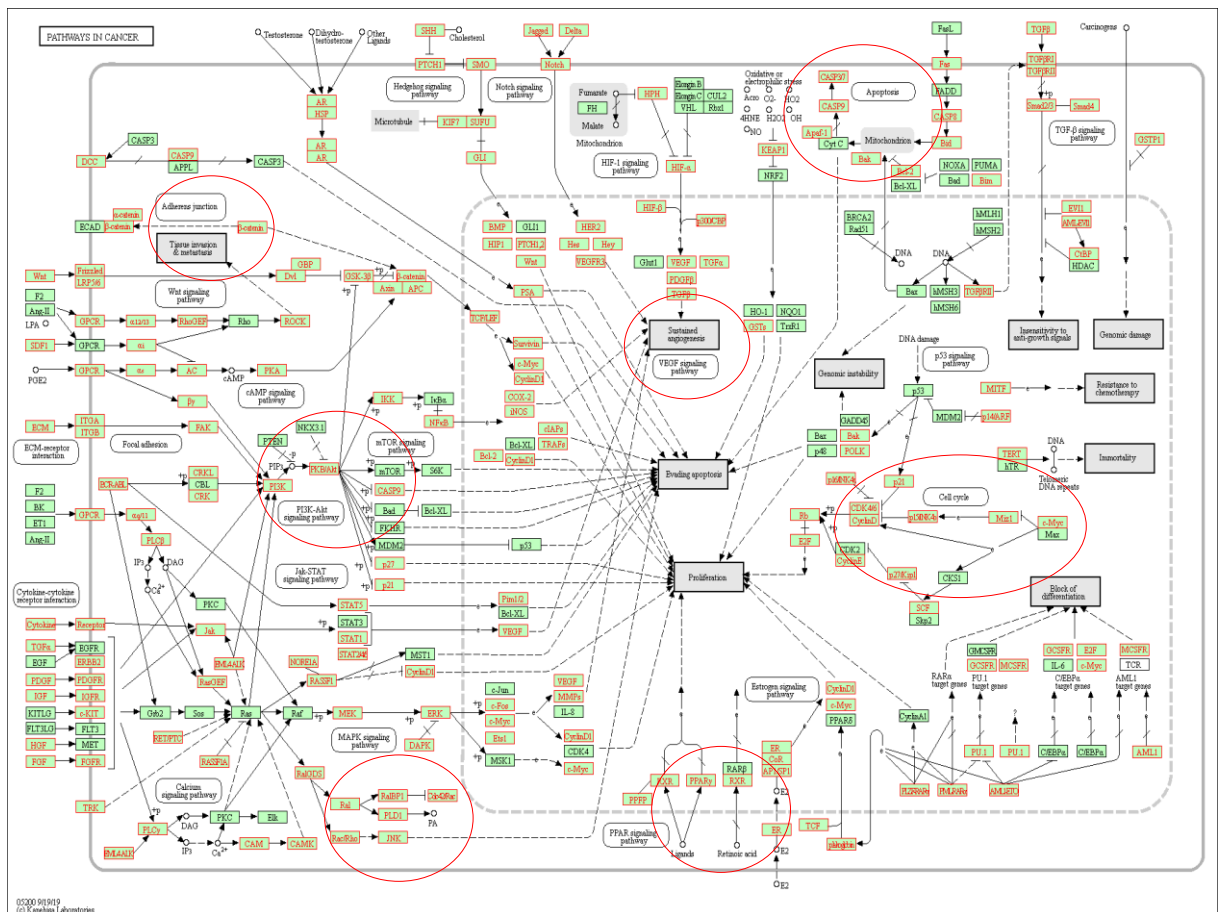
Os alvos do *HOXA13* que se sobrepõem à via *pathways in cancer* foram os genes *RAC1*, *CREBBP*, *CTNNB1*, e *HSP90AA1* com grande número de interações na rede (Figura 37). Seguido por eles, porém com menor número de interações, podemos citar os genes *BCL2*, *IKBKB*, *FGFR1*, *ITGB1*, *PCLB2*, *FZD1* e *BMP4*. As proteínas codificadas por esses genes aparecem interagindo em uma análise de interação entre proteínas (*protein-protein interaction - PPI*) (Figura 37).



**Figura 36. Sobreposição de genes alvos do HOXA13 com vias do banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto).** No círculo azul estão os genes usados para o enriquecimento e que também se encontram anotados para a via avaliada; escrito em laranja estão os genes que compõem a via em questão e escrito em preto estão os genes da lista fornecida que se sobrepõem à lista de genes da via. \*FDR <0,05. Resultados gerados por meio da ferramenta online WebGestalt (WEB-based Gene Set AnaLysis Toolkit) e KEGG.



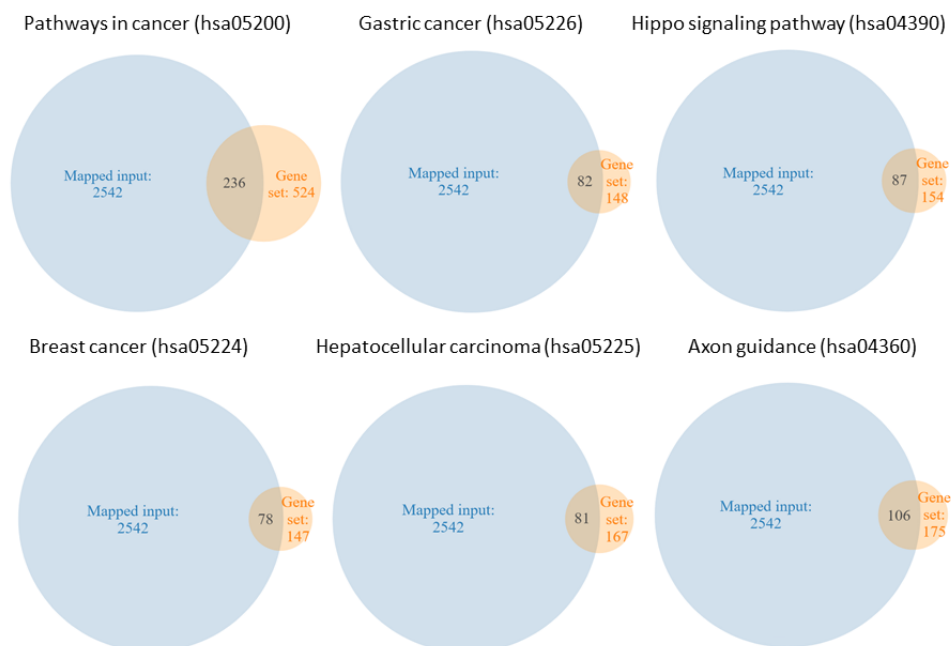
**Figura 37. Rede de interação entre proteínas utilizando a lista dos alvos do HOXA13 enriquecidos na via de cancer (pathways in cancer, KEGG).** Circulados em azul estão indicados os genes interagindo na via e que também estavam na lista de entrada; proteínas em nós mais escuros possuem maior número de interações (genes hubs). Uso da base de dados STRING Interactome. Foi realizada uma análise reduzida para os genes com maior número de interações (betweenness = 500).



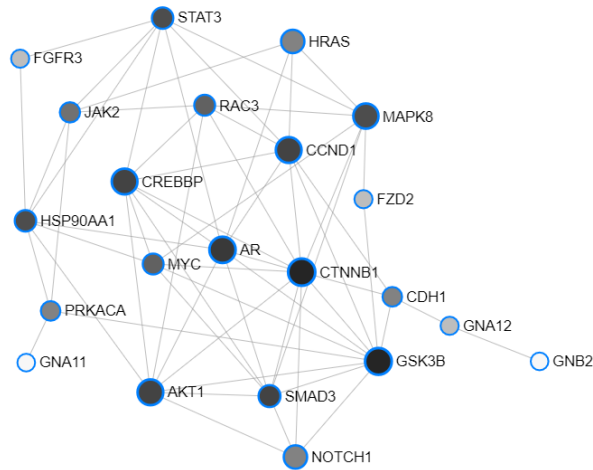
**Figura 38. Enriquecimento da via biológica pathways in cancer do KEGG pelos alvos identificados para o Hoxa13.** Em vermelho estão os alvos que fazem parte da via. Seta contínua: interação molecular; seta tracejada: ligação indireta; seta com risco: interação perdida por mutação, (+p) fosforilação; (-p) desfosforilação. Via de interação obtida a partir do banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000).

Ainda na via *pathways in cancer* do KEGG, 236 genes alvos do *HOXB2* se sobrepõem à lista dos 524 genes anotados (Figura 39). Na figura 41 destacam-se o envolvimento desses alvos em vias de manutenção de ciclo celular e sinalização de componentes da via Wnt. Dentre os genes que apresentam maior número de interações nessa rede podemos citar os genes *CTNBB1*, *GSK3B*, *AKT1*, *AR*, *HSP90AA1*, *CREBBP*, *SMAD3*, *MAPK8*, *CCND1*, *RAC3*, *STAT3* e *NOTCH1* (Figura 40). Outras vias com grande impacto no processo biológico de tumores, pode-se destacar as vias do câncer gástrico com 82 genes sobrepondo à lista de 148 genes anotados; sinalização da via Hippo (87/154); câncer de mama (78/147); carcinoma hepatocelular (81/167) e orientação de neurônios (106/175) (Figura 39).

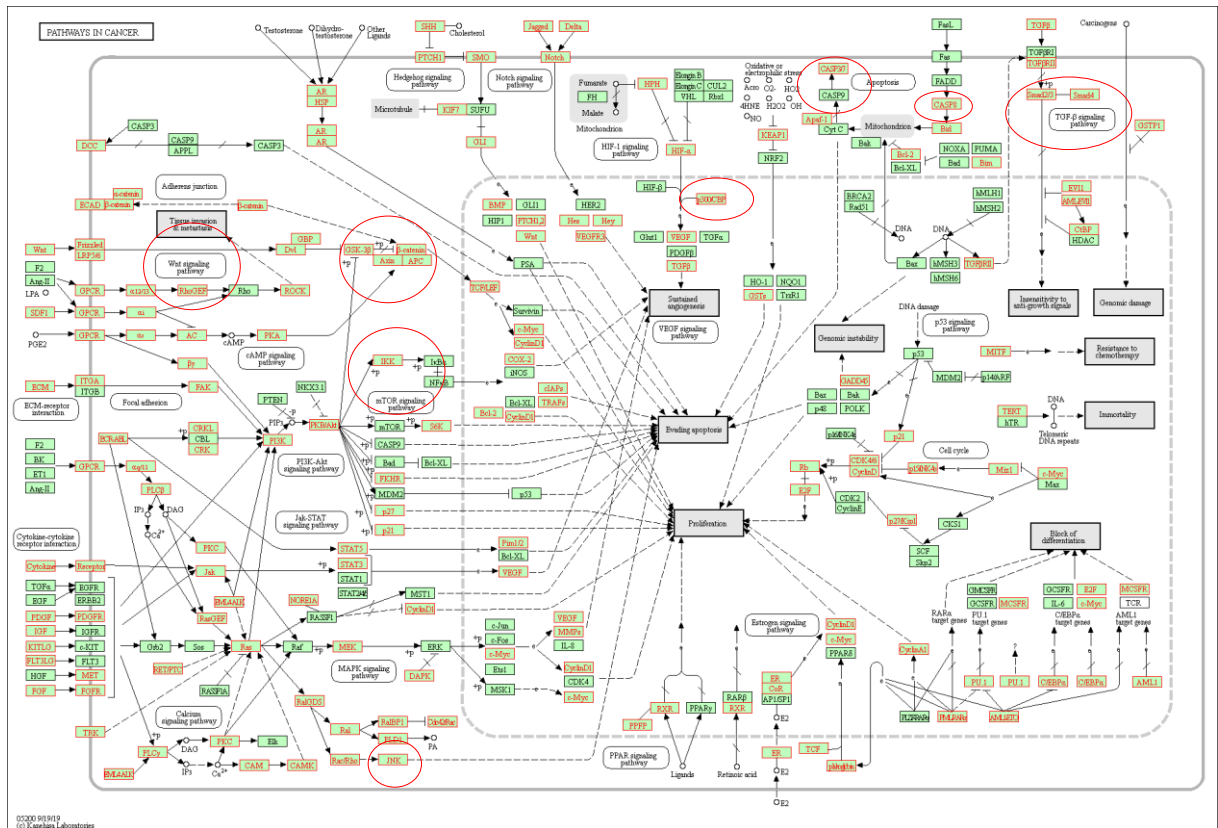
Para os alvos do *HOXB3*, 359 genes se sobrepõem à lista dos 524 genes anotados na via *pathways in cancer* (Figura 42). Na figura 44 destacam-se o envolvimento desses alvos em vias de adesão celular e apoptose. Contribuíram no enriquecimento os seguintes genes: *RAC1*, *AKT1*, *CTNBB1*, *MAPK1*, *STAT3*, *JAC3*, *CASP8*, *ITGB1*, *BMP4* e *PDGFRB*, sendo que todos esses interagem entre si e são genes *hubs*, que se comunicam com grande parte dos genes que atuam nesta via (Figura 43). Outras vias com grande impacto no processo biológico de tumores, pode-se destacar as vias câncer gástrico com 82 genes sobrepondo à lista de 148 genes anotados; sinalização da via Hippo (87/154); câncer de mama (78/147); carcinoma hepatocelular (81/167) e orientação de neurônios (106/175) (Figura 42).



**Figura 39.** Sobreposição de genes alvos do *HOXB2* com vias do banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto). No círculo azul estão os genes usados para o enriquecimento e que também encontram-se anotados para a via avaliada; escrito em laranja estão os genes que compõem a via em questão e escrito em preto estão os genes da lista fornecida que se sobrepõem à lista de genes da via. \*FDR <0,05.

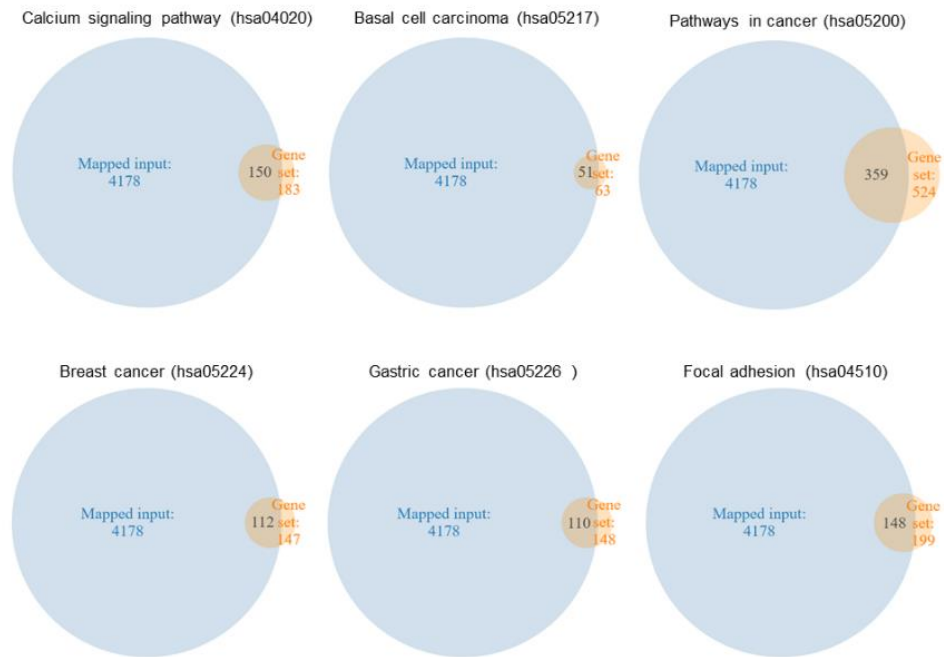


**Figura 40. Rede de interação entre proteínas obtida com a lista de alvos do gene HOXB2 que se apresentaram enriquecidos na via de câncer (Pathways in cancer – KEGG).** Uso do banco de dados STRING Interactome para a interação entre proteínas. Circulados em azul estão os genes que também estavam na lista de entrada. Foi realizada uma análise reduzida para os genes com maior número de interações (betweenness = 500). Proteínas em nós mais escuros possuem maior número de interações e menor valor de FDR.

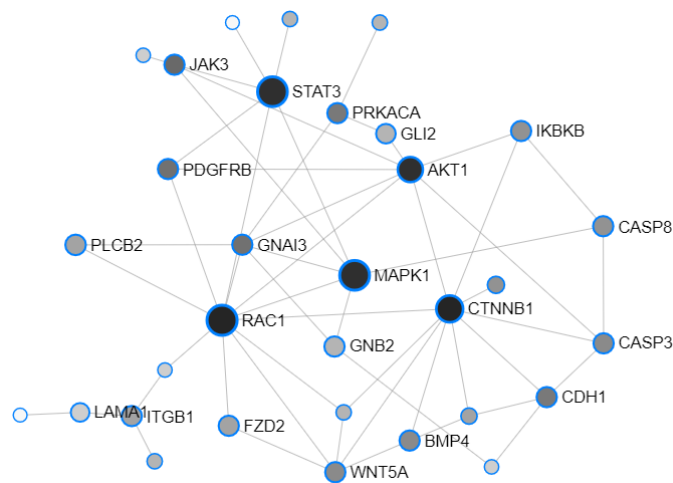


**Figura 41. Enriquecimento da via biológica pathways in cancer do KEGG pelos alvos identificados para o HOXB2.** Em vermelho estão os alvos que fazem parte da via. Seta contínua: interação molecular; seta tracejada: ligação indireta; seta com risco: interação perdida por mutação, (+p) fosforilação; (-p) desfosforilação. Via de interação obtida a partir do banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000)

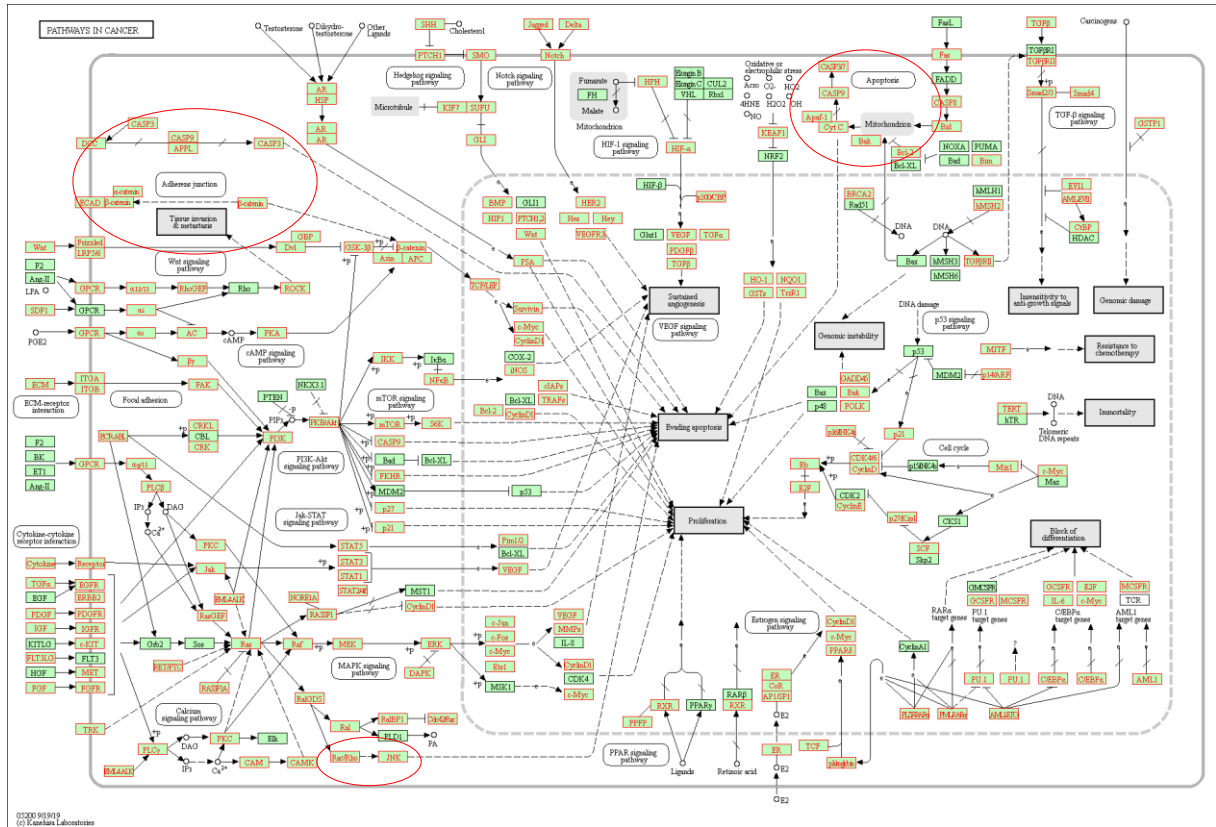




**Figura 42. Sobreposição de genes alvos do HOXB3 com vias do banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto).** No círculo azul estão os genes usados para o enriquecimento e que também encontram-se anotados para a via avaliada; escrito em laranja estão os genes que compõem a via em questão e escrito em preto estão os genes da lista fornecida que se sobrepõem à lista de genes da via. \*FDR <0,05.



**Figura 43. Rede de interação entre proteínas obtida com a lista de alvos do gene HOXB3 que se apresentaram enriquecidos na via de câncer (Pathways in cancer – KEGG).** Banco STRING Interactome para a interação entre proteínas. Circulados em azul estão os genes que estavam na lista de entrada. Análise reduzida, betweenness = 500. Proteínas em nós mais escuros são denominados genes hubs, pois possuem maior número de interações menor valor de FDR



**Figura 44. Enriquecimento da via biológica pathways in cancer do KEGG pelos alvos identificados para o HOXB3.** Em vermelho estão os alvos que fazem parte da via. Seto contínua: interação molecular; seto tracejada: ligação indireta; seto com risco: interação perdida por mutação, (+p) fosforilação; (-p) desfosforilação. Via de interação obtida a partir do banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000).

#### 4.6 Correlação da expressão dos genes HOX e dos seus alvos em tumores primários

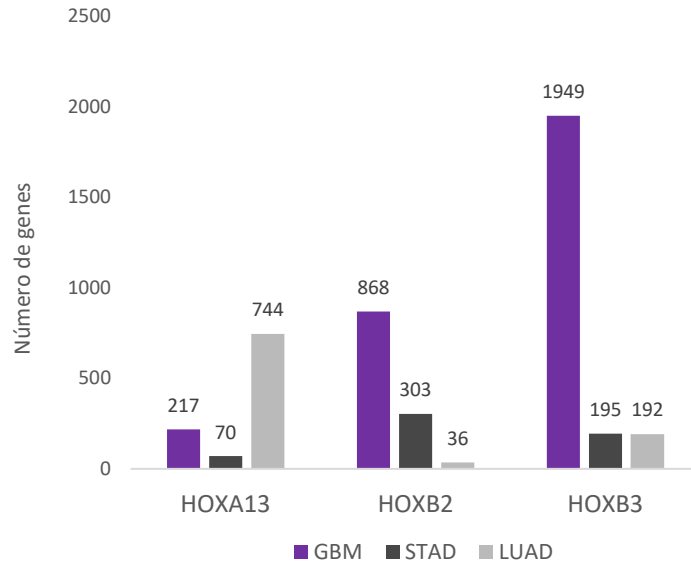
Para caracterizar os genes HOX na regulação dos seus alvos e avaliar o papel biológico na tumorigênese, foram avaliadas as correlações de expressão entre o fator de transcrição e os alvos identificados no ChIP-seq em dados *in silico* de tumor primário de glioblastoma multiforme (GBM), adenocarcinoma de estômago (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD), provenientes da plataforma do TCGA. Identificamos 217 alvos do Hoxa13 com alta correlação em GBM, 70 alvos para o STAD e 744 para o LUAD. O Hoxb2 teve 868 alvos com alta correlação em GBM, 303 alvos com alta correlação em STAD e 36 alvos com alta correlação em LUAD. O Hoxb3 teve 1949 alvos com alta correlação em GBM, 195 alvos com alta correlação em STAD e 192 alvos com alta correlação em LUAD (Figura 45).

Alguns genes alvos possuem alta correlação com mais de um HOX e em mais de um tumor. Na figura 46 é possível observar os genes que se sobrepõem entre as listas. Utilizando todas as listas da figura 45, foi realizada a análise de enriquecimento de vias do KEGG, para desvendar

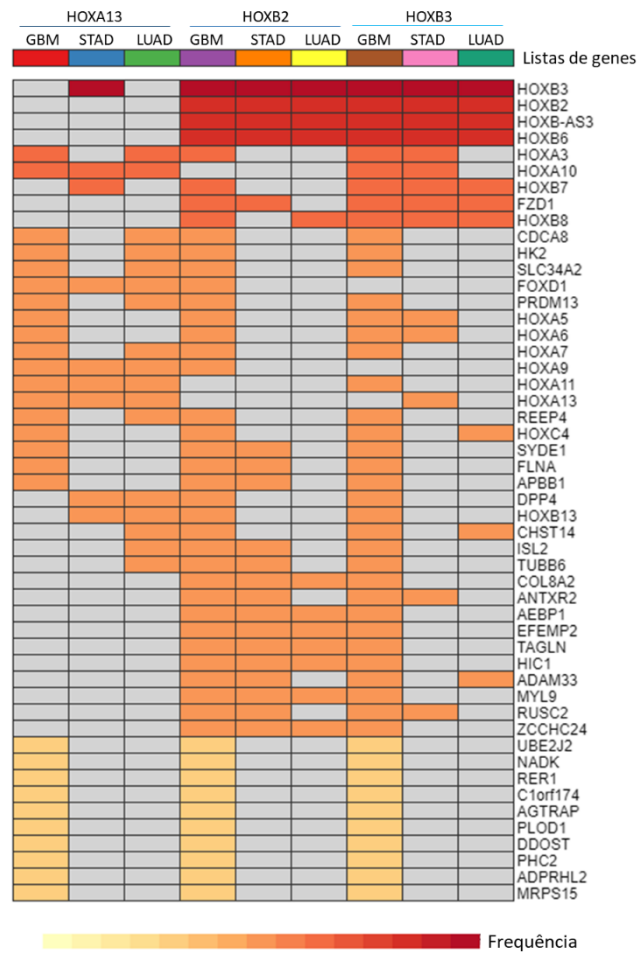
os tipos de mecanismos que esses alvos, com correlação em tumor, estão atuando (Tabela 10). Como esperado a via com maior enriquecimento foi a via de câncer (*pathways in câncer*) com 442 genes sobrepondo aos 524 anotados nesta via. Outras vias biológicas relacionadas ao câncer que também estão com grande número de sobreposições, podemos citar a via de sinalização de PI3K-Akt com 298 sobreposições de 354, MAPK com 250 de 295, ciclo celular com 118 de 124, Adesão focal com 175 de 199 e etc.

Avaliando apenas os genes alvos do *HOXA13*, 217 estavam com alta correlação em GBM, 70 genes em STAD e 744 em LUAD. Do total, 8 genes aparecem em comum para os três tipos de tumores (Figura 47 a,b; na figura 47-a 7 genes aparecem em comum, pois 1 gene não estava anotado nessa base de dados) e existe maior semelhança entre os alvos com correlação em GBM e LUAD do que entre STAD e os outros 2 tumores (Figura 47c). Os alvos de Hoxa13 com correlação nos três tumores enriqueceram vias do ciclo celular, sinalização de p53 e sinalização de regulação de pluripotência de células tronco (Figura 48a). Por meio de análise de interação entre proteínas (*protein-protein interaction* - PPI) podemos identificar a interação entre os genes alvos de Hoxa13 com correlação nos três tumores, *HOXA11*, *HOXA9* e *HOXA10* através de proteínas codificadas pelos genes *PBX1*, *PBX2*, *CREBBP* e *ASXL1* (cofatores de transcrição), *HDAC2*, *CYBB*. Essas proteínas interagem com outras da via de câncer (*spl1*, *esr1*, *nco1*, *fgf2* e *foxo1*) ou vias do ciclo celular (*cdkn1a*, *hdac1*, *smad4*) (Figura 48 a,c).

Além disso, dentre os 3 tumores, o tipo LUAD apresentou o maior número de alvos com alta correlação ( $-0,5 < R < 0,4$ ) e, portanto, foram investigadas as vias em que estão atuando e como as proteínas codificadas interagem. As vias mais enriquecidas foram de ciclo celular seguida pela via de sinalização de p53. Os genes atuando nas duas vias estão descritos na tabela 11 junto com o valor de correlação no tumor.



**Figura 45. Número de alvos dos HOX com alta correlação de expressão nos tumores.** Correlação de Pearson com dados de expressão em tumores do tipo GBM: Glioblastoma multiforme, STAD: adenocarcinoma de estômago, LUAD: adenocarcinoma de pulmão.

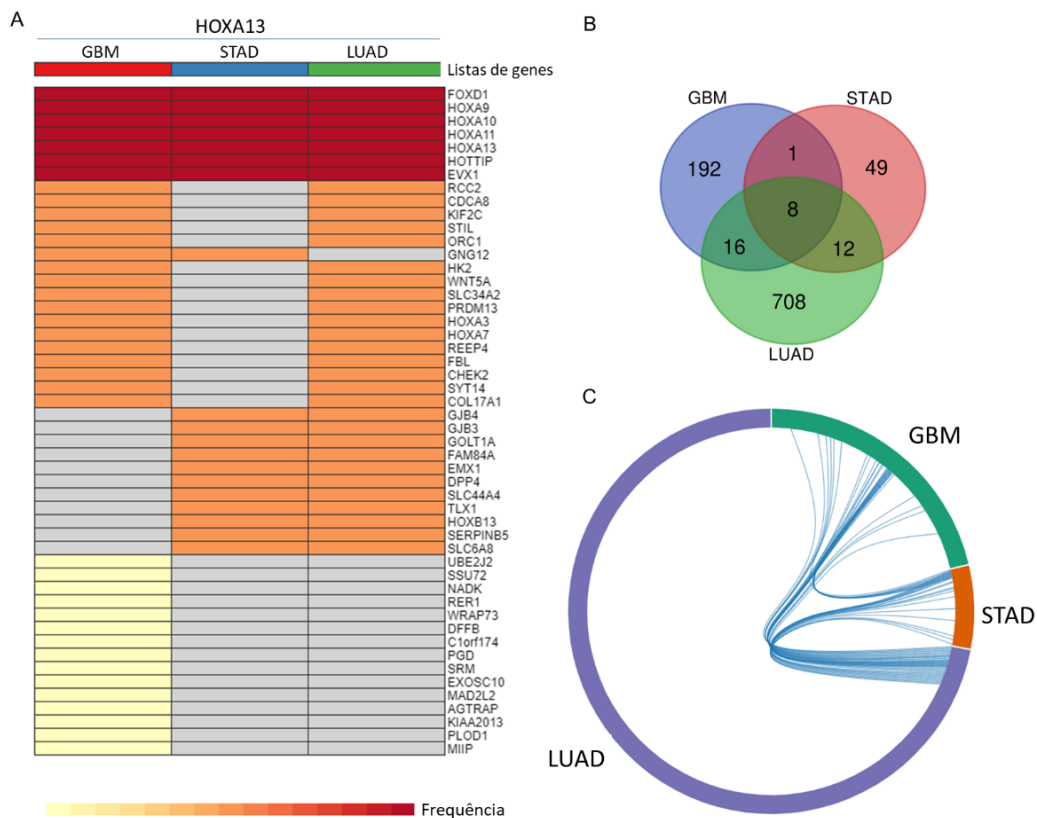


**Figura 46. Heatmap do conteúdo das listas utilizadas na análise de enriquecimento dos genes com alta correlação.** Em cada linha estão os genes utilizados que apresentam intersecção em no mínimo duas listas. Cada coluna representa um HOX como regulador em um determinado tipo tumoral, em cinza estão os genes que não estão presentes na lista, aqueles genes que estão em apenas uma lista foram removidos do heatmap. FDR<0.05.

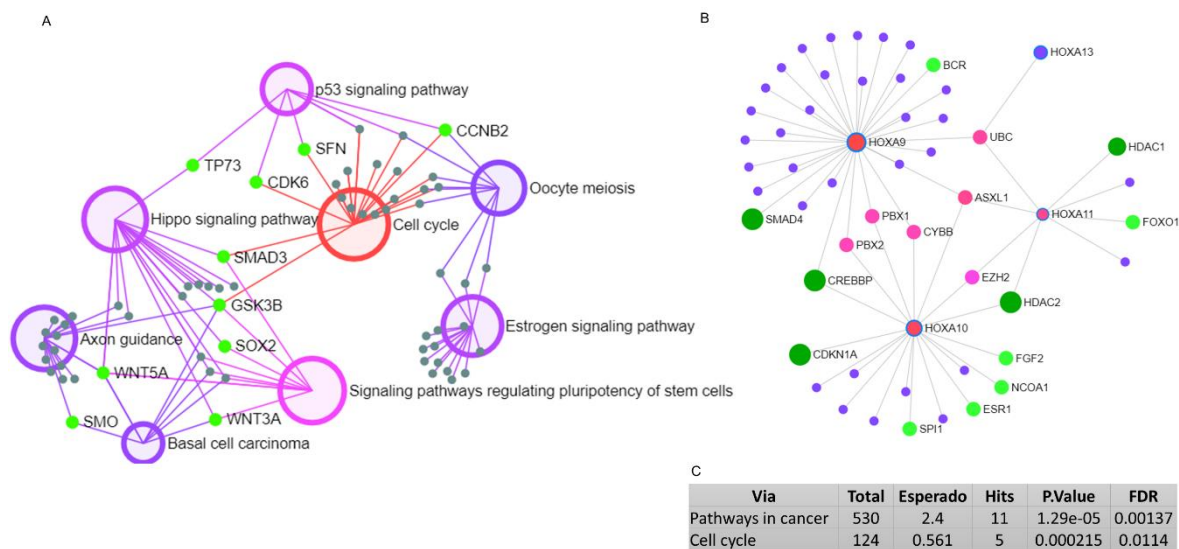
**Tabela 10. Enriquecimento de vias biológicas com os alvos dos três genes HOX selecionados que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastomas (GBM), câncer gástrico (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD).**

Via	Total	Esperado	Hits	Valor de p	FDR
<i>Pathways in cancer</i>	530	323	442	5.36e-31	1.7e-28
<i>HTLV-I infection</i>	219	134	198	3.41e-23	5.43e-21
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	354	216	298	2.47e-22	2.62e-20
<i>Hepatitis B</i>	163	99.5	150	1.05e-19	6.99e-18
<i>MAPK signaling pathway</i>	295	180	250	1.1e-19	6.99e-18
<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	137	83.6	129	1.81e-19	9.6e-18
<i>Cell cycle</i>	124	75.7	118	5.15e-19	2.34e-17
<i>Endocytosis</i>	244	149	210	2.38e-18	9.44e-17
<i>Focal adhesion</i>	199	121	175	1.44e-17	5.09e-16
<i>Proteoglycans in cancer</i>	201	123	175	1.43e-16	4.56e-15
<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	214	131	184	4.04e-16	1.17e-14
<i>Cellular senescence</i>	160	97.7	143	5.67e-16	1.5e-14
<i>Epstein-Barr virus infection</i>	201	123	174	6.18e-16	1.51e-14
<i>T cell receptor signaling pathway</i>	101	61.6	96	1.45e-15	3.3e-14
<i>Small cell lung cancer</i>	93	56.8	89	4.47e-15	9.48e-14
<i>Apoptosis</i>	136	83	123	7.46e-15	1.48e-13
<i>Transcriptional misregulation in cancer</i>	186	114	161	7.99e-15	1.49e-13
<i>Prostate cancer</i>	97	59.2	92	8.79e-15	1.55e-13
<i>HIF-1 signaling pathway</i>	100	61	94	2.39e-14	4.00E-13
<i>Neurotrophin signaling pathway</i>	119	72.6	109	2.93e-14	4.67e-13
<i>Chronic myeloid leukemia</i>	76	46.4	74	4.96e-14	7.51e-13
<i>Pancreatic cancer</i>	75	45.8	73	7.97e-14	1.15e-12
<i>Rap1 signaling pathway</i>	206	126	174	9.36e-14	1.29e-12
<i>Colorectal cancer</i>	86	52.5	82	1.09e-13	1.44e-12
<i>TNF signaling pathway</i>	110	67.1	101	1.78e-13	2.27e-12
<i>FoxO signaling pathway</i>	132	80.6	118	2.1e-13	2.51e-12
<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	165	101	143	2.13e-13	2.51e-12
<i>Non-small cell lung cancer</i>	66	40.3	65	2.57e-13	2.92e-12
<i>Chagas disease (American trypanosomiasis)</i>	103	62.9	95	4.64e-13	5.09e-12
<i>Renal cell carcinoma</i>	69	42.1	67	1.35e-12	1.43e-11
<i>Toxoplasmosis</i>	113	69	102	2.17e-12	2.16e-11
<i>Measles</i>	138	84.2	121	2.62e-12	2.52e-11
<i>Ras signaling pathway</i>	232	142	190	2.79e-12	2.61e-11
<i>AMPK signaling pathway</i>	120	73.2	107	4.26e-12	3.87e-11
<i>NF-kappa B signaling pathway</i>	100	61	91	1.11e-11	9.8e-11
<i>Insulin signaling pathway</i>	137	83.6	119	1.68e-11	1.44e-10
<i>Viral carcinogenesis</i>	201	123	166	1.78e-11	1.49e-10
<i>Autophagy - animal</i>	128	78.1	112	2.36e-11	1.92e-10
<i>Axon guidance</i>	181	110	151	3.16e-11	2.51e-10
<i>Hippo signaling pathway</i>	154	94	130	1.49e-10	1.03e-09

\* 40 vias mais enriquecidas para os alvos com alta correlação ( $R > 0,04$ ) nos três tipos de tumores de acordo com a base de dados KEGG. A análise foi realizada utilizando a união das listas de genes. Coluna total, números de genes que estão anotados na via em questão, *Hits*, número de genes que estavam na lista de entrada no banco de dados e que sobrepõem aos genes da via.

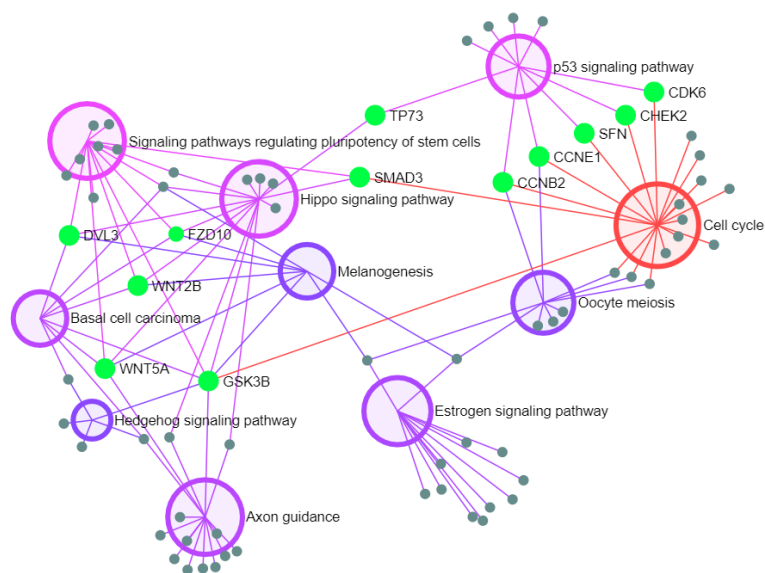


**Figura 47.** Alvos do gene *HOXA13* que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastomas (GBM), câncer gástrico (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD). (A) *Heatmap* do conteúdo das listas de genes utilizadas na análise de enriquecimento dos genes com alta correlação. Em cada linha estão os genes utilizados que apresentam intersecção nas listas e cada coluna representa um determinado tipo tumoral; em cinza estão os genes que não estão presentes na lista; (B) Diagrama de Venn mostrando a intersecção dos alvos entre os tumores; (C) Diagrama de corda apresentando a intersecção dos genes entre as listas utilizadas como entrada na análise de interação entre proteínas. Glioblastoma (GBM), câncer gástrico (STAD), adenocarcinoma de pulmão (LUAD). ( $-0,5 > R > 0,4$ ).



**Figura 48.** Alvos do *HOXA13* com alta correlação em glioblastoma, câncer gástrico e adenocarcinoma de pulmão. (A) Análise de enriquecimento dos alvos em formato de rede utilizando o banco de dados KEGG. Em vermelho a via com maior enriquecimento (*cell cycle*) seguida pelo lilás (*p53 signaling pathway* e *pluripotency of stem cells*), ambas com  $FDR < 0,05$  e em roxo com  $FDR > 0,05$  (*Hippo*, *Estrogen*, *Axon guidance*, *Basal cell ca.*); (B) Rede de interação entre proteínas utilizando a lista de alvos do gene *HOXA13*. Em verde claro e verde escuro estão todos os alvos que se sobrepõem à via de câncer [*pathways in cancer*, KEGG], em verde escuro estão marcadas as proteínas que também se sobrepõem à via de ciclo celular (*cell cycle*);

(C) Análise de enriquecimento destacadas na Figura B que apresentaram valores FDR <0.05 (Hits: número de genes da lista utilizada que se sobrepõem à lista de genes da via mencionada). IMEx Interactome para a interação entre proteínas.



**Figura 49. Análise de enriquecimento em formato de rede dos alvos do gene HOXA13 com alta correlação em adenocarcinoma de pulmão (LUAD).** Em vermelho destaca-se a via com maior enriquecimento (*cell cycle*) seguida pelo lilás (*p53 signaling pathway, pluripotency of stem cells and Hippo pathway*), com FDR<0.05 e em tons de roxo com FDR > 0.05.

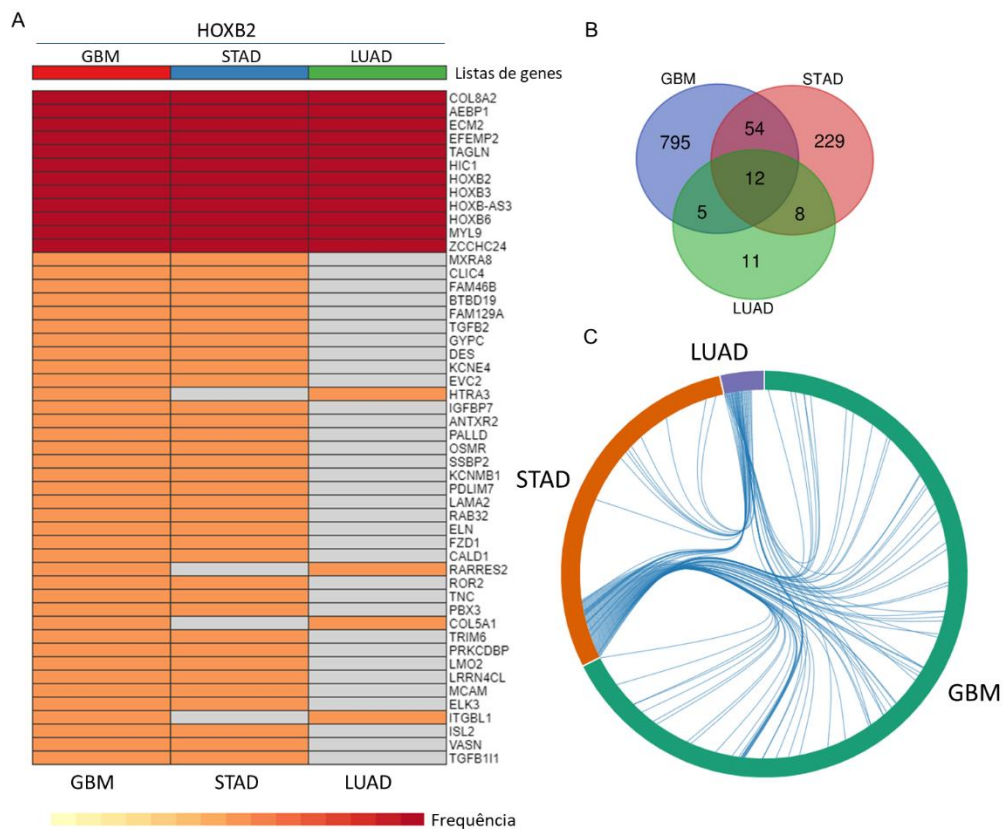
**Tabela 11. Genes alvos do HOXA13 que aparecem nas vias de ciclo celular e sinalização de p53 e valor de correlação da expressão em adenocarcinoma de pulmão (R).**

Gene	R	Via
SFN	0.45	Ciclo celular
ORC1	0.45	Ciclo celular
CDC25A	0.51	Ciclo celular
GSK3B	0.48	Ciclo celular
MCM2	0.54	Ciclo celular
CDK6	0.47	Ciclo celular
MCM7	0.42	Ciclo celular
ESPL1	0.42	Ciclo celular
BUB1B	0.48	Ciclo celular
CCNB2	0.50	Ciclo celular
SMAD3	0.41	Ciclo celular
PKMYT1	0.4	Ciclo celular
PLK1	0.44	Ciclo celular
ORC6	0.50	Ciclo celular
CDC6	0.50	Ciclo celular
CCNE1	0.43	Ciclo celular
CDC45	0.53	Ciclo celular
TP3	0.46	Sinalização de p53
SFN	0.45	Sinalização de p53
CDK6	0.47	Sinalização de p53
TP53AIP1	0.43	Sinalização de p53
CCNB2	0.50	Sinalização de p53
SERPINB5	0.56	Sinalização de p53
CCNE1	0.43	Sinalização de p53
BID	0.48	Sinalização de p53
CHEK2	0.40	Sinalização de p53
GTSE1	0.49	Sinalização de p53

\*Enriquecimento produzido utilizando a ferramenta online NetworkAnalyst 3.0 que utilizou o banco de dados KEGG.

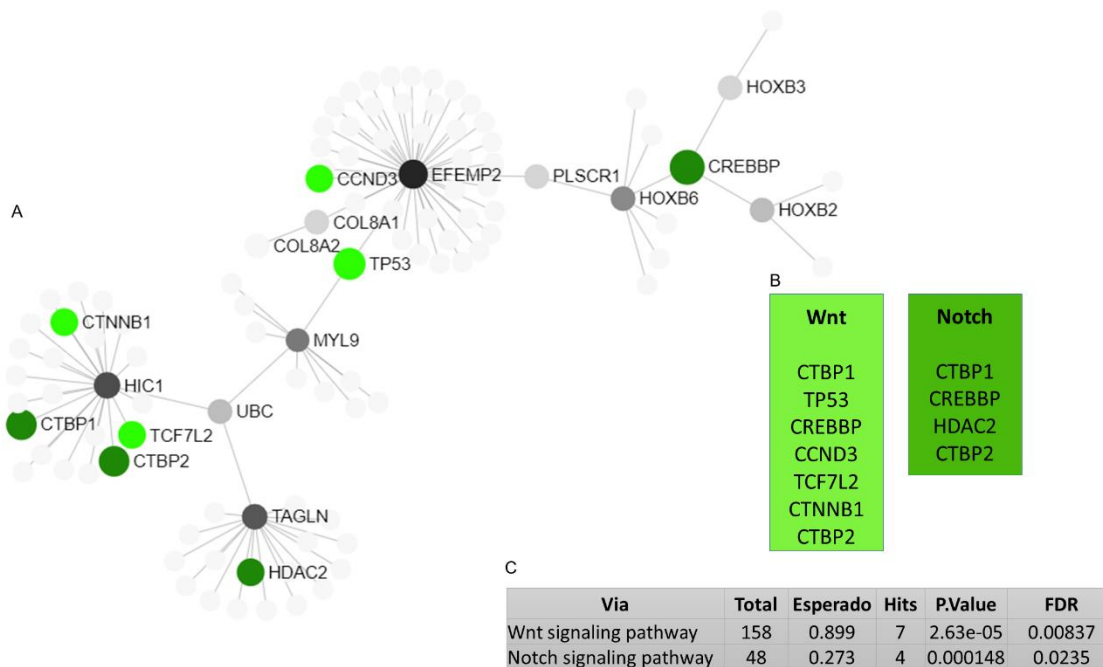
De 9597 genes alvos identificados para o *HOXB2*, 867 deles estavam com alta correlação em GBM, 303 genes em STAD e 36 em LUAD. Do total, 12 genes aparecem em comum para os três tipos tumorais (Figura 50 a, b) e existe maior semelhança entre os alvos com correlação em GBM e STAD do que entre LUAD e os outros 2 tumores, especialmente devido ao número menor de alvos em LUAD (Figura 50 b). Os alvos de *Hoxb2* com correlação nos três tumores enriqueceram vias de sinalização da família Wnt por meio da interação com *TP53*, *CCND3*, *CTBP1*, *CREBBP*, *TCF7L2*, *CTNNB1* e *CTBP*; a via Notch também está enriquecida e os genes que interagem nessa via são *CTBP1*, *CREBBP*, *HDAC2* e *CTBP2* (Figura 51 a).

O tipo tumoral GBM apresentou o maior número de alvos com alta correlação ( $-0,5 < R > 0,4$ ) e dentre as vias mais enriquecidas estão a de ciclo celular e sinalização de p53 (Tabela 12). Os genes atuando nas duas vias estão destacados na figura 52.



**Figura 50.** Alvos do gene *HOXB2* que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastomas (GBM), câncer gástrico (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD). (A) *Heatmap* do conteúdo das listas de genes utilizadas na análise de enriquecimento dos genes com alta correlação. Em cada linha estão os genes utilizados que apresentam intersecção nas listas e cada coluna representa um determinado tipo tumoral; em cinza estão os genes que não estão presentes na lista; (B) Diagrama de Venn mostrando a intersecção dos alvos entre os tumores; (C) Diagrama de corda apresentando a intersecção dos genes entre as listas utilizadas como entrada na análise de interação entre proteínas. Glioblastoma (GBM), câncer gástrico (STAD), adenocarcinoma de pulmão (LUAD). ( $-0,5 > R > 0,4$ ).



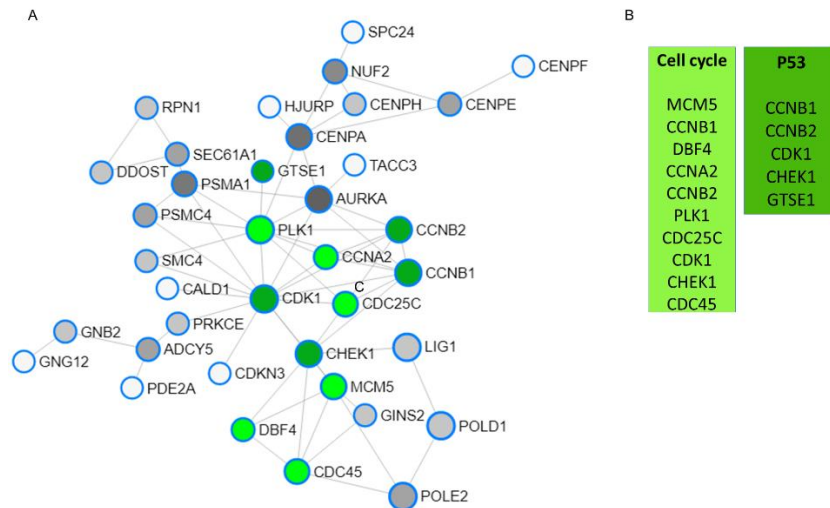


**Figura 51. Alvos do HOXB2 com alta correlação em glioblastoma, câncer gástrico e adenocarcinoma de pulmão.** (A) Rede de interação entre proteínas utilizando a intersecção das listas de alvos do gene *HOXB2* com alta correlação nos três tumores. Em verde claro e verde escuro estão todos os alvos que se sobrepõem às vias de sinalização Wnt e Notch, respectivamente (genes em escalas de cinza de tons mais escuros indicam menor valor de FDR); (B) Genes que enriqueceram em cada uma das vias Wnt e Notch; (C) Informações de valores e p-valor dos genes presentes na via. Utilizado o banco IMEx *Interactome* para a interação entre proteínas.

**Tabela 12. Vias biológicas enriquecidas (FDR <0,05) com os genes alvos do HOXB2 com alta correlação em Glioblastoma (GBM).**

Via	Total	Esperado	Hits	Valor de p	FDR
<i>Cell cycle</i>	124	0.433	10	5.2e-12	1.65e-09
<i>p53 signaling pathway</i>	72	0.251	5	4.17e-06	0.000332
<i>DNA replication</i>	36	0.126	4	6.42e-06	0.000408
<i>Base excision repair</i>	33	0.115	3	0.000193	0.00901
<i>Cellular senescence</i>	160	0.558	5	0.000198	0.00901
<i>Morphine addiction</i>	91	0.318	4	0.000256	0.0102
<i>Nucleotide excision repair</i>	47	0.164	3	0.000555	0.0196
<i>Apelin signaling pathway</i>	137	0.478	4	0.0012	0.0383

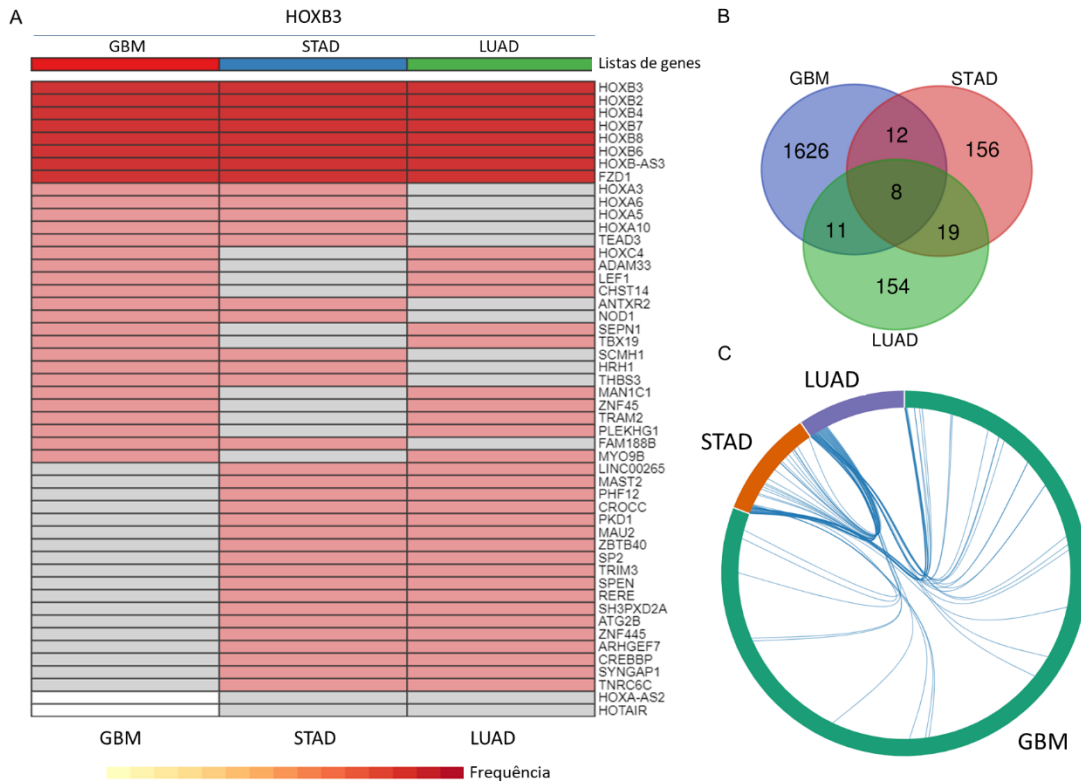
\* Coluna total, números de genes que estão anotados na via em questão, *Hits*, número de genes que estavam na lista de entrada no banco de dados e que sobrepõem aos genes da via.



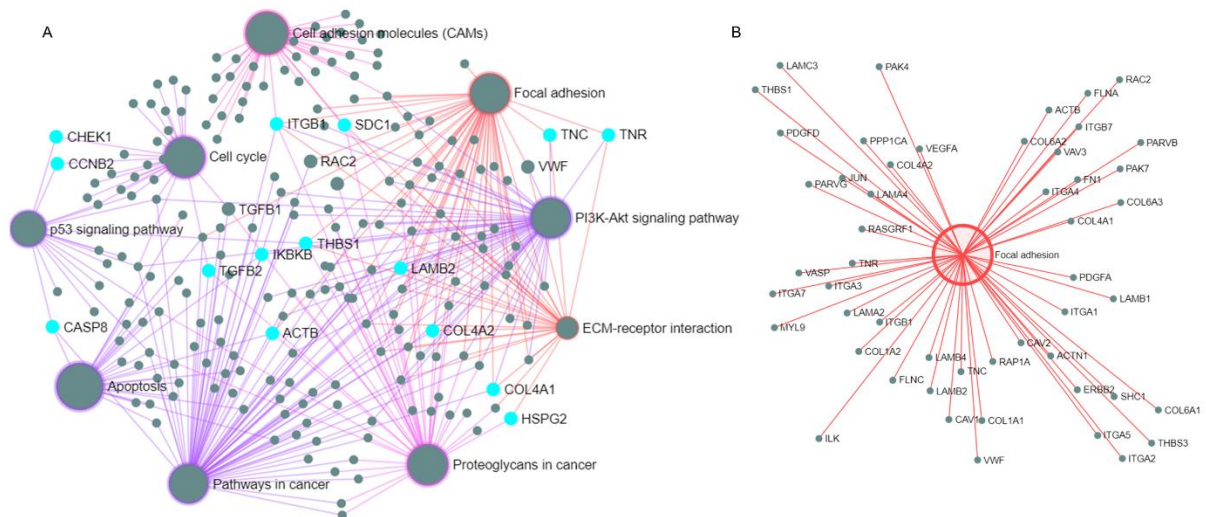
**Figura 52. Alvos do HOXB2 com alta correlação de expressão em glioblastoma (GBM).** (A) Rede de interação entre proteínas utilizando a lista de alvos do gene *HOXB2* em GBM. Em verde claro e verde escuro estão todos os alvos que se sobrepõem às vias de sinalização em ciclo celular (cell cycle) e de sinalização da proteína p53 (p53 signaling pathway), respectivamente. Análise de interação reduzida (zero-order); os genes que estão na lista de alvos foram circulos em azul. Utilizado o banco STRING Interactome para a interação entre proteínas. (B) Genes envolvidos na via de ciclo celular e sinalização de p53.

Investigando os alvos identificados para o *HOXB3*, 1949 genes apresentaram alta correlação da expressão com esse HOX em tumor do tipo GBM, 195 genes em STAD e 192 genes em LUAD. Foram identificados 7 genes que possuem alta correlação com *HOXB3* nos três tumores selecionados. *HOXB2*, *HOXB4*, *HOXB7*, *HOXB8*, *HOXB6*, *HOXB-AS3* e *FZD1* (Figura 53 a). Comparando as listas de genes, 11 estão em comum entre STAD e GBM e entre GBM e LUAD; são 19 em comum entre STAD e LUAD (Figura 53 b,c). A análise de enriquecimento de vias biológicas com a união das listas de alvos do *HOXB3* nos três tumores identificou a via de câncer do KEGG como a mais enriquecida em uma análise de interação de proteínas com a redução de conexões. Dentre os 530 genes anotados na via, um número de 290 se sobrepõem aos alvos com um  $FDR = 5.67^{-58}$ .

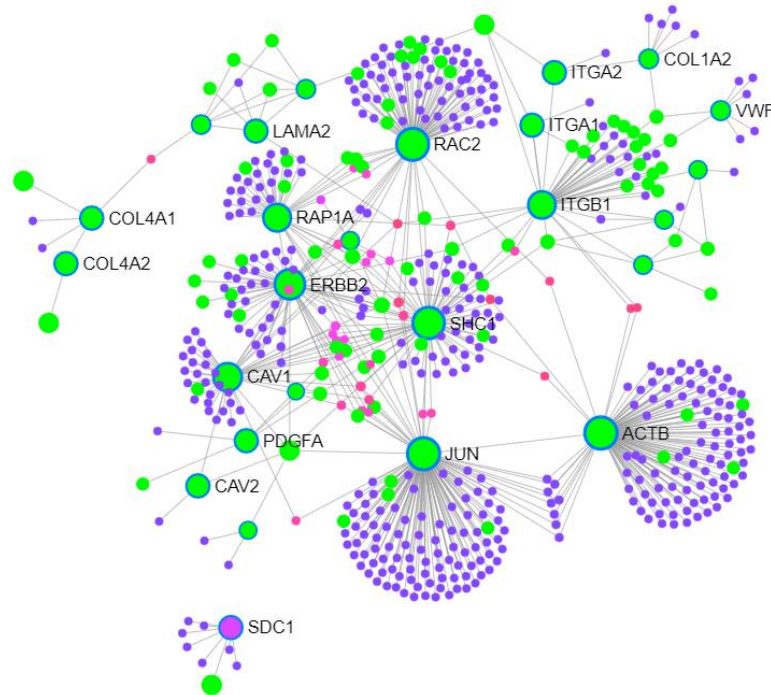
Os alvos com expressão correlacionada com *HOXB3* em tumor do tipo GBM enriqueceu especialmente a via de adesão focal e interação de receptores de matriz extracelular (ECM-receptor interaction). Os genes envolvidos na via de adesão focal estão destacados na figura 44. Uma análise rede de interação entre proteínas foi realizada para investigar a interação entre esses genes (Figura 55). A figura 55 mostra que na rede, alguns genes hubs, aqueles com grande número de interações, são parte da via de adesão, como por exemplo: membros da família de integrinas, *ITGB1*, *ITGA1*, *ITGA2*; genes da família do colágeno, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL4A1*, *COL4A2*; além desses podemos citar: *ERBB2*, *ACTB*, *CAV1* e 2, *RAP1A* e *SHC1* (Figura 55).



**Figura 53. Alvos do gene HOXB3 que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastomas (GBM), câncer gástrico (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD).** (A) Heatmap do conteúdo das listas de genes utilizadas na análise de enriquecimento dos genes com alta correlação. Em cada linha estão os genes utilizados que apresentam intersecção nas listas e cada coluna representa um determinado tipo tumoral; em cinza estão os genes que não estão presentes na lista; (B) Diagrama de Venn mostrando a intersecção dos alvos entre os tumores; (C) Diagrama de corda apresentando a intersecção dos genes entre as listas utilizadas como entrada na análise de interação entre proteínas. Glioblastoma (GBM), câncer gástrico (STAD), adenocarcinoma de pulmão (LUAD). (-0,5>R>0,4).



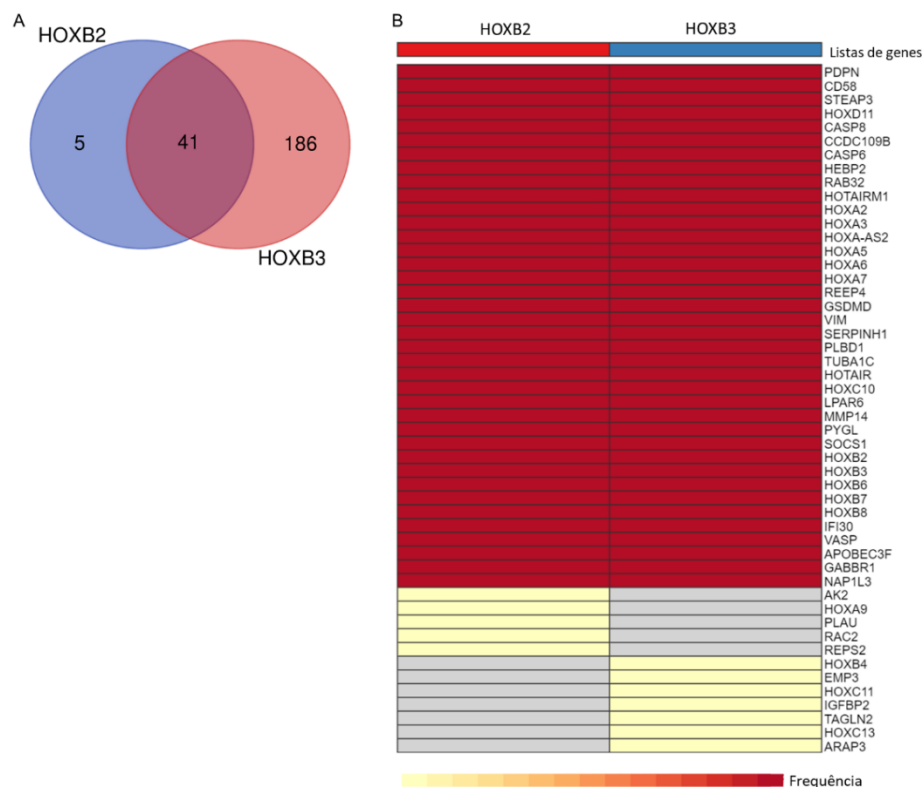
**Figura 54. Análise de enriquecimento em formato de rede dos alvos do gene HOXB3 com alta correlação em tumor primário de glioblastoma (GBM).** (A) em vermelho destacam-se as vias com maior enriquecimento (*Focal adhesion*, seguida pela via *ECM-receptor interaction*) com  $FDR < 0.05$ , as vias com  $FDR \geq 0.05$  estão em tons de roxo, alguns genes alvos que estão interligando mais de uma via estão destacados em azul; (B) Genes alvos do *HOXB3* que enriqueceram na via de adesão focal (*Focal adhesion*) com valor de  $p = 6.83 \cdot 10^{-14}$  e  $FDR = 2.17 \cdot 10^{-11}$ . Gráfico produzido utilizando a ferramenta online NetworkAnalyst 3.0 que utilizou o banco de dados KEGG para a análise de enriquecimento.



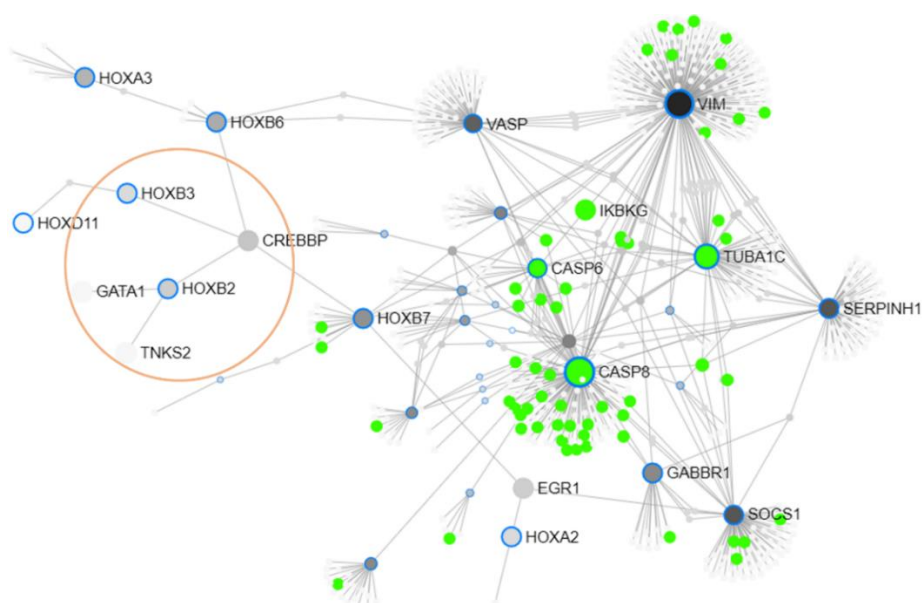
**Figura 55. Rede de interação entre proteínas utilizando a lista de alvos do gene *HOXB3* com alta correlação em Glioblastoma e enriquecidas na via de adesão focal.** Em verde claro estão todos os alvos que se sobrepõem à via de adesão focal (*Focal adhesion*) que obteve maior enriquecimento. Os genes que estão na lista de alvos foram circulosados em azul, os genes em roxo são as proteínas que não possuem outras interações e em tons de rosa as proteínas com 2 ou mais interações. Gráfico produzido utilizando a ferramenta online *NetworkAnalyst 3.0* que utilizou o banco de dados KEGG para a análise de enriquecimento e o *STRING Interactome* para a interação entre proteínas.

Os genes *HOXB2* e *HOXB3* apresentaram interação entre eles, sendo identificados como alvos entre si e com alta correlação de expressão nos três tumores. Na análise dos seus alvos em comum, mas apenas dos que possuem alta correlação de expressão em tumor, foram identificados 41 genes em comum sendo regulados por esses dois HOX, cinco genes são exclusivos do *HOXB2* e 186 são exclusivos do *HOXB3*. Os genes em comum estão listados na figura 56b (Figura 56 a e b).

A análise de interação entre proteínas utilizando a lista de 41 genes em comum revelou um enriquecimento da via de sinalização de apoptose com 60 genes sobrepondo os 136 genes anotados na via do KEGG (FDR = 4.47<sup>-37</sup>). Na figura 57, é possível observar que a via de apoptose foi enriquecida diretamente pelos genes *CASP8*, *CASP6*, *TUBA1C*, *IKBKG* e outros com os quais esses genes interagem. Além disso, a interação entre *Hoxb2* e *Hoxb3* pode ser vista circulado em laranja, com ajuda de *Crebbp*, cofator transcricional que também interage com *Hoxb6* e *Hoxb7*.



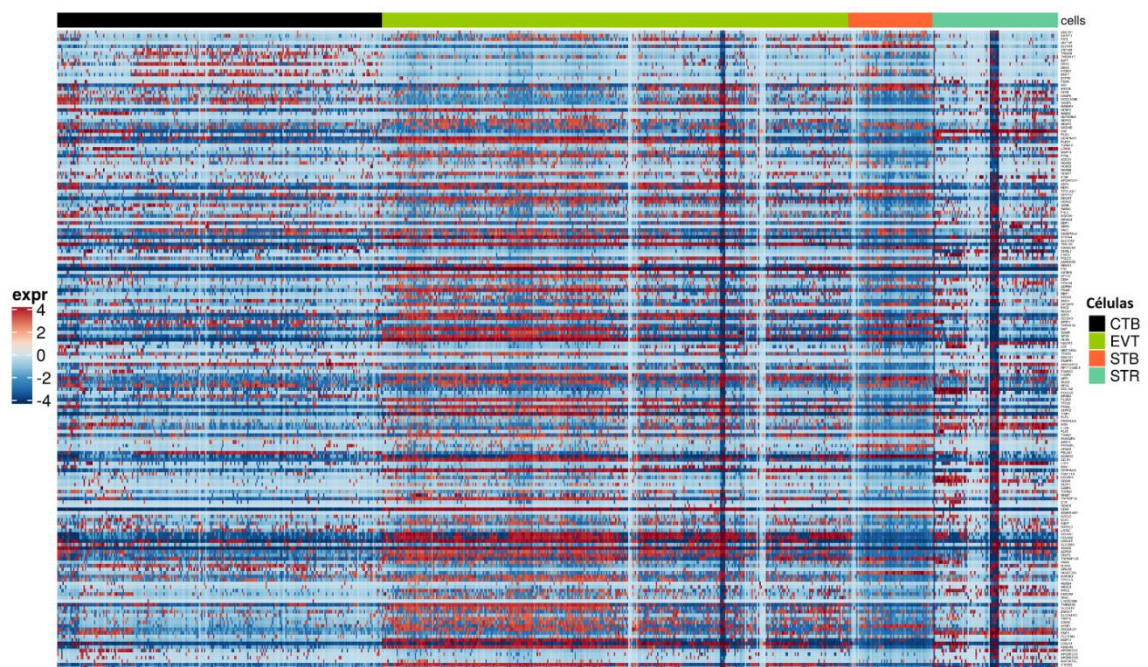
**Figura 56.** Alvos dos genes *HOXB2* e *HOXB3* que possuem alta correlação com a expressão gênica em tumores primários de Glioblastoma (GBM). (A) Diagrama de Venn mostrando a intersecção dos alvos entre os HOX. (B) *Heatmap* do conteúdo das listas de genes utilizadas na análise de enriquecimento. Em cada linha estão os genes utilizados que apresentam intersecção nas listas e cada coluna representa um determinado tipo tumoral; em cinza estão os genes que não estão presentes na lista; (-0,6>R>0,6).



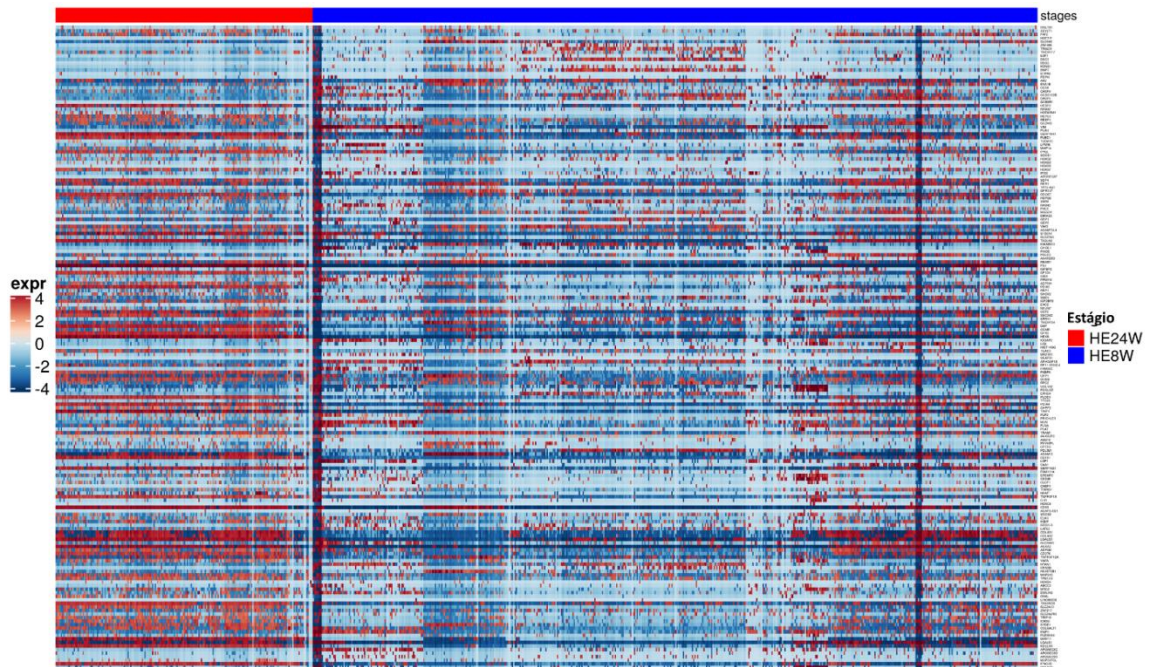
**Figura 57.** Rede de interação entre proteínas utilizando os 41 alvos em comum aos genes *HOXB2* e *HOXB3* com alta correlação em glioblastoma multiforme (GBM). Em verde claro estão todos os alvos que se sobrepõem à via de apoptose do banco KEGG, que obtiveram maior enriquecimento (FDR = 4.47<sup>-37</sup>). Os genes que estão na lista de alvos foram circulado em azul, os genes em escalas de cinza de tons mais claros indicam maior valor de FDR, circulado em laranja destaca-se a interação entre *HOXB2* e *HOXB3*. Gráfico produzido utilizando a ferramenta online *NetworkAnalyst* 3.0 que utilizou o banco de dados KEGG para a análise de enriquecimento e o *STRING Interactome* para a interação entre proteínas. (-0,6>R>0,6).

#### 4.7 Avaliação de alvos dos genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* na regulação de vias gênicas num cenário de transcriptoma de células únicas de placenta.

Foi analisado o perfil de expressão do conjunto de alvos nos dados de sequenciamento de RNA de células únicas (*in silico*). Foram filtrados os genes alvos com maiores valores de correlação nos tumores utilizados no estudo, GBM, STAD e LUAD ( $-0.6 < R > 0.6$ ). Em uma análise supervisionada de clusterização, observamos que um conjunto de células do subtipo trofoblasto extraviloso (EVT) apresenta alta expressão desses genes, enquanto que os subtipos citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto apresentam níveis mais baixos de expressão gênica (Figura 59). Dividindo as amostras por tempo de desenvolvimento placentário, 8 e 24 semanas de gestação, identificamos maior expressão dos genes em células isoladas de placenta de 24 semanas (Figura 60).

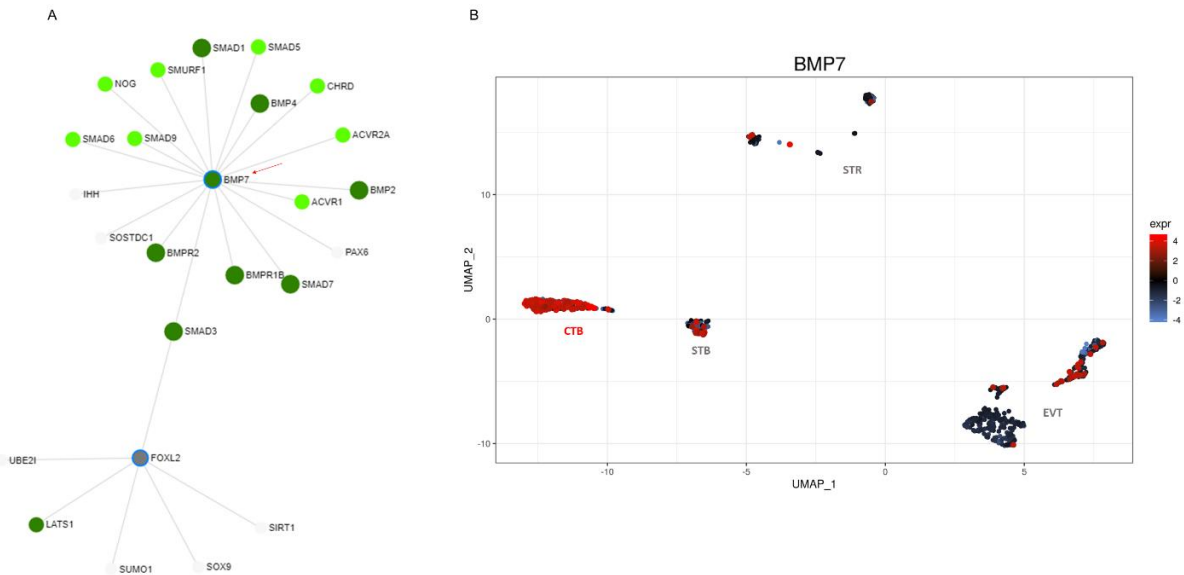


**Figura 58.** Nível de expressão em células únicas de placenta de alvos dos genes HOX que estão com alta correlação em tumores primários. As células são de diferentes subtipos e pode ser identificado na legenda à direita com a cor correspondente a barra na parte superior do heatmap. Foram utilizados os dados de análise *in silico* de sequenciamento de RNA em células únicas disponíveis no GEO sob código GEO: GSE89497. Os genes listados possuem alta correlação com expressão em tumor ( $R > 0,6$ ).



**Figura 59. Nível de expressão em células únicas de placenta de alvos dos genes HOX que estão com alta correlação em tumores primários.** As células são de diferentes estágios de desenvolvimento placentário e pode ser identificado na legenda à direita com a cor correspondente a barra na parte superior do heatmap; HE24E:24 semanas de desenvolvimento e HE8W: 8 semanas de desenvolvimento. Foram utilizados os dados de análise *in silico* de sequenciamento de RNA em células únicas disponíveis no GEO sob código GEO: GSE89497. Os genes listados possuem alta correlação com expressão em tumor ( $R > 0,6$ ).

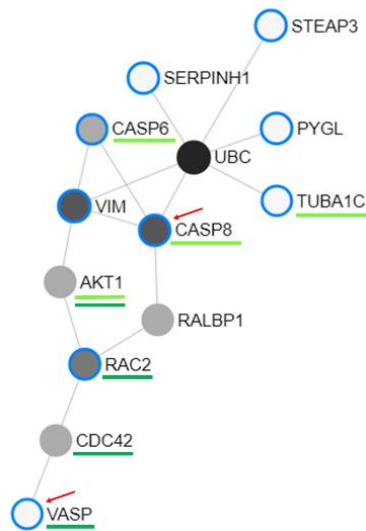
Para prever o impacto da regulação dos genes HOX e do nível de expressão dos seus alvos em vias biológicas relacionadas à tumorigênese, foram filtrados os genes com as maiores correlações de expressão nos tumores e identificamos na análise de enriquecimento de vias que os alvos do *HOXA13* ( $-0.6 < R > 0.6$ ) com alta correlação em LUAD, fazem parte da sinalização da via Hippo e de sinalização de TGFB, sugerindo que seja principalmente pela regulação de *BMP7*, que por sua vez apresenta alta expressão em células únicas de placenta, especialmente em células do citotrofoblasto (Figura 60 b).



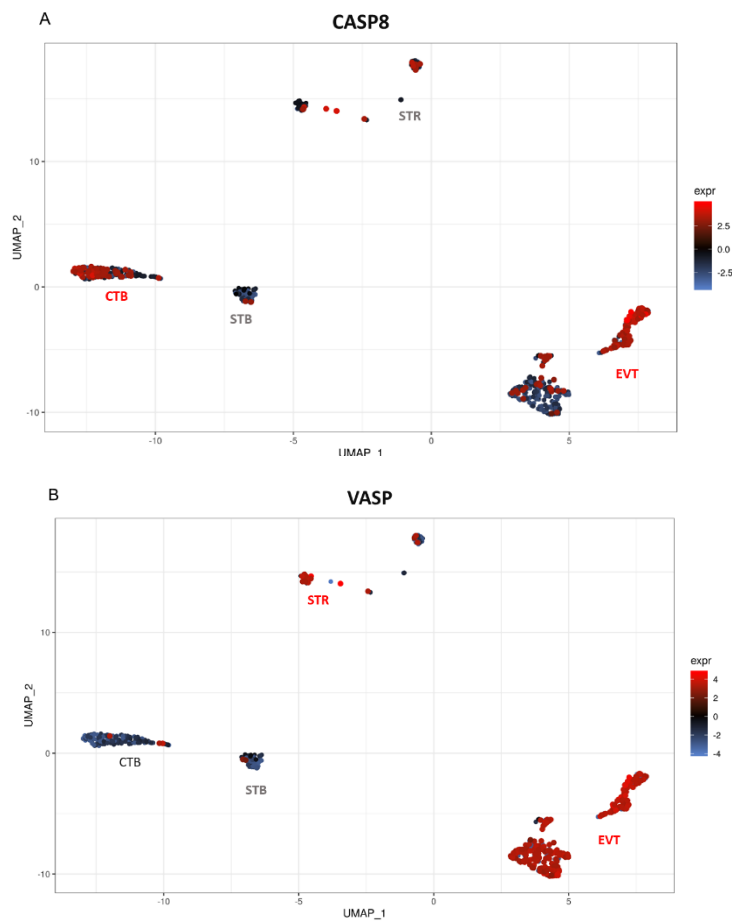
**Figura 60. Genes alvos de HOXA13 com alta correlação em tumor e alta expressão em placenta.** (A) Rede de interação entre proteínas utilizando os alvos que apresentam alta correlação de expressão LUAD ( $-0,6 < R < 0,6$ ). Em verde claro estão todos os alvos que se sobrepõem à via de sinalização de TGFβ do banco KEGG e em verde escuro são os alvos que se sobrepõem à via Hippo. Os genes da lista de alvos estão circulos em azul e nós em tons de cinza mais escuros indicam maior número de interações na rede e menor valor de FDR. Análise reduzida (zero-order) utilizando o STRING Interactome. (B) UMAP (Uniform manifold approximation and projection) mostrando os subtipos de células em que o gene BMP7 apresenta expressão.

A mesma análise realizada com os alvos do gene *HOXB2* com alta correlação da expressão em tumores do tipo GBM enriquecem vias de apoptose por meio dos genes *CASP8*, *CASP6* e *TUBA1C* e também a via de adesão focal por meio do gene *RAC2* (Figura 61). O gene *CASP8* que é um gene hub e também faz parte da via de apoptose, está altamente expresso em células únicas de placenta, bem como o *CASP6* (Figura 62 a). Em relação à via de adesão focal, o gene *RAC2* não apresenta alta expressão nesse conjunto de amostras, porém o gene *VASP* que faz parte da mesma via está altamente expresso em trofoblasto extraviloso e células estromais da placenta (Figura 62 b).





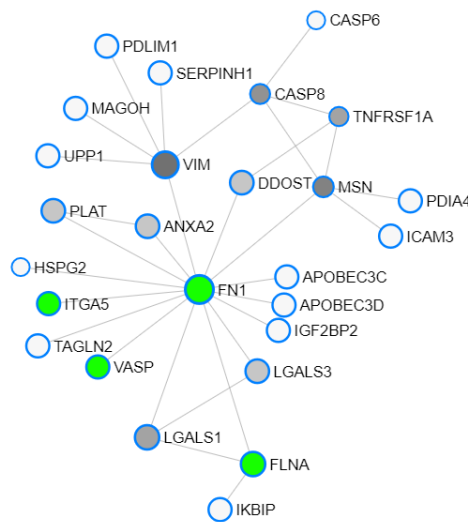
**Figura 61. Genes alvos de HOXB2 com alta correlação em tumor e alta expressão em placenta.** (A) Rede de interação entre proteínas utilizando os alvos que apresentam alta correlação de expressão GBM ( $-0,6 > R > 0,6$ ). Sublinhado em verde claro estão todos os alvos que se sobrepõem à via apoptose e em verde escuro são os alvos que se sobrepõem à via de adesão focal. Nós em tons de cinza mais escuros, indicam maior número de interações na rede e menor valor de FDR. Análise reduzida (zero-order) utilizando o STRING Interactome. A seta destaca os genes com maior expressão em placenta que fazem parte de cada via.



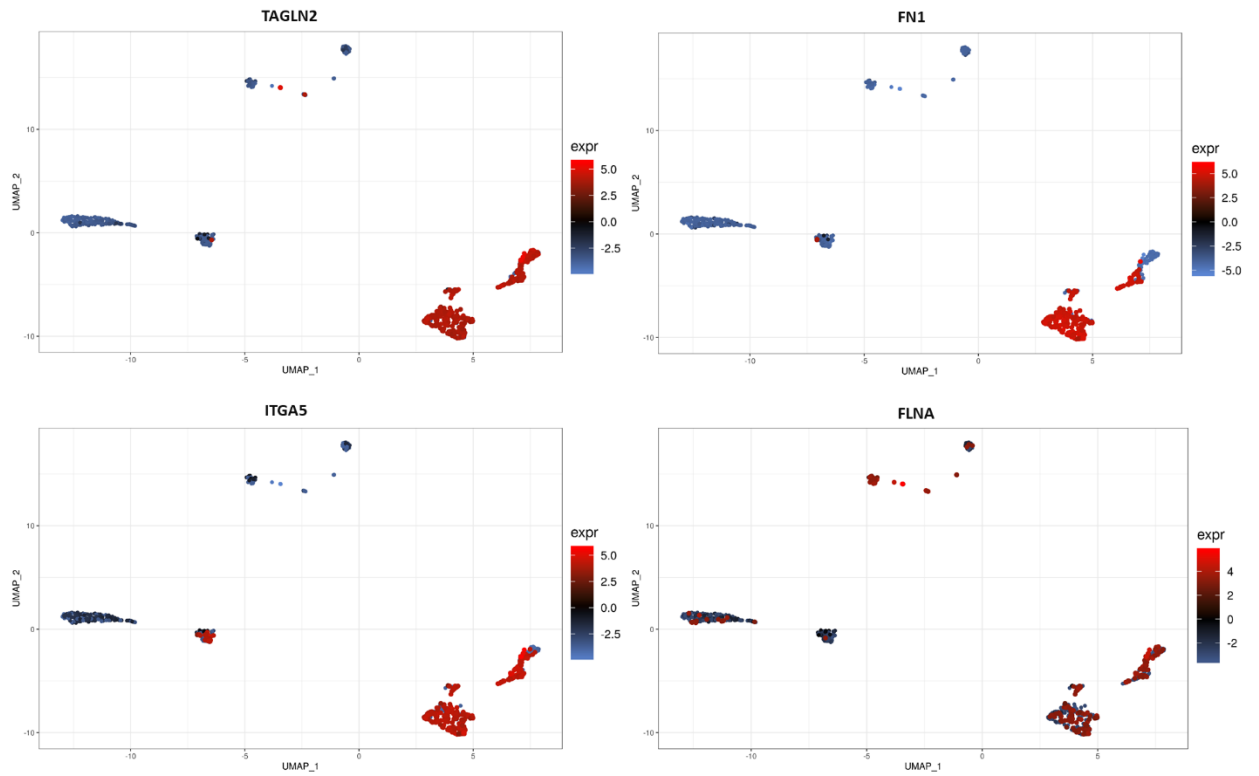
**Figura 62. Subtipo celular de placenta que expressam os genes alvos de HOXB2 com alta correlação em GBM** (A) Expressão do gene CASP8, envolvido na via de apoptose. (B) expressão do gene VASP, envolvido na via de adesão focal. UMAP (Uniform manifold approximation and projection).

Avaliando a expressão dos alvos de *HOXB3* com alta correlação de expressão em tumor do tipo glioblastoma multiforme (GBM), porém dessa vez apenas com os genes com valor de *R* abaixo de -0,6 e acima de 0,6 ( $-0.6 < R > 0.6$ ), identificamos um enriquecimento da via de adesão focal com 94 genes sobrepondo os 199 anotados para esta via e um *p* ajustado de  $3,03 \times 10^{-18}$ .

Na análise de interações entre proteínas, realizada no formato de redução para os genes com maior número de interações, identificamos os genes *FNI*, *ITGA5*, *VASP* e *FLNA* envolvidos na via biológica de adesão focal (Figura 63). Em placenta, esses genes se apresentam com alto nível de expressão gênica em um grande, porém específico, número de células. O gene *TAGLN2* está expresso, quase que exclusivamente, em células do subtipo trofoblasto extraviloso (EVT) (Figura 64 a). O gene *FNI*, que se apresenta como gene central na interação com outros genes da via de adesão, está altamente expresso em um grande número de células EVT, o gene *ITGA5* (*Integrin Subunit Alpha 5*) que pertence à família de integrinas está com alta expressão em STB e EVT (Figura 64). O gene *FLNA* está expresso especialmente em EVT, porém também aparece expresso em algumas células do subtipo CTB e STR (Figura 64).



**Figura 63. Rede de interação entre proteínas utilizando os alvos de *HOXB3* que apresentam alta correlação de expressão GBM ( $-0,6 > R > 0,6$ )** Alvos da via de adesão focal em verde claro e nós em tons de cinza mais escuros, indicam maior número de interações na rede e menor valor de FDR. Análise reduzida (zero-order) utilizando o IMEx Interactome.



**Figura 64.** Subtipo celular de placenta que expressam os genes alvos de *HOXB3* com alta correlação em GBM. Expressão do gene *CASP8*, envolvido na via de apoptose. (B) expressão do gene *VASP*, envolvido na via de adesão focal. UMAP (*Uniform manifold approximation and projection*).

## 5 Discussão

Os passos iniciais do desenvolvimento placentário se assemelham às propriedades invasivas de tumores malignos e, nesse sentido, encontramos um grande número de genes alvos dos fatores de transcrição *Hoxa13*, *Hoxb2* e *Hoxb3*, atuando em vias biológicas envolvidas no processo da carcinogênese, inclusive um grande número de alvos em comum fazem parte desta via (Figura 65). Nossa análise reforça os estudos que traçam paralelos entre os dois eventos (HOLTAN et al., 2009; LALA et al., 2002; SOUNDARARAJAN; RAO, 2004).

O passo inicial do estudo foi avaliar como alguns membros da família HOX estavam sendo expressos em tecido placentário. A análise quantitativa inicial mostrou que existem diferentes níveis de expressão entre as amostras, sugerindo que a transcrição dos genes HOX variem conforme o estágio de desenvolvimento placentário e uma das possíveis perguntas seria se o nível de expressão se modifica e como isso acontece de forma específica entre os subtipos celulares presentes no tecido.

O gene *HOXC8*, encontrado mais expresso na análise quantitativa inicial, possui poucos relatos de expressão em tecido placentário e ainda não há na literatura, dados que possam explicar a sua funcionalidade neste tecido (TAKAHASHI et al., 2004) (figuras 7 e 8). Em contrapartida, existem muitas associações da expressão desse gene com o desenvolvimento ou progressão de tumores sólidos. O *HOXC8* está envolvido com a promoção do câncer de mama por meio da regulação de *CDH11* em células cancerosas, mas também pode agir como supressor tumoral, visto que a perda da expressão induziu o estado indiferenciado de células cancerígenas mamárias (LI et al., 2014; SHAH et al., 2017). Em câncer de laringe, foi visto que o silenciamento do *HOXC8* diminuiu a proliferação e migração de linhagens celulares tumorais (DE BARROS E LIMA BUENO et al., 2016). Também foi vista associação do *HOXC8* com osteosarcoma, câncer pancreático, câncer de próstata e ovário (ADWAN et al., 2011; CHENG et al., 2016; LU et al., 2016; WALTREGNY et al., 2002).

O segundo gene mais expresso, o *HOXA10*, tem forte associação com a manutenção do endométrio e com os processos de implantação do embrião. O *HOXA10* é um dos responsáveis pela formação do útero durante o período embrionário (DU; TAYLOR, 2016; TAYLOR, 2000). Além disso, existem evidências que mostram que seu padrão de expressão no útero adulto varia conforme o período do ciclo menstrual e sua expressão se mostra dependente da regulação por hormônios, como o estrógeno e a progesterona, e esse, por sua vez, regula genes envolvidos na etapa de implantação do embrião (GAO et al., 2015; TAYLOR et al., 1998).

As análises em larga escala realizadas nesse trabalho, a partir de conjuntos de dados públicos, revelou a expressão de outros genes da família HOX. Embora tanto a técnica de qPCR

quanto o sequenciamento de RNA sejam utilizados para medir o nível de expressão em amostras biológicas, já foram relatadas discordâncias entre os dois métodos (NASSIRPOUR et al., 2014). O sequenciamento de nova geração tem como vantagem a possibilidade de análise de um grande número de genes e como consequência, maior potencial na descoberta de novos genes e vias. Porém, diferente da qPCR cuja medida de expressão é relativa à expressão do gene referência (gene com expressão constitutiva que não varia entre as amostras), o RNA-seq considera a contagem de *reads*, tornando a análise dependente da cobertura vertical e horizontal no genoma.

Nos nossos resultados, como mostra a figura 10, a expressão dos 39 genes HOX em placenta a termo é menor que a expressão de todos os outros transcritos, o que está de acordo com o que encontramos na literatura em tecidos não tumorais. O estudo de Takahashi e colaboradores (2003) apresentou a expressão, ainda que em níveis mais baixos, dos 39 genes da família HOX em um painel de 20 tecidos adultos normais, o que demonstrou que o seu papel não se limita ao desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI et al., 2004). Dessa forma, podemos sustentar a ideia de que essa família de genes possui uma expressão basal em tecidos normais que já é suficiente para realizar seu papel biológico. Inclusive, discutimos nesse trabalho como a alta expressão pode estar correlacionada com o desenvolvimento e progressão do tumor (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2014).

No RNA-seq de placenta a termo, o gene *HOXA10* não se apresentou com alta expressão (figura 11 b), o que inicialmente indicou ser uma característica de expressão desse gene, visto que as evidências na literatura indicam que ele exerce função no período de implantação do blastocisto e é relatado altamente expresso na fase de decidualização do endométrio, o que poderia indicar maior expressão nas etapas iniciais (DAS, 2010; GODBOLE et al., 2017). Entretanto, a expressão gênica e proteica do *HOXA10* foi confirmada em células decíduais coletadas após o parto a termo, sugerindo que seja responsável por manter o fenótipo das células decíduais, garantindo o sucesso da gestação (SARNO et al., 2009). A decidualização é o evento progressivo de preparação do endométrio, que se inicia na fase secretória do ciclo reprodutivo e implica em diferenciação das células endometriais, facilitando a implantação do blastocisto nas camadas mais profundas do epitélio uterino e invasão dos tecidos maternos pelas células trofoblásticas, eventos cruciais para a aderência da placenta e desenvolvimento do embrião (GELLERSEN; BROSENS; BROSENS, 2007).

Em tumores, a perda da regulação do *HOXA10* foi vista em carcinoma endometrial, onde a expressão do gene era menor conforme aumentava o grau de progressão do tumor. As análises sugeriram que a diminuição da expressão de *HOXA10* pode promover a progressão tumoral pela indução da transição epitélio-mesênquima, que ocorre possivelmente pela regulação

negativa da proteína Snail, uma molécula repressora de E-caderina, que por sua vez é responsável pela adesão celular (YOSHIDA et al., 2006). A inibição do fenótipo invasivo pela expressão do *HOXA10* também foi vista em linhagens tumorais de câncer de mama, ainda que não seja, necessariamente, sob o mesmo mecanismo de ação (CHU; SELAM; TAYLOR, 2004).

Apesar dos dados contundentes a respeito dos genes HOX citados acima, apenas a análise inicial não foi suficiente para selecionar os genes para o estudo, pois não havia informação de todos os membros da família. Dessa forma, direcionamos a seleção dos três genes HOX com ajuda da análise de expressão em larga escala para toda a família HOX em tecido placentário de diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 3).

Uma das hipóteses levantadas nesse estudo é que os genes HOX expressos no início do desenvolvimento estariam fortemente envolvidos com os processos mais pertinentes na formação da placenta, como de proliferação, migração e invasão. Enquanto que os genes HOX expressos na placenta a termo estariam não apenas contribuindo na manutenção desses eventos para garantir o sucesso da gestação, como também regulando negativamente algumas das vias envolvidas nesses processos biológicos, que supostamente asseguram que a placenta não tenha o mesmo comportamento de um tumor, apresentando, por exemplo, divisão celular descontrolada.

Para investigar essa relação foram selecionados genes com alta expressão em placenta para identificar os seus alvos e as vias que eles estão possivelmente atuando. Selecionamos o gene *HOXA13* altamente expresso no conjunto de dados de placenta a termo (GSE66622) e os genes *HOXB2* e *HOXB3*, que apresentam nível de expressão consideravelmente mais elevado nesse conjunto de dados, porém, se distinguem por apresentar expressão diferencial entre células de estágios iniciais em relação à estágios finais de desenvolvimento (provenientes do estudo disponível sob código de acesso GSE73017).

O gene *HOXA13* se destaca, pois, é o único dentre os 39 membros da família, com o qual foi demonstrado, até o momento, que quando mutado, pode acarretar em irregularidades no desenvolvimento da placenta (SHAUT et al., 2008). A função do gene foi analisada em placenta de ratos e foi visto que quando o gene tem sua ação bloqueada, os vasos sanguíneos no labirinto placentário não se desenvolvem corretamente, levando à morte do embrião. Análises de expressão e de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) revelaram que o Hoxa13 regula genes pró-vasculares que podem estar envolvidos na falha do desenvolvimento placentário em mutantes (SHAUT et al., 2008).

Uma mutação que resulta em uma proteína truncada de Hoxa13 também está associada ao fenótipo da síndrome mão-pé-genital (*hand-foot-genital syndrome*), caracterizada pela má-

formação dos membros e anormalidades no trato urinário e genital (DU; TAYLOR, 2016; TAYLOR, 2000).

Bem como em tecidos normais, os tumores precisam do fornecimento de oxigênio e descarte de resíduos metabólicos. Durante a progressão do tumor, vias pró-angiogênicas são ativadas para sustentar a expansão neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em carcinoma hepatocelular, a expressão do gene *HOXA13* foi associada a uma sobrevivência global desfavorável, além disso, também houve associação com o tamanho do tumor, invasão microvascular, densidade de microvasos e correlação positiva com VEGF, sugerindo que sua expressão seja importante para a angiogênese nesse tipo de tumor (PAN et al., 2014).

O *HOXA13* também foi descrito altamente expresso em câncer de bexiga e está associado com a progressão desse tipo tumoral, podendo ser útil como marcador prognóstico. A alta expressão desse gene também foi descrita em câncer gástrico, onde o seu silenciamento por siRNA restaurou as propriedades epiteliais e reduziu as propriedades mesenquimais das células cancerosas, reduzindo a capacidade de invasão (HE et al., 2017). De forma semelhante, em glioblastoma, foi descrita alta expressão do *HOXA13* e a regulação negativa desse HOX inibiu a invasão de linhagens tumorais em ensaios funcionais, além disso, a indução da expressão do *HOXA13* contribui para o fenótipo invasivo das células tumorais de glioblastoma por meio da regulação de TGF-beta que desencadeia o mecanismo de transição epitélio-mesênquima (DUAN et al., 2015).

Os genes *HOXB2* e *HOXB3* encontrados expressos em placenta, não possuem associações diretas na literatura quanto ao desenvolvimento desse órgão (Figura 11). Existe uma evidência de que a expressão do gene *HOXB2* seja dependente da expressão do receptor de progesterona (PGR), um hormônio que regula vias de proliferação e diferenciação celular na placenta e cuja deficiência pode acarretar na restrição do crescimento fetal (MURTHI et al., 2012). Em contrapartida, o *HOXB2* está altamente expresso em câncer pancreático e foi associado a um pior prognóstico (SEGARA et al., 2005), além disso, foi identificado como regulador negativo de proliferação celular em câncer de mama, visto que a diminuição da expressão (*knockdown*) levou ao aumento significativo do crescimento tumoral *in vivo*, em relação ao controle (BOIMEL; CRUZ; SEGALL, 2011). Em câncer de pulmão, foi demonstrado que a atenuação da expressão por siRNA do *HOXB2* diminui o potencial invasivo das células tumorais (INAMURA et al., 2008). E em outro estudo mais recente, foi visto que polimorfismos genéticos conferem a suscetibilidade ao câncer de pulmão, pela modulação negativa da expressão de *HOXB2* (CLEMENCEAU et al., 2018).

Quanto ao *HOXB3*, níveis mais altos de expressão promovem a angiogênese *in vivo* pela indução de ramificação de capilares (MYERS; CHARBONEAU; BOUDREAU, 2000). Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com *Hoxb3* mostrou que ele se liga à região promotora de *CDCA3*, um gene que atua como gatilho para a entrada das células na fase de mitose, o que supostamente pode ajudar a promover o câncer de próstata (CHEN et al., 2013).

Os 3 genes HOX selecionados também apresentaram expressão na análise do RNA-seq de células únicas (referido posteriormente pelo termo em inglês *single-cell*). Além disso, a análise permitiu identificar para os 39 membros da família HOX, um perfil específico de expressão que varia entre subtipos celulares e entre estágios de desenvolvimento.

O *single-cell* foi incluído no estudo para explorar a variabilidade de subtipos celulares da placenta e comparar os genes expressos entre primeiro e segundo trimestre de gestação. Como já foi abordado, a placenta é formada por vários subtipos celulares que desempenham diferentes papéis ao longo da sua maturação e, para isso, expressam conjuntos diferentes de genes (LIU et al., 2018).

A análise de UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) segregou as células de acordo com o transcriptoma total de cada uma e como esperado, formaram-se grupos de acordo com o subtipo (Figura 15). Como apresentado na figura 17, a mediana da expressão é menor quando se avaliam o conjunto total de células, porém ao avaliar apenas as células onde o HOX é detectado, o nível de expressão é semelhante aos genes mais expressos do transcriptoma. O mesmo ocorre para os genes *HOXB2* e *HOXB3*.

Um estudo recente mostrou o nível de expressão dos genes parálogos HOX9, 10 e 11 em RNA-seq de células únicas de tecido uterino (*Single-cell RNA-seq*, scRNAseq) e, reforçando nossas análises, encontraram níveis basais de expressão para grande parte dos membros da família, porém, alta expressão em subtipos específicos de células (MUCENSKI et al., 2019).

Esses dados sustentam a hipótese de que os genes HOX aparecem pouco expressos em tecido normal porque são transcritos em um contexto muito específico a nível celular, extrapolando a heterogeneidade entre tecidos. Esse nível de expressão pode ser mascarado quando se avalia o tecido total. Um estudo recente fortalece essa ideia uma vez que relata que a expressão dos genes HOX se mantém regionalmente em tecidos adultos (RUX et al., 2016). John Liu e colaboradores (2016), trazem evidências que corroboram essa hipótese, uma vez que na avaliação de RNAs longos não codificantes que normalmente aparecem com baixos níveis de expressão em RNA-seq do tecido total, na verdade são encontrados de forma abundante no scRNA-seq, uma vez que se avalia a expressão em subpopulações específicas de células (LIU et al., 2016).



Os três genes HOX apresentam alta expressão em vários tipos de tumores primários provenientes do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). De forma geral, os 39 genes aparecem altamente expressos no conjunto de tumores analisados. O *HOXA13* está altamente expresso em 12 dos 19 tipos tumorais e só tem baixa expressão em três tipos.

Identificamos no ChIP-seq, que os 3 Hox ligam-se preferencialmente em regiões distais do genoma o que sugere que a atuação desses fatores de transcrição seja por regulação de longo alcance. Estudos de padrões da organização da cromatina sugerem que esse tipo de interação reflete diferentes níveis de organização da cromatina com papéis distintos na regulação de genes (DEKKER; MISTELI, 2015). Apesar das evidências, pouco se sabe sobre como os genes HOX regulam seus alvos e esse mecanismo deve ser melhor estudado.

A via *pathways in cancer* do KEGG foi enriquecida com os alvos dos 3 genes HOX selecionados. Os alvos do Hoxa13 mais significativos para esta via são os genes *AKT1*, que atua na via de sinalização Pi3k-Akt, o gene *RAC1* que faz parte da via Ras e regula proliferação e a beta-catenina (*CTNNB1*) que atua na via de adesão e *PPAR $\gamma$*  que faz parte da sinalização da subfamília de receptores nucleares PPAR.

O Hoxb2 atua na via *pathways in cancer* também regulando alvos da via de adesão, como a beta-catenina e o *GSK3B*; vias que controlam o ciclo celular, como a ciclina D1 (*CCND1*), receptor de androgênio (*AR*), *CREBBP*, *AKT1* (sinalização de PI3K-AKT), *STAT3* que regula vias de angiogênese e *MAPK8*. Dentre os alvos do Hoxb3 que fazem parte da via *pathways in cancer*, podemos citar os já mencionados anteriormente, que são aqueles genes com maior impacto na via por possuírem grande número de conexões: beta-catenina (*CTNNB1*), o gene *RAC1*, *AKT1* e *STAT3*. Além desses, destacaram-se os genes da família caspase *CASP8* e *CASP3*.

Para associar o papel biológico dos genes HOX entre placenta e câncer, selecionamos os genes alvos com alta correlação de expressão com os HOX em tumor primário. Os tumores escolhidos para a análise de correlação foram aqueles com níveis mais altos de expressão dos HOX: glioblastoma multiforme (GBM), adenocarcinoma de estômago (STAD) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD). A participação dos alvos em vias relacionadas ao câncer se destaca quando realizamos a análise de enriquecimento com os alvos correlacionados nos três tumores (Figura 46 e tabela 10) com valor de p ajustado altamente significativo (*pathways in cancer*, FDR=1,7<sup>-28</sup>).

No ChIP-seq, o *HOXA13* também apresenta como alvo o gene *FOXF1*, ao contrário do gene *TIE2*, que não foi identificado. Ambos os genes foram relatados por Shaut e colaboradores, em análises *in vivo* de placenta de camundongos. No estudo em questão os autores sugerem que

essa regulação pode ser um programa responsável pela formação do labirinto placentário em camundongos e que com a inibição de *HOXA13* a morfologia das células endoteliais é alterada, acarretando na perda da integridade da parede dos vasos sanguíneos (SHAUT et al., 2008). O gene *FOXF1* (*forkhead box F1*) pertence à uma família de fatores de transcrição e já foi relatado que o bloqueio da sua expressão em células endoteliais é letal no desenvolvimento embrionário.

A vasculogênese ocorre, em princípio, durante o período embrionário onde células precursoras do embrião se diferenciam para formar a rede de vasos sanguíneos (NEUFELD et al., 1999). Já a angiogênese, se refere à formação de novos vasos sanguíneos a partir do remodelamento de vasos pré-existentes e eventos de migração celular (NEUFELD et al., 1999). Os mesmos autores do estudo anterior identificaram que o *HOXA13* se liga à EphA6 e EphA7, genes importantes para a formação do endotélio vascular no tubérculo genital (SHAUT et al., 2008).

Em conjunto, esses achados fornecem evidências das vias gênicas a serem consideradas quando se busca caracterizar a formação de vasos no desenvolvimento placentário e a ideia é que esses resultados possam ser extrapolados para compreensão de mecanismos de angiogênese no desenvolvimento tumoral. Nos nossos resultados para os alvos do *HOXA13*, identificamos inúmeros genes que atuam como fatores pró-angiogênicos e que fazem parte das vias de angiogênese e vias do câncer da base de dados do KEGG (*sustained angiogenesis* e *pathways in cancer*, respectivamente), como o *VEGF*, *TGFB*, *PDGFB*, *VEGFR3*, *HER2*, *COX-2* e *MMPs* (Figura 38).

As interações e seus efeitos fenotípicos ainda devem ser validados, porém nossos resultados são importantes para o entendimento do mecanismo. Um dos tumores usados para análise de correlação de expressão dos alvos, o glioblastoma multiforme (GBM), também já foi utilizado para avaliar o potencial angiogênico do *HOXA13*. Ensaios *in vitro* mostraram que a inibição de *HOXA13* diminuiu de forma significativa a invasão de linhagens celulares de glioma e os autores propõem que o mecanismo acontece por meio da redução de  $\beta$ -catenina, fosfo-SMAD2 e fosfo-SMAD3 no núcleo e aumento da expressão da fosfo- $\beta$ -catenina no citoplasma.

Quando avaliamos os alvos de *HOXA13* com correlação em tumor, identificamos o enriquecimento de vias relacionadas à sinalização do ciclo celular e sinalização de p53. Ambas as vias se conectam pelos genes *TP21*, *CDK6*, *CCNB2* e *SFN*, todos identificados como alvos diretos do *HOXA13* por meio do ChIP-seq.

Em câncer gástrico, onde o *HOXA13* foi encontrado hiper-regulado, foi visto que o silenciamento do gene acarreta no acúmulo de células na fase G1, devido ao bloqueio do ciclo, enquanto que a superexpressão leva à transição da fase G1 para fase S. Além disso, a

superexpressão de *HOXA13* ocasionou em maiores níveis de transcritos de ciclina D1 (*CCND1*), gene que regula a proliferação celular e também foi identificado como alvo de Hoxa13, fazendo parte da via de câncer (Figura 38). Em ensaios funcionais *in vitro* foi visto que a redução da expressão de *HOXA13* levou à diminuição da proliferação e formação de colônias, além de ter diminuído a invasão e migração. A superexpressão de *HOXA13* levou aos efeitos contrários, corroborando o seu papel na proliferação e invasão do tumor gástrico (QIN et al., 2019). Os autores desse estudo sugerem que a regulação dessas vias nesse tipo tumoral acontece pela regulação de quinases Erk (quinases reguladas por sinal extracelular), onde observaram por western blot que a expressão elevada de *HOXA13* aumentava a fosforilação de Erk1/2 e justamente os tumores que apresentam alta expressão desse HOX também apresentam alta expressão dos genes *VEGFA*, *EGFR*, *FGF2* e *FGFR2* que regulam positivamente a cascata Erk e também foram identificados como alvos de Hoxa13 no ChIP-seq de placenta apresentada nesta tese.

Componentes do ciclo celular estão frequentemente desregulados em câncer, o que reflete na proliferação descontrolada das células. As ciclinas dependentes de quinases (CDKs) fazem parte do núcleo desse processo e são responsáveis pela progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (LANDIS et al., 2006). A ciclina CDK6 foi um dos alvos identificados para o Hoxa13 conectando as vias de ciclo celular e sinalização de p53, contudo, um outro papel dessa molécula é a de conexão entre as vias de progressão do ciclo celular com a via de angiogênese, pela indução de fatores pró-angiogênicos, como o *VEGF* (KOLLMANN et al., 2013). Essas evidências ajudam a esclarecer os mecanismos pelos quais o *HOXA13* contribui para a vasculogênese, na placenta e angiogênese no tumor.

Com uma intersecção entre os alvos de *HOXB2* com alta correlação nos três tumores encontramos o enriquecimento de sinalização da via Wnt e Notch. O *HOXB2* não possui correlação direta com essas vias na literatura, porém, por meio da análise de interação entre proteínas vimos que tanto *HOXB2* quanto *HOXB3* se ligam à proteína CREBBP (Proteína de ligação ao CREB, em inglês: *CREB Binding Protein*). Acreditamos que a atuação de *HOXB2* na via de Wnt, ocorra por intermédio de moléculas como a CREBBP, que é recrutada para o núcleo da célula quando ocorre o acúmulo de beta-catenina, estimulando a transcrição de moléculas alvos da via Wnt (BORDONARO; LAZAROVA, 2016).

A sinalização da via Wnt exerce papel no controle de proliferação, migração, invasão e apoptose e o papel dos seus componentes são bem estudados no desenvolvimento do câncer (ZHAN; RINDTORFF; BOUTROS, 2017), além disso as vias canônicas e não-canônicas de

sinalização Wnt são importantes para o sucesso na implantação do blastocisto e adesão aos tecidos maternos (SONDEREGGER; POLLHEIMER; KNÖFLER, 2010).

O gene *HOXB2* foi encontrado altamente expresso em tumores primários de glioblastoma multiforme (Figura 18), além disso, muitos dos seus alvos estão altamente correlacionados nesse tipo de tumor, que por sua vez, estão enriquecendo vias de sinalização do ciclo celular e p53 (Figura 45). Um estudo recente mostrou que um RNA longo não codificador *HOXB-AS1* estava altamente expresso em tumores de GBM e que a sua inibição levava ao bloqueio do ciclo celular na fase S, inibindo a proliferação. O estudo relatou que por meio da interação entre *HOXB-AS1/mir-885-3p/HOXB2* ocorre a regulação de eventos de proliferação, migração e invasão em glioblastoma (CHEN et al., 2019). O *HOXB-AS1* aparece altamente expresso nos nossos dados de expressão em células de estágios iniciais da placenta e esse pode ser um possível mecanismo de regulação realizado por *HOXB2*, também neste tecido (Figura 13).

O gene *HOXB3* também está com alta expressão nos nossos dados de GBM do TCGA. Em um estudo com esse tipo de tumor, o silenciamento de *HOXB3* em linhagens celulares de GBM diminuiu a proliferação celular e também a invasibilidade das células, acredita-se que uma provável via de regulação desses eventos possa acontecer com ajuda da regulação de E-caderina e de marcadores mesenquimais N-caderina e vimentina (XU et al., 2018b).

A via de adesão focal foi a mais enriquecida para os alvos de *Hoxb3*, seguida da via de interação de receptor-ECM, ambas controlam atividade de adesão celular, migração e proliferação. Em câncer pancreático, foi relatada a diminuição do comportamento invasivo e metastático como resposta à supressão de *HOXB3*. Os autores desse estudo sugerem que esses mecanismos são regulados por um micro-RNA que se liga a *HOXB3*, no entanto não se sabe quais os efeitos moleculares da redução da expressão nesse caso específico. Os resultados apresentados nesta tese corroboram as hipóteses de que o gene *HOXB3* faça parte de um controle de eventos relacionados à adesão celular, e pela análise de interação de proteínas, vimos que genes alvos *ERBB2*, *RAC2*, *ITGB1* e *SHC1* interagem com muitos genes envolvidos na via de adesão focal, como mostrado na figura 55.

Alguns alvos de *HOXB3* com correlações mais altas em GBM ( $R > 0,6$ ) também estão relacionados à via de adesão celular, como o gene da fibronectina 1(FN1), *ITGA5*, *TAGLN2* e *FLNA* e que, interessante, aparecem expressos em um grande número de células nos dados de *single-cell* de placenta (Figura 64). A expressão desses genes em placenta se restringiu especificamente às células do subtipo trofoblasto extraviloso (EVT), que apresentam alto potencial invasivo e migratório (JEYARAJAH et al., 2019). Dessa forma, sugerimos uma

conexão pelo qual os genes *HOXB2* e *HOXB3* também regulam eventos requeridos no desenvolvimento placentário e no tumor.

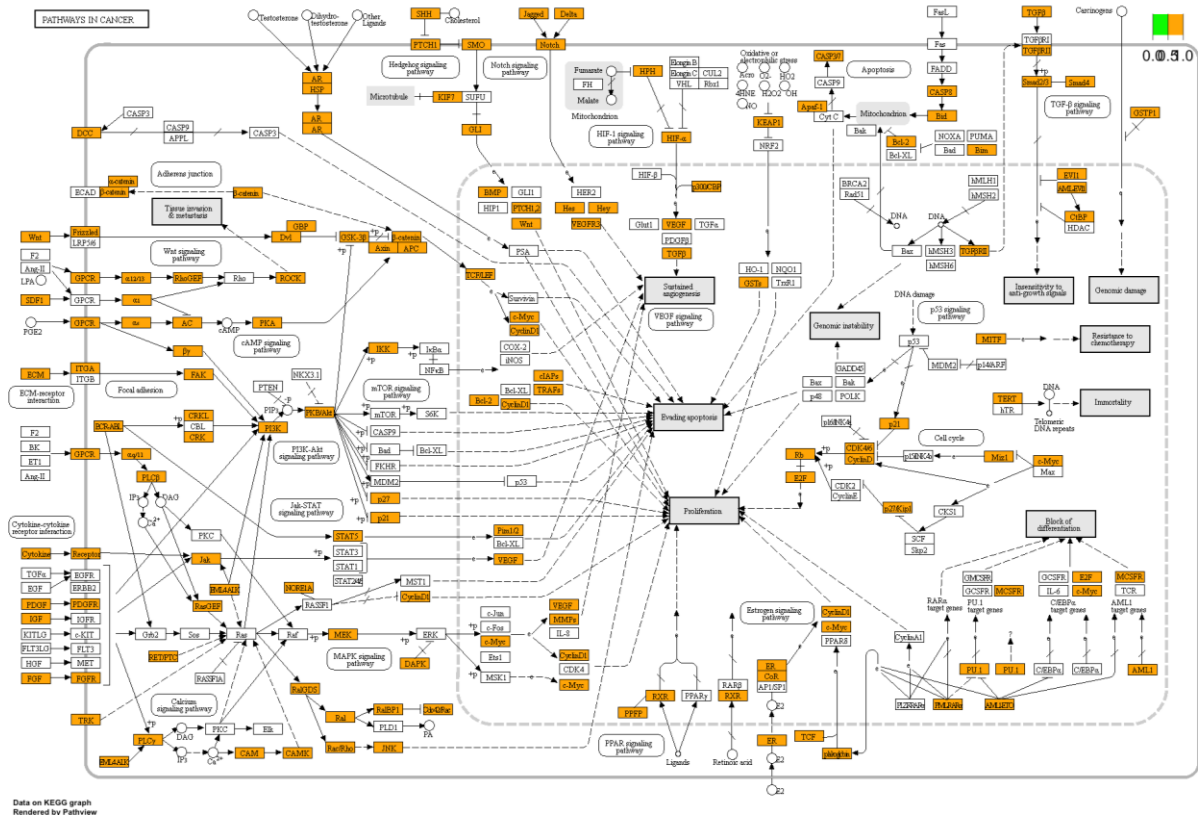
As células EVTs se diferenciam a partir do citotrofoblasto e migram das pontas dos vilos para o endométrio e artérias espirais maternas, para fazer o remodelamento dos vasos e facilitar o fluxo sanguíneo uteroplacentário (F. GARY CUNNINGHAM et al., 2010). Alguns estudos trazem evidências de que o processo de diferenciação de CTB para EVT tem vários pontos em comuns ao processo de transição epitélio-mesenquimal, observada também no câncer. O perfil invasivo desse subtipo celular é bastante estudado para entender quais vias gênicas estão sendo ativadas (POLLHEIMER et al., 2018).

Outro dado interessante apresentado nesta tese é o compartilhamento de alvos entre *Hoxb2* e *Hoxb3*, os 41 alvos em comum enriquecem a via de apoptose celular de forma significativa e na figura 57, identificamos que a sinalização dessa via acontece principalmente por genes da família de caspases, *CASP8* e *CASP6*. Essas duas moléculas, interagem com um grande número de componentes da via de apoptose e aparecem com alta expressão em grande número de células no *single-cell* de placenta (Figura 63). Foi observado que, pacientes de leucemia mielóide aguda que carregam uma mutação específica no gene *FLT3* (mutação *FLT3D-ITD*, *internal tandem duplication*), também tem alta expressão de *HOXB2* e *HOXB3* que acarreta na inibição da proliferação celular e indução da apoptose (LINDBLAD et al., 2015). Os autores sugerem que esses genes *HOX* iniciem um programa transcricional que bloqueia a fosforilação de genes dependentes da via *FLT3*, um gene que ativa efetores de vias de apoptose (GAO et al., 2016).

Faltam estudos que tratam de forma abrangente a expressão gênica da família *HOX* em tecido placentário e ainda mais escassos são os que tratam das funções regulatórias dos membros dessa família nesse tecido. A validação experimental desses circuitos regulados pelos fatores de transcrição *Hoxa13*, *Hoxb2* e *Hoxb3*, ajudará na ampliação do conhecimento sobre o papel da família *HOX* no processo de progressão tumoral, e será objeto de análises futuras pelo nosso grupo de pesquisa.

No presente estudo, utilizamos a placenta como modelo biológico para identificar e avaliar a função de genes *HOX* mediadores de mecanismos compartilhados entre o desenvolvimento placentário e o processo cancerígeno. Segundo Haria e Naoria (2013) o padrão de expressão e a funcionalidade de genes homeobox em tumores sólidos se adequam em 3 categorias, que compreendem: genes expressos no tecido adulto normal, porém, regulados negativamente em tumor, executando atividade de supressores tumorais; genes expressos em tumores derivados de tecidos que não o expressam na fase embrionária; ou genes expressos em tumores derivados

de tecidos que expressam o mesmo gene na fase embrionária, em ambos os casos, exibindo atividade oncogênica (HARIA; NAORA, 2013).



**Figura 65.** Enriquecimento da via biológica pathways in cancer do KEGG pelos alvos em comum aos HOXA13, HOXB2 e HOXB3. Em laranja estão os alvos que fazem parte da via. Seta contínua: interação molecular; seta tracejada: ligação indireta; seta com risco: interação perdida por mutação, (+p) fosforilação; (-p) desfosforilação. Via de interação obtida a partir do banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000).

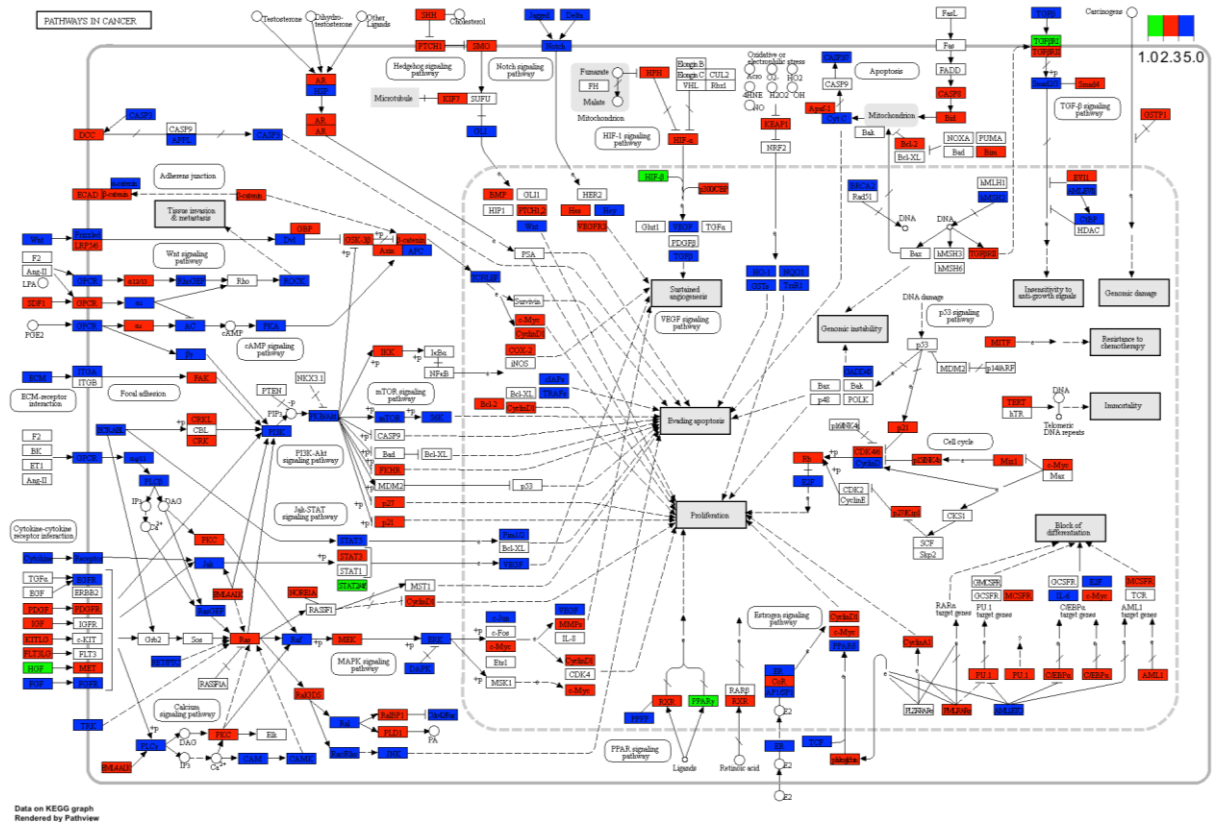


Figura 66. Enriquecimento da via biológica pathways in cancer do KEGG pelos alvos exclusivos de cada HOX selecionado. Alvos de *HOXA13* em verde, alvos de *HOXB2* em vermelho e alvos de *HOXB3* em azul. Seta contínua: interação molecular; seta tracejada: ligação indireta; seta com risco: interação perdida por mutação, (+) fosforilação; (-) desfosforilação. Via de interação obtida a partir do banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000).

## 6 Conclusões

- I. As amostras de placenta humana a termo de tecido total apresentaram baixa expressão dos genes da família HOX, corroborando com a literatura. Entretanto, a análise do transcriptoma de células únicas de placenta revelou a expressão elevada dos três genes HOX em subpopulações específicas de células.
- II. Em tumores primários, o perfil de expressão dos genes HOX varia de acordo com o tipo tumoral; porém, alguns tecidos apresentam alta expressão de mais da metade dos membros da família HOX.
- III. Foram selecionados os genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3*, por apresentarem perfil de expressão único em placenta e alta expressão nos tecidos tumorais primários.
- IV. Com a identificação dos 7938 alvos dos genes HOX estudados, observou-se que esses fatores de transcrição apresentam sítio preferencial de ligação em regiões distais, sugerindo um padrão de regulação via enhancer.
- V. O estudo revelou que os programas genéticos identificados utilizando os alvos de genes HOX em placenta humana, são os mesmos associados com a tumorigênese. Os genes *HOXB2* e *HOXB3* e alguns de seus alvos, como *CASP8*, *CASP6* (relacionados à apoptose), *TAGLN2* e *ITGA5* (relacionados à adesão) apresentam expressão específica no subtipo celular placentário trofoblasto extraviloso, sugerindo que esses genes possam regular, nesse subtipo, os mecanismos de apoptose e adesão celular, contribuindo para o seu fenótipo invasivo.
- VI. Há evidências de correção entre os genes *HOXB2* e *HOXB3*. Além disso, observamos que, em glioblastoma, os alvos comuns a ambos os genes estão envolvidos na regulação da apoptose via *CASP6* e *CASP8*. Tal resultado sustenta o uso da placenta como fonte para identificação de marcadores tumorais.
- VII. Revelamos que um grande número de alvos comuns dos genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* também estão atuando na via “*Pathways in Cancer*” do KEGG. Os resultados sugerem que os genes HOX estudados, são fortes candidatos à alvos terapêuticos.



## 7 Considerações finais

O presente estudo descreve uma abordagem alternativa para avaliar o potencial dos genes HOX como marcadores usando a placenta como plataforma de investigação. A análise se concentrou nos genes *HOXA13*, *HOXB2* e *HOXB3* e revelou que todos regulam grande parte dos genes associados com as principais habilidades adquiridas pelas células tumorais (*Hallmarks of Cancer*). O estudo disponibiliza um conjunto de dados, incluindo alvos dos três genes estudados para o planejamento de estudos funcionais e validação de circuitos gênicos ativos em câncer e regulados por genes HOX. Em resumo, temos fortes evidências do uso dos genes HOX como alvos para terapia anti-câncer.

## 8 Referências

- ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 777–785, 1 out. 2002.
- ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human reproduction update**, v. 12, n. 6, p. 731–46, jan. 2006.
- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1438–49, jun. 2009.
- ADWAN, H. et al. Expression of HOXC8 is inversely related to the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 2, p. 288–295, 12 jul. 2011.
- AMESSE, L. S. et al. Expression of HOX gene products in normal and abnormal trophoblastic tissue. **Gynecologic oncology**, v. 90, n. 3, p. 512–8, 2003.
- AMIN, A. R. M. R. et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S55–S77, 2015.
- APLIN, J. D.; RUANE, P. T. Embryo – epithelium interactions during implantation at a glance. n. 3, p. 15–22, 2017.
- ARGIROPOULOS, B.; HUMPHRIES, R. K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 47, p. 6766–6776, 2007.
- AUVRAY, C. et al. HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 168–178, 2012.
- AXLUND, S. D.; LAMBERT, J. R.; NORDEEN, S. K. HOXC8 inhibits androgen receptor signaling in human prostate cancer cells by inhibiting SRC-3 recruitment to direct androgen target genes. **Molecular cancer research : MCR**, v. 8, n. 12, p. 1643–55, dez. 2010.
- BARKETT, M.; GILMORE, T. D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6842–4, 1999.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the Human Placenta**. 6. ed. Berlin: Springer, 2012.
- BENNETT, L. B. et al. DNA Hypermethylation Accompanied by Transcriptional Repression in Follicular Lymphoma. v. 48, n. 9, p. 828–841, 2010.
- BHATLEKAR, S. et al. Overexpression of HOXA4 and HOXA9 genes promotes self-renewal and contributes to colon cancer stem cell overpopulation. **Journal of Cellular Physiology**, 2018.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 8, p. 811–823, 2014.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer. **Stem Cells International**, 2018.
- BOIMEL, P. J.; CRUZ, C.; SEGALL, J. E. A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies *HOXB2* as a regulator of tumor growth in breast cancer. **Genomics**, v. 98, n. 3, p. 164–72, set. 2011.
- BONDAR, T.; MEDZHITOV, R. The origins of tumor-promoting inflammation. **Cancer cell**, v. 24, n. 2, p. 143–4, 2013.
- BORDONARO, M.; LAZAROVA, D. L. Determination of the Role of CBP- and p300-Mediated Wnt Signaling on Colonic Cells. **JMIR Research Protocols**, v. 5, n. 2, p. e66, 13 maio 2016.
- BOUDREAU, N. et al. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. **The Journal of cell biology**, v. 139, n. 1, p. 257–64, 6 out. 1997.
- BOUDREAU, N. J.; VARNER, J. A. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes

integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4862–8, 6 fev. 2004.

BUTLER, A. et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 411–420, 1 jun. 2018.

CAI, J. et al. Upregulation of HOXB7 promotes the tumorigenesis and progression of gastric cancer and correlates with clinical characteristics. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1641–1650, 26 fev. 2016.

CANTILE, M. et al. HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 194, n. 2, p. 225–236, 1 fev. 2003.

CANTILE, M. et al. Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 91, 14 maio 2012.

CARBONE, C. et al. Homeobox B9 mediates resistance to anti-VEGF therapy in colorectal cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 15, p. 4312–4322, 2017.

CARDOSO, M. et al. Oncogenic mechanisms of HOXB13 missense mutations in prostate carcinogenesis. **Oncoscience**, v. 3, n. September, p. 288, 2016.

CARÉ, A. et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 9, p. 4842–51, 1 set. 1996.

CARÈ, A. et al. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. **Cancer research**, v. 61, n. 17, p. 6532–9, 1 set. 2001.

CARROLL, T. S. et al. Impact of artifact removal on ChIP quality metrics in ChIP-seq and ChIP-exo data. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 10 abr. 2014.

CHEN, D. et al. miR-100 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition but Suppresses Tumorigenesis, Migration and Invasion. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004177, 27 fev. 2014.

CHEN, H. et al. miR-10b Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation and Invasion of Endometrial Cancer Cells via Targeting HOXB3. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 31, n. 6, p. 225–231, 22 ago. 2016a.

CHEN, J. et al. HoxB3 promotes prostate cancer cell progression by transactivating CDCA3. **Cancer Letters**, v. 330, n. 2, p. 217–224, 28 abr. 2013.

CHEN, J. Y. et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 223–227, 2016b.

CHEN, P.; DUAN, S.; ZHENG, X. HOTTIP / *HOXA13* axis is positively associated with cell proliferation in glioma. **Int J Clin Exp Med**, v. 10, n. 12, p. 16388–16394, 2017.

CHEN, S. et al. HOXA9 is critical in the proliferation, differentiation, and malignancy of leukaemia cells both in vitro and in vivo. **Cell Biochemistry and Function**, v. 35, n. 7, p. 433–440, 2017.

CHEN, S. W. et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 3261–3268, 2016c.

CHEN, X. et al. Long non-coding RNA HOXB-AS1 promotes proliferation, migration and invasion of glioblastoma cells via HOXB-AS1/miR-885-3p/*HOXB2* axis. **Neoplasia**, v. 66, n. 03, p. 386–396, 2019.

CHENG, L. et al. The predictive potential and oncogenic effects of HOXC8 expression on osteosarcoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14961–14967, 20 nov. 2016.

CHENG, Y. et al. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10840–10852, 10 maio 2015.

CHU, M. C.; SELAM, F. B.; TAYLOR, H. S. HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. **Cancer biology & therapy**, v. 3, n. 6, p. 568–72, jun. 2004.

CLEMENCEAU, A. et al. Lung cancer susceptibility genetic variants modulate HOXB2 expression in the lung. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 11–12, p. 857–864, 2018.

COSTA, B. M. et al. Reversing HOXA9 Oncogene Activation by PI3K Inhibition: Epigenetic Mechanism and Prognostic Significance in Human Glioblastoma. *v. 70, n. 2, p. 453–462, 2011.*

CROSS, J. C. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 857, p. 23–32, 1998.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: Advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584–596, 2015.

CURRIE, E. et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153–161, 6 ago. 2013.

DAS, S. K. Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 5, p. 387–96, maio 2010.

DE BARROS E LIMA BUENO, R. et al. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, 2016.

DEKKER, J.; MISTELI, T. Long-range chromatin interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 10, 1 out. 2015.

DESTRO, M. F. D. S. S. D. et al. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 01, p. 141–149, 19 nov. 2009.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.

DONG, X. Y. et al. PLAC1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spontaneous antibody responses in human cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2038–2043, 2008.

DONG, Y. et al. *HOXA13* is associated with unfavorable survival and acts as a novel oncogene in prostate carcinoma. **Future Oncology**, v. 13, n. 17, p. 1505–1516, 2017.

DU, H.; TAYLOR, H. S. The role of hox genes in female reproductive tract development, adult function, and fertility. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, 2016.

DUAN, R. et al. *HOXA13* is a potential GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF- $\beta$  pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27778–93, 29 set. 2015.

DUBOULE, D.; DOLLÉ, P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. **The EMBO journal**, v. 8, n. 5, p. 1497–505, 1989.

DUBOULE, D.; MORATA, G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. **Trends in genetics : TIG**, v. 10, n. 10, p. 358–64, 1994.

ECONOMIDES, K. D.; ZELTSER, L.; CAPECCHI, M. R. Hoxb13 mutations cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae. **Developmental Biology**, v. 256, n. 2, p. 317–330, 2003.

ESCUADERO-ESPARZA, A. et al. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2 and the PGF receptor, neuropilin, in human breast cancer: prognostic significance. **Oncology reports**, v. 23, n. 2, p. 537–44, fev. 2010.

ESPOSITO, M. T. et al. Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1481–1490, 2015.

F. GARY CUNNINGHAM et al. Williams obstetrics. In: **Williams Obstetrics**. 23. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. p. 1239–1326.

FISHER, S. J. et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. **The Journal of cell biology**, v. 109, n. 2, p. 891–902, ago. 1989.

FLORIDON, C. et al. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 10, p. 943–50, 2000.

FRASOR, J. et al. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of

proliferation and cell phenotype. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4562–4574, 2003.

FU, H. et al. miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 1093–1099, jan. 2017.

GAO, F. et al. Control of regional decidualization in implantation: Role of FoxM1 downstream of Hoxa10 and cyclin D3. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13863, 2015.

GAO, K. et al. Induced apoptosis investigation in wild-type and FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells by nanochannel electroporation and single-cell qRT-PCR. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 5, p. 956–964, 1 maio 2016.

GARCIA-BELLIDO, A. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. **Ciba Foundation symposium**, v. 0, n. 29, p. 161–182, 1975.

GARCÍA-BELLIDO, A. . Homoeotic and Atavic Mutations in Insects. **American Zoologist**, v. 17, n. 3, p. 613–629, 1977.

GASPAR, N. et al. MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9243–9252, 2010.

GEHRING, W.; HIROMI, Y. Homeotic genes and the homobox. **Annual review of genetics**, v. 20, p. 147–73, 1986.

GEHRING, W. J.; AFFOLTER, M.; BURGLIN, T. Homeodomain proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 487–526, 1994.

GEISMANN, C. et al. Role of CCL20 mediated immune cell recruitment in NF-κB mediated TRAIL resistance of pancreatic cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 5, p. 782–796, 2017.

GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 445–453, 2007.

GODBOLE, G. et al. Decrease in Expression of HOXA10 in the Decidua after Embryo Implantation Promotes Trophoblast Invasion. **Endocrinology**, 17 maio 2017.

GOEL, H. L.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871–82, dez. 2013.

GOLPON, H. A. et al. HOX Genes in Human Lung Altered Expression in Primary Pulmonary Hypertension and Emphysema. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 955–966, 2001.

GOODE, E. L. et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. **Nature genetics**, v. 42, n. 10, p. 874–9, out. 2010.

GOODMAN, F. R. et al. Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7458–63, 8 jul. 1997.

GORSKI, D. H.; WALSH, K. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. **Circulation Research**, 2000.

GRIER, D. et al. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 154–171, 2005.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine**, v. 21, n. 1, p. 11–19, 2011.

GU, Z.-D. et al. *HOXA13* Promotes Cancer Cell Growth and Predicts Poor Survival of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 69, n. 12, p. 4969–4973, 15 jun. 2009.

GUDE, N. M. et al. **Growth and function of the normal human placenta** **Thrombosis Research**, 2004.

GUERRERO-PRESTON, R. et al. Key tumor suppressor genes inactivated by “greater

promoter" methylation and somatic mutations in head and neck cancer. **Epigenetics**, v. 9, n. 7, p. 1031–1046, 2014.

GUERRIERO, I. et al. Analysis of miRNA profiles identified miR-196a as a crucial mediator of aberrant PI3K/AKT signaling in lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19172–19191, 2017.

GUO, T. et al. An evolving NGF-Hoxd1 signaling pathway mediates development of divergent neural circuits in vertebrates. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 31–36, 12 jan. 2011.

GURCHOT, C. The trophoblast theory of cancer (John Beard, 1857-1924) revisited. **Oncology**, v. 31, n. 5–6, p. 310–33, 1975.

HAKAMI, F. et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 807–816, 2014.

HAMID, A. R. A. H. et al. The role of HOXC6 in prostate cancer development. **The Prostate**, v. 75, n. 16, p. 1868–1876, dez. 2015.

HAN, H. et al. TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11432, 12 set. 2015.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HARIA, D.; NAORA, H. Homeobox Gene Deregulation: Impact on the Hallmarks of Cancer. **Cancer Hallmarks**, v. 1, n. 2, p. 67–76, 1 ago. 2013.

HAYASHIDA, T. et al. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1100–5, 19 jan. 2010.

HE, Y.-X. et al. *HOXA13* upregulation in gastric cancer is associated with enhanced cancer cell invasion and epithelial-to-mesenchymal transition. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 2, p. 258–265, jan. 2017.

HEINRICHS, S. et al. HOXB9 Is Aberrantly Expressed in Blast Cells in a Subset of Acute Myeloid Leukemia Patients and Supports Proliferation of AML Cell Lines. **Blood**, v. 106, n. 11, 2005.

HEMBERGER, M.; CROSS, J. C. Genes governing placental development. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 12, n. 4, p. 162–8, 2001.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12:86, p. 1–15, 2013.

HOLLAND, P. W. H.; BOOTH, H. A. F.; BRUFORD, E. A. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC biology**, v. 5, p. 47, 2007.

HOLTAN, S. G. et al. Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 84, n. 11, p. 985–1000, 2009.

HUAN, H. et al. HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 86, 24 dez. 2017.

HUANG, D. et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. **Cancer research**, v. 70, n. 3, p. 1063–71, 1 fev. 2010.

HUANG, K. et al. Overexpression of HOXB9 promotes metastasis and indicates poor prognosis in colon cancer. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 26, n. 1, p. 72–80, 2014.

HUGHES, D. A. et al. Evaluating intra- and inter-individual variation in the human placental transcriptome. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 54, 2015.

HUR, H. et al. Analysis of HOX Gene Expression Patterns in Human Breast Cancer. **Molecular**

**Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 64–71, 2014.

IMANISHI, H. et al. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. **PLoS ONE**, 2011.

INAMURA, K. et al. HOXB2, an adverse prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas, promotes invasion by transcriptional regulation of metastasis-related genes in HOP-62 non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Research**, v. 28, n. 4 B, p. 2121–2127, jul. 2008.

JAFRI, M. A. et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, 2016.

JEYARAJAH, M. J. et al. Syndecan-4 regulates extravillous trophoblast migration by coordinating protein kinase C activation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

JIA, H. et al. MicroRNA-10a Is Down-Regulated by DNA Methylation and Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e88057, 31 jan. 2014.

JIANG, C. et al. TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D137-40, jan. 2007.

JIANG, Y. et al. Repression of Hox genes by LMP1 in nasopharyngeal carcinoma and modulation of glycolytic pathway genes by HoxC8. **Oncogene**, v. 34, n. 50, p. 6079–6091, 9 dez. 2015.

JUNG, C. et al. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. **Cancer research**, v. 64, n. 9, p. 3046–51, 2004.

JURISICOVA, A.; DETMAR, J.; CANIGGIA, I. **Molecular mechanisms of trophoblast survival: From implantation to birth** *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 2005.

KAISTHA, B. P. et al. PLAC8 Localizes to the Inner Plasma Membrane of Pancreatic Cancer Cells and Regulates Cell Growth and Disease Progression through Critical Cell-Cycle Regulatory Pathways. **Cancer research**, v. 76, n. 1, p. 96–107, 1 jan. 2016.

KAM, M. K. M. et al. Homeobox b5 (Hoxb5) regulates the expression of Forkhead box D3 gene (Foxd3) in neural crest. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 55, p. 144–152, 1 out. 2014.

KAMEL, S. et al. Morpholino-mediated knockdown in primary chondrocytes implicates Hoxc8 in regulation of cell cycle progression. **Bone**, v. 44, n. 4, p. 708–716, 2009.

KANAI, M. et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncology reports**, v. 23, n. 3, p. 843–51, mar. 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes - Release 72.1, December 1, 2014. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KELLY, Z. et al. HOX genes in ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 4, n. 1, p. 16, 2011.

KELLY, Z. et al. The prognostic significance of specific HOX gene expression patterns in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 7, p. 1608–1617, 2016.

KIM, H. J. et al. In Vivo Imaging of Functional Targeting of miR-221 in Papillary Thyroid Carcinoma. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 10, p. 1686–1693, 2008.

KIM, J. W. et al. HOXA10 is associated with temozolomide resistance through regulation of the homologous recombinant DNA repair pathway in glioblastoma cell lines. **Genes & cancer**, v. 5, n. 5–6, p. 165–174, maio 2014.

KIM, Y. R. et al. HOXB13-mediated suppression of p21WAF1/CIP1 regulates JNK/c-Jun signaling in prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v. 35, n. 4, p. 2011–2016, 2016.

KLAUSEN, C.; LEUNG, P. C. K.; AUERSPERG, N. Cell motility and spreading are suppressed by HOXA4 in ovarian cancer cells: possible involvement of beta1 integrin. **Molecular cancer research : MCR**, v. 7, n. 9, p. 1425–37, set. 2009.

KO, S. Y.; LENGYEL, E.; NAORA, H. The Müllerian HOXA10 gene promotes growth of

ovarian surface epithelial cells by stimulating epithelial-stromal interactions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 317, n. 1–2, p. 112–119, 2010.

KO, S. Y.; NAORA, H. Adaptation of ovarian cancer cells to the peritoneal environment: Multiple mechanisms of the developmental patterning gene HOXA9. **Cancer cell & microenvironment**, v. 1, n. 6, p. e379, 13 nov. 2014.

KODAMA, A. et al. Immunohistochemical Demonstration of Angiogenesis-Associated Homeobox Proteins in Canine Vascular Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, n. 2–3, p. 199–203, ago. 2009.

KOLLMANN, K. et al. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 24, n. 2, p. 167–181, 12 ago. 2013.

KORSHUNOV, A. et al. Gene Expression Patterns in Ependymomas Correlate with Tumor Location, Grade, and Patient Age. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 5, p. 1721–1727, 2003.

KREBS, H. A.; JOHNSON, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. **FEBS Letters**, v. 117, p. K2–K10, 25 ago. 1980.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1–2, p. 15–30, 2008.

KYO, S. et al. Expression of Telomerase Activity in Human Chorion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 2, p. 498–503, dez. 1997.

LADAM, F.; SAGERSTRÖM, C. G. Hox regulation of transcription: More complex(es). **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 1, p. 4–15, jan. 2014.

LAKSHMI NARENDRA, B. et al. Immune system: A double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, n. 9, p. 823–834, 2013.

LALA, P. K. et al. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 142–149, 2002.

LANDIS, M. W. et al. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 13–22, jan. 2006.

LANDT, S. G. et al. **ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia** *Genome Research*, 2012.

LAWRENCE, H. J. et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3988–3994, 2005.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, J.-Y. et al. HOXB5 Promotes the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 6, p. 701–711, 2015.

LEI, H. et al. Identification of a Hoxc8-regulated transcriptional network in mouse embryo fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10305–9, 2006.

LEUNEN, K. et al. Recurrent copy number alterations in BRCA1-mutated ovarian tumors alter biological pathways. **Human Mutation**, v. 30, n. 12, p. 1693–1702, 2009.

LEVINE, M.; HOEY, T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. **Cell**, v. 55, n. 4, p. 537–540, 1988.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565–70, 1978.

LI, C. H.; CHEN, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: Progress and prospects. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 8, p. 1895–1910, 2013.

LI, H.-P. et al. Aberrantly hypermethylated Homeobox A2 derepresses metalloproteinase-9 through TBP and promotes invasion in Nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 2154–2165, 19 nov. 2013.



LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.

LI, H. et al. MicroRNA-433 Represses Proliferation and Invasion of Colon Cancer Cells by Targeting Homeobox A1. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 315–322, 5 mar. 2018.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

LI, Q. et al. miR-30b inhibits cancer cell growth, migration, and invasion by targeting homeobox A1 in esophageal cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 485, n. 2, p. 506–512, 1 abr. 2017.

LI, Y. et al. HOXC8 promotes breast tumorigenesis by transcriptionally facilitating cadherin-11 expression. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2596–2607, 6 maio 2014.

LI, Y. et al. HOXA7 stimulates human hepatocellular carcinoma proliferation through cyclin E1/CDK2. **Oncology Reports**, v. 33, n. 2, p. 990–996, 1 fev. 2015.

LIAO, K.-H. et al. Endothelial angiogenesis is directed by RUNX1T1-regulated VEGFA, BMP4 and TGF- $\beta$ 2 expression. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179758, 22 jun. 2017.

LINDBLAD, O. et al. The role of HOXB2 and HOXB3 in acute myeloid leukemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 742–747, 2015.

LIU, S. et al. HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGF $\beta$  signaling pathway. **Cancer Research**, v. 75, n. 4, p. 709–719, 2015a.

LIU, S. J. et al. Single-cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 14 abr. 2016.

LIU, T. et al. Telomerase reverse transcriptase inhibition stimulates cyclooxygenase 2 expression in cancer cells and synergizes with celecoxib to exert anti-cancer effects. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2272–2280, 16 jun. 2013.

LIU, Y.-J. et al. Overexpression of HOXC11 homeobox gene in clear cell renal cell carcinoma induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2821–2829, 2015b.

LIU, Y. et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. **Cell Research**, v. 28, n. 8, p. 819–832, 24 ago. 2018.

LOUWEN, F. et al. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia ABSTRACT : v. 3, n. 8, p. 759–773, 2012.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LU, L. et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 3, p. 875–883, 2012.

LU, S. et al. Overexpression of HOXC8 is Associated With Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. **Reproductive Sciences**, v. 23, n. 7, p. 944–954, jul. 2016.

LU, Z.; HARDT, J.; KIM, J. J. Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation. **Molecular human reproduction**, v. 14, n. 6, p. 357–66, 2008.

LUNGHI, L. et al. Control of human trophoblast function. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 5, p. 6, 8 fev. 2007.

LUO, J. et al. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–10, 2012.

MANNINI, L. et al. SMC1B is present in mammalian somatic cells and interacts with mitotic cohesin proteins. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

MARBACH, D. et al. Tissue-specific regulatory circuits reveal variable modular perturbations across complex diseases. **Nature Methods**, v. 13, n. 4, p. 366–370, 7 abr. 2016.

MARTIN, N. et al. Co-regulation of senescence-associated genes by oncogenic homeobox proteins and polycomb repressive complexes. **Cell Cycle**, v. 12, n. 14, p. 2194–2199, 2013.

MARTINI, M. et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. **Annals of Medicine**, v. 46, n. 6, p. 372–383, 2014.

MCALLISTER, S. S. et al. Systemic Endocrine Instigation of Indolent Tumor Growth Requires Osteopontin. v. 133, n. 6, p. 994–1005, 2014.

MCGINNIS, W.; KRUMLAUF, R. Homeobox genes and axial patterning. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 283–302, 24 jan. 1992.

MCINTYRE, D. C. et al. Hox patterning of the vertebrate rib cage. **Development**, v. 134, n. 16, p. 2981–2989, 2007.

MEAZZA, R. et al. Expression of HOXC4 homeoprotein in the nucleus of activated human lymphocytes. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2084–90, 1995.

MIAO, J. et al. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 43, p. 17093–17098, 2007.

MILLER, G. J. et al. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5879–5888, 2003.

MOORE, K. **Embriologia clínica**. 8ª ed. Amsterdã: Elsevier, 2008.

MORGAN, R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 2, p. 67–69, 2006.

MORGAN, R. et al. Targeting HOX transcription factors in prostate cancer. **BMC Urology**, v. 14, n. 17, p. 1–9, 2014.

MORTLOCK, D. P.; INNIS, J. W. Mutation of *HOXA13* in hand-foot-genital syndrome. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 179–180, 1 fev. 1997.

MUCENSKI, M. L. et al. Single cell RNA-seq study of wild type and Hox9,10,11 mutant developing uterus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

MUELLER, D. W.; BOSSERHOFF, A. K. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 5, p. 1064–1074, 2011.

MURTHI, P. et al. Novel Homeobox Genes are Differentially Expressed in Placental Microvascular Endothelial Cells Compared with Macrovascular Cells. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 624–630, 2008.

MURTHI, P. et al. The role of homeobox genes in the development of placental insufficiency. **Fetal diagnosis and therapy**, v. 32, n. 4, p. 225–30, 2012.

MYERS, C.; CHARBONEAU, A.; BOUDREAU, N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. **Journal of Cell Biology**, 2000.

NASSIRPOUR, R. et al. Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 485, 2014.

NEPH, S. et al. Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1274–86, 14 set. 2012.

NEUFELD, G. et al. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors** **FASEB Journal**, 1999.

NI, L.-Y. et al. MicroRNA-30c suppressed giant-cell tumor of bone cell metastasis and growth via targeting HOXA1. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 21, p. 4819–4827, nov. 2017.

NING, Y. et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 9, p. 2038–2049, 1 maio 2011.

NOMAN, M. Z. et al. Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 18, p. 4629–4641, 2012.

NOVAKOVIC, B.; SAFFERY, R. Placental pseudo-malignancy from a DNA methylation perspective: unanswered questions and future directions. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. December, p. 1–7, 2013.

OHUCHIDA, K. et al. MicroRNA-10a is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer and Involved in Its Invasiveness Partially via Suppression of the HOXA1 Gene. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 7, p. 2394–2402, 10 jul. 2012.

OKUDA, H. et al. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 12, p. 1733–1742, 2006.

PAN, T.-T. et al. Overexpression of *HOXA13* as a Potential Marker for Diagnosis and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. **Tohoku J. Exp. Med. Tohoku J. Exp. Med**, v. 234, n. 2343, p. 209–219, 2014.

PAPAGEORGIU, S. **Hox Gene Expression**. 1<sup>a</sup> ed. New York: [s.n.].

POJO, M. et al. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 7657–7674, 2015.

POLLHEIMER, J. et al. **Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 13 nov. 2018.

POON, E.; HARRIS, A. L.; ASHCROFT, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e26, 27 ago. 2009.

QIN, Z. et al. Elevated *HOXA13* expression promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer partly via activating Erk1/2. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 1803–1813, 2019.

QU, L.-P. et al. CDH17 is a downstream effector of *HOXA13* in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 1234–1241, 2017.

REZSOHAZY, R. et al. Cellular and molecular insights into Hox protein action. **Development**, v. 142, n. 7, p. 1212–1227, 2015.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C.; LUNENFELD, S. PLACENTAL DEVELOPMENT : LESSONS FROM MOUSE MUTANTS. v. 2, n. July, p. 538–548, 2001.

RÖSSIG, L. et al. Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 11, p. 1825–35, 6 jun. 2005.

RUBIN, E. et al. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. **Cancer Research**, v. 67, n. 4, p. 1527–1535, 2007.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, n. 1- 5 SPEC. ISS., p. 89–96, 2006.

RUX, D. R. et al. Regionally Restricted Hox Function in Adult Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Developmental Cell**, v. 39, n. 6, p. 653–666, 19 dez. 2016.

SÁNCHEZ-HERRERO, E. Hox Targets and Cellular Functions. **Scientifica**, v. 2013, p. 738257, 2013.

SANDOVAL, J.; ESTELLER, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. **Current opinion in genetics & development**, v. 22, n. 1, p. 50–5, 2012.

SARNO, J. et al. Thrombin and interleukin-1beta decrease HOX gene expression in human first trimester decidual cells: implications for pregnancy loss. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 7, p. 451–7, 2009.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 15 mar. 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–8, 2008.

SEGARA, D. et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3587–96, 1 maio 2005.

SEIFERT, A. Role of *Hox* genes in stem cell differentiation. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 583, 2015.

SHAH, C. A. et al. HoxA10 Protein Regulates Transcription of Gene Encoding Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) in Myeloid Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18230–18248, 25 maio 2012.

SHAH, M. et al. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 38, 16 fev. 2017.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 5, p. 361–371, 2010.

SHAUT, C. A. E. et al. *HOXA13* is essential for placental vascular patterning and labyrinth endothelial specification. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 5, p. 11–15, 2008.

SHRESTHA, B. et al. Homeodomain-containing protein HOXB9 regulates expression of growth and angiogenic factors, facilitates tumor growth *in vitro* and is overexpressed in breast cancer tissue. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 19, p. 3715–3726, out. 2012.

SHRIMPTON, A. E. et al. A HOX gene mutation in a family with isolated congenital vertical talus and Charcot-Marie-Tooth disease. **American journal of human genetics**, v. 75, n. 1, p. 92–96, 2004.

SILVA, W. A. et al. PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses. **Cancer immunity**, v. 7, p. 18, jan. 2007.

SIMPSON, A. J. G. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 615–25, ago. 2005.

SIO, A. et al. Dysregulated hematopoiesis caused by mammary Cancer is associated with epigenetic changes and Hox gene expression in hematopoietic cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 19, p. 5892–5904, 2013.

SONDEREGGER, S.; POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation-Review. 2010.

SOUNDARARAJAN, R.; RAO, A. J. Trophoblast “pseudo-tumorigenesis”: significance and contributory factors. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, p. 15, 2004.

STANLEY J. ULJASZEK, FRANCIS E. JOHNSTON, MICHAEL A. PREECE. **The Cambridge Encyclopedia of Human Growth and Development**. London: Cambridge University Press, 1998.

STOLL, S. J.; KROLL, J. HOXC9: A Key Regulator of Endothelial Cell Quiescence and Vascular Morphogenesis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 7–11, jan. 2012.

STORTI, P. et al. HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. **Leukemia**, v. 25, n. 3, p. 527–537, 23 mar. 2011.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005.

SURH, Y. J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480–481, p. 243–268, 2001.

SVINGEN, T.; TONISSEN, K. F. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. **Heredity**, v. 97, n. 2, p. 88–96, 2006.

TAIT, D. L. et al. Downregulation of HOXC6 in Serous Ovarian Cancer. **Cancer investigation**, v. 33, n. 7, p. 303–11, jan. 2015.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. **Experimental cell research**, v. 293, p. 144–153, 2004.

TAMINIAU, A. et al. HOXA1 binds RBCK1/HOIL-1 and TRAF2 and modulates the TNF/NF- $\kappa$ B pathway in a transcription-independent manner. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 15, p. 7331–7349, 2016.

TAYLOR, H. S. et al. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 7, p. 1379–84, 1998.

TAYLOR, H. S. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. **Semin Reprod Med**, v. 18, n. 1, p. 81–89, 2000.

TAYLOR, H. S.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI, P. A Conserved Hox Axis in the Mouse and Human Female Reproductive System: Late Establishment and Persistent Adult Expression of the Hoxa Cluster Genes. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 57, p. 1338–1345, 1997.

THOMAS W. SADLER. **Medical Embriology**. 10. ed. Baltimore: [s.n.].

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 185–198, 2015.

VINNITSKY, V. B. Oncogerminative Hypothesis of Tumor Formation. p. 19–27, 1993.

VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA, P. et al. MiR-215-5p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epiregulin and its transcriptional inducer HOXB9. **Oncogenesis**, v. 6, n. 11, 2017.

WALTREGNY, D. et al. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. **Prostate**, v. 50, n. 3, p. 162–169, 2002.

WANG, F. et al. Mammary Fat of Breast Cancer: Gene Expression Profiling and Functional Characterization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109742, 7 out. 2014.

WANG, H. et al. HoxA10 Terminates Emergency Granulopoiesis by Increasing Expression of Triad1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 11, p. 5375–87, 1 jun. 2015a.

WANG, J.-G. et al. MiR-99a suppresses cell invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma through targeting HOXA1. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 753–761, 10 fev. 2017a.

WANG, W.-M. et al. HOXB7 promotes tumor progression via bFGF-induced activation of MAPK/ERK pathway and indicated poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 47121–47135, 18 jul. 2017b.

WANG, X. et al. MicroRNA-99a inhibits tumor aggressive phenotypes through regulating HOXA1 in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32737–32747, 20 out. 2015b.

WANG, Z. et al. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 21, p. 6327–34, 1 nov. 2007.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WEISS, F. U. et al. Retinoic Acid Receptor Antagonists Inhibit miR-10a Expression and Block Metastatic Behavior of Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 2136- 2145.e7, dez. 2009.

WU, Q. et al. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. **Molecular Cancer**, v. 6, p. 1–11, 2007.

XU, K. et al. Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 3712–3718, 8 jan. 2018a.

XU, K. et al. Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. **Oncology letters**, v. 15, n. 3, p. 3712–3718, mar. 2018b.

YABE, S. et al. Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 19, p. E2598–E2607, 2016.

YAN, T. et al. HoxC5 and miR-615-3p target newly evolved genomic regions to repress hTERT and inhibit tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 100, 8 dez. 2018.

YARMISHYN, A. A. et al. HOXD-AS1 is a novel lncRNA encoded in HOXD cluster and a marker of neuroblastoma progression revealed via integrative analysis of noncoding transcriptome. **BMC Genomics**, v. 15, n. Suppl 9, p. S7, 8 dez. 2014.

YOSHIDA, H. et al. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: Role in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 889–897, 2006.

YU, G.; WANG, L.-G.; HE, Q.-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. **Bioinformatics**, v. 31, n. 14, p. 2382–2383, 15 jul. 2015.

ZAGOZEWSKI, J. L. et al. The role of homeobox genes in retinal development and disease. **Developmental Biology**, v. 393, n. 2, p. 195–208, 2014.

ZHAI, L.-L. et al. Overexpression of homeobox B-13 correlates with angiogenesis, aberrant expression of EMT markers, aggressive characteristics and poor prognosis in pancreatic carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 6919–27, 2015.

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. **Wnt signaling in cancer** Oncogene Nature Publishing Group, , 1 mar. 2017.

ZHANG, L. et al. Upregulation HOXA10 homeobox gene in endometrial cancer: role in cell cycle regulation. **Medical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 52, 19 jul. 2014.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of cancer-promoting inflammation: A new approach for anticancer therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. February, p. 1–11, 2017.

ZHANG, X. et al. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7580–90, 28 fev. 2003.

ZHANG, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome biology**, v. 9, n. 9, p. R137, 2008.

ZHANG, Y. M. et al. Expression of homeobox gene transcripts in trophoblastic cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, n. 1, p. 24–32, 2002.

ZHENG, G. et al. ITFP: an integrated platform of mammalian transcription factors. **Bioinformatics**, v. 24, n. 20, p. 2416–2417, 15 out. 2008.

ZHOU, G. et al. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W234–W241, 2 jul. 2019.

ZHU, L. J. et al. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 237, 11 dez. 2010.

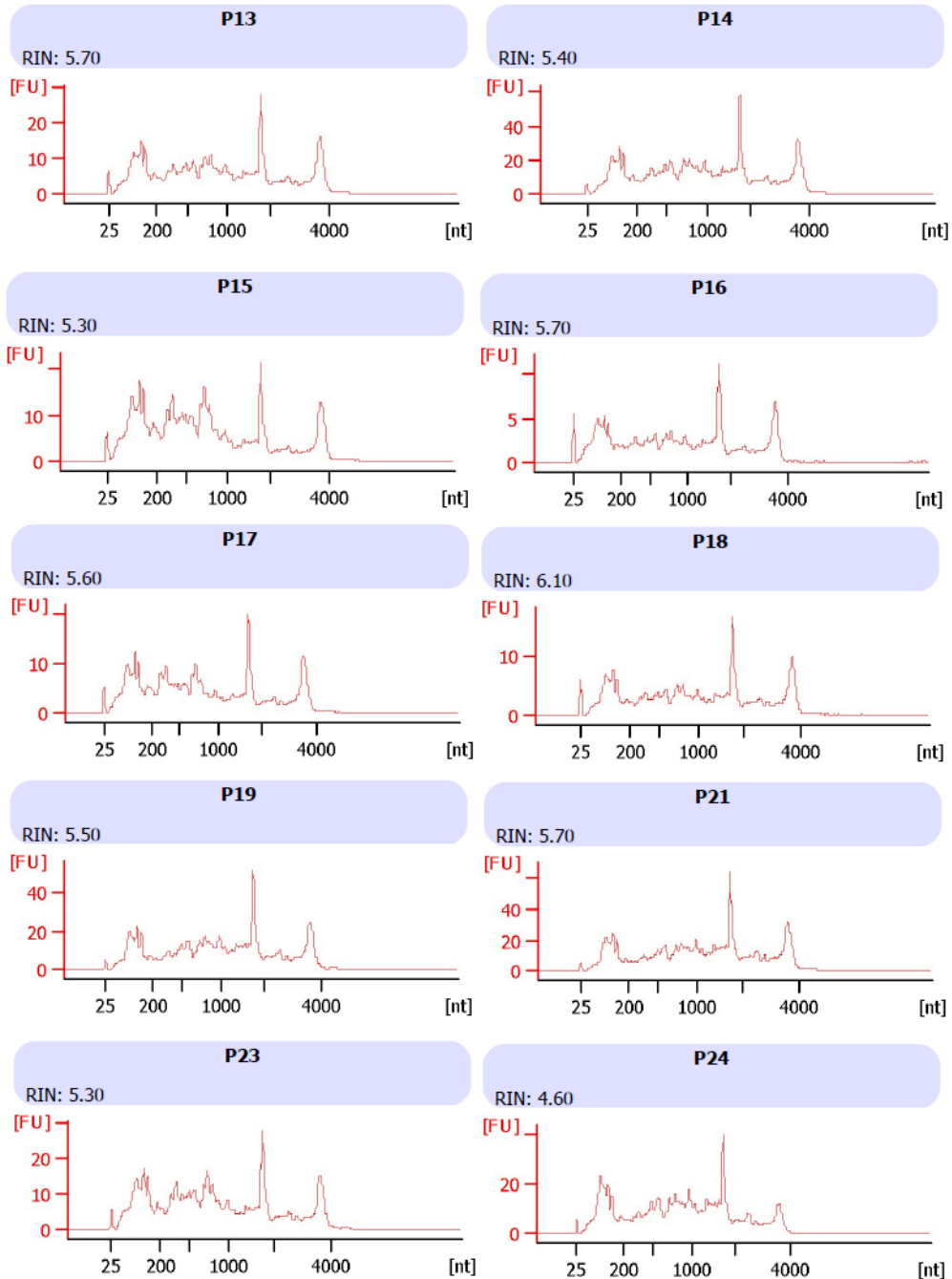
ZHUANG, L. et al. HoxB7 promotes growth and metastasis of lung adenocarcinoma cells through regulation of the  $\text{tgf-}\beta\text{/smad3}$  signaling. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 29, n. 3, p. 601–8, 2015.

ZOU, D. et al. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 99–108, 7 jun. 2016.

## 9 Apêndice

### 9.1 Apêndice 1

Análise de integridade dos RNAs de placenta para teste piloto de expressão gênica em tempo real. RIN: RNA *Integrity number*.



## 9.2 Apêndice 2

Descrição do número de *read* geradas e mapeadas no RNA-seq das 40 amostras de placenta retiradas da base de dados do GEO (GSE66622).

	<b>ID</b>	<b>da</b>	<b>Reads</b>	<b>Reads</b>	<b>Reads</b>
	<b>amostra</b>		<b>geradas (n)</b>	<b>mapeadas (n)</b>	<b>mapeadas (%)</b>
<b>1</b>	SRR1850941		4558756	3442322	75.5%
<b>2</b>	SRR1850942		3878911	3006960	77.5%
<b>3</b>	SRR1850943		3963721	3075118	77.6%
<b>4</b>	SRR1850944		5584506	4456025	79.8%
<b>5</b>	SRR1850947		4234922	3261661	77.0%
<b>6</b>	SRR1850948		4807865	3754385	78.1%
<b>7</b>	SRR1850967		5222923	4033520	77.2%
<b>8</b>	SRR1850968		4454624	3507002	78.7%
<b>9</b>	SRR1850975		2802122	2164379	77.2%
<b>10</b>	SRR1850976		4190007	3300930	78.8%
<b>11</b>	SRR1850977		4350784	3278914	75.4%
<b>12</b>	SRR1850978		6480299	5073880	78.3%
<b>13</b>	SRR1850981		3804696	3054363	80.3%
<b>14</b>	SRR1850982		4506915	3561938	79.0%
<b>15</b>	SRR1850983		1095558	850688	77.6%
<b>16</b>	SRR1850984		4321604	3334011	77.1%
<b>17</b>	SRR1850985		5170467	3893653	75.3%
<b>18</b>	SRR1850986		3108171	2411097	77.6%
<b>19</b>	SRR1850987		4629598	3644672	78.7%
<b>20</b>	SRR1850988		4077711	3132012	76.8%
<b>21</b>	SRR1850991		4649252	3580763	77.0%
<b>22</b>	SRR1850992		4010167	3116806	77.7%
<b>23</b>	SRR1850993		2275948	1772387	77.9%
<b>24</b>	SRR1850994		4375208	3433490	78.5%
<b>25</b>	SRR1850995		4125604	3110408	75.4%
<b>26</b>	SRR1850996		4491399	3543144	78.9%
<b>27</b>	SRR1850997		4060677	3099149	76.3%
<b>28</b>	SRR1850998		4096151	3266536	79.7%



<b>29</b>	SRR1850999	4253556	3312987	77.9%
<b>30</b>	SRR1851000	3696655	2866991	77.6%
<b>31</b>	SRR1851001	4625962	3628862	78.4%
<b>32</b>	SRR1851002	4569265	3619446	79.2%
<b>33</b>	SRR1851009	8224107	6386233	77.7%
<b>34</b>	SRR1851010	4506048	3606804	80.0%
<b>35</b>	SRR1851011	4244183	3260520	76.8%
<b>36</b>	SRR1851012	2175953	1664530	76.5%
<b>37</b>	SRR1851013	4192311	3302292	78.8%
<b>38</b>	SRR1851014	2396732	1819228	75.9%
<b>39</b>	SRR1851015	4241608	3293606	77.6%
<b>40</b>	SRR1851016	4074004	3050782	74.9%
<hr/>				
	Total	168528950	130972494	-
	Média	4213223,75	3274312,4	77,60%
<hr/>				

### 9.3 Apêndice 3

Contagem de *read* únicas e duplicadas em cada uma das 4 lanes (L001 – L004), fita *forward* (R1) e *reverse* (R2) das 8 amostras sequenciadas (S1 – S8).

Amostra	Reads únicas	Reads duplicadas
P14A-HOXA13_S8_L001_R1_001	13108066	2045529
P14A-HOXA13_S8_L001_R2_001	13783650	1369945
P14A-HOXA13_S8_L002_R1_001	12944364	2082399
P14A-HOXA13_S8_L002_R2_001	13584556	1442207
P14A-HOXA13_S8_L003_R1_001	13101110	2088036
P14A-HOXA13_S8_L003_R2_001	13748639	1440507
P14A-HOXA13_S8_L004_R1_001	13078011	1996265
P14A-HOXA13_S8_L004_R2_001	13688863	1385413
P14A-HOXB2_S7_L001_R1_001	9722108	1689896
P14A-HOXB2_S7_L001_R2_001	10465237	946767
P14A-HOXB2_S7_L002_R1_001	9652229	1615798
P14A-HOXB2_S7_L002_R2_001	10328099	939928
P14A-HOXB2_S7_L003_R1_001	9727454	1683274
P14A-HOXB2_S7_L003_R2_001	10495244	915484
P14A-HOXB2_S7_L004_R1_001	9740361	1582985
P14A-HOXB2_S7_L004_R2_001	10388130	935216
P14A-HOXB3_S6_L001_R1_001	12205792	2099751
P14A-HOXB3_S6_L001_R2_001	12946589	1358954
P14A-HOXB3_S6_L002_R1_001	11701483	2068325
P14A-HOXB3_S6_L002_R2_001	12364774	1405034
P14A-HOXB3_S6_L003_R1_001	12209395	2141589
P14A-HOXB3_S6_L003_R2_001	12922817	1428167
P14A-HOXB3_S6_L004_R1_001	11866170	2025071
P14A-HOXB3_S6_L004_R2_001	12513697	1377544
P14A-Input_S5_L001_R1_001	14122190	2775507
P14A-Input_S5_L001_R2_001	15293807	1603890
P14A-Input_S5_L002_R1_001	13858610	2797608
P14A-Input_S5_L002_R2_001	14997337	1658881
P14A-Input_S5_L003_R1_001	14067106	2862774
P14A-Input_S5_L003_R2_001	15315334	1614546
P14A-Input_S5_L004_R1_001	13993090	2748629
P14A-Input_S5_L004_R2_001	15058768	1682951
P7B-HOXA13_S4_L001_R1_001	14041186	2535813
P7B-HOXA13_S4_L001_R2_001	14715653	1861346
P7B-HOXA13_S4_L002_R1_001	13800409	2588136

P7B-HOXA13_S4_L002_R2_001	14373907	2014638
P7B-HOXA13_S4_L003_R1_001	13957023	2648539
P7B-HOXA13_S4_L003_R2_001	14556141	2049421
P7B-HOXA13_S4_L004_R1_001	13895064	2557413
P7B-HOXA13_S4_L004_R2_001	14488222	1964255
P7B-HOXB2_S3_L001_R1_001	9604110	1188311
P7B-HOXB2_S3_L001_R2_001	10044613	747808
P7B-HOXB2_S3_L002_R1_001	9573291	1084352
P7B-HOXB2_S3_L002_R2_001	9927241	730402
P7B-HOXB2_S3_L003_R1_001	9623342	1178670
P7B-HOXB2_S3_L003_R2_001	10041762	760250
P7B-HOXB2_S3_L004_R1_001	9659605	1033911
P7B-HOXB2_S3_L004_R2_001	9981703	711813
P7B-HOXB3_S2_L001_R1_001	10206288	1464004
P7B-HOXB3_S2_L001_R2_001	10769630	900662
P7B-HOXB3_S2_L002_R1_001	10083138	1370828
P7B-HOXB3_S2_L002_R2_001	10570048	883918
P7B-HOXB3_S2_L003_R1_001	10230565	1454065
P7B-HOXB3_S2_L003_R2_001	10775136	909494
P7B-HOXB3_S2_L004_R1_001	10160226	1344538
P7B-HOXB3_S2_L004_R2_001	10637667	867097
P7B-Input_S1_L001_R1_001	16513501	2671847
P7B-Input_S1_L001_R2_001	17523269	1662079
P7B-Input_S1_L002_R1_001	16270544	2670711
P7B-Input_S1_L002_R2_001	17229529	1711726
P7B-Input_S1_L003_R1_001	16555863	2678708
P7B-Input_S1_L003_R2_001	17509408	1725163
P7B-Input_S1_L004_R1_001	16460831	2601429
P7B-Input_S1_L004_R2_001	17395916	1666344

---

## 9.4 Apêndice 4

Informações das *reads* após a filtragem por qualidade Q score. Porcentagem de *reads* duplicadas (dup%), porcentagens de bases guanina ou citosina (Conteúdo GC%) e número total de *reads* que passaram pela trimagem. Informação para cada uma das 4 *lanes* (L001 – L004), fita *forward* (R1) e *reverse* (R2) das 8 amostras sequenciadas (S1 – S8).

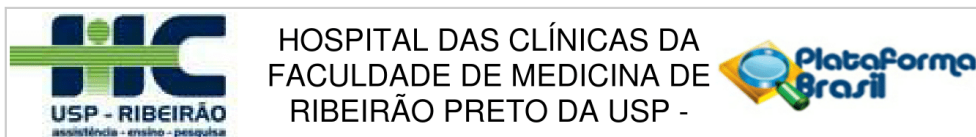
Amostra	Dup (%)	Conteúdo de GC (%)	Reads (milhões)
P14A-HOXA13_S8_L001_R1_001_val_1	9.5%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L001_R2_001_val_2	5.3%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L002_R1_001_val_1	10.8%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L002_R2_001_val_2	6.5%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L003_R1_001_val_1	10.4%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L003_R2_001_val_2	5.8%	45%	13.5
P14A-HOXA13_S8_L004_R1_001_val_1	9.9%	45%	13.4
P14A-HOXA13_S8_L004_R2_001_val_2	6.2%	45%	13.4
P14A-HOXB2_S7_L001_R1_001_val_1	9.8%	44%	8.9
P14A-HOXB2_S7_L001_R2_001_val_2	4.3%	43%	8.9
P14A-HOXB2_S7_L002_R1_001_val_1	10.7%	43%	9.3
P14A-HOXB2_S7_L002_R2_001_val_2	5.3%	43%	9.3
P14A-HOXB2_S7_L003_R1_001_val_1	10.4%	44%	9.0
P14A-HOXB2_S7_L003_R2_001_val_2	4.8%	43%	9.0
P14A-HOXB2_S7_L004_R1_001_val_1	10.0%	43%	9.2
P14A-HOXB2_S7_L004_R2_001_val_2	5.1%	43%	9.2
P14A-HOXB3_S6_L001_R1_001_val_1	10.5%	46%	12.7
P14A-HOXB3_S6_L001_R2_001_val_2	5.6%	45%	12.7
P14A-HOXB3_S6_L002_R1_001_val_1	11.9%	46%	12.3
P14A-HOXB3_S6_L002_R2_001_val_2	7.1%	45%	12.3
P14A-HOXB3_S6_L003_R1_001_val_1	11.5%	46%	12.7
P14A-HOXB3_S6_L003_R2_001_val_2	6.4%	45%	12.7
P14A-HOXB3_S6_L004_R1_001_val_1	11.3%	46%	12.3
P14A-HOXB3_S6_L004_R2_001_val_2	6.9%	45%	12.3
P14A-Input_S5_L001_R1_001_val_1	12.2%	44%	13.7
P14A-Input_S5_L001_R2_001_val_2	5.6%	43%	13.7
P14A-Input_S5_L002_R1_001_val_1	13.9%	44%	14.1
P14A-Input_S5_L002_R2_001_val_2	6.9%	43%	14.1
P14A-Input_S5_L003_R1_001_val_1	13.6%	44%	13.9
P14A-Input_S5_L003_R2_001_val_2	6.3%	43%	13.9
P14A-Input_S5_L004_R1_001_val_1	13.0%	44%	14.0
P14A-Input_S5_L004_R2_001_val_2	7.1%	43%	14.0

P7B-HOXA13_S4_L001_R1_001_val_1	11.9%	45%	14.8
P7B-HOXA13_S4_L001_R2_001_val_2	8.4%	45%	14.8
P7B-HOXA13_S4_L002_R1_001_val_1	13.4%	45%	14.7
P7B-HOXA13_S4_L002_R2_001_val_2	10.1%	45%	14.7
P7B-HOXA13_S4_L003_R1_001_val_1	13.2%	45%	14.7
P7B-HOXA13_S4_L003_R2_001_val_2	9.6%	45%	14.7
P7B-HOXA13_S4_L004_R1_001_val_1	12.9%	45%	14.7
P7B-HOXA13_S4_L004_R2_001_val_2	9.8%	45%	14.7
P7B-HOXB2_S3_L001_R1_001_val_1	6.5%	48%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L001_R2_001_val_2	3.5%	47%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L002_R1_001_val_1	6.9%	48%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L002_R2_001_val_2	4.1%	47%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L003_R1_001_val_1	6.8%	48%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L003_R2_001_val_2	3.9%	47%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L004_R1_001_val_1	6.3%	48%	9.3
P7B-HOXB2_S3_L004_R2_001_val_2	3.8%	47%	9.3
P7B-HOXB3_S2_L001_R1_001_val_1	8.0%	47%	9.9
P7B-HOXB3_S2_L001_R2_001_val_2	4.0%	46%	9.9
P7B-HOXB3_S2_L002_R1_001_val_1	8.6%	46%	9.9
P7B-HOXB3_S2_L002_R2_001_val_2	4.8%	46%	9.9
P7B-HOXB3_S2_L003_R1_001_val_1	8.5%	47%	9.8
P7B-HOXB3_S2_L003_R2_001_val_2	4.5%	46%	9.8
P7B-HOXB3_S2_L004_R1_001_val_1	8.1%	46%	9.8
P7B-HOXB3_S2_L004_R2_001_val_2	4.6%	46%	9.8
P7B-Input_S1_L001_R1_001_val_1	10.4%	44%	17.1
P7B-Input_S1_L001_R2_001_val_2	5.3%	43%	17.1
P7B-Input_S1_L002_R1_001_val_1	11.3%	44%	17.0
P7B-Input_S1_L002_R2_001_val_2	6.6%	43%	17.0
P7B-Input_S1_L003_R1_001_val_1	11.0%	44%	17.1
P7B-Input_S1_L003_R2_001_val_2	6.0%	43%	17.1
P7B-Input_S1_L004_R1_001_val_1	10.7%	44%	17.0
P7B-Input_S1_L004_R2_001_val_2	6.3%	43%	17.0

## 10 ANEXOS

### 10.1 Anexo 1.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise do papel dos genes HOX em tecido placentário e tumoral

**Pesquisador:** Danielle Barbosa Brotto

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 53443416.0.0000.5440

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.498.320

##### Apresentação do Projeto:

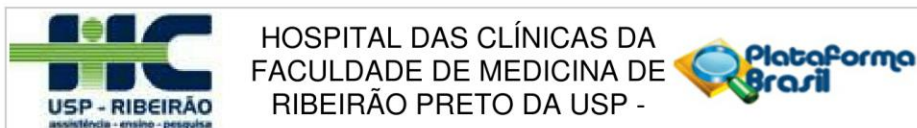
Os pesquisadores pretendem estudar a expressão de um conjunto de genes, denominados HOX, em tecido placentário, a fim de comparar os achados com o que ocorre em tecidos neoplásicos, pois a placenta compartilha com os tumores algumas características, como a invasividade local, que, entretanto, nos primeiros é controlado e incontrolado nos segundos.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Analisar o papel biológico dos genes HOX em amostras de tecido placentário e correlacionar à sua função na formação tumoral e nas etapas da carcinogênese.

**Objetivo Secundário:** Avaliar o perfil de expressão dos 39 genes HOX em amostras de placenta humana a termo. a. Identificar padrões de expressão característicos para cada HOX em amostras de placenta; b. Correlacionar inversamente o perfil de expressão gênica das amostras de placenta ao perfil encontrado em linhagens tumorais; II. Avaliar a função Biológica de genes HOX previamente selecionados. Selecionar genes HOX com base no nível de expressão; b. Avaliar a função biológica a partir da associação com o tipo celular placentário na qual a expressão ocorre; III. Investigar o papel do HOX na regulação de genes ou vias gênicas no tecido placentário e linhagem tumoral. Identificar regiões de ligação do fator de transcrição com seu sítio regulatório.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.498.320

- Analisar o efeito do HOX no perfil de expressão de genes alvos- Correlacionar o perfil de expressão gênica global em amostras de placenta e tumor com dados de interação do HOX com seus genes alvos;- Análise da diferença na expressão de alvos downstream, após silenciamento do HOX selecionado.- Análise funcional dos genes HOX.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: A pesquisa não apresenta riscos às gestantes, visto que será coletado o fragmento da placenta após o parto e nem a mãe ou seu bebê sofrerá qualquer tipo de picada ou qualquer desconforto físico. Além disso, Todos os dados coletados pelas pacientes serão mantidos em sigilo de forma que a identificação das amostras será feita por código de números e letras.

Benefícios: As gestantes que concordarem em participar do estudo não receberão nenhuma premiação em dinheiro ou outra vantagem adicional. Apenas estarão colaborando para o projeto de pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este projeto de pesquisa parece ter relevância, pois poderá fornecer informações úteis para melhor compreender o comportamento invasivo dos tumores neoplásicos por meio do estudo do gene HOX em tecido placentário.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados. As pendências foram devidamente tratadas, com a modificação referente à informação dos riscos e o esclarecimento quanto ao número de participantes.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 29/03/2016, Criação de Biorrepositório e Termo de Consentimento de Guarda de Material Biológico, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 29/03/2016 podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Página 02 de 04

Continuação do Parecer: 1.498.320

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_652213.pdf	29/03/2016 15:26:43		Aceito
Outros	Carta_Parecer.pdf	29/03/2016 15:24:29	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_Doutorado_DanielleBroto_CEPv2.pdf	29/03/2016 15:22:33	Danielle Barbosa Broto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_V2.pdf	29/03/2016 15:15:46	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Outros	TermoParaBiorrepositorio.pdf	22/02/2016 15:55:13	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Outros	Dispensa_TCLE.pdf	22/02/2016 15:53:32	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Outros	CriacaoDeBiorrepositorio_CEP.pdf	22/02/2016 15:44:43	Danielle Barbosa Broto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	22/02/2016 15:13:44	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_Doutorado_DanielleBroto_CEP.pdf	22/02/2016 15:13:06	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Cronograma	Cronograma_CEP.pdf	22/02/2016 15:12:11	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Orçamento	Orcamento_projetoPesquisa.pdf	22/02/2016 15:10:02	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Outros	AprocacaoOrcamento_CEP.pdf	22/02/2016 15:07:21	Danielle Barbosa Broto	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	22/02/2016 14:57:50	Danielle Barbosa Broto	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



## 10.2 Anexo 2.

Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelas gestantes que participaram do estudo

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada Análise do papel dos genes *HOX* em tecido placentário e tumoral, sob a responsabilidade dos pesquisadores Danielle Barbosa Brotto e Wilson Araújo da Silva Jr. Nesta pesquisa nós buscamos entender como a placenta humana pode ajudar a compreender melhor os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do câncer. Nós esperamos identificar genes na placenta e no câncer que sirvam como alvo para o diagnóstico ou tratamento da doença. Os resultados da pesquisa também servirão para nos orientar se haverá necessidade de outros estudos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Danielle Barbosa Brotto antes do parto no Centro de Referência de saúde da mulher de Ribeirão Preto – Mater. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Não terá nenhuma premiação ou qualquer outra vantagem adicional. A sua participação não envolve também nenhum risco. Na sua participação você não será submetida a nenhum procedimento invasivo. Após o parto, será cortado com bisturi um pedaço da placenta que será levado para o laboratório onde será extraído DNA e RNA, onde iremos trabalhar. O material ficará estocado em freezer dentro do nosso laboratório por tempo indeterminado para futuras pesquisas. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato através dos telefones indicados abaixo.

Ribeirão Preto, ..... de .....de 200.....

Nome da paciente:.....

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecida.

\_\_\_\_\_  
Participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**Para maiores informações e esclarecimentos, entre em contato com os pesquisadores responsáveis:**

Danielle Barbosa Brotto – (16) 2101-9368

Wilson Araújo da Silva Jr (16) 2101-9362

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática

Hemocentro de Ribeirão Preto

**Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade de São Paulo**

HC e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

(16) 3602-2228

Campus Universitário da USP

Bairro Monte Alegre

Ribeirão Preto – USP

14048-900

**INFORMAÇÕES**

Nome da

gestante: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ N° Registro: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Observações caso a gestante apresente alguma desordem não apontada nos critérios de exclusão:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Recém-nascido**

Sexo: \_\_\_\_\_ Semanas de gestação: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Comprimento: \_\_\_\_\_

Parto: \_\_\_\_\_

### 10.3 Anexo 3.

Manuscrito submetido à revista Tumor Biology.

Review Article

Contributions of Hox genes to cancer hallmarks

Brotto DB<sup>1,2</sup>; Araujo LF<sup>1,2</sup>, Siena ADD<sup>1,2</sup>; Barros II<sup>1,2</sup>; Carvalho SCS<sup>1,2</sup>; Muys BR<sup>1,2</sup>; Goedert L<sup>2,5</sup>; Cardoso C<sup>1,2</sup>; Praça JR<sup>2</sup>; Ramão, A<sup>1,2</sup>; Squire JA<sup>1,6</sup>; Silva WA Jr<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup>National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy (INCT/CNPq); Center for Cell-based Therapy-CEPID/FAPESP, Ribeirão Preto, Brazil.

<sup>3</sup>Center for Integrative System Biology - CISBi-NAP/USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Center for Medical Genomics at the Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Canada

\*Corresponding author

E-mail address: wilsonjr@usp.br

Abstract

Homeobox genes function as master regulatory transcription factors during development, and their expression is often altered in cancer. The HOX gene family was initially studied intensively to understand how expression of each gene was involved in forming axial patterns and shaping the body plan during embryogenesis. More recent investigations have discovered that HOX genes can also play an important role in cancer. The literature has shown that the expression of HOX genes may be increased or decreased in different tumors, and that these alterations may differ depending on the specific HOX gene involved, and the type of cancer being investigated. New studies are also emerging showing the critical role of some members of the HOX gene family in tumor progression and variation in clinical response. However, there has been limited systematic evaluation of the various contributions of each member of the HOX gene family in the pathways that drive the common phenotypic changes (or "hallmarks"), that underlie the transformation of normal cells to cancer cells. In this review, we investigate the context of the engagement of HOX gene targets and their downstream pathways in the acquisition of competence of tumor cells to undergo malignant transformation and tumor

progression. We also summarize published findings on the involvement of HOX genes in carcinogenesis and use bioinformatic methods to examine how their downstream targets and pathways are involved in each hallmark of the cancer phenotype.

**Keywords:** *HOX* genes; Transcription factors, Embryogenesis; Cancer; Hallmarks.

## 1. Background

HOX genes are members of the major Homeobox gene family of transcription factors that encode a highly conserved 61-amino acid helix-turn-helix DNA binding homeodomain (GEHRING; HIROMI, 1986; GEHRING; AFFOLTER; BURGLIN, 1994). In mammals, there are 39 HOX genes that highly conserved at the genomic level and are organized tandemly in four clusters; each one mapped on different chromosomes: HOXA on chromosome 7, HOXB on chromosome 17, HOXC on chromosome 12 and HOXD on chromosome 2 (HOLLAND; BOOTH; BRUFORD, 2007). Homeobox genes were first discovered after genetic characterization of *Drosophila melanogaster* mutants that led to distinct homeotic displacement of body parts to different locations (LEWIS, 1978).

The discovery of the homeobox genes was crucial for understanding the genetic control of early development. HOX proteins function as master regulators of embryonic development acting through a complex assembly with other transcription factors and with cofactor proteins (LADAM; SAGERSTRÖM, 2014). HOX genes define cellular territories during formation of the anteroposterior axis on the embryogenesis in many different organisms. This highly coordinated temporospatial control of several cellular processes including proliferation, differentiation, migration, and apoptosis led to the HOX family to be classed as selector genes (GARCIA-BELLIDO, 1975). The HOX regulatory mechanism has affinity for the cognate binding of the homeodomain to specific sequence elements of target genes. Also, it has a very versatile function due to its context-dependent activity since it can activate or repress downstream pathways in a tissue-specific manner (REZSOHAZY et al., 2015). The versatility of these transcription factors is a result of their unique regulation, which is determined by the linear order of each gene along the chromosome. HOX genes are arranged within clusters so that the position of a gene in the 3' to 5' direction corresponds to the temporal sequence and spatial order of gene expression in the anteroposterior axis of the organism. This form of developmental regulation is a standard feature in vertebrates, called temporal and spatial collinearity (DUBOULE; MORATA, 1994). Although there is a large amount of information about HOX genes in embryonic development, it is important to note that these transcription

factors have diverse functions since they regulate pathways in many different cellular processes. Evidence shows that HOX genes are also expressed in adulthood, suggesting that they continue to play a role in cellular identity for tissue maintenance and stem cell renewal (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2018; MORGAN, 2006; RUX et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2004) and can be expressed in cancer stem cells (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2018). As critical regulatory genes in mammalian development, the HOX family has pathophysiological functions, which have been intensely studied by the scientific community.

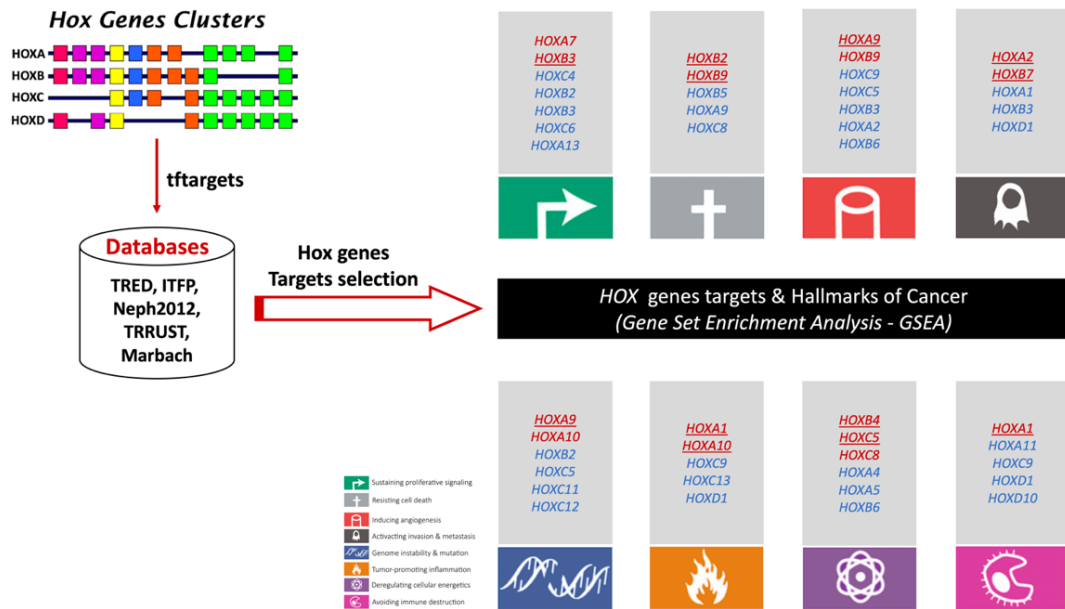
Mutations in HOX genes are associated with several human developmental disorders, including limb malformation as synpolydactyly (SPD) (GOODMAN et al., 1997), Hand-Foot-Genital Syndrome (HFGS) (MORTLOCK; INNIS, 1997) and Charcot-Marie-tooth disease (CMT) (SHRIMPSON et al., 2004). Deregulation of HOX genes has also been identified in cancer. Several studies reported differences between normal and tumor conditions as reviewed by Bathlekar and coworkers (2018); however, assigning a specific role for HOX genes as drivers of the malignant phenotype requires further investigation (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2018). Evidence is accumulating that HOX genes may be deregulated in different ways in different types of cancer. The mechanisms that cause deregulation of these genes in tumors appears to vary, sometimes HOX transcripts appear to be down-regulated and in other situations they are up-regulated. These findings imply that factors related to tissue-specificity may lead HOX genes to act as tumor suppressor genes in some cell types, while in others, they might be more involved in oncogenic effects (JUNG et al., 2004; WANG et al., 2007).

HOX genes seem to undergo deregulation by at least three different mechanisms. The first way, is through tumor-specific loss of control of the temporospatial patterns of expression in comparison to the expression that is usually seen in related normal tissues. The second mechanism is through gene dominance. This type of HOX gene deregulation occurs in a tumor but the corresponding normal tissue does not usually express the HOX gene. The third mechanism is due to epigenetic alterations that lead to loss of control due methylation changes at regulatory regions of HOX genes (ABATE-SHEN, 2002). Through these three mechanisms, HOX genes become disrupted and can influence a large number of pathways that are crucial for proliferation and maintenance during tumor growth. As proposed by Hanahan & Weinberg, cancer has a highly complex etiology that begins when a normal cell acquires some an essential new capability for tumorigenesis that will allow it to develop the cancer phenotype. These so-called capabilities or “hallmarks of cancer”, encompass sustained proliferative signaling, insensitivity to anti-growth signals, resistance to cell death, limitless reproductive potential, immune system evasion, sustained angiogenesis and invasion and metastasis potential. All these

steps are triggered by enabling characteristics such as genomic instability and tumor-promoting inflammation (HANAHAH; WEINBERG, 2000, 2011). This review highlights the role of the HOX genes in the regulation of the hallmarks of cancer by reviewing recent literature and by an enrichment pathway analysis based on their target genes and pathways.

## 2. Research strategy

We investigated the downstream HOX gene targets and pathways in which they are involved to determine how the deregulation of the HOX family can interfere with each of the hallmarks of cancer. Our overall strategy was to perform an in-silico analysis using transcription factor databases to search for targets of human HOX genes and then to perform a gene set enrichment analysis based on these targets (Figure 1). The enriched gene set was then used to identify biological processes associated with the cancer hallmarks that could be affected by HOX target pathways. We reasoned that by applying this strategy, we could assign each HOX gene to specific cancer hallmarks. We extract target data from tftargets package available in <https://github.com/slowkow/tftargets>. The database assembles data from five other databases, which are: TRED (JIANG et al., 2007), ITFP (ZHENG et al., 2008), Neph2012 (NEPH et al., 2012), TRRUST (HAN et al., 2015) and Marbach (MARBACH et al., 2016). After generating the targets list for each one of the 39 HOX genes, we used the GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) method to identify the biological processes pathways enriched by those targets (SUBRAMANIAN et al., 2005). Within GSEA we used the Molecular signature database, selecting specifically the hallmark gene set collection (H). For the biological pathway selection, we applied FDR  $q$ -value $<0.05$  and used the top 20 enriched pathways. After that, each pathway was assigned to a hallmark and, we finally selected the HOX genes that were highly associated with each of the hallmarks of cancer. Table 1 shows the top five HOX genes highly associated with each hallmark of cancer. The consensus of the target genes by hallmarks are listed in Table S1 (supplemental material). Interestingly, only two cancer hallmarks: Evasion of growth-suppressors and Replicative immortality did not have an association with HOX gene targets based on this enrichment approach.



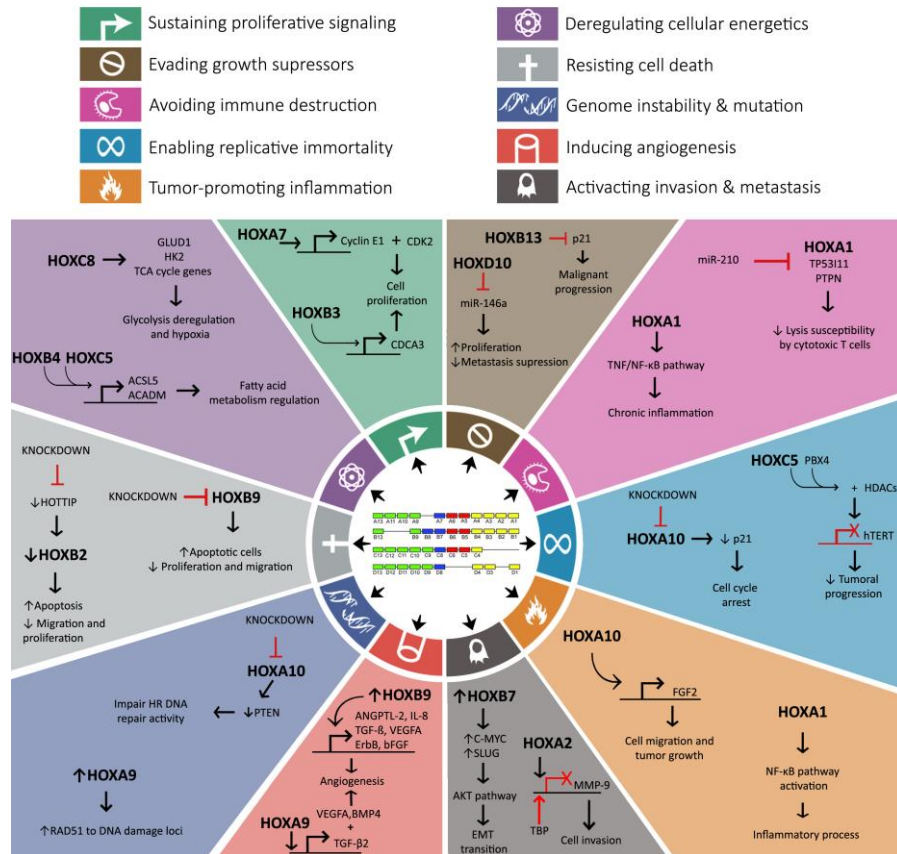
**Figure 1.** Workflow showing the step by step of the experimental design to select the top five HOX genes predicted to regulate eight hallmarks of cancer.

**Table 1.** Top five HOX genes associated with the hallmarks of cancer

Hallmarks	HOX members				
Sustaining proliferative signaling	HOXC4	HOXB2	HOXB3	HOXC6	<i>HOXA1</i> 3
Resisting cell death	HOXB9	HOXB2	HOXB5	HXA9	HOXC8
Inducing angiogenesis	HOXC9	HOXC5	HOXA9	HOXB3	HOXA2 HOXB6
Activating invasion and metastasis	HOXD1	HOXA1	HOXA2	HOXB3	HOXB7
Genome instability and mutation	HOXC1 2	HOXC1 1	HOXC5	HOXB2	HOXA9
Tumor-Promoting Inflammation	HOXA1	HOXD1	HOXC9	HOXA1 0	HOXC1 3
Deregulating cellular energetics	HOXA4	HOXA5	HOXB6	HOXB4	HOXC5
Avoiding immune destruction	HOXD1	HOXA1	HOXC9	HOXD1 0	HOXA1 1

\*Genes HOX in bold type contain targets with similar scores.

### 3. HOX genes contributing to cancer cells abilities



**Figure 2. HOX genes in the hallmarks of cancer.** HOX genes positively (black arrows) or negatively (red) regulates the expression of genes involved in cancer pathways. Modified from Hanahan and Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### 3.1. Sustaining proliferative signaling

Normal cells will usually proliferate when supplied with appropriate stimuli for cell growth, such as mitogenic factors, but tumor cells show a reduced dependence on exogenous proliferation signals (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Several HOX genes are deregulated in many cancer types and to play critical roles in tumor proliferation (BHATLEKAR et al., 2018; CARÉ et al., 1996; CHEN et al., 2013; CHEN; DUAN; ZHENG, 2017; CHEN et al., 2016c; GU et al., 2009; HAMID et al., 2015; HEINRICHS et al., 2005; LI et al., 2015; LU et al., 2016; XU et al., 2018a). Our enrichment analysis showed that *HOXC4*, *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXC6*, and *HOXA13* exhibited the highest number of enriched targets involving pathways related to sustained proliferative signaling (Table 1). The five HOX genes have either tumor-suppressive or tumor-promoting properties, depending on which tumor type they are expressed. We found that *HOXC4* had more targets enriched in proliferation pathways in keeping with studies that have shown its involvement in stem cell expansion (AUVRAY et al., 2012) and lymphocyte



proliferation (MEAZZA et al., 1995). However, there are presently no reports of a direct influence of *HOXC4* on tumor cell growth. Interestingly, Frasor et al. (2003) demonstrated that *HOXC4* is upregulated by estradiol stimulation of breast cancer cells (FRASOR et al., 2003). This hormone is associated with initiation and proliferation in breast cancer cells (RUSSO; RUSSO, 2006), indirectly suggesting a role for *HOXC4* in breast cancer growth. In a study of in acute myeloid leukemia, *HOXB2* was identified as one of the negative regulators of FLT3-ITD-dependent proliferation (LINDBLAD et al., 2015). Similarly, a functional screen for novel repressors of breast cancer tumorigenesis identified *HOXB2* as a growth inhibitor (BOIMEL; CRUZ; SEGALL, 2011). In prostate cancer, *HOXB3* was shown to bind to the cell division cycle associated 3 (*CDCA3*) promoter region, transactivating its expression and promoting proliferation (CHEN et al., 2013) (Figure 2). Transcriptional silencing of *HOXB3* expression has also been shown to promote proliferation and invasion in glioblastoma (XU et al., 2018a). It was demonstrated that *HOXC6* is capable of promoting cell proliferation and colony formation in gastric cancer cell lines, allowing tumor cells to grow in both an anchorage-dependent and independent way (CHEN et al., 2016c). In contrast, overexpression of *HOXC6* in prostate cancer cell lines strongly reduced tumor cell growth (HAMID et al., 2015). In esophageal squamous cell carcinoma, *HOXA13* enhanced tumor growth and was associated with reduced disease-free survival of patients (GU et al., 2009). Both *HOXA13* and *HOTTIP* promoted cell proliferation and growth and were associated with a higher grade in gliomas (CHEN; DUAN; ZHENG, 2017). In addition to these top five HOX genes, several other members of the gene family were shown to be involved in proliferation of different types of cancer. Li et al. (2015) demonstrated that *HOXA7* has an essential role in the regulation of cell cycle progression in hepatocellular carcinoma (LI et al., 2015) (Figure 2). It was also found that aberrant expression of *HOXB9* inhibited the differentiation of acute myeloid progenitor cells and maintained the undifferentiated and rapidly proliferative state of leukemic cells (HEINRICHS et al., 2005). Similarly, many other examples can be found, such as *HOXB7* in melanoma (CARÉ et al., 1996), *HOXA4* and *HOXA9* in colorectal cancer (BHATLEKAR et al., 2018) and *HOXC8* in epithelial ovarian cancer (LU et al., 2016).

### 3.2. Evading growth suppressors

A crucial growth control mechanisms disrupted by the loss of tumor suppression is limitless replication and evasion of growth arrest (AMIN et al., 2015). Curiously, in our analysis, no HOX genes had targets enriched for this particular hallmark. However, there are a few studies that have explored the role of individual HOX genes in the regulation of genetic pathways

related to cell growth control. For example, in prostate cancer *HOXB13*, can contribute to tumorigenesis by inhibiting p21, a cyclin kinase inhibitor involved in the control of cell proliferation and differentiation (Figure 2) (KIM et al., 2016). In ovarian cancer *HOXB13* was also shown to promote growth by interaction with the K-ras pathway, leading to resistance to tamoxifen-induced apoptosis (MIAO et al., 2007). Similarly, Carbone et al. (2017) showed that *HOXB9* mediates resistance to treatment with an vascular endothelial growth factor (*VEGF*) inhibitor in colorectal cancer (CARBONE et al., 2017). In another study, Hakami et al. (2014), demonstrated that *HOXD10* suppress miR-146a expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) (Figure 2). Loss of growth control occurred because miR-146a is a well-known inhibitor of cell proliferation and a metastasis suppressor (HAKAMI et al., 2014). The onset of ovarian cancer may be involved in pathways mediated by *HOXA10* expression. This HOX gene was shown to confer a growth advantage to ovarian surface epithelial cells, by enhancing cell adhesion, probably by overexpressing  $\alpha\beta3$  integrin and preventing anoikis in target cells for tumorigenesis (KO; LENGYEL; NAORA, 2010).

### 3.3. Resisting cell death

The response to physiological cell death may contribute either positively or negatively to tumor development. In cancer, both apoptosis and autophagy are mainly impaired by loss of function of tumor suppressor genes or by modulating expression of pro-apoptotic or anti-apoptotic factors, which may lead to immortalization of cancer cells (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Necrosis, on the other hand, will enhance the pro-tumoral activity by releasing bioactive regulatory factors which will stimulate neighboring cells to proliferate, contributing to tumor progression (HANAHAH; WEINBERG, 2000, 2011). According to our data, *HOXB9*, *HOXB2*, *HOXB5*, *HOXA9*, and *HOXC8* were the five HOX genes that targeted signaling pathways that were the most related to the hallmark of resisting cell death (Table 1). In addition to those genes, *HOXA13* and *HOXB13* are also known to be associated with evasion of apoptosis (CARDOSO et al., 2016; DONG et al., 2017; DUAN et al., 2015; ECONOMIDES; ZELTSER; CAPECCHI, 2003; QU et al., 2017). *HOXB9* expression has been reported as significantly increased in tumor tissues and to be associated with a poor prognosis, chemotherapy resistance, invasion, and metastasis (HUANG et al., 2014; KELLY et al., 2016; SHRESTHA et al., 2012). Vychytilova-Faltejskova et al. (2017) showed in their recent study that *HOXB9* downregulation in p53 proficient colorectal cell lines led to significant increases in the number of apoptotic cells and decreased proliferation and migration rates (Figure 2). However, depending on the type of the tumor, the anti-apoptotic activity of *HOXB9* could be associated either with oncogenic or tumor

suppressor activities (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2017). In acute myeloid leukemia loss of expression of *HOXB2* is associated with an enrichment of oncogenic pathways and its overexpression decreased cell proliferation and further increased apoptosis rates (LINDBLAD et al., 2015). In contrast, *HOXB2* overexpression in pancreatic cancer was associated with a poor prognosis (SEGARA et al., 2005). It has been also demonstrated that the knockdown of *HOTTIP*, another HOX-associated lncRNA that has pro-oncogenic functions similar to that reported for *HOTAIR*, promotes the downregulation of *HOXB2*, which induced apoptosis and decreased cell proliferation and migration (CHENG et al., 2015) (Figure 2). The *HOXB5* gene also has anti-apoptotic activity, which was first observed by Kam et al. (2014). Their study showed that *HOXB5* regulated neural crest development *in vivo*, by repressing apoptosis through directly inducing Foxd3 (KAM et al., 2014). Although *HOXB5* is well-known as an oncogene and is overexpressed in many cancer types (KORSHUNOV et al., 2003; LEE et al., 2015; LUO et al., 2012), it has been shown that *HOXB5* is repressed in the oral squamous cell (DESTRO et al., 2009), ovarian and papillary thyroid carcinomas. Its downregulation and repression were associated with methylation or miRNA regulation (KIM et al., 2008; WU et al., 2007). Both *HOXB5* and *HOXA9* have been reported to have anti-apoptotic activity in human astrocytes, glioblastoma and leukemia cells, and to be associated with increased proliferation (CHEN et al., 2017; COSTA et al., 2011). It has also been shown that *PI3K* may reduce *HOXA9* expression since a decrease in *PI3K* activity led to a reduction in *HOXA9* transcript levels (COSTA et al., 2011; GUERRIERO et al., 2017). *PI3K* is well-known as a regulator of cell growth, survival, and proliferation, and the *PI3K* downregulation is also associated with autophagy and/or apoptosis induction (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MARTINI et al., 2014). *HOXC8* has been reported as a potential oncogene, regulating many genes involved in tumor progression. Its expression is associated with cell proliferation, migration inhibition and induction of apoptosis in ovarian and in laryngeal squamous cancer cells. *HOXC8* serves as a cadherin-11 (*CDH11*)-specific transcription factor and as expected its expression is associated with increased *CDH1*-dependent metastatic potential (DE BARROS E LIMA BUENO et al., 2016; LEI et al., 2006; LI et al., 2014; LU et al., 2016; MUELLER; BOSSERHOFF, 2011). In chondrocytes, depletion of HOXc8 protein decreased proliferation rates (probably associated with increased cell death), and M-phase appeared to be prolonged with cell cycle arrest (KAMEL et al., 2009). In addition to the five HOX genes associated with the hallmark of cell death, the *HOXA13* and *HOXB13* have also been reported to be involved in apoptosis modulation. In prostate tumors, *HOXA13* overexpression promoted tumor cell proliferation, migration, and invasion, and inhibits tumor cell apoptosis, which was correlated

with an unfavorable survival (DONG et al., 2017). *HOXA13* is also upregulated in gastric cancer tissues, and its expression has been directly correlated with Wnt/ $\beta$ -catenin activation, which explains how its increased expression enhances cell proliferation and invasion rates and decreases rates of cell apoptosis in cancer cells (DUAN et al., 2015; QU et al., 2017). Conversely, *HOXB13* is a known activator of apoptotic pathways, and HOXB13 loss-of-function mutations are highly associated with an increased risk of prostate cancer related to increased levels of cell proliferation and decreased rates of apoptosis (CARDOSO et al., 2016; DESTRO et al., 2009; ECONOMIDES; ZELTSER; CAPECCHI, 2003; MIAO et al., 2007; OKUDA et al., 2006). Collectively, the HOX genes that are involved in cell death responses can act as oncogenes or as tumor suppressor genes. Their functional relationship to this cancer hallmark will depend on the specific role the HOX gene had in maintaining cellular homeostasis in normal tissues (MIAO et al., 2007).

#### **3.4. Enabling replicative immortality**

Cancer cells acquire immortality by escaping from the limitations on the total number of cell cycle divisions that can occur before senescence, non-proliferative state, crisis, and apoptosis take place. There are several mechanisms involved in cellular immortalization including telomere length stabilization, genomic instability, epigenetic gene silencing by selective promoter methylation, oxidative DNA damage, inactivation of cell cycle regulatory genes, or overexpression of a cellular oncogenic proteins (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Telomeres (chromosome ends) are essential for imposing a replication limit. Telomeres are composed of multiple repeats using the “TTAGGG” repeat that protect the tips of the chromosomes from end fusion. The loss of telomeres ends leads to crisis. Cancer cell lines express a specific enzyme called telomerase, which can add the “TTAGGG” repeats on the chromosome ends. This enzyme has two main components: Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) and Telomerase RNA (TR); while TERT is responsible for catalyzing the reverse transcriptional of a small template, TR accounts for the immortalization process (JAFRI et al., 2016). The role of the HOX genes on these mechanisms is unclear. In our analysis, we did not identify any enrichment of the HOX target genes in the replicative immortality hallmark. There is a report that knockdown of *HLX1* (H2.0-like homeobox 1) and *HOXA9* repressed INK4a expression by recruiting *HDAC1* and Polycomb repressive complex (*PCR2*), promoting cell cycle arrest and senescence in leukemia (MARTIN et al., 2013). Zhang et al. (2014) have also shown that *HOXA10* knockdown decreases p21 expression and promotes cell cycle arrest in endometrial cancer (Figure 2)(ZHANG et al., 2014). It is well-known that telomerase is

activated in cancer cells and hTERT inhibition suppress cell proliferation (JAFRI et al., 2016; LIU et al., 2013). Yan and co-workers demonstrated a strong negative correlation between *HOXC5* and *hTERT* expression in thymoma and testicular germ cell tumor (YAN et al., 2018). They identified that *HOXC5* overexpression decreased *hTERT* expression in cancer cells, and the *HOXC5* knockdown increased hTERT expression and telomerase elongation. hTERT regulation by *HOXC5* involved transcriptional regulation by promoting the *HOXC5: PBX4* complex formation by recruiting HDACs proteins to repress hTERT expression in cancer cell (YAN et al., 2018)(Figure 2). These findings were the first to suggest that HOX genes play a role in telomerase shortening and telomere dysfunction in cancer cells leading to inhibition of cell proliferation.

### 3.5. Inducing angiogenesis

Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed to provide nutrients and oxygen for adequate cell function and survival of normal and tumor tissues. Tumors acquired the ability of sustained angiogenesis by counterbalancing the positive and negative signals to activate or inhibit this process (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Several HOX genes have been shown to promote sustained angiogenesis by activating VEGF (vascular endothelial growth factor) signaling pathways or by inhibiting TSP-1 (thrombospondin-1), the main respective inducers and inhibitors of angiogenesis (GORSKI; WALSH, 2000). Among the HOX genes upregulated in tumors and associated with the activation of angiogenesis is *HOXB7*, which activates gene expression of fibroblast growth factor (bFGF) and many other proangiogenic factors such as VEGFA, interleukin-8 (IL-8) and angiopoietin-2 (ANGPT2) in breast cancer cell lines (CARÈ et al., 2001) and in multiple myeloma cells (STORTI et al., 2011). Activation of pro-angiogenic factors have also been associated with *HOXB9*, which is upregulated in breast carcinoma (HAYASHIDA et al., 2010). Similarly, *HOXB13* upregulates pro-angiogenic factors in pancreatic carcinoma (ZHAI et al., 2015). Integrin signaling and extracellular matrix proteases also contribute to the balance between pro and antiangiogenic factors (HANAHAH; WEINBERG, 2000). An important HOX gene that is associated with these pathways is *HOXD3*, which promotes tumor-specific angiogenesis through upregulating expression of  $\alpha\beta3$  integrin, urokinase plasminogen activator (uPA) and integrin  $\alpha5\beta1$ . Promotion of tumor blood vessels occurs in tumors but not in quiescent endothelial cells (BOUDREAU et al., 1997; BOUDREAU; VARNER, 2004). The result of our enrichment analysis with HOX target genes against the GSEA hallmarks shows that the HOX genes most

associated with angiogenesis were *HOXA2*, *HOXA9*, *HOXB3*, *HOXB6*, *HOXC5*, and *HOXC9* (Table 1). Some of these genes have been previously described in studies that have linked HOX involvement to an angiogenic phenotype. For instance, *HOXC9* was suggested to have a role in quiescence of endothelial cells and to negatively regulate tumor angiogenesis by inhibition of IL-8 (STOLL; KROLL, 2012). This growth factor is closely involved in angiogenesis since it has been demonstrated to contribute to enhanced blood vessel density in tumors (HUANG et al., 2010) and it acts as an autocrine growth factor produced by tumor cells (NING et al., 2011). *HOXA9* is also involved in multiple mechanisms of angiogenesis activation in ovarian cancer. It has been shown to upregulate transforming growth factor- $\beta$ 2 (*TGF- $\beta$ 2*), which together with *VEGFA* and *BMP4* has been suggested to influence RUNX1T1-regulated angiogenesis (KO; NAORA, 2014; LIAO et al., 2017). Furthermore, the expression of *HOXA9* by progenitor endothelial cells was demonstrated to influence gene regulation of essential endothelial genes as eNOs, *VEGFR2*, and VE-cadherin in the tumor microenvironment, which are essential for angiogenesis (RÖSSIG et al., 2005). For *HOXB3*, a unique association of angiogenesis with cancer was also verified in canine hemangiosarcoma samples (KODAMA et al., 2009).

### 3.6. Activating invasion and metastasis

Invasion and metastasis are the leading cause of mortality in patients with cancer. Recent studies have identified several gene targets and molecular pathways that underlie both these complex processes (HANAHAN; WEINBERG, 2011). We focused on the top five HOX genes that had targets enriched for invasion and metastatic pathways. Our data analyses ranked *HOXD1*, *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB3*, and *HOXB7* genes in decreasing order for target enrichment (Table 1). *HOXD1* has previously been shown to have increased expression in ovarian cancer in comparison to control ovarian tissue, suggesting that its activation may be associated with ovarian carcinoma development (GOODE et al., 2010). *HOXA1* is a known oncogene (ZHANG et al., 2003) that can be targeted and inhibited by miR-100, resulting in inhibition of downstream genes *MET*, *SMO* and *SEMA3C*, all of which have been implicated in lower rates of cell migration and invasion (CHEN et al., 2014). Other studies illustrate diverse regulation of *HOXA1* gene by miRNAs and also demonstrate an association with invasiveness and metastasis, which includes: miR-10 family members in pancreatic, gastric cancer and cervical cancer (JIA et al., 2014; OHUCHIDA et al., 2012; ZOU et al., 2016), miR-30 family members in esophageal cancer and giant cell tumor of bone (LI et al., 2017; NI et al., 2017), miR-99a in nasopharyngeal carcinoma and breast cancer (WANG et al., 2017a, 2015b) and miR-433 in colon cancer (LI et al., 2018). Similar regulation occurs for *HOXB3*, which is

targeted by multiple miRNAs, such as the miR-375 that inhibits cancer stem cell traits by degrading *HOXB3* mRNA in breast cancer (FU et al., 2017). *HOXB3* is also inhibited by specific targeting and degradation by the miR-10 family, leading to up regulation of metastasis in pancreatic cancer (WEISS et al., 2009) and increased invasion in endometrial cancer (CHEN et al., 2016a). Interestingly, Li *et al.* (2013) demonstrated that *HOXA2* promotes cell invasion by degradation of extracellular components in nasopharyngeal carcinoma (LI et al., 2013), competing with TATA-box binding protein (TBP) for TATA-box near metalloproteinase-9 (*MMP-9*) transcription start site and thus repressing *MMP-9* expression (Figure 2). Recent studies have shown that the *HOXB7* gene may contribute to malignant progression and metastasis by directly binding and activation of *TGFβ2* in breast cancer (LIU et al., 2015a) or through activation of the TGF-β/SMAD3 signaling in lung adenocarcinoma (ZHUANG et al., 2015). Overexpression of *HOXB7* has also linked to activation of the AKT pathway via upregulation of c-Myc and Slug, resulting in epithelial-to-mesenchymal transition and malignant progression of hepatocellular carcinoma (HUAN et al., 2017)( Figure 2). In another study, Wang et al. (2017) demonstrated that *HOXB7* may also have a critical role in cell invasion through the activation of the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma (WANG et al., 2017b).

### 3.7. Genome instability and mutation

Different types of cancer originate from distinct mechanisms, which may have varying exposure to hormonal and immune responses that can also contribute to tumor progression. Tumors have diverse progression and proliferation profiles as well as defects in genomic maintenance, cell cycle control, errors in DNA repair machinery, all of which favor carcinogenesis (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

The top five HOX genes most associated with genomic instability and DNA repair pathways after the enrichment analysis were *HOXC12*, *HOXC11*, *HOXC5*, *HOXB2*, and *HOXA9* (Table 1). Although there is good evidence that these HOX genes are involved in cancer development, their role in DNA repair and genomic instability is presently unknown. Some studies suggest that *HOXC12*, *HOXC11*, and *HOXC5* play a role in cellular proliferation and epigenetic modifications (GUERRERO-PRESTON et al., 2014; LI; CHEN, 2013; LU et al., 2012; YAN et al., 2018). The *HOXC12* gene has been assumed to be a tumor suppressor gene since it is inactivated in head and neck squamous cell carcinoma and lymphomas due to somatic mutations and alterations on DNA methylation (BENNETT et al., 2010; GUERRERO-PRESTON et al., 2014). The methylation of a CpG island located between *HOXC11* and

*HOXC12* is positively correlated with *HOTAIR* lncRNA expression, which is associated with increased proliferation and cancer progression and also with an unfavorable outcomes in breast cancer patients (LI; CHEN, 2013; LU et al., 2012). The *HOXC5* gene has been associated with both replicative immortality and cellular metabolic pathways, as discussed more extensively elsewhere in this review (IMANISHI et al., 2011; YAN et al., 2018). Cohesins comprise a crucial mitotic protein complex that regulates the separation and segregation of chromatids and safeguards genome stability during cell division. Manini et al. (2015) evaluated cohesins and found that among other genes, *HOXB2* was significantly downregulated when the cells were depleted for the SMC1B cohesin (MANNINI et al., 2015). Leunem et al. (2009) compared BRCA-related ovarian cancer to sporadic ovarian tumors. Both *BRCA1* and *BRCA2* play a crucial role in homologous repair (HR) of double-stranded breaks on DNA (DSBs). The *BRCA1* ovarian tumors were characterized by complex alterations affecting the HOX gene cluster, with some genes being upregulated others downregulated suggesting they had different contributions to the instability processes in ovarian cancer (LEUNEN et al., 2009). In another study, *HOXA9* expression correlated with HR gene expression and DNA repair, with overexpression being significantly increased when there was recruitment of RAD51 to DNA damage foci. These data suggest that *HOXA9* might act as an upstream regulator of *RAD51* in acute leukemia cell lines (ESPOSITO et al., 2015) (Table 1). Other studies showed that the loss of *HOXA9* resulted in an increased radiation-sensitivity in mice and that *HOXA9* gene was also found to be silenced by methylated in more than half cases of ovarian carcinomas (LAWRENCE et al., 2005; WU et al., 2007). As discussed above, *HOXA9* is also involved in other hallmarks of cancer such as sustained proliferative signaling and apoptosis/resistance to cell death pathways (POJO et al., 2015) (Table 1 and Supplementary Table 1).

In addition to the top five HOX genes found in our enrichment analysis, *HOXA10* and *HOXB7* have both been described as having a role in DNA repair and genomic stability maintenance. *HOXA10* has been reported as a regulator of the nuclear function of *PTEN*, a tumor suppressor gene that is known to be involved in aspects of DNA repair. Kim et al. (2014), demonstrated that after *HOXA10* knockdown, the expression of *PTEN* in the nucleus was significantly reduced and it was observed there was impaired HR DNA repair activity (KIM et al., 2014) (Figure 2). In agreement with these data, the high expression levels of *HOXA10* and *HOXA9* were associated with shorter survival times in pediatric high-grade glioma patient (GASPAR et al., 2010). Similarly, in breast cancer cell lines, *HOXB7*-expressing was related to better survival after irradiation exposure, probably due to interactions with proteins involved in DNA DSB repair that act as genomic caretakers (RUBIN et al., 2007). *HOXB7* promoted an enhanced



non-homologous end joining (NHEJ) activity, an error-prone DNA repair pathway. However, the increased NHEJ mutation rate may lead to decreased genomic stability, suggesting that *HOXB7* may also lead to oncogene activations during progression. Overexpression of *HOXB7* has also been associated with increased proliferation rates and invasive characteristics in ovarian cancer cells (KELLY et al., 2011). Some HOX gene clusters may contribute differently to the various pathways of genome stability and maintenance, and these functional characteristics may be useful as therapeutic targets.

### 3.8. Tumor-promoting inflammation

Chronic inflammation can cause DNA damage and lead to cancer development due to alterations in cellular and molecular events such as altered proliferative rates, resistance to apoptosis, neovascularization, epigenetic events and changes in gene expression (BONDAR; MEDZHITOV, 2013; CRUSZ; BALKWILL, 2015; KUNDU; SURH, 2008; ZHANG; ZHU; LI, 2017). The inflammatory process involves the activation of innate immunity in response to oxidative stress and/or the stimulation of the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway (KUNDU; SURH, 2008). In many types of cancer, NF- $\kappa$ B activation has been associated with an inflammatory response, and tumor initiation and progression (HOESEL; SCHMID, 2013). In our enrichment pathway analysis, we identify the *HOXA1*, *HOXD1*, *HOXC9*, *HOXA10* and *HOXC13* genes as the top five HOX highly associated with the inflammatory process in cancer (Table 1). Some HOX genes have previously been reported to be involved in tumor-promoting inflammation and other tumor enabling characteristics. For instance, *HOXA1* promotes the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in breast cancer cells. This transcription factor acts upstream of  $\kappa$ B and triggering *TAB2*, *I $\kappa$ B $\alpha$* , *IKK $\alpha$ / $\beta$* , and p65 phosphorylation. The collective regulation of these pathways suggests that activation of the NF- $\kappa$ B pathway by *HOXA1* overexpression can promote the inflammatory process in breast cancer cells (TAMINIAU et al., 2016) (Figure 2). We did not find any evidence that *HOXD1* participated in tumor inflammatory processes. However, Guo and coworkers (2011) have shown that *HOXD1* participates in the inflammatory process when activated by the NGF/TrKA pathway during development in the mouse (GUO et al., 2011). Interestingly, we found that 53 out of 1945 *HOXD1* targets are involved in the JAK/STAT pathway (Unpublished data). In addition, the long noncoding RNA *HOXD-AS1*, localized between *HOXD1* and *HOXD3*, regulates the expression of genes correlated with the inflammatory process by the JAK/STAT pathway in neuroblastoma cells (YARMISHYN et al., 2014). These data implicate the participation of *HOXD1* during tumor inflammation by

regulation of the JAK/STAT pathway. Wang and coworkers (2014) demonstrated that the expression levels of *HOXC8*, *HOXC9*, *FABP4*, and *HSL* were inversely correlated with *TNF $\alpha$*  and *MCP-1* levels in adipose tissue adjacent to malignant breast tumors. These findings suggest that low levels *HOXC9* increased the cytokine expression and led to the participation of this gene in the inflammatory process (WANG et al., 2014). *HOXA10* overexpression increases the *FGF2* levels in myeloid progenitor cells by Triad1-induced ubiquitination and degradation of Fgf-R1 (SHAH et al., 2012; WANG et al., 2015a). In *HOXA10* knockout mice, the opposite result was demonstrated, with decreased levels of Fgf2 in *HOXA10* deficient mice and an increase in granulocyte/monocyte cells that promoted an inflammatory response during leukemogenesis (SHAH et al., 2012; WANG et al., 2015a) (Figure 2). We were unable to find published evidence in current literature indicating that *HOXC13* participated directly in tumor-promoting inflammation. Its identification by our enrichment analysis as one of the top five genes in this hallmark may mean that other functions related to inflammation have yet to be elaborated.

### 3.9. Deregulating cellular energetics

Metabolic reprogramming of tumor cells has been indicated as a hallmark of cancer since Otto Warburg pointed out that even in the presence of oxygen, cancer cells reprogram their metabolism, relying more on glycolysis than oxidative phosphorylation (OXPHOS), (WARBURG, 1925). Although this metabolic switch does not seem efficient to ATP production, it supports the elevated biomass demands of the highly proliferative cells typical of cancer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). So far, only one study has associated a HOX gene with the metabolic reprogramming in cancer. Jiang *et al.*, (2015) showed that latent membrane protein 1 (LMP1), one of the oncoproteins of the Epstein-Barr virus (EBV), represses HOX to maintain tumor growth (JIANG et al., 2015). A direct role for the *HOXC8* gene in energy metabolism was shown by restoring *HOXC8* expression. Ectopic expression of *HOXC8* arrested tumor growth and downregulated glycolytic enzymes, such as *GLUD1* and *HK2*, and up-regulates tricarboxylic acid (TCA) cycle-related genes. Enrichment analysis using HOX target genes showed that, in addition to *HOXC8*, other HOX members are also involved in energetic metabolism. We showed that *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXB6*, *HOXB4*, and *HOXC5* could modulate different metabolic pathways such as oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism, adipogenesis, and glycolysis. In keeping with these findings it was shown that that *HOXA4* was involved in adipocytes differentiation by Cantile *et al.*, (2003). Additionally, both

*HOXB4* and *HOXC5* regulate the enzymes *ACSL5* and *ACADM*: the former is responsible for activating long-chain fatty acids for lipid synthesis and beta-oxidation degradation and, the latter is involved in the first step of peroxisomal beta-oxidation (CANTILE et al., 2003). Similarly, *HOXA5* is known to regulate *ACOX1*, which acts in the first step of the mitochondrial beta-oxidation. Fatty acid metabolism has been described as an alternative energy source for the cancer cells, and *HOX* genes might play an important role in regulating this pathway (CURRIE et al., 2013).

*HOX* genes also appear to regulate OXPHOS and glycolysis, two metabolic pathways commonly altered in cancer cells (WARD; THOMPSON, 2012). In normal cells under normoxia, glucose is converted to pyruvate and then to acetyl-CoA, which undergoes oxidation in the TCA cycle, generating the electron transporters: NADH and FADH<sub>2</sub>. These molecules feed the electron respiratory chain, formed by five mitochondrial complexes, which are held in the OXPHOS structures in the inner mitochondrial membrane (KREBS; JOHNSON, 1980; WARD; THOMPSON, 2012). Our in-silico analysis based on transcription factors databases showed that many genes coding for subunits of mitochondrial complexes are regulated by *HOXB4* and *HOXC5*, especially concerning the ATP synthase complex that is responsible for the ATP synthesis. Altered subunit expression can impact OXPHOS functioning and decrease ATP production (IMANISHI et al., 2011). Additionally, key glycolysis and hypoxia genes, such as *HK1*, *CDKN1A*, and *PPARGC1A* are regulated by *HOXA5*. In normal cells, hypoxia triggers metabolic rewiring using the hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1, which induces the expression of genes associated with metabolism and angiogenesis (POON; HARRIS; ASHCROFT, 2009). Many *HOX* targets are involved in this pathway, suggesting an association of *HOX* and hypoxia response, which could have both metabolic and pro-tumorigenic consequences. Although *HOX* genes have been commonly deregulated in different cancer types, not much is known regarding the role of the *HOX* family in energy metabolism. Our findings show that *HOX* could modulate different metabolic pathways and support the metabolic rewiring inherent to cancer cells. However, more studies employing both genomic and metabolic tools are necessary to unravel details of the role of *HOX* genes in tumor metabolism.

### **3.10. Avoiding immune destruction**

Despite protecting the host from tumor cells, the loss of the immune system can also contribute to the development of a tumor (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013). Tumor cells can evade immune cells surveillance by downregulating the antigen processing machinery, producing immunosuppressive cytokines (by tumor cells or from surrounding cells in the tumor

microenvironment), which in turn activate immunosuppressive cells like Tregs, and by promoting tolerance or apoptosis in T cells. (VINAY et al., 2015). These processes support immunoediting - the selection of tumor cells resistant to immune system components, which contributes to tumor development (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013; VINAY et al., 2015). Nevertheless, not much is known about the role of HOX genes in facilitating tumor cells evasion of immune destruction. Noman et al. (2012) reported that miR-210, which is induced in hypoxic conditions in lung cancer and melanoma, targets *PTPN1*, *HOXA1*, and *TP53III1* genes, which, in turn, decreased tumor cell susceptibility to Cytotoxic T lymphocytes mediated lysis (NOMAN et al., 2012). Sio et al. (2013) demonstrated that mammary tumor cells produce granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), which acts together with hematopoietic regulatory cytokines FLT3L and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to enhance HSPC production (SIO et al., 2013). This treatment caused global and gene-specific changes in histone methylation patterns associated with enhanced *HOXA9* gene expression in bone marrow cultures. As a result, activated bone marrow cells and progenitors of hematopoietic origin could instigate the growth of indolent tumors and metastases (MCALLISTER et al., 2014; SIO et al., 2013). Taminiau et al. (2016) showed that there is a highly significant positive correlation between expression of *HOXA1* and of members of the TNF/NF- $\kappa$ B signaling pathway in breast tumors and that *HOXA1* can activate NF- $\kappa$ B in a transcription-independent manner (TAMINIAU et al., 2016). NF- $\kappa$ B is a nuclear factor that promotes inflammation by activation of proinflammatory cytokines and also has a role in cancer initiation, development, metastasis, and resistance to treatment (LAWRENCE, 2009). As chronic inflammation can lead to the promotion of tumor cell growth and angiogenesis (VINAY et al., 2015), *HOXA1* has a potential role in evasion of the immune system in breast cancer. Most of the targets from *HOXA1*, which was found to be one of the most enriched HOX gene associated with immune evasion in this work, are enriched to the TNFA signaling via the NF- $\kappa$ B pathway. Among those targets are genes that are subunits from NF- $\kappa$ B complex, such as *NFKB1* and *REL* (BARKETT; GILMORE, 1999), or genes that are also activated by this complex, including *CCL2*, *CCL20* and *PTGS2* (GEISMANN et al., 2017; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; SURH et al., 2001). These findings corroborate the critical role of *HOXA1* in this pathway. In summary, as specific HOX genes can be deregulated in different ways depending on tumor type or site (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2014), their role in tumor destruction evasion seems to be similarly dependent both on the type of tumor and the genes that are being regulated.

#### 4. Clinical implications and future perspectives

Even though there is considerable knowledge about the role of HOX genes during embryonic development (LEWIS, 1978), there are still many aspects to be explored regarding their functions in the context of tumor progression. Although the involvement of HOX genes in tumorigenesis is well-known, there has been no study systematically evaluating their various roles in cancer progression in the context of the global functions of their target genes. As previously mentioned, the HOX genes act in different biological processes, which include proliferation, differentiation, migration, and apoptosis (GARCIA-BELLIDO, 1975). Their role in regulating these processes may continue during carcinogenesis by modulation of the cancer hallmarks (SÁNCHEZ-HERRERO, 2013). In this review, we employed a strategy analyzing the collective functions of each HOX gene's regulatory pathways to investigate the direct link between their potential roles in the various cancer hallmark phenotypes. Thus, we can infer in which genetic mechanisms the HOX genes would be most likely to act. Further studies are necessary to address whether the dysregulation of HOX genes is the cause or a consequence of carcinogenesis. Indeed, a better understanding of how HOX genes and their downstream pathways are involved in each cancer is likely to bring new insights for the development of specific tumor biomarkers, and new therapeutic approaches that target the most clinically important hallmarks.

#### Financial support

This work was jointly supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant #465539/2014-9; São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants #2009/53853-5, #2013/08135-2, and by Research Support of the University Sao Paulo, CISBi-NAP/USP grant #12.1.25441.01.2.

#### Author contributions

Brotto DB, Siena ADD, Barros II, Carvalho SCS, Muys BR, Cardoso C, Squire JA and Araujo LF wrote the manuscript. Praça JR conducted in-silico analysis for HOX genes targets. Brotto DB, Siena ADD, Barros II, Carvalho SCS, Muys BR, Cardoso C, Araujo LF conducted gene set enrichment analysis. Goedert L set up the supplementary table 1. Ramão A, and Silva WA Jr contribute to the writing structure of the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

## References

- ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 777–785, 1 out. 2002.
- ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human reproduction update**, v. 12, n. 6, p. 731–46, jan. 2006.
- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1438–49, jun. 2009.
- ADWAN, H. et al. Expression of HOXC8 is inversely related to the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 2, p. 288–295, 12 jul. 2011.
- AMESSE, L. S. et al. Expression of HOX gene products in normal and abnormal trophoblastic tissue. **Gynecologic oncology**, v. 90, n. 3, p. 512–8, 2003.
- AMIN, A. R. M. R. et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S55–S77, 2015.
- APLIN, J. D.; RUANE, P. T. Embryo – epithelium interactions during implantation at a glance. n. 3, p. 15–22, 2017.
- ARGIROPOULOS, B.; HUMPHRIES, R. K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 47, p. 6766–6776, 2007.
- AUVRAY, C. et al. HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 168–178, 2012.
- AXLUND, S. D.; LAMBERT, J. R.; NORDEEN, S. K. HOXC8 inhibits androgen receptor signaling in human prostate cancer cells by inhibiting SRC-3 recruitment to direct androgen target genes. **Molecular cancer research : MCR**, v. 8, n. 12, p. 1643–55, dez. 2010.
- BARKETT, M.; GILMORE, T. D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6842–4, 1999.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the Human Placenta**. 6. ed. Berlin: Springer, 2012.
- BENNETT, L. B. et al. DNA Hypermethylation Accompanied by Transcriptional Repression in Follicular Lymphoma. v. 48, n. 9, p. 828–841, 2010.
- BHATLEKAR, S. et al. Overexpression of HOXA4 and HOXA9 genes promotes self-renewal and contributes to colon cancer stem cell overpopulation. **Journal of Cellular Physiology**, 2018.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 8, p. 811–823, 2014.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer. **Stem Cells International**, 2018.
- BOIMEL, P. J.; CRUZ, C.; SEGALL, J. E. A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies HOXB2 as a regulator of tumor growth in breast cancer. **Genomics**, v. 98, n. 3, p. 164–72, set. 2011.
- BONDAR, T.; MEDZHITOV, R. The origins of tumor-promoting inflammation. **Cancer cell**, v. 24, n. 2, p. 143–4, 2013.
- BORDONARO, M.; LAZAROVA, D. L. Determination of the Role of CBP- and p300-Mediated Wnt Signaling on Colonic Cells. **JMIR Research Protocols**, v. 5, n. 2, p. e66, 13 maio 2016.
- BOUDREAU, N. et al. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. **The Journal of cell biology**, v. 139, n. 1, p. 257–64, 6 out. 1997.
- BOUDREAU, N. J.; VARNER, J. A. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4862–8, 6 fev. 2004.
- BUTLER, A. et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 411–420, 1 jun. 2018.
- CAI, J. et al. Upregulation of HOXB7 promotes the tumorigenesis and progression of gastric cancer and correlates with clinical characteristics. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1641–1650, 26 fev. 2016.
- CANTILE, M. et al. HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 194, n. 2, p. 225–236, 1 fev. 2003.
- CANTILE, M. et al. Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression. **Journal of**

**translational medicine**, v. 10, p. 91, 14 maio 2012.

CARBONE, C. et al. Homeobox B9 mediates resistance to anti-VEGF therapy in colorectal cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 15, p. 4312–4322, 2017.

CARDOSO, M. et al. Oncogenic mechanisms of HOXB13 missense mutations in prostate carcinogenesis. **Oncoscience**, v. 3, n. September, p. 288, 2016.

CARÉ, A. et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 9, p. 4842–51, 1 set. 1996.

CARÈ, A. et al. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. **Cancer research**, v. 61, n. 17, p. 6532–9, 1 set. 2001.

CARROLL, T. S. et al. Impact of artifact removal on ChIP quality metrics in ChIP-seq and ChIP-exo data. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 10 abr. 2014.

CHEN, D. et al. miR-100 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition but Suppresses Tumorigenesis, Migration and Invasion. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004177, 27 fev. 2014.

CHEN, H. et al. miR-10b Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation and Invasion of Endometrial Cancer Cells via Targeting HOXB3. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 31, n. 6, p. 225–231, 22 ago. 2016a.

CHEN, J. et al. HoxB3 promotes prostate cancer cell progression by transactivating CDCA3. **Cancer Letters**, v. 330, n. 2, p. 217–224, 28 abr. 2013.

CHEN, J. Y. et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 223–227, 2016b.

CHEN, P.; DUAN, S.; ZHENG, X. HOTTIP / HOXA13 axis is positively associated with cell proliferation in glioma. **Int J Clin Exp Med**, v. 10, n. 12, p. 16388–16394, 2017.

CHEN, S. et al. HOXA9 is critical in the proliferation, differentiation, and malignancy of leukaemia cells both in vitro and in vivo. **Cell Biochemistry and Function**, v. 35, n. 7, p. 433–440, 2017.

CHEN, S. W. et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 3261–3268, 2016c.

CHEN, X. et al. Long non-coding RNA HOXB-AS1 promotes proliferation, migration and invasion of glioblastoma cells via HOXB-AS1/miR-885-3p/HOXB2 axis. **Neoplasma**, v. 66, n. 03, p. 386–396, 2019.

CHENG, L. et al. The predictive potential and oncogenic effects of HOXC8 expression on osteosarcoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14961–14967, 20 nov. 2016.

CHENG, Y. et al. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10840–10852, 10 maio 2015.

CHU, M. C.; SELAM, F. B.; TAYLOR, H. S. HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. **Cancer biology & therapy**, v. 3, n. 6, p. 568–72, jun. 2004.

CLEMENCEAU, A. et al. Lung cancer susceptibility genetic variants modulate HOXB2 expression in the lung. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 11–12, p. 857–864, 2018.

COSTA, B. M. et al. Reversing HOXA9 Oncogene Activation by PI3K Inhibition: Epigenetic Mechanism and Prognostic Significance in Human Glioblastoma. v. 70, n. 2, p. 453–462, 2011.

CROSS, J. C. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 857, p. 23–32, 1998.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: Advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584–596, 2015.

CURRIE, E. et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153–161, 6 ago. 2013.

DAS, S. K. Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 5, p. 387–96, maio 2010.

DE BARROS E LIMA BUENO, R. et al. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, 2016.

DEKKER, J.; MISTELI, T. Long-range chromatin interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 10, 1 out. 2015.

DESTRO, M. F. D. S. S. D. et al. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 01, p. 141–149, 19 nov. 2009.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1

jan. 2013.

- DONG, X. Y. et al. PLAC1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spontaneous antibody responses in human cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2038–2043, 2008.
- DONG, Y. et al. *HOXA13* is associated with unfavorable survival and acts as a novel oncogene in prostate carcinoma. **Future Oncology**, v. 13, n. 17, p. 1505–1516, 2017.
- DU, H.; TAYLOR, H. S. The role of hox genes in female reproductive tract development, adult function, and fertility. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, 2016.
- DUAN, R. et al. *HOXA13* is a potential GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF- $\beta$  pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27778–93, 29 set. 2015.
- DUBOULE, D.; DOLLÉ, P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. **The EMBO journal**, v. 8, n. 5, p. 1497–505, 1989.
- DUBOULE, D.; MORATA, G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. **Trends in genetics : TIG**, v. 10, n. 10, p. 358–64, 1994.
- ECONOMIDES, K. D.; ZELTSER, L.; CAPECCHI, M. R. Hoxb13 mutations cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae. **Developmental Biology**, v. 256, n. 2, p. 317–330, 2003.
- ESCUADERO-ESPARZA, A. et al. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2 and the PGF receptor, neuropilin, in human breast cancer: prognostic significance. **Oncology reports**, v. 23, n. 2, p. 537–44, fev. 2010.
- ESPOSITO, M. T. et al. Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1481–1490, 2015.
- F. GARY CUNNINGHAM et al. Williams obstetrics. In: **Williams Obstetrics**. 23. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. p. 1239–1326.
- FISHER, S. J. et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. **The Journal of cell biology**, v. 109, n. 2, p. 891–902, ago. 1989.
- FLORIDON, C. et al. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 10, p. 943–50, 2000.
- FRASOR, J. et al. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4562–4574, 2003.
- FU, H. et al. miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 1093–1099, jan. 2017.
- GAO, F. et al. Control of regional decidualization in implantation: Role of FoxM1 downstream of Hoxa10 and cyclin D3. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13863, 2015.
- GAO, K. et al. Induced apoptosis investigation in wild-type and FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells by nanochannel electroporation and single-cell qRT-PCR. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 5, p. 956–964, 1 maio 2016.
- GARCIA-BELLIDO, A. Genetic control of wing disc development in Drosophila. **Ciba Foundation symposium**, v. 0, n. 29, p. 161–182, 1975.
- GARCÍA-BELLIDO, A. . Homeotic and Atavic Mutations in Insects. **American Zoologist**, v. 17, n. 3, p. 613–629, 1977.
- GASPAR, N. et al. MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9243–9252, 2010.
- GEHRING, W.; HIROMI, Y. Homeotic genes and the homobox. **Annual review of genetics**, v. 20, p. 147–73, 1986.
- GEHRING, W. J.; AFFOLTER, M.; BURGLIN, T. Homeodomain proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 487–526, 1994.
- GEISMANN, C. et al. Role of CCL20 mediated immune cell recruitment in NF- $\kappa$ B mediated TRAIL resistance of pancreatic cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 5, p. 782–796, 2017.
- GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 445–453, 2007.
- GODBOLE, G. et al. Decrease in Expression of HOXA10 in the Decidua after Embryo Implantation Promotes Trophoblast Invasion. **Endocrinology**, 17 maio 2017.



GOEL, H. L.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871–82, dez. 2013.

GOLPON, H. A. et al. HOX Genes in Human Lung Altered Expression in Primary Pulmonary Hypertension and Emphysema. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 955–966, 2001.

GOODE, E. L. et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. **Nature genetics**, v. 42, n. 10, p. 874–9, out. 2010.

GOODMAN, F. R. et al. Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7458–63, 8 jul. 1997.

GORSKI, D. H.; WALSH, K. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. **Circulation Research**, 2000.

GRIER, D. et al. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 154–171, 2005.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine**, v. 21, n. 1, p. 11–19, 2011.

GU, Z.-D. et al. *HOXA13* Promotes Cancer Cell Growth and Predicts Poor Survival of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 69, n. 12, p. 4969–4973, 15 jun. 2009.

GUDE, N. M. et al. **Growth and function of the normal human placenta** **Thrombosis Research**, 2004.

GUERRERO-PRESTON, R. et al. Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. **Epigenetics**, v. 9, n. 7, p. 1031–1046, 2014.

GUERRIERO, I. et al. Analysis of miRNA profiles identified miR-196a as a crucial mediator of aberrant PI3K/AKT signaling in lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19172–19191, 2017.

GUO, T. et al. An evolving NGF-Hoxd1 signaling pathway mediates development of divergent neural circuits in vertebrates. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 31–36, 12 jan. 2011.

GURCHOT, C. The trophoblast theory of cancer (John Beard, 1857-1924) revisited. **Oncology**, v. 31, n. 5–6, p. 310–33, 1975.

HAKAMI, F. et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 807–816, 2014.

HAMID, A. R. A. H. et al. The role of HOXC6 in prostate cancer development. **The Prostate**, v. 75, n. 16, p. 1868–1876, dez. 2015.

HAN, H. et al. TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11432, 12 set. 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HARIA, D.; NAORA, H. Homeobox Gene Deregulation: Impact on the Hallmarks of Cancer. **Cancer Hallmarks**, v. 1, n. 2, p. 67–76, 1 ago. 2013.

HAYASHIDA, T. et al. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1100–5, 19 jan. 2010.

HE, Y.-X. et al. *HOXA13* upregulation in gastric cancer is associated with enhanced cancer cell invasion and epithelial-to-mesenchymal transition. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 2, p. 258–265, jan. 2017.

HEINRICHS, S. et al. HOXB9 Is Aberrantly Expressed in Blast Cells in a Subset of Acute Myeloid Leukemia Patients and Supports Proliferation of AML Cell Lines. **Blood**, v. 106, n. 11, 2005.

HEMBERGER, M.; CROSS, J. C. Genes governing placental development. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 12, n. 4, p. 162–8, 2001.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12:86, p. 1–15, 2013.

HOLLAND, P. W. H.; BOOTH, H. A. F.; BRUFORD, E. A. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC biology**, v. 5, p. 47, 2007.

HOLTAN, S. G. et al. Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 84, n. 11, p. 985–1000, 2009.

HUAN, H. et al. HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 86, 24 dez. 2017.

HUANG, D. et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. **Cancer research**, v. 70, n. 3, p. 1063–71, 1 fev. 2010.

HUANG, K. et al. Overexpression of HOXB9 promotes metastasis and indicates poor prognosis in colon cancer. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 26, n. 1, p. 72–80, 2014.

HUGHES, D. A. et al. Evaluating intra- and inter-individual variation in the human placental transcriptome. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 54, 2015.

HUR, H. et al. Analysis of HOX Gene Expression Patterns in Human Breast Cancer. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 64–71, 2014.

IMANISHI, H. et al. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. **PLoS ONE**, 2011.

INAMURA, K. et al. HOXB2, an adverse prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas, promotes invasion by transcriptional regulation of metastasis-related genes in HOP-62 non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Research**, v. 28, n. 4 B, p. 2121–2127, jul. 2008.

JAFRI, M. A. et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, 2016.

JEYARAJAH, M. J. et al. Syndecan-4 regulates extravillous trophoblast migration by coordinating protein kinase C activation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

JIA, H. et al. MicroRNA-10a Is Down-Regulated by DNA Methylation and Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e88057, 31 jan. 2014.

JIANG, C. et al. TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D137–40, jan. 2007.

JIANG, Y. et al. Repression of Hox genes by LMP1 in nasopharyngeal carcinoma and modulation of glycolytic pathway genes by HoxC8. **Oncogene**, v. 34, n. 50, p. 6079–6091, 9 dez. 2015.

JUNG, C. et al. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. **Cancer research**, v. 64, n. 9, p. 3046–51, 2004.

JURISICOVA, A.; DETMAR, J.; CANIGGIA, I. **Molecular mechanisms of trophoblast survival: From implantation to birth** *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 2005.

KAISTHA, B. P. et al. PLAC8 Localizes to the Inner Plasma Membrane of Pancreatic Cancer Cells and Regulates Cell Growth and Disease Progression through Critical Cell-Cycle Regulatory Pathways. **Cancer research**, v. 76, n. 1, p. 96–107, 1 jan. 2016.

KAM, M. K. M. et al. Homeobox b5 (Hoxb5) regulates the expression of Forkhead box D3 gene (Foxd3) in neural crest. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 55, p. 144–152, 1 out. 2014.

KAMEL, S. et al. Morpholino-mediated knockdown in primary chondrocytes implicates Hoxc8 in regulation of cell cycle progression. **Bone**, v. 44, n. 4, p. 708–716, 2009.

KANAI, M. et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncology reports**, v. 23, n. 3, p. 843–51, mar. 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes - Release 72.1, December 1, 2014. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KELLY, Z. et al. HOX genes in ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 4, n. 1, p. 16, 2011.

KELLY, Z. et al. The prognostic significance of specific HOX gene expression patterns in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 7, p. 1608–1617, 2016.

KIM, H. J. et al. In Vivo Imaging of Functional Targeting of miR-221 in Papillary Thyroid Carcinoma. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 10, p. 1686–1693, 2008.

KIM, J. W. et al. HOXA10 is associated with temozolomide resistance through regulation of the homologous recombinant DNA repair pathway in glioblastoma cell lines. **Genes & cancer**, v. 5, n. 5–6, p. 165–174, maio 2014.

KIM, Y. R. et al. HOXB13-mediated suppression of p21WAF1/CIP1 regulates JNK/c-Jun signaling in prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v. 35, n. 4, p. 2011–2016, 2016.

KLAUSEN, C.; LEUNG, P. C. K.; AUERSPERG, N. Cell motility and spreading are suppressed by HOXA4 in ovarian cancer cells: possible involvement of beta1 integrin. **Molecular cancer research** :

**MCR**, v. 7, n. 9, p. 1425–37, set. 2009.

KO, S. Y.; LENGYEL, E.; NAORA, H. The Müllerian HOXA10 gene promotes growth of ovarian surface epithelial cells by stimulating epithelial-stromal interactions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 317, n. 1–2, p. 112–119, 2010.

KO, S. Y.; NAORA, H. Adaptation of ovarian cancer cells to the peritoneal environment: Multiple mechanisms of the developmental patterning gene HOXA9. **Cancer cell & microenvironment**, v. 1, n. 6, p. e379, 13 nov. 2014.

KODAMA, A. et al. Immunohistochemical Demonstration of Angiogenesis-Associated Homeobox Proteins in Canine Vascular Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, n. 2–3, p. 199–203, ago. 2009.

KOLLMANN, K. et al. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 24, n. 2, p. 167–181, 12 ago. 2013.

KORSHUNOV, A. et al. Gene Expression Patterns in Ependymomas Correlate with Tumor Location, Grade, and Patient Age. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 5, p. 1721–1727, 2003.

KREBS, H. A.; JOHNSON, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. **FEBS Letters**, v. 117, p. K2–K10, 25 ago. 1980.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1–2, p. 15–30, 2008.

KYO, S. et al. Expression of Telomerase Activity in Human Chorion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 2, p. 498–503, dez. 1997.

LADAM, F.; SAGERSTRÖM, C. G. Hox regulation of transcription: More complex(es). **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 1, p. 4–15, jan. 2014.

LAKSHMI NARENDRA, B. et al. Immune system: A double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, n. 9, p. 823–834, 2013.

LALA, P. K. et al. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 142–149, 2002.

LANDIS, M. W. et al. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 13–22, jan. 2006.

LANDT, S. G. et al. **ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia** *Genome Research*, 2012.

LAWRENCE, H. J. et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3988–3994, 2005.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, J.-Y. et al. HOXB5 Promotes the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 6, p. 701–711, 2015.

LEI, H. et al. Identification of a Hoxc8-regulated transcriptional network in mouse embryo fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10305–9, 2006.

LEUNEN, K. et al. Recurrent copy number alterations in BRCA1-mutated ovarian tumors alter biological pathways. **Human Mutation**, v. 30, n. 12, p. 1693–1702, 2009.

LEVINE, M.; HOEY, T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. **Cell**, v. 55, n. 4, p. 537–540, 1988.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565–70, 1978.

LI, C. H.; CHEN, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: Progress and prospects. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 8, p. 1895–1910, 2013.

LI, H.-P. et al. Aberrantly hypermethylated Homeobox A2 derepresses metalloproteinase-9 through TBP and promotes invasion in Nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 2154–2165, 19 nov. 2013.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.

LI, H. et al. MicroRNA-433 Represses Proliferation and Invasion of Colon Cancer Cells by Targeting Homeobox A1. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 315–322, 5 mar. 2018.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

LI, Q. et al. miR-30b inhibits cancer cell growth, migration, and invasion by targeting homeobox A1 in esophageal cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 485, n. 2, p. 506–512, 1 abr. 2017.

LI, Y. et al. HOXC8 promotes breast tumorigenesis by transcriptionally facilitating cadherin-11 expression. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2596–2607, 6 maio 2014.

LI, Y. et al. HOXA7 stimulates human hepatocellular carcinoma proliferation through cyclin E1/CDK2. **Oncology Reports**, v. 33, n. 2, p. 990–996, 1 fev. 2015.

LIAO, K.-H. et al. Endothelial angiogenesis is directed by RUNX1T1-regulated VEGFA, BMP4 and TGF- $\beta$ 2 expression. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179758, 22 jun. 2017.

LINDBLAD, O. et al. The role of HOXB2 and HOXB3 in acute myeloid leukemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 742–747, 2015.

LIU, S. et al. HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGF $\beta$  signaling pathway. **Cancer Research**, v. 75, n. 4, p. 709–719, 2015a.

LIU, S. J. et al. Single-cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 14 abr. 2016.

LIU, T. et al. Telomerase reverse transcriptase inhibition stimulates cyclooxygenase 2 expression in cancer cells and synergizes with celecoxib to exert anti-cancer effects. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2272–2280, 16 jun. 2013.

LIU, Y.-J. et al. Overexpression of HOXC11 homeobox gene in clear cell renal cell carcinoma induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2821–2829, 2015b.

LIU, Y. et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. **Cell Research**, v. 28, n. 8, p. 819–832, 24 ago. 2018.

LOUWEN, F. et al. A lesson for cancer research : placental microarray gene analysis in preeclampsia ABSTRACT : v. 3, n. 8, p. 759–773, 2012.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LU, L. et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 3, p. 875–883, 2012.

LU, S. et al. Overexpression of HOXC8 is Associated With Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. **Reproductive Sciences**, v. 23, n. 7, p. 944–954, jul. 2016.

LU, Z.; HARDT, J.; KIM, J. J. Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation. **Molecular human reproduction**, v. 14, n. 6, p. 357–66, 2008.

LUNGHI, L. et al. Control of human trophoblast function. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 5, p. 6, 8 fev. 2007.

LUO, J. et al. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–10, 2012.

MANNINI, L. et al. SMC1B is present in mammalian somatic cells and interacts with mitotic cohesin proteins. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

MARBACH, D. et al. Tissue-specific regulatory circuits reveal variable modular perturbations across complex diseases. **Nature Methods**, v. 13, n. 4, p. 366–370, 7 abr. 2016.

MARTIN, N. et al. Co-regulation of senescence-associated genes by oncogenic homeobox proteins and polycomb repressive complexes. **Cell Cycle**, v. 12, n. 14, p. 2194–2199, 2013.

MARTINI, M. et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. **Annals of Medicine**, v. 46, n. 6, p. 372–383, 2014.

MCALLISTER, S. S. et al. Systemic Endocrine Instigation of Indolent Tumor Growth Requires Osteopontin. v. 133, n. 6, p. 994–1005, 2014.

MCGINNIS, W.; KRUMLAUF, R. Homeobox genes and axial patterning. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 283–302, 24 jan. 1992.

MCINTYRE, D. C. et al. Hox patterning of the vertebrate rib cage. **Development**, v. 134, n. 16, p. 2981–2989, 2007.

MEAZZA, R. et al. Expression of HOXC4 homeoprotein in the nucleus of activated human

lymphocytes. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2084–90, 1995.

MIAO, J. et al. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 43, p. 17093–17098, 2007.

MILLER, G. J. et al. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5879–5888, 2003.

MOORE, K. **Embriologia clínica**. 8ª ed. Amsterdã: Elsevier, 2008.

MORGAN, R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 2, p. 67–69, 2006.

MORGAN, R. et al. Targeting HOX transcription factors in prostate cancer. **BMC Urology**, v. 14, n. 17, p. 1–9, 2014.

MORTLOCK, D. P.; INNIS, J. W. Mutation of *HOXA13* in hand-foot-genital syndrome. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 179–180, 1 fev. 1997.

MUCENSKI, M. L. et al. Single cell RNA-seq study of wild type and Hox9,10,11 mutant developing uterus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

MUELLER, D. W.; BOSSERHOFF, A. K. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 5, p. 1064–1074, 2011.

MURTHI, P. et al. Novel Homeobox Genes are Differentially Expressed in Placental Microvascular Endothelial Cells Compared with Macrovascular Cells. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 624–630, 2008.

MURTHI, P. et al. The role of homeobox genes in the development of placental insufficiency. **Fetal diagnosis and therapy**, v. 32, n. 4, p. 225–30, 2012.

MYERS, C.; CHARBONEAU, A.; BOUDREAU, N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. **Journal of Cell Biology**, 2000.

NASSIRPOUR, R. et al. Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 485, 2014.

NEPH, S. et al. Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1274–86, 14 set. 2012.

NEUFELD, G. et al. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors** **FASEB Journal**, 1999.

NI, L.-Y. et al. MicroRNA-30c suppressed giant-cell tumor of bone cell metastasis and growth via targeting HOXA1. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 21, p. 4819–4827, nov. 2017.

NING, Y. et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 9, p. 2038–2049, 1 maio 2011.

NOMAN, M. Z. et al. Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 18, p. 4629–4641, 2012.

NOVAKOVIC, B.; SAFFERY, R. Placental pseudo-malignancy from a DNA methylation perspective: unanswered questions and future directions. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. December, p. 1–7, 2013.

OHUCHIDA, K. et al. MicroRNA-10a is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer and Involved in Its Invasiveness Partially via Suppression of the HOXA1 Gene. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 7, p. 2394–2402, 10 jul. 2012.

OKUDA, H. et al. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 12, p. 1733–1742, 2006.

PAN, T.-T. et al. Overexpression of *HOXA13* as a Potential Marker for Diagnosis and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. **Tohoku J. Exp. Med. Tohoku J. Exp. Med**, v. 234, n. 2343, p. 209–219, 2014.

PAPAGEORGIOU, S. **Hox Gene Expression**. 1ª ed. New York: [s.n.].

POJO, M. et al. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 7657–7674, 2015.

POLLHEIMER, J. et al. **Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment** **Frontiers in Immunology** **Frontiers Media S.A.**, , 13 nov. 2018.

POON, E.; HARRIS, A. L.; ASHCROFT, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e26, 27 ago. 2009.

QIN, Z. et al. Elevated *HOXA13* expression promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer

partly via activating Erk1/2. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 1803–1813, 2019.

QU, L.-P. et al. CDH17 is a downstream effector of *HOXA13* in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 1234–1241, 2017.

REZSOHAZY, R. et al. Cellular and molecular insights into Hox protein action. **Development**, v. 142, n. 7, p. 1212–1227, 2015.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C.; LUNENFELD, S. PLACENTAL DEVELOPMENT : LESSONS FROM MOUSE MUTANTS. v. 2, n. July, p. 538–548, 2001.

RÖSSIG, L. et al. Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 11, p. 1825–35, 6 jun. 2005.

RUBIN, E. et al. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. **Cancer Research**, v. 67, n. 4, p. 1527–1535, 2007.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, n. 1- 5 SPEC. ISS., p. 89–96, 2006.

RUX, D. R. et al. Regionally Restricted Hox Function in Adult Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Developmental Cell**, v. 39, n. 6, p. 653–666, 19 dez. 2016.

SÁNCHEZ-HERRERO, E. Hox Targets and Cellular Functions. **Scientifica**, v. 2013, p. 738257, 2013.

SANDOVAL, J.; ESTELLER, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. **Current opinion in genetics & development**, v. 22, n. 1, p. 50–5, 2012.

SARNO, J. et al. Thrombin and interleukin-1beta decrease HOX gene expression in human first trimester decidual cells: implications for pregnancy loss. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 7, p. 451–7, 2009.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 15 mar. 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–8, 2008.

SEGARA, D. et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3587–96, 1 maio 2005.

SEIFERT, A. Role of *Hox* genes in stem cell differentiation. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 583, 2015.

SHAH, C. A. et al. HoxA10 Protein Regulates Transcription of Gene Encoding Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) in Myeloid Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18230–18248, 25 maio 2012.

SHAH, M. et al. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 38, 16 fev. 2017.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 5, p. 361–371, 2010.

SHAUT, C. A. E. et al. *HOXA13* is essential for placental vascular patterning and labyrinth endothelial specification. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 5, p. 11–15, 2008.

SHRESTHA, B. et al. Homeodomain-containing protein HOXB9 regulates expression of growth and angiogenic factors, facilitates tumor growth *in vitro* and is overexpressed in breast cancer tissue. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 19, p. 3715–3726, out. 2012.

SHRIMPTON, A. E. et al. A HOX gene mutation in a family with isolated congenital vertical talus and Charcot-Marie-Tooth disease. **American journal of human genetics**, v. 75, n. 1, p. 92–96, 2004.

SILVA, W. A. et al. PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses. **Cancer immunity**, v. 7, p. 18, jan. 2007.

SIMPSON, A. J. G. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 615–25, ago. 2005.

SIO, A. et al. Dysregulated hematopoiesis caused by mammary Cancer is associated with epigenetic changes and Hox gene expression in hematopoietic cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 19, p. 5892–5904, 2013.

SONDEREGGER, S.; POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation-Review. 2010.

SOUNDARARAJAN, R.; RAO, A. J. Trophoblast “pseudo-tumorigenesis”: significance and contributory factors. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, p. 15, 2004.

STANLEY J. ULJASZEK, FRANCIS E. JOHNSTON, MICHAEL A. PREECE. **The Cambridge Encyclopedia of Human Growth and Development**. London: Cambridge University Press, 1998.

STOLL, S. J.; KROLL, J. HOXC9: A Key Regulator of Endothelial Cell Quiescence and Vascular Morphogenesis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 7–11, jan. 2012.

STORTI, P. et al. HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. **Leukemia**, v. 25, n. 3, p. 527–537, 23 mar. 2011.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005.

SURH, Y. J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480–481, p. 243–268, 2001.

SVINGEN, T.; TONISSEN, K. F. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. **Heredity**, v. 97, n. 2, p. 88–96, 2006.

TAIT, D. L. et al. Downregulation of HOXC6 in Serous Ovarian Cancer. **Cancer investigation**, v. 33, n. 7, p. 303–11, jan. 2015.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. **Experimental cell research**, v. 293, p. 144–153, 2004.

TAMINIAU, A. et al. HOXA1 binds RBCK1/HOIL-1 and TRAF2 and modulates the TNF/NF-κB pathway in a transcription-independent manner. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 15, p. 7331–7349, 2016.

TAYLOR, H. S. et al. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 7, p. 1379–84, 1998.

TAYLOR, H. S. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. **Semin Reprod Med**, v. 18, n. 1, p. 81–89, 2000.

TAYLOR, H. S.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI, P. A Conserved Hox Axis in the Mouse and Human Female Reproductive System: Late Establishment and Persistent Adult Expression of the Hoxa Cluster Genes. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 57, p. 1338–1345, 1997.

THOMAS W. SADLER. **Medical Embriology**. 10. ed. Baltimore: [s.n.].

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 185–198, 2015.

VINNITSKY, V. B. Oncogerminative Hypothesis of Tumor Formation. p. 19–27, 1993.

VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA, P. et al. MiR-215-5p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epi-regulin and its transcriptional inducer HOXB9. **Oncogenesis**, v. 6, n. 11, 2017.

WALTREGNY, D. et al. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. **Prostate**, v. 50, n. 3, p. 162–169, 2002.

WANG, F. et al. Mammary Fat of Breast Cancer: Gene Expression Profiling and Functional Characterization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109742, 7 out. 2014.

WANG, H. et al. HoxA10 Terminates Emergency Granulopoiesis by Increasing Expression of Triad1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 11, p. 5375–87, 1 jun. 2015a.

WANG, J.-G. et al. MiR-99a suppresses cell invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma through targeting HOXA1. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 753–761, 10 fev. 2017a.

WANG, W.-M. et al. HOXB7 promotes tumor progression via bFGF-induced activation of MAPK/ERK pathway and indicated poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 47121–47135, 18 jul. 2017b.

WANG, X. et al. MicroRNA-99a inhibits tumor aggressive phenotypes through regulating HOXA1 in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32737–32747, 20 out. 2015b.

WANG, Z. et al. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for**

**Cancer Research**, v. 13, n. 21, p. 6327–34, 1 nov. 2007.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WEISS, F. U. et al. Retinoic Acid Receptor Antagonists Inhibit miR-10a Expression and Block Metastatic Behavior of Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 2136–2145.e7, dez. 2009.

WU, Q. et al. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. **Molecular Cancer**, v. 6, p. 1–11, 2007.

XU, K. et al. Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 3712–3718, 8 jan. 2018a.

XU, K. et al. Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. **Oncology letters**, v. 15, n. 3, p. 3712–3718, mar. 2018b.

YABE, S. et al. Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 19, p. E2598–E2607, 2016.

YAN, T. et al. HoxC5 and miR-615-3p target newly evolved genomic regions to repress hTERT and inhibit tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 100, 8 dez. 2018.

YARMISHYN, A. A. et al. HOXD-AS1 is a novel lncRNA encoded in HOXD cluster and a marker of neuroblastoma progression revealed via integrative analysis of noncoding transcriptome. **BMC Genomics**, v. 15, n. Suppl 9, p. S7, 8 dez. 2014.

YOSHIDA, H. et al. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: Role in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 889–897, 2006.

YU, G.; WANG, L.-G.; HE, Q.-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. **Bioinformatics**, v. 31, n. 14, p. 2382–2383, 15 jul. 2015.

ZAGOZEWSKI, J. L. et al. The role of homeobox genes in retinal development and disease. **Developmental Biology**, v. 393, n. 2, p. 195–208, 2014.

ZHAI, L.-L. et al. Overexpression of homeobox B-13 correlates with angiogenesis, aberrant expression of EMT markers, aggressive characteristics and poor prognosis in pancreatic carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 6919–27, 2015.

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. **Wnt signaling in cancer** Oncogene Nature Publishing Group, , 1 mar. 2017.

ZHANG, L. et al. Upregulation HOXA10 homeobox gene in endometrial cancer: role in cell cycle regulation. **Medical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 52, 19 jul. 2014.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of cancer-promoting inflammation: A new approach for anticancer therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. February, p. 1–11, 2017.

ZHANG, X. et al. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7580–90, 28 fev. 2003.

ZHANG, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome biology**, v. 9, n. 9, p. R137, 2008.

ZHANG, Y. M. et al. Expression of homeobox gene transcripts in trophoblastic cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, n. 1, p. 24–32, 2002.

ZHENG, G. et al. ITFP: an integrated platform of mammalian transcription factors. **Bioinformatics**, v. 24, n. 20, p. 2416–2417, 15 out. 2008.

ZHOU, G. et al. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W234–W241, 2 jul. 2019.

ZHU, L. J. et al. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 237, 11 dez. 2010.

ZHUANG, L. et al. HoxB7 promotes growth and metastasis of lung adenocarcinoma cells through regulation of the  $\text{tgf-}\beta\text{/smad3}$  signaling. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 29, n. 3, p. 601–8, 2015.

ZOU, D. et al. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 99–108, 7 jun. 2016.