



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO CÂNCER ORAL

CAMILE DE BARROS LOPES

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
UFPA como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Genética e Biologia
Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ândrea
K.C Ribeiro dos Santos.

Belém

Março /2016

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

1. Universidade Federal do Pará (UFPA).
2. Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)/ Instituto de Ciências Biológicas (ICB).
3. Universidade Federal do Ceará (UFCE).
4. Dipartimento di Medicina Sperimentale e diagnostica, Università di Ferrara, Ferrara, Itália.

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS:

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq).
– Bolsa de doutorado.
2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
– Bolsa doutorado Sanduíche.
3. Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana/ RPGPH (Bio Comp/CAPES)

Dedico este trabalho aos meus pais.
Meus grandes mestres que se dedicaram e
depositaram todas as suas energias para me
proporcionar os melhores estudos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar meu caminho, permitindo que eu faça as escolhas certas e por ter conservado minha fé a cada momento durante a execução deste trabalho.

Agradeço à minha mãe Maria de Jesus, por todo o apoio, amor, dedicação, confiança, investimentos e compreensão. Aos meus irmãos Cássia e Miguel Crasso pela paciência e compreensão da minha ausência em alguns momentos importantes. À minha sobrinha Taís pela sua doçura, admiração por mim e pelo meu trabalho e à minha querida Luna.

À minha orientadora Ândrea Ribeiro dos Santos pela dedicação, investimento e confiança ao longo desses 10 anos de pesquisa (TCC, mestrado e doutorado).

Ao Prof. Dr. Massimo Negrini por ter aceito e apoiado meu projeto de pesquisa realizado em Ferrara/ITA.

À Profa. Dra. Raquel Montenegro por ter cedido todo o apoio para a obtenção das amostras para realização desta tese.

À clínica de estomatologia da Universidade Federal do Ceará, em especial à Carolina Teófilo e Dra. Ana Paula Alves por terem cedido as amostras deste estudo.

Aos meus amigos Glória Tatiana por todo o suporte na finalização desta tese, Leandro Magalhães que disponibilizou tempo para me ajudar nas análises estatísticas e Rebecca Cruz pela ajuda diária nas atividades do laboratório.

À minhas amigas Gabriela Esteves, Débora Fernandes, Giovanna Cavalcante, Greice Cardoso, Aline Cruz e Isabela Guerreiro pelos momentos de muitas risadas, tornando a rotina do laboratório muito mais prazerosa.

Agradeço todos os meus amigos que me acompanharam e incentivaram a sempre prosseguir neste caminho – Tirza Leal, Cynthia Oliveira, Michele Sousa, Luciane Araújo e muitos outros.

Às agências financiadoras CNPq e CAPES pelo suporte financeiro para execução deste estudo.

SUMARIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1. O Câncer.....	Erro! Indicador não definido.
2. O Câncer da Cavidade Oral.....	15
3. RNAs não codificantes (MicroRNAs)	18
II. OBJETIVO	28
1. Objetivo Geral	28
2. Objetivos Específicos	28
III. CAPÍTULOS	29
1. Capítulo I.....	30
2. Capítulo II	50
IV. DISCUSSÃO	79
V. REFERÊNCIAS	88
VI. APÊNDICE	112
1. Ficha de dados clínicos	113
2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	115
3. Produção no periodo do Doutorados.....	116

FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese.	11
Figura 2: Sequência de microRNAs com destaque em <i>Seed</i>	19
Figura 3. Resumo esquemático da biogênese do miRNA	21
Figura 4: Ação dos miRNAs oncogênicos (onco-miRs) e supressores de tumor (TS-miRs).	23
Figura 5. miRNAs desregulados em cada etapa do processo de desenvolvimento ao CCEO.	25

CAPITULO I

Tabela 1. Dados de comparação da expressão e valores de significância do <i>hsa-miR-21</i> , <i>hsa-miR-221</i> , <i>hsa-miR-135b</i> e <i>hsa-miR-29c</i> , entre os diferentes tipos de tecidos (CCEO, adjacente ao câncer e sem câncer).	37
Figura 1. Valores de expressão normalizada (ΔCt) em amostras de tecido sem câncer, adjacente ao câncer e câncer para <i>hsa-miR-221</i> , <i>hsa-miR-21</i> , <i>hsa-miR-135b</i> e <i>hsa-miR-29c</i> (A-D).	38
Figura 2. Receiver operating characteristic curves (ROC) de <i>hsa-miR-21</i> (a), <i>hsa-miR-221</i> (c), <i>hsa-miR-135b</i> (e) para diferenciação de tecidos CCEO dos sem cancer e entre tecidos adjacentes e sem câncer para <i>hsa-miR-21</i> (b), <i>hsa-miR-221</i> (d) and <i>hsa-miR-135b</i> (f).	40

CAPITULO II

Figura 1. Heatmap em log10 da expressão normalizada (RPKM) de miRNAs diferenciados em tecido CCEO em comparação com o tecido sem câncer.	58
Figura 2. Perfil de expressão relativa de miRNAs em tecidos CCEO comparado com o sem câncer (os valores de log2FoldChange negativos representam os miRNAs hipoexpressos, o cor vermelha indica um <i>padj</i> < 0,05 e FoldChange > 2).	58
Tabela 1. miRNAs diferencialmente expressos pelo sequenciamento e validados pela literatura para o CCEO.	59

Figura 3. Boxplots dos miRNAs não correlatados na literatura, diferencialmente expressos entre entre CCEO tecido sem cancer.	60
Tabela 2. Genes alvos em comum dos miRNAs diferencialmente expressos em CCEO e validados pelo miR Tabase.....	61
Figura 4. Interação gênica dos genes alvos que compartilharam mais de um miRNA como alvo e que participam da carcinogênese oral.....	62
Tabela 3. Lista dos genes alvos envolvidos na carcinogênese oral.	63

RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é uma doença multifatorial que envolve fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Caracteriza-se por um padrão de crescimento agressivo, altamente metastático e elevadas taxas de mortalidade. Apesar dos avanços da tecnologia nos tratamentos cirúrgicos, radio e quimioterápicos, a taxa de sobrevivência de cinco anos não houve melhora significativa nos últimos anos. Através da regulação da expressão de genes alvos, os microRNAs desempenham papel importante na iniciação e progressão em cânceres humano, conseqüentemente, são uma ferramenta promissora para investigação de biomarcadores de identificação de risco, prognóstico e alvos terapêuticos. Com objetivo de investigar o perfil de expressão dos miRNAs no câncer gástrico, dez tecidos de CCEO foram caracterizados a partir de dados gerados de sequenciamento de alto desempenho. Além disso, por qRT-PCR avaliamos o tecido adjacente ao CCEO para quatro miRNAs. Os resultados mostraram 17 miRNAs diferencialmente expressos, os quais foram capazes de discriminar o tecido CCEO do sem câncer. Dentre esses, encontramos sete novos miRNAs (*hsa-let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* e *hsa-miR-941*), os quais ainda não estão descritos na literatura suas participações no CCEO. Adicionalmente, verificamos que os quatro miRNAs *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* foram hiperexpressos no tecido adjacente, confirmando o efeito de campo de cancerização. Os resultados revelaram que esses miRNAs são potenciais biomarcadores de ocorrência no CCEO com a capacidade de identificar indivíduos com maior risco de desenvolver este câncer, e indicam sua utilidade como possíveis alvos terapêuticos.

Palavras chaves: CCEO, miRNAs, sequenciamento de alto desempenho, biomarcadores.

ABSTRACT

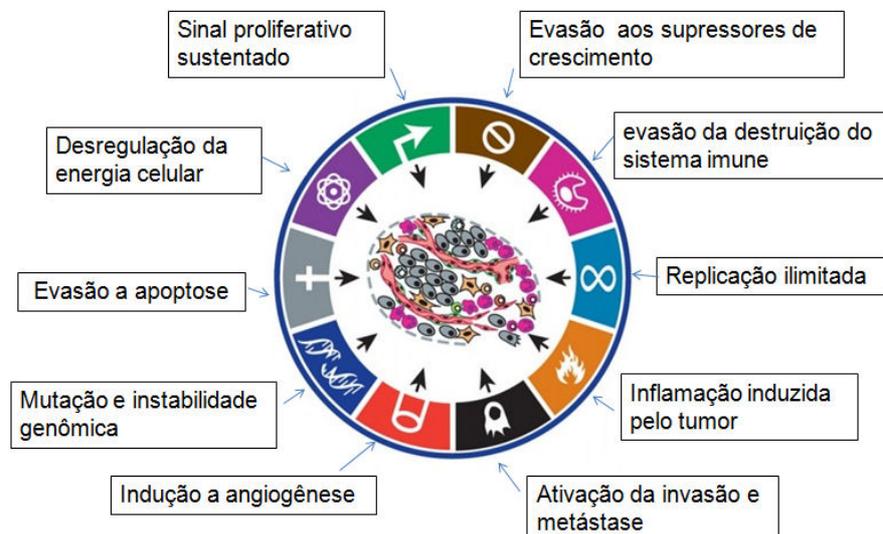
Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a multifactorial disease involving genetic, epigenetic and environmental factors. It is characterized by a pattern of aggressive growth, high metastatic potential and high mortality rates. Despite advances in technology in the surgical treatment, radiotherapy and chemotherapy, the five-year survival rate has no significant improvement in recent years. By regulating the expression of target genes, microRNAs play an important role in the initiation and progression of human cancers. Therefore, they are a promising tool for the identification of biomarkers of risk, as well as prognostic and therapeutic targets. In order to investigate the miRNAs expression profile in ten tissues of OSCC were characterized based on data generated from high-performance sequencing. Furthermore, by qPCR we assessed the adjacent tissue to the OSCC for four miRNAs. The results showed 17 differentially expressed miRNAs were able to discriminate the tissue without cancer. Among these, we found seven new miRNAs (*hsa-let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* and *hsa-miR-941*) which are not described in the literature their participation in OSCC. Additionally, we found that the four miRNAs *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* and *hsa-miR-29c* presented overexpression in the adjacent tissue, confirming the field cancerization effect. The results revealed that these miRNAs are potential biomarkers occurring in OSCC with the ability to identify individuals at high risk of developing this type of cancer, and indicate their utility as potential therapeutic targets.

Keywords: OSCC, miRNAs, biomarkers, high-throughput sequencing

1. O Câncer

O câncer é uma doença multifatorial que envolve fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Caracteriza-se por alterações em genes específicos do controle celular conferindo um fenótipo proliferativo e em um emaranhado de células heterogêneas (Yasui *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007). As alterações moleculares, bioquímicas e celulares desregulam o ciclo celular gerando eventos mutacionais acumulativos que adquirem capacidade e vantagem proliferativa (Croce, 2009).

As células cancerosas caracterizaram-se por apresentarem uma autossuficiência quanto ao sinal de crescimento, insensibilidade aos fatores inibitórios, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune, invasão celular e metástase (Hanahan and Weinberg, 2011 (Figura 1).



Fonte: Hanahan and Weinberg, 2011

FIGURA 1: Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese.

A massa tumoral é constituída por i) células cancerosas; ii) células aparentemente normais que são recrutadas para formar o estroma tumoral, e se comportam como participantes ativos na tumorigênese; iii) células tronco tumoral, as quais participam tanto das alterações nas células-tronco quanto na renovação de células-tronco cancerosas (Bhowmick *et al.*, 2004; Serakinci *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

As células estromais promovem distintos microambientes, alteração tumoral e invasão do tecido normal, permitindo a colonização em outros tecidos distante do sítio primário. Desta forma, a abundância, organização histológica, e características fenotípicas das diversas células estromais e da matriz extracelular permitem o crescimento primário, invasivo e metastático. E por fim, as células normais circundantes dos sítios primários e metastáticos contribuem para a diversidade dos microambientes neoplásicos (Hanahan and Weinberg, 2011).

Embora muitos dos eventos genéticos da carcinogênese sejam conhecidos, suas interações precisas com os fatores ambientais que controlam a expansão clonal e progressão maligna não são esclarecidas, devido à ausência de um modelo generalizado da carcinogênese (Gatenby and Vincent, 2003). Dentre os inúmeros modelos de carcinogênese, destacam-se: (i) modelo da expansão clonal (MEC) e (ii) modelo das células-tronco tumorais (MCTT).

Em 1990, Fearon and Vogelstein desenvolveram um modelo para a carcinogênese do câncer colorretal, que pode ser aplicado a outras neoplasias. Este modelo é baseado nas seguintes premissas: (i) o câncer surge como resultado da ativação de oncogenes e inativação dos genes supressores de tumor; (ii) são necessárias mutações em, no mínimo,

quatro a cinco genes; (iii) as mutações são responsáveis por determinar as propriedades biológicas do tumor.

Segundo este modelo, o câncer surge a partir de um pequeno conjunto de células que ao sofrer sucessivas mutações, adquire vantagem proliferativa e expande-se, e a este fenômeno denomina-se de expansão clonal (Fearon and Vogelstein, 1990).

Vogelstein *et al.* (2013) classificaram as mutações acumuladas nas células tumorais em dois tipos: (i) mutações *driver* (“condutora”) e (ii) mutações *passenger* (“passageira”). As mutações *driver* são aquelas que conferem uma vantagem de crescimento seletiva para a célula tumoral – e os genes que apresentam estas mutações são igualmente denominados de genes *driver*. As mutações *passenger* não conferem vantagem de crescimento clonal e, portanto, não contribuem diretamente para a carcinogênese.

Além da classificação dos genes quanto ao tipo de mutação, Kinzler and Vogelstein (1998) classificaram os genes de susceptibilidade ao câncer em três classes, de acordo com a função gênica: *gatekeepers*, *caretakers* e *landscapers*. Os genes *gatekeepers* regulam o crescimento e diferenciação celular por meio da parada do ciclo celular para o reparo de DNA ou para a eliminação da célula por apoptose. Caso a célula com DNA danificado continue a proliferar, a acumulação de mutações genéticas podem resultar na transformação maligna. Os genes *caretakers* apresentam papel na manutenção da integridade do genoma, através do reparo do DNA. O efeito *landscaper* representa o papel do estroma alterado no crescimento de células epiteliais, ou seja, o microambiente estromal anormal induz o epitélio adjacente a avançar para a transformação maligna.

Assim como no MEC, o MCTT também tem como premissa o acúmulo de mutações sucessivas nas células, dando-lhes vantagem proliferativa. Entretanto, a diferença é que o MEC admite que a mutação ocorra de forma aleatória em qualquer tipo celular,

enquanto que MCTT sugere que as mutações aconteçam especificamente nas células-tronco do tecido, levando a uma desregulação das vias de auto-renovação (Wicha *et al.*, 2006).

As células-tronco são as únicas células com capacidade de sofrer divisões de auto-renovação que podem ser simétricas ou assimétricas. A divisão simétrica ocorre quando a célula-tronco gera duas descendentes de células-tronco idênticas; na divisão assimétrica, a célula-tronco é capaz de produzir uma cópia exata de si mesma, bem como uma célula-filha que sofre diferenciação (Wicha *et al.*, 2006).

Em condições naturais, o processo de autorenovação das células-tronco é regulado por sinais externos e componentes originados do microambiente celular. Segundo este modelo, as células-tronco tumorais surgem, provavelmente, através da desregulação das vias de autorenovação – isto leva a expansão da população destas células que, em seguida, podem sofrer mais alterações genéticas e/ou epigenéticas, tornando-se completamente transformadas. Nestas circunstâncias de desregulação, as divisões simétricas e assimétricas conferem expansão clonal e propriedades fenotípicas ao tumor, respectivamente (Greaves and Maley, 2012; Wicha *et al.*, 2006).

Além destes modelos principais, outro modelo de carcinogênese vem ganhando ímpeto recentemente, apesar de ter sido desenvolvido em 1953 – o modelo de campo de cancerização (*field effect* ou *field cancerization*), preconizado por Slaughter *et al.* A partir de estudos realizados no “tecido normal” adjacente ao tumor e nas margens cirúrgicas, foram identificadas alterações em torno do tumor, que foram denominadas de campo de cancerização.

Apesar do campo de cancerização, geralmente, apresentar características histopatológicas de uma mucosa normal, estudos de Biologia Molecular demonstraram a

presença de alterações moleculares (perda de heterozigosidade, alterações de microssatélites, instabilidade cromossômica, mutações no gene P53, entre outras) (Braakhuis *et al.*, 2003; Chai and Brown, 2009). Portanto, o campo de cancerização pode ser conceituado como um epitélio morfológicamente normal, localizado próximo ao tumor, mas que pode compartilhar a maioria das alterações genéticas presentes no câncer (Chai and Brown, 2009).

De modo geral, este modelo baseia-se na premissa que o desenvolvimento do campo de cancerização com células alteradas geneticamente e epigeneticamente é um fator de risco para o câncer. Entretanto, os mecanismos que originam o campo de cancerização ainda não são completamente entendidos (Chai and Brown, 2009).

1. O Câncer da Cavidade Oral

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo com e a causa de mais de 400.000 mortes/anuais relacionadas ao câncer, dos quais 80% dos óbitos ocorrem em países em desenvolvimento. A taxa de incidência de CCEO é crescente principalmente nos indivíduos jovens (Jemal *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2011).

No Brasil, o câncer da cavidade oral é o quinto câncer mais frente. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam para o ano de 2016, que o Brasil apresentará aproximadamente 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (INCA 2016). Para a região nordeste estima-se 1.880 novos casos, atribuindo ao Ceará 300 casos.

O câncer da cavidade oral abrange lesões nos lábios, mucosa jugal, palato duro, assoalho bucal, língua, gengiva, região retromolar e rebordo alveolar. Aproximadamente 90% dos cânceres da cavidade oral são do tipo carcinoma espinocelular (CCEO) (Ferlay *et al.*, 2007; Argiris *et al.*, 2008; Nasman *et al.*, 2009; Jemal *et al.*, 2010).

O CCEO é uma doença altamente agressiva, mutiladora e que frequentemente deixa sequelas irreversíveis na fala, respiração e deglutição. Desta forma, além do comprometimento da saúde, prejudica a autoimagem e consequente isolamento social, dependendo da área acometida. Portanto, é o tipo de malignidade caracterizada como a forma mais traumática e com maior impacto na qualidade de vida do paciente (Silveira *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

O CCEO apresenta baixa sobrevida e altas taxas de morbimortalidade devido a estágios avançados no diagnóstico. A sua alta mortalidade é oriunda, principalmente, da metástase linfática cervical e da metástase a distancia em pulmões e ossos (Liu *et al.*, 2008; Takes *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços das pesquisas no diagnóstico e tratamento do CCEO, a taxa de sobrevida de 50% em cinco anos não sofreu grandes alterações nas últimas três décadas (Jemal *et al.*, 2010; Majchrzak *et al.*, 2014). Fato atribuído pela complexidade anatômica e etiológica, o que dificulta a escolha da abordagem terapêutica ou de técnicas mais eficazes para o seu diagnóstico (Périé *et al.*, 2014; Baxi *et al.*, 2014).

Os principais fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do CCEO são o consumo excessivo de álcool e/ou do tabaco, visto que seus produtos metabólicos induzem mutações diretas no DNA e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, levando a danos no DNA de genes essenciais para a regulação do ciclo celular (Perez *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Wald *et al.*, 2011). No entanto, alguns cânceres na região da

orofaringe e cavidade oral acometem adultos jovens (18-45 anos) sem hábitos etilista e tabagista, desta forma, outros fatores de risco podem estar envolvidos como os fatores genéticos e infecções virais. A infecção pelo vírus Epstein-Barr e Papilomavírus Humano (HPV), dos subtipos 16 e 18, que desempenham uma forte contribuição no processo de carcinogênese do CCEO (Tran *et al.*, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2008; Leemans *et al.*, 2011). Sabe-se que o vírus HPV tem a capacidade de inserir-se no genoma do hospedeiro, e perturbar o controle do ciclo celular, aumento da proliferação, o que assegura a replicação viral dentro da divisão celular (Moody and Laimins, 2010).

O CCEO desenvolve-se a partir de um processo que envolve várias etapas, iniciando com hiperplasia, progredindo para displasia e, finalmente, a neoplasia maligna. Durante esses passos, diversas alterações genéticas podem ocorrer, incluindo aberrações cromossômicas, mutações no DNA, amplificação, ou deleções (Speight *et al.*, 2007; Scully and Bagan, 2008; Pitiyage *et al.*, 2009).

Estudos reportaram que 16-62% dos CCEO desenvolvem-se a partir de Desordens Potencialmente Malignas (DPM), conhecidas como leucoplasia, lesão linquenóide, eritroplasias e leucoeritroplasia (van der Waal, 2009; Scully and Bagan, 2009; Neville, 2011).

A leucoplasia é uma lesão na mucosa oral, predominantemente branca que clinicamente não pode ser caracterizada como qualquer outro tipo de lesão (WHO, 2005; Warnakulasuriya *et al.*, 2007). Classificadas em homogêneas ou heterogêneas, a qual o último grupo é considerado a ter um maior risco de transformação maligna (Reibel, J., 2003; Holmstrup *et al.*, 2006). Histologicamente, as leucoplasias podem ser não-displásicas ou displásicas que variam entre os graus leve, moderada ou grave (Reibel, 2003). As leucoplasias displásicas estão associadas com maior risco de transformação

epitelial e conseqüente malignização, no entanto, tais características clínicas e histológicas têm um valor limitado ao prognóstico (Reibel, 2003; Holmstrup *et al.*, 2006).

A queilite ou queilose actínica é caracterizada pelo ressecamento, erosões e perda do limite do lábio inferior com a pele, acometendo, sobretudo, pessoas de pele clara. Esta DPM é decorrente da exposição crônica aos raios solares (em especial as UVB) e cerca de 40% podem evoluir para o CEC de lábio. Outros fatores de risco contribuem sinergicamente como a cor da pele (porcentagem de melanina), fatores sócio-demográfico, estilo de vida, imunossupressão e suscetibilidade genética (Luna-Ortiz *et al.*, 2004; Van *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2011). Assim, a exposição a agentes genotóxicos endógenos e exógenos, como a radiação UV, causam disrupção do ciclo celular e danos ao sistema de reparo do DNA que são funções fisiológicas fundamentais para manutenção da função celular (Rodust *et al.*, 2009; Ikehata, 2011).

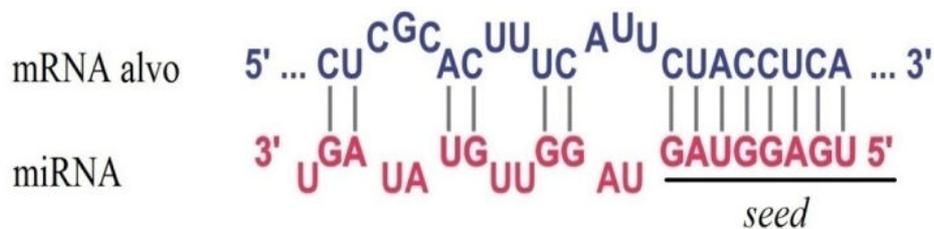
Diante da heterogeneidade, agressividade, difícil tratamento e diagnóstico, bem como a morbimortalidade ocasionada pela doença, faz-se necessária a investigação de biomarcadores preditivos que possam auxiliar no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento do CCEO.

2. RNAs não codificantes (MicroRNAs)

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes (18-25 nucleotídeos), de fita dupla que pertencem a uma longa família altamente conservada (Ambros, 2004; O'Donnell *et al.*, 2005; Ivey and Srivastava, 2010). Estão envolvidos em diversas vias de regulação, incluindo o desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação, envelhecimento do organismo, senescência e apoptose. A desregulação da

expressão de miRNAs contribuem para a manifestação de algumas doenças, dentre elas, o câncer (Yanaihara *et al.*, 2006; Calin *et al.*, 2007; Farazi *et al.*, 2011).

Os pequenos RNAs são clivados a partir de um mRNA precursor de 70-100 nucleotídeos em forma de *hairpin* e agem na diminuição da síntese de proteína através da repressão postranscricional ou pela degradação do mRNA (Fabian *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2010). O processo de seleção é dirigida pela interação molecular entre a extremidade 5'UTR do regulador e extremidade 3'UTR do regulado e pelo reconhecimento da sequência *seed* (2-8 nucleotídeos iniciais da extremidade 5'UTR do miRNA) que então, pareia-se com mRNA alvo. Deste pareamento duas situações distintas podem ocorrer: i) perfeito entre as bases, desencadeia a clivagem/degradação do mensageiro - siRNAs e ii) imperfeito, induzindo a repressão traducional, característicos dos miRNAs (Bartel, 2004; Nilsen *et al.*, 2007) (Figura 2).



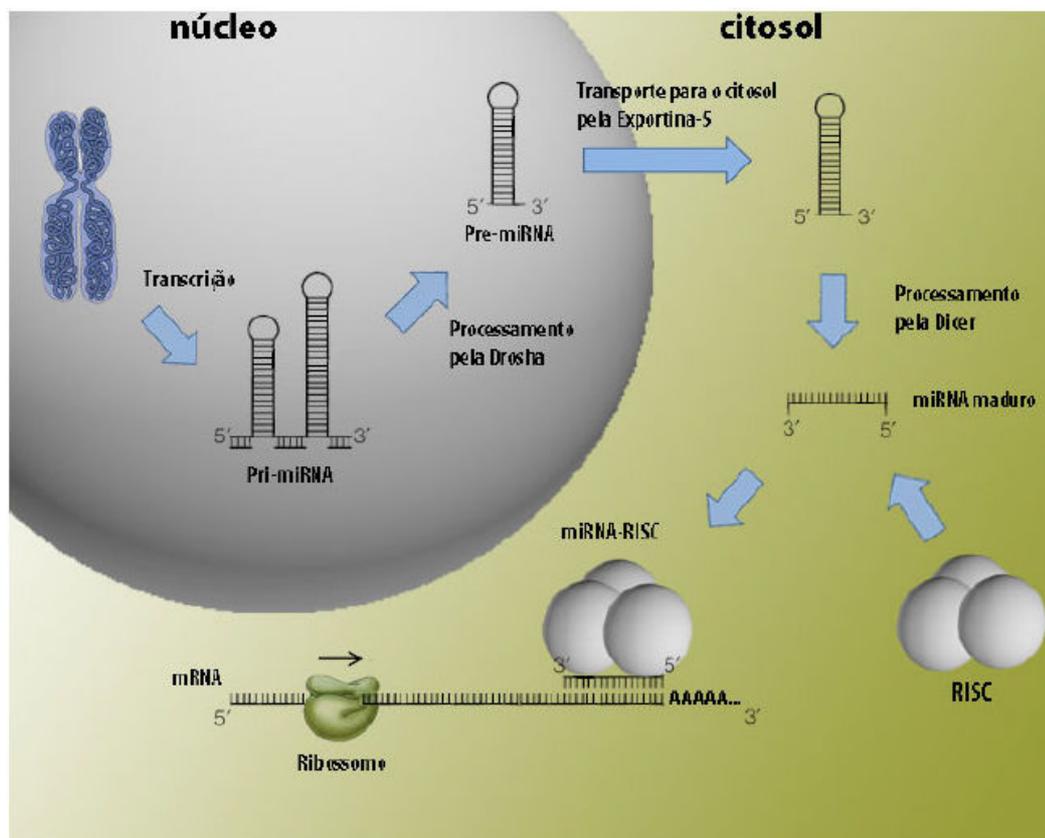
Fonte: Ribeiro- dos- Santos *et al.*, (2010).

FIGURA 2: Sequência de microRNAs com destaque em *Seed*.

Os miRNAs são conhecidos como reguladores de genes endógenos, enquanto os siRNA são os defensores da integridade do genoma, em resposta a ácidos nucléicos externos ou invasivos, tais como vírus, transposons e transgenes. Apesar desta diferença, a

forma de filamento único dos miRNAs e siRNAs estão associados ao mesmo processo de montagem do Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) e participam do mesmo processo de conservação evolutiva (Bartel, 2004; Meister and Tuschl, 2004; Lippman and Martienssen, 2004).

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, nas quais os transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias: as regiões “*stem*”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “*loop*”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares. No núcleo, os pri-miRNA são processados pela ação endonucleotídica da DROSHA e seu cofator DGCR8. A estrutura resultante, designada miRNA pre-cursor (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5. No citoplasma, os pre-miRNAs são processados por DICER, que remove a alça na estrutura *stem-loop*, resultando na formação da duplex miRNA/miRNA*. Após o processamento, os miRNAs são incorporados em miRISC e apenas uma vertente da duplex é estavelmente associado a este complexo. Usualmente, a vertente miRNA é a mais fortemente favorecida do que o miRISC* (Lee et al., 2003; Han et al., 2006; Klaze et al., 2011). (Figura 3).



Fonte: Adaptado de Mack, G.S., MicroRNA gets down to business

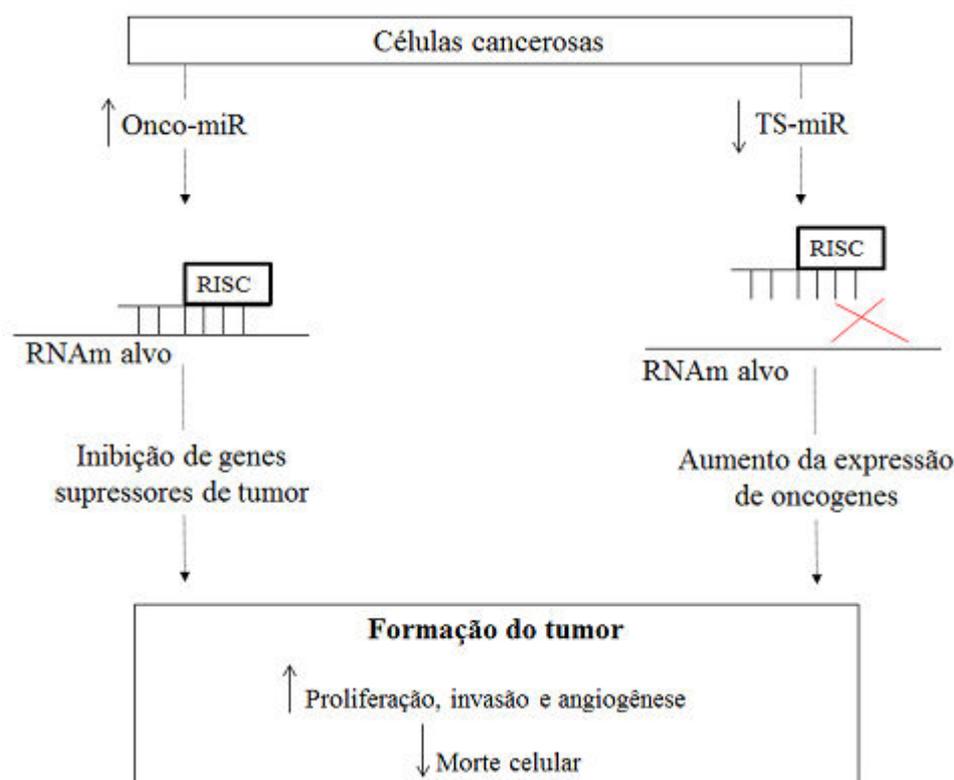
Figura 3. Resumo esquemático da biogênese do miRNA

Geralmente, um miRNA pode regular centenas de genes-alvo, alternativamente, um gene pode ser reprimido por centenas de miRNAs, o que resulta na formação de vias de regulação complexas (Bartel *et al.*, 2008). Uma justificativa é que em média 60% dos mRNAs apresentam uma ou mais sequências evolutivamente conservadas que estão previstas para interagir com miRNAs (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Betel, *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2009). Outro fundamento é o auxílio das análises de bioinformática que preveem a 3' UTR de um único gene é alvo frequente de vários miRNAs diferentes (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

3.1. MicroRNA e câncer

A alteração da regulação postranscricional do mRNAs por miRNAs exerce um papel importante na oncogênese, desencadeando o aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose, e aumentando o potencial metastático de células afetadas, assim, favorecendo a progressão e invasão tumoral (Di Leva *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Varol *et al.*, 2011).

A alteração na expressão de miRNAs modificam o equilíbrio entre oncogenes e genes supressores tumorais. Os miRNAs oncogênicos (oncomiR) revelam expressão aumentada em neoplasias malignas, promovendo o desenvolvimento tumoral através do estímulo à proliferação celular e/ou inibição de genes que regulam apoptose e genes supressores tumorais. Dependendo do contexto e do tipo celular em que são expressos, um mesmo miRNA pode exibir atividade oncogênica ou supressora tumoral (Fabbri *et al.*, 2007). Além disso, um único miRNA é capaz de regular diversos genes-alvo e, com isso, controlar simultaneamente atividades opostas, como a proliferação celular e a apoptose. O miRNA com função de supressores de tumor (TS-miR) são reprimidos em tumores, permitindo o desenvolvimento tumoral (Zhang *et al.*, 2007). Além do oncomiRs e dos TS-miR, alguns trabalhos referem os metamR, que possuem efeitos pró e anti-metastáticos e se superpõem, aos dois primeiros grupos (Hurst *et al.*, 2009) (figura 4).



Fonte: Adaptado de Ahmad et al., 2013.

Figura 4: Ação dos miRNAs oncogênicos (onco-miRs) e supressores de tumor (TS-miRs).

O perfil da expressão de miRNAs, assim como, o os de mRNAs variam de tecido para tecido, porém são semelhantes para o mesmo tipo de tecido a partir de diferentes indivíduos, inclusive entre gêneros (Volinia *et al.*, 2006). Assim, uma análise comparativa de miRNAs entre tecidos com tumor e sem tumor poderia revelar marcadores de diagnóstico ou de alvos terapêuticos (Ramdas *et al.*, 2009). De acordo com Calin and Croce (2006), a análise da expressão de miRNAs revela perfis característicos da célula normal e da célula cancerosas que facilitam a identificação e o monitoramento da doença.

Além disso, Volinia *et al* (2006), descreveram uma assinatura comum composto por 21 miRNAs diferencialmente expressa em pelo menos três tipos de tumores a partir de 540 amostras incluindo o pulmão, mama, estômago, próstata, cólon e tumores

pancreáticos. O *hsa-miR-21* foi encontrado superexpresso em todos os seis tipos de cânceres, enquanto o *hsa-miR-17-5p* e *hsa-miR-191* foram superexpressos em apenas cinco. Baseado nos alvos preditivos dos miRNAs, os autores identificaram vários genes já associados à cânceres como alvos para a assinatura miRNAs e concluíram que miRNAs estão envolvidos na patogênese de tumores sólidos.

Existem evidências de que tais perfis podem ser utilizados para classificação, determinação do estágio e da progressão do câncer, bem como para prognósticos e respostas ao tratamento (Calin and Dumitru *et al.*, 2002; Calin and Sevignani *et al.*, 2004). Por exemplo, a expressão reduzida do *hsa-let-7* foi associada com a diminuição da sobrevida de pacientes com câncer de pulmão (Takamizawa, Konishi *et al.*, 2004), enquanto níveis elevados de *hsa-miR-21*, um potente oncomiR, já foram referidos em pacientes com adenocarcinoma de cólon apresentando sobrevida reduzida e resposta terapêutica reduzida (Schetter, Leung *et al.*, 2008).

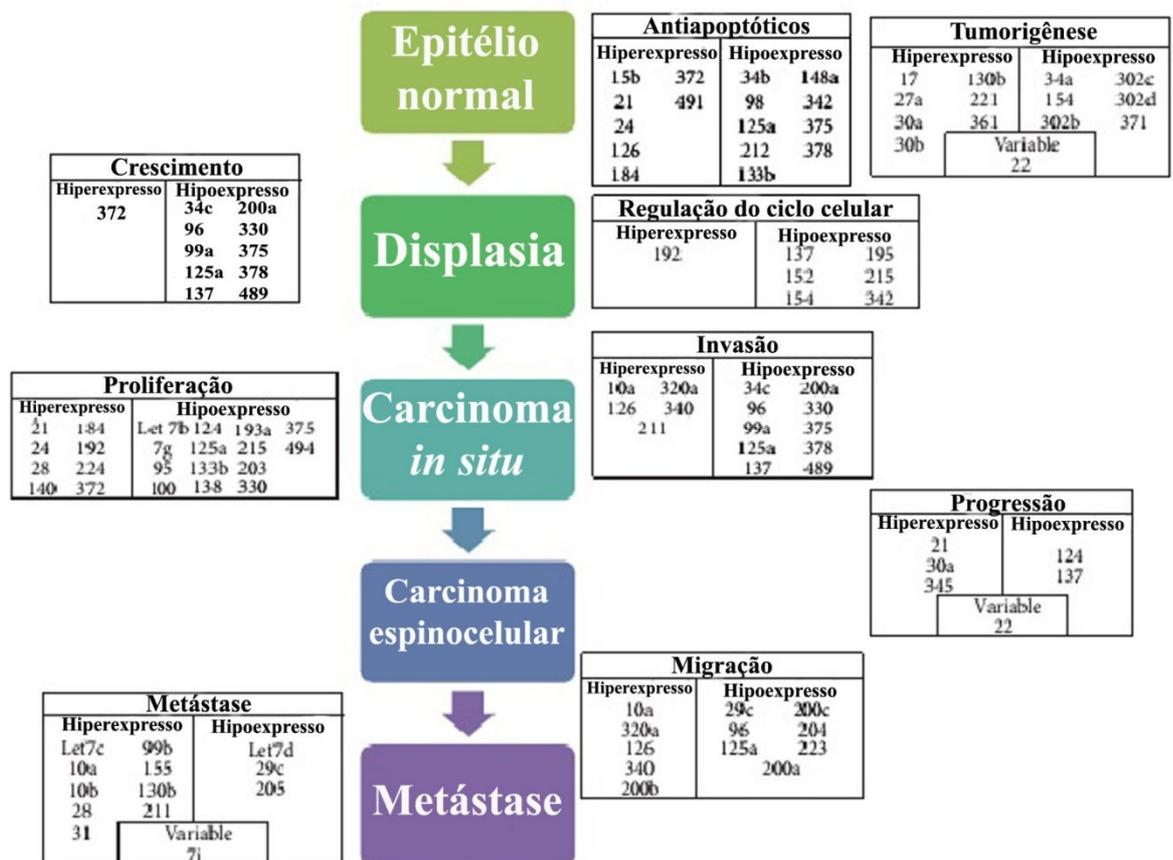
3.2. microRNAs no Câncer Oral

Os miRNAs, através da regulação dos seus genes alvos desempenham um papel crucial na iniciação e progressão do CCEO. A partir de amostras de tumor, soro/plasma ou saliva, as alterações da expressão de miRNAs determinam uma assinatura específica que pode auxiliar no diagnóstico, prognóstico, e alvos terapêuticos em CCEO (Lo *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2015).

Diversos estudos mostraram a expressão desregulada de miRNAs no tecido tumoral ou em linhagens derivadas de CCEO em comparação com amostras normais ou adjacentes indicando o seu potencial papel no desenvolvimento do câncer oral. Por conseguinte, estes

miRNAs participam como supressores tumorais ou oncogenes de diversas funções biológicas da tumorigênese oral, além da correlação do seu perfil de expressão com as variáveis clinicopatológicas e com o valor de diagnóstico e prognóstico (Avisar *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2010; Sethi *et al.*, 2014)

Por estas razões, miRNAs proporcionaram um grande volume de investigação oncológica e publicações de estudos sobre miRNAs em CCEO (figura 5).



Fonte: Adaptado de Nagadia *et al.*, 2013.

Figura 5. miRNAs desregulados em cada etapa do processo de desenvolvimento ao CCEO.

A hiperexpressão do *hsa-miR-21* foi associada a diversos tipos de cânceres, dentre eles o CCEO (Huang *et al.*, 2009; Avisar *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014; Kawakita *et al.*, 2014; Hedback *et al.*, 2014). Este é classificado como um potente oncomiR regulado pelo oncogene *RAS*. Provavelmente, esse papel é resultado de sua

atuação sobre genes supressores de tumor, como o *PDCD4*, *PTEN*, *RECK* e *DKK2*, o que deve favorecer invasão, evasão da apoptose e metástase, proliferação celular e quimiorresistência (Meng *et al.*, 2007; Ramdas *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Allgayer, 2010; Reis *et al.*, 2010; Bourguignon *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012; Kawakita *et al.*, 2014; Mydlarz *et al.*, 2014).

A hiperexpressão de *hsa-miR-21* foi observada em desordens potencialmente malignas orais (leucoplasia) comparada com a mucosa oral normal, indicando que a alteração neste miRNA poderia ser um evento inicial da progressão ao CCEO (Brito *et al.*, 2014).

Além do *hsa-miR-21*, os miRNAs *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-345* e *hsa-miR-96* foram significativamente hiperexpressos em displasia oral, associados a gravidade da lesão. Isso, permitiu concluir que os perfis de expressão global de miRs foram capazes de distinguir leucoplasia avançada/CEC de leucoplasias não avançada/tecidos normais, sendo assim, podem desempenhar um papel na transformação maligna (Cervigne *et al.*, 2009; Santhi *et al.* 2013).

O nível de expressão de *hsa-miR-31* na saliva foi encontrado hiperexpresso em pacientes com CCEO de todos os estágios clínicos em comparação com a dos controles saudáveis. A hiperexpressão de *hsa-miR-31* na saliva foi significativamente reduzida após a excisão de lesão de CCEO (Harris *et al.*, 2012). Além disso, hiperexpressão de *hsa-miR-31* foi encontrada na leucoplasia oral e CCEO e, portanto, participa da carcinogênese oral (Hung *et al.*, 2014).

O estudo de Avissar *et al.* (2010) permitiu distinguir um tecido livre de câncer de um outro com CECCP mediante a hiperexpressão do *hsa-miR-221* e *hsa-miR-375*. Enquanto que, Shiiba *et al.* (2010) observaram hiperexpressão de *hsa-miR-221* e *hsa-miR-*

18 tanto em linhagens celulares quanto em amostras de pacientes com CCEO. Hui *et al.*, (2010) demonstraram que é possível avaliar expressão global de miRNAs em amostras de CCEO fixadas em formol, nas quais encontraram a hipoexpressão do *hsa-miR-451* em pacientes com recidiva quando comparados aos pacientes sem recidiva.

Inúmeros estudos correlacionaram a expressão de miRNAs em CECCP, em linhagens celulares ou em amostras de tecido tumoral, lífonodo, saliva e plasma. Estes estão envolvidas em diversas vias dos processos celulares, como redução de níveis por metilação do promotor (Kozaki *et al.*, 2008; Langevin *et al.*, 2010), associação da expressão com consumo de álcool (Avissar El ta., 2009), progressão de lesão pré-malignas (Cervigne *et al.*, 2009), migração/invasão (Liu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010) e prognóstico (Chang *et al.*, 2008; Avissar *et al.*, 2009).

Considerando que o CCEO é uma doença altamente agressiva, mutiladora que frequentemente deixa sequelas irreversíveis, comprometendo a saúde, autoimagem, qualidade de vida e conseqüentemente o isolamento social (Silveira *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), faz-se necessária a investigação de biomarcadores preditivos que possam auxiliar no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento do CCEO. Portanto, investigações no perfil de expressão de miRNAs pode fornecer uma ferramenta epigenética importante para o estabelecimento destes biomarcadores.

I. OBJETIVO

1. Objetivo Geral

Investigar e caracterizar o perfil da expressão de microRNAs por meio do sequenciamento massivo de alto desempenho em plataforma de nova geração (NGS - RNASeq), em amostras de carcinoma espinocelular da cavidade oral.

2. Objetivos Específicos

- Investigar o perfil de expressão de microRNAs em amostras de tecidos da cavidade oral com e sem câncer.
- Identificar, caracterizar e validar o perfil de expressão diferencial dos microRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b*, *hsa-miR-29c* em amostras de tecidos da cavidade oral com e sem câncer, assim como áreas adjacentes ao tumor.
- Investigar, *in silico*, os genes alvos identificados, de acordo com dados da literatura.
- Melhorar o conhecimento acerca dos mecanismos biológicos do câncer oral, além de realizar o primeiro sequenciamento de alto desempenho em amostras de tecidos da cavidade oral.

II. CAPÍTULOS

1. Capítulo I

Este capítulo é a versão original do manuscrito “Expressão diferencial de has-miR-221, has-miR-21, has-miR-135b and has-miR-29c sugere efeito de cancerização no câncer oral”. Artigo em preparação para submissão na Revista Oral Oncology (ISSN: 1368-8375).

Expressão diferencial de *has-miR-221*, *has-miR-21*, *has-miR-135b* and *has-miR-29c* sugere efeito de cancerização no câncer oral.

Lopes CB¹; Teófilo CR², Alves APNN², Montenegro RC³, Negrini M⁴, Ribeiro-dos-Santos, A¹

¹Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

²Departamento de Clínica Odontológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará.

³Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

⁴Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Ferrara.

Correspondence: Profa. Dra. Ândrea Ribeiro-dos-Santos - Universidade Federal do Pará – UFPA, Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Genética Humana e Médica. Av. Augusto Corrêa, 01 – Guamá, 66.075-970 – Belém (PA), Brazil Phone/Fax: (+5591)32017843, akelyufpa@gmail.com / andrea.santos@pq.cnpq.br.

Resumo

A teoria do campo de cancerização sugere a presença de uma área adjacente ao tumor com aspecto histopatológico normal, mas com alterações genéticas e epigenéticas. Portanto, essas modificações podem alterar a homeostase epitelial predispondo ao desenvolvimento do câncer. Dentre as diversas alterações moleculares descritas, encontram-se os microRNAs (miRNAs) capazes de regular a expressão de genes importantes da via carcinogênica. Com o objetivo de investigar o efeito de campo de cancerização no câncer oral, investigamos o perfil de expressão diferencial de quatro miRNAs específicos (*hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c*) em amostras de tecidos tumorais, adjacentes e de pacientes sem câncer. Nossos resultados mostram perfis de hiperexpressão significativa do *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* no tecido oral com câncer quando comparado às amostras sem câncer; assim como no tecido adjacente ao câncer quando comparado com o tecido sem câncer. Entretanto, não se observou diferença de expressão quando se comparou o perfil dos grupos câncer e tecido adjacente. Nossos resultados nos permitem concluir que o tecido adjacente ao câncer não pode ser considerado como tecido normal, uma vez que os aspectos moleculares destes se encontram significativamente alterados. Nossos dados corroboram à hipótese do campo de malignização.

Introdução

O câncer oral é o mais frequente dentre as neoplasias de cabeça e pescoço e incluem lesões nos lábios e na cavidade oral (mucosa jugal, palato duro, assoalho bucal, língua, gengiva, região retromolar e rebordo alveolar). O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) representa 90% das neoplasias na cavidade oral e caracteriza-se por um padrão de crescimento agressivo, invasivo e que se dissemina para os gânglios linfáticos cervicais. O CCEO, na maioria dos casos, é de caráter mutilador, pois provoca sequelas irreversíveis na fala, respiração e deglutição, comprometendo a saúde, autoimagem e como consequência o isolamento social. Portanto, é o tipo de malignidade mais traumática e com maior impacto na qualidade de vida do paciente (Silveira *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Adicionalmente, o CCEO apresenta alta mortalidade oriunda, principalmente, da metástase linfática cervical, recidiva loco-regional e metástase a distância em pulmões e ossos (Liu *et al.*, 2008; Takes *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012).

O campo de cancerização preconizado por Slaughter, em 1953, demonstra que a área de tecido adjacente ao tumor sofre alterações genéticas e eventualmente podem levar ao desenvolvimento de recidiva local ou o surgimento de um segundo tumor primário (Slaughter *et al.*, 1953).

A literatura mostra que alterações na regulação pos-transcricional dos mRNAs por miRNAs exerce um papel importante na oncogênese (Di Leva *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Varol *et al.*, 2011, Lupini *et al.*, 2013). Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes (18-25 nucleotídeos), de fita dupla que pertencem a uma longa família altamente conservada (Ambros, 2004; O'Donnel *et al.*, 2005; Ivey and Srivastava, 2010; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2012). Estão envolvidos em diversas vias de regulação,

incluindo o desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação, envelhecimento do organismo, senescência e apoptose. A desregulação da expressão de miRNAs contribui para a manifestação de algumas doenças, dentre elas, o câncer (Farazi *et al.*, 2011; Darnet *et al.*, 2015; Van Den Berg, Magalhães *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 2016).

O perfil da expressão de miRNAs variam de tecido para tecido, porém são tecido-específico entre distintos indivíduos, inclusive entre gêneros (Volinia *et al.*, 2006; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2010). Assim, uma análise comparativa de miRNAs entre tecidos com e sem câncer poderia revelar marcadores de diagnóstico ou de alvos terapêuticos (Ramdas *et al.*, 2009; Van Den Berg, Magalhães *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 2016). Além disso, estes perfis podem ser utilizados para classificação, determinação do estágio e da progressão do câncer, bem como para prognósticos e respostas ao tratamento (Moshiri *et al.*, 2014; Fabris *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016).

Os estudos sobre microRNAs (miRNAs) e os seus alvos demonstram que estas moléculas participam da iniciação e progressão do cancer oral (Tran *et al.*, 2010; Sethi *et al.*, 2014), dentre eles a hiperexpressão do *hsa-miR-21* (Cervigne *et al.*, 2009; Kawakit *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015), *hsa-miR-221* (He *et al.*, 2015; Avissar *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de expressão do *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* no tecido sem câncer, câncer oral e associá-los ao efeito de campo de cancerização.

Material e métodos

Caracterização da amostra e aspectos éticos

O presente estudo foi composto por 47 indivíduos caracterizados em três grupos de amostras: i) amostras de tecido de câncer oral (n=28); ii) amostras de tecido adjacente ao tumor (n=11); e iii) amostras de tecido gengival sem câncer (n=19). As amostras de tecidos saudáveis são provenientes de pacientes voluntários que foram submetidos à exodontia do 3º molar.

Todos os procedimentos da pesquisa foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinki e do Código de Nuremberg, obedecendo as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde, respeitando as normas éticas e os direitos dos pacientes. Os dados foram coletados após os pacientes assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 77/09.

As amostras foram obtidas de pacientes atendidos na clínica odontológica da Universidade Federal do Ceará no período de 2011 a 2015. As amostras foram coletadas em um tubo de 2 mL contendo RNAlater e armazenadas até o momento da extração de RNA. Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

O RNA total foi extraído seguindo as orientações do protocolo do kit de extração High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science) e as concentrações do RNA foram determinadas no equipamento Qubit®2.0 (Life Technologies, Foster City, CA, US). O

RNA total extraído foi diluído em água DEPC para concentração final de 5 ng/ μ L e armazenado a -80°C.

Um total de 5 ng de RNA total foi utilizado na reação da transcrição reversa com o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo as orientações do fabricante. O produto da transcriptase reversa, foi submetido à reação de amplificação com sondas e reagentes TaqMan® Universal master mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA) realizado no equipamento Rotor-Gene Q (QIAGEN). Todas as reações foram executadas em triplicata e para analisar as diferenças de expressão de cada grupo foi utilizado o método comparativo de Ct. Para normalizar os níveis de expressão de *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* o controle endógeno RNU6B (Applied Biosystem, Foster City, CA) foi usado.

Análise estatística

Para verificar as diferenças na expressão do *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* entre os grupos, câncer, adjacente e sem câncer foi utilizado valores de $2^{-\Delta Ct}$. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se as amostras seguem a distribuição gaussiana e o teste ANOVA One Way foi usado para comparar os valores de expressão entre os três grupos. Foram consideradas diferenças significativas, valores de $P < 0.05$ e aplicado a correção de Bonferroni para as múltiplas comparações par a par. Para estimar a sensibilidade do biomarcador de distinguir os grupos, utilizamos o Receiver Operating Characteristic (ROC) e análise da área sob a curva (AUC). Todos os testes foram realizados no programa estatístico R statistical (www.R-project.org) e os gráficos feitos no BoxPlotR online tool (<http://boxplot.tyerslab.com>).

Resultados

Perfil de expressão *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* no CCEO.

Os dados de expressão normalizados do *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* seguiram uma distribuição normal gaussiana e o teste ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos sem câncer e câncer, assim como entre sem câncer e adjacente. Comparações par a par revelaram que a expressão desses três miRNAs foi significativamente aumentada nos tecidos CCEO e adjacente ao câncer (Tabela 1).

O perfil de expressão do *hsa-miR-21* foi o único que não seguiu distribuição normal gaussiana e, portanto, utilizamos o teste Mann-Whitney para suas análises. A expressão do *hsa-miR-21* foi significativamente maior no tecido CCEO e adjacente ao câncer em comparação ao tecido sem câncer (Tabela 1). Por outro lado, a comparação do perfil de expressão entre tecido adjacente e CCEO não mostrou diferença estatística (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Dados de comparação da expressão e valores de significância do *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c*, entre os diferentes tipos de tecidos (CCEO, adjacente ao câncer e sem câncer).

MicroRNA	Normal x Cancer (P)	Normal x Adjacent (P)	Adjacent x Cancer (P)
<i>hsa-miR-221</i>	0.0001	0.008	1
<i>hsa-miR-135b</i>	8.4E ⁻⁷	9.7E ⁻⁶	1
<i>hsa-miR-29c</i>	0.04	0.005	0.49
<i>hsa-miR-21</i>	7.6E ⁻⁸	7.3E ⁻⁶	0.63

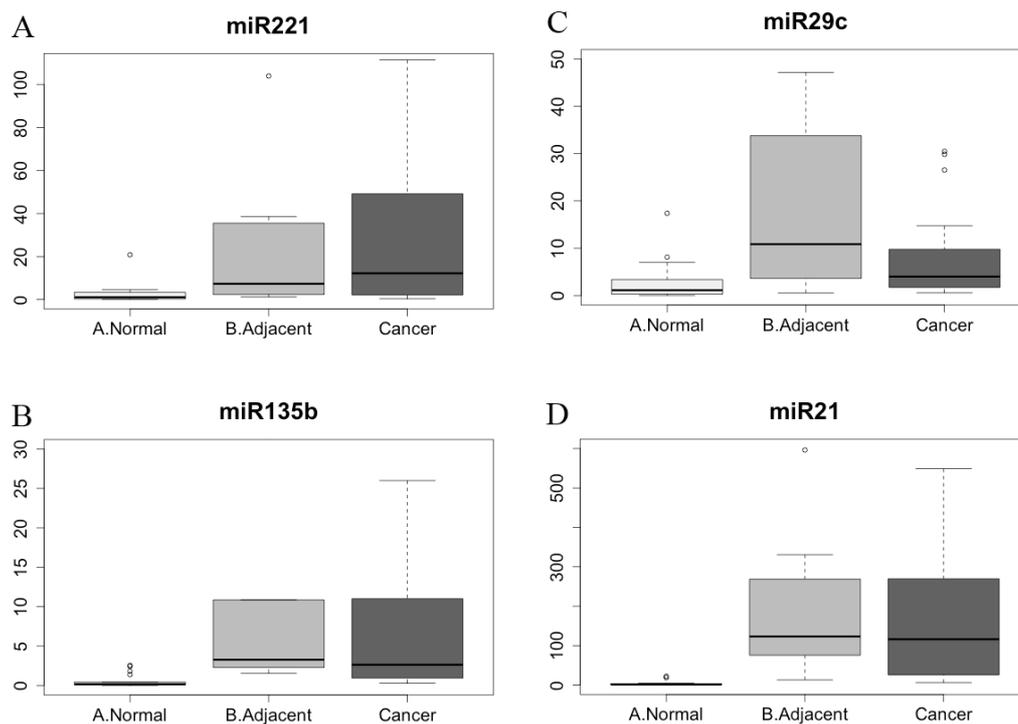


Figura 1. Valores de expressão normalizada (ΔC_t) em amostras de tecido sem câncer, adjacente ao câncer e câncer para *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* (A-D).

O perfil de expressão do *hsa-miR-221*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* como biomarcador de carcinogênese no CCEO.

Para verificar se o perfil de expressão do *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* poderiam ser empregados como biomarcador de carcinogênese realizou-se análise da curva ROC e a acurácia discriminatória pelos valores da AUC. Nossos resultados mostram que a expressão desses miRNAs diferenciam os grupos de tecidos sem câncer, dos com câncer e, adjacente.

A expressão de *hsa-miR-21* apresentou maior precisão discriminatória entre os grupos de tecidos sem e com câncer, com uma curva de 96.8% de precisão [AUC= 0,968; IC 95% 0.920-1.00]. De igual forma, os grupos sem câncer e adjacente, com um curva de 98.7% de precisão [AUC= 0,987; IC 95% 0.987-1.00] (Figura 2).

O valor do biomarcador *hsa-miR-221* teve melhor precisão discriminatórios para diferenciar os grupos de tecidos sem e com câncer, com AUC de 0,848 (IC 95% 0.728-0.968), seguido do poder discriminatório entre os grupos sem câncer e adjacente (AUC=0,833 (IC 95% 0.674-0.993) (Figura 2).

O poder discriminatório de *hsa-miR-135b* para diferenciar os grupos de tecidos sem e com câncer foi AUC de 0,880 (IC 95% 0.778-0.983), enquanto sem câncer e adjacente apresentou uma AUC de 0,957 (IC 95% 0.890-1.00) (Figura 2).

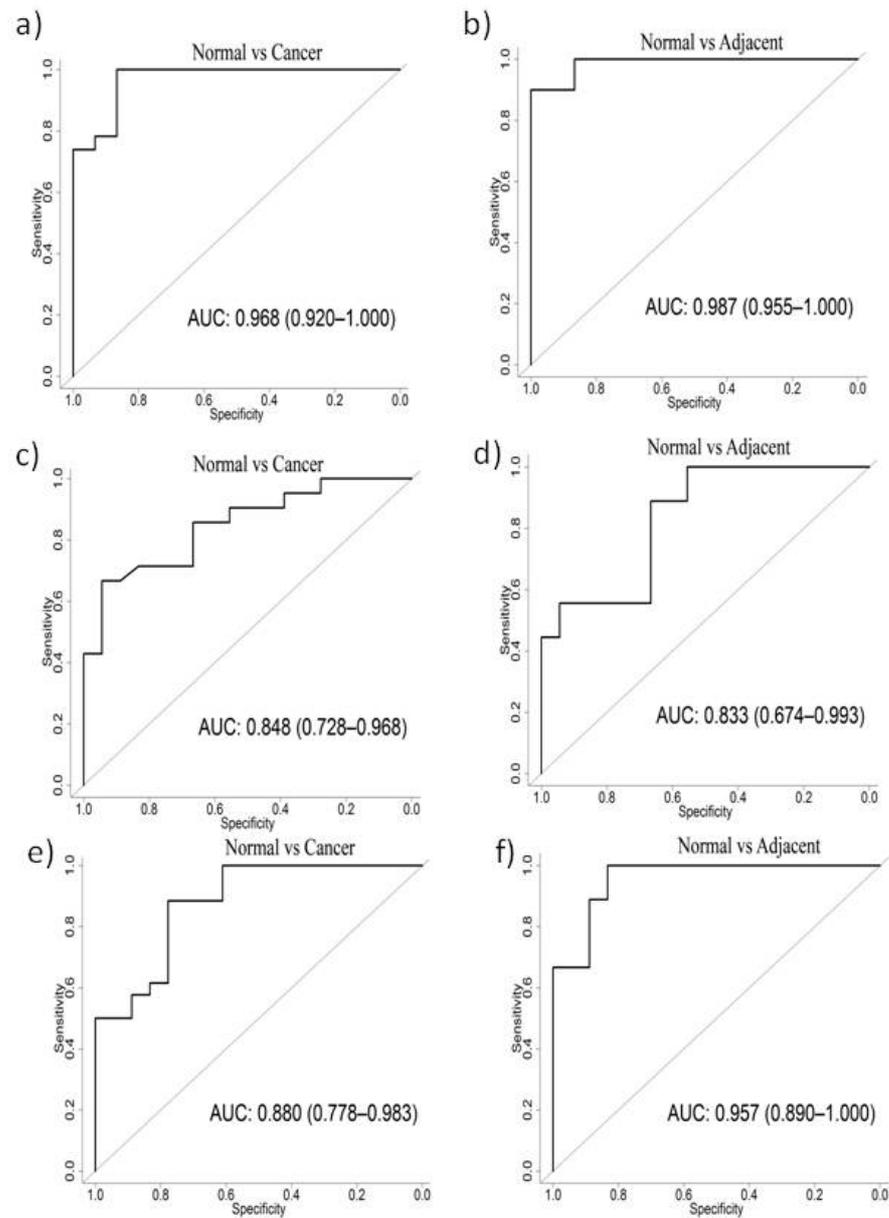


Figura 2. Receiver operating characteristic curves (ROC) de *hsa-miR-21* (a), *hsa-miR-221* (c), *hsa-miR-135b* (e) para diferenciação de tecidos CCEO dos sem cancer e entre tecidos adjacentes e sem câncer para *hsa-miR-21* (b), *hsa-miR-221* (d) and *hsa-miR-135b* (f).

Discussão

A maioria dos estudos de carcinogênese do CCEO comparam amostras teciduais tumorais com amostras histopatológicas normais, mas adjacentes ao tumor, para investigação de marcadores genéticos e epigenéticos (Matsuyama *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). Para esta abordagem, consideraram o tecido adjacente ao tumor como amostras livres de câncer (Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). No presente estudo, comparamos três grupos de amostras: (i) tecidos histopatológicos normais de pacientes sem câncer; (ii) tecidos tumorais; e (iii) tecidos adjacentes ao tumor. Nossos resultados mostram diferenças significativas entre tecidos sem câncer e adjacentes, apoiando a existência do efeito de campo no CCEO.

O nível de expressão dos miRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-29c* e *hsa-miR-135b* foram maiores no CCEO, seguidos pelo tecido adjacente e pelas amostras sem câncer. Estes quatro miRNAs sugerem a ocorrência do efeito de campo de cancerização em CCEO, pois a expressão diferenciada dessas moléculas reguladoras podem fornecer um ambiente permissivo para uma sequência de eventos que ocorrem durante a carcinogênese oral, reforçando o conceito de efeitos de campo.

O *hsa-miR-21* é considerado um oncomiR, o qual encontra-se hiperexpresso em vários tipos de carcinomas, incluindo de coloretal (Xu *et al.*, 2012), esôfago (Nouraei *et al.*, 2013) hepatocelular (Karakatsanis *et al.*, 2013), mama (Han *et al.*, 2016) e CCEO (Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). O bloqueio da expressão de *hsa-miR-21* inibe ou reduz o crescimento e proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, além de induzir a apoptose (Nouree *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Diversos estudos demonstraram a superexpressão do *hsa-miR-21* no CCEO (Reis *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014; Zhou *et al.*,

2014; Manikandan M *et al.*, 2015;), porém a maioria utilizou o tecido adjacente ao tumor para uma análise comparativa ao tecido tumoral. Por outro lado, nossos resultados também demonstram hiperexpressão do *hsa-miR-21* no tecido adjacente ao tumor, quando comparado com uma amostra de tecido sem câncer.

Os dados dos perfis de expressão do *hsa-miR-221* em cânceres de cabeça e pescoço (HNSCC) mostraram sua relação com a oncogenese e invasão celular. Além disso, a hiperexpressão do *hsa-miR-221* aumentou a proliferação, crescimento e migração celular e, portanto, estaria envolvido na tumorigenese de CCEO. Conseqüentemente, estes marcadores poderiam ser úteis na definição de estratégias de prevenção e tratamento em cânceres de HNSCC (Avisar *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Wald *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Assim como os nossos resultados que mostraram o envolvimento do *hsa-miR-221* no processo de carcinogênese do CCEO.

O *hsa-miR-135b* encontra-se hiperexpresso em cânceres como o de pulmão (Lin *et al.*, 2013), cervical (Xu *et al.*, 2015), gástrico (Vidal *et al.*, 2016) e coloretal (Li *et al.*, 2015). No câncer de pulmão atua como oncomiR e promove o crescimento tumoral, invasão celular, contribui para a angiogênese e metástase, assim, sugere-se que desempenha um papel importante em múltiplos processos do desenvolvimento ao câncer (Matsuyama *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013). A expressão de *hsa-miR-135b* até o presente estudo não foi descrita no CCEO, portanto esta é a primeira evidência de sua participação no CCEO.

O *hsa-miR-29c* age como um Ts-miR por sua expressão reduzida em alguns cânceres como o gástrico (Vidal *et al.*, 2016), fígado (Wang *et al.*, 2015), hepatocelular (Bae *et al.*, 2014) e o de pulmão metastático (Wang *et al.*, 2013). No entanto, nossos resultados mostraram uma hiperexpressão do *hsa-miR-29c* no CCEO o que corrobora os resultados de

outro estudo que relaciona a expressão deste miRNA ao CCEO, (Serrano *et al.*, 2012) que observou que a hiperexpressão de *hsa-miR-29c*.

A análise conjunta dos resultados de expressão dos *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-29c* em amostras de tecidos sem câncer, adjacente e CCEO, mostraram de forma inequívoca a observação do efeito de campo de cancerização na carcinogênese oral por uma abordagem epigenética. Assim como, foi possível identificar biomarcadores potenciais do processo de adoecimento envolvido no CCEO.

Referências

- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. (2003). A uniform system for miRNA annotation. *RNA*. 9 (3):277-9
- Avissar, B. C. Christensen, K. T. Kelsey, and C. J. Marsit, “MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 8, pp. 2850–2855, 2009.
- Bae HJ, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Jung KH, Kim MG, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2014;33:2557–67.
- Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, et al: Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 2009, 18:4818-4829.
- Darnet, Sylvain ; MOREIRA, F. C. ; HAMOY, Igor Guerreiro ; BURBANO, Rommel Mario Rodriguez ; KHAYAT, A. S. ; CRUZ, ALINE ; MAGALHAES, L. L. ; SILVA, Artur Luiz da Costa da ; SANTOS, Sidney e B ; SAMIA DEMACKHI ; Assumpção, M.B. ; Assumpção, Paulo ; RIBEIRO-DOS-SANTOS, ANDREA . High-Throughput Sequencing of miRNAs Reveals a Tissue Signature in Gastric Cancer and Suggests Novel Potential Biomarkers. *Bioinformatics and Biology Insights*, v. 9, p. 1-8, 2015.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 2014; 9:287–314. Epub 2013/10/02. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715 PMID:24079833.
- Fabris L1, Berton S1,2, Citron F1, D'Andrea S1, Segatto I1, Nicoloso MS1,3, Massarut S4, Armenia J1, Zafarana G2, Rossi S3, Ivan C3, Perin T5, Vaidya JS6, Avanzo M7, Roncadin M8, Schiappacassi M1, Bristow RG2, Calin G3, Baldassarre G1, Belletti B1. Radiotherapy-induced miR-223 prevents relapse of breast cancer by targeting the EGF pathway. *Oncogene*. 2016 Feb 15. doi: 10.1038/onc.2016.23.
- Farazi TA1, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):102-15. doi: 10.1002/path.2806. Epub 2010 Nov 18.

- Han M1, Wang F1, Gu Y1, Pei X1, Guo G1, Yu C2, Li L1, Zhu M1, Xiong Y1, Wang Y3. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- β pathways. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):73-80. doi: 10.3892/or.2015.4360. Epub 2015 Oct 29.
- Harding S, Sanipour F, Moss T. (2014) Existence of benefit finding and posttraumatic growth in people treated for head and neck cancer: a systematic review. *PeerJ.* Feb 11;2:e256. doi: 10.7717/peerj.256.
- He K1, Tong D2, Zhang S3, Cai D2, Wang L2, Yang Y2, Gao L4, Chang S2, Guo B2, Song T2, Li A1, Huang C2. miRNA-99b-3p functions as a potential tumor suppressor by targeting glycogen synthase kinase-3 β in oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cells. *Int J Oncol.* 2015 Oct;47(4):1528-36. doi: 10.3892/ijo.2015.3135. Epub 2015 Aug 27.
- Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell.* 2010 Jul 2;7(1):36-41.
- Kawakita A1, Yanamoto S, Yamada S, Naruse T, Takahashi H, Kawasaki G, Umeda M. MicroRNA-21 promotes oral cancer invasion via the Wnt/ β -catenin pathway by targeting DKK2. *Pathol Oncol Res.* 2014 Apr;20(2):253-61. doi: 10.1007/s12253-013-9689-y. Epub 2013 Sep 3.
- Li J, Liang H, Bai M, Ning T, Wang C, Fan Q, Wang Y, Fu Z, Wang N, Liu R, Zen K, Zhang CY, Chen X, Ba Y. miR-135b Promotes Cancer Progression by Targeting Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGFB2) in Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2015 Jun 10;10(6):e0130194. doi: 10.1371/journal.pone.0130194. eCollection 2015.
- Lin CW, Chang YL, Chang YC, Lin JC, Chen CC, Pan SH, Wu CT, Chen HY, Yang SC, Hong TM, Yang PC. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun.* s2013;4:1877. doi: 10.1038/ncomms2876.
- Liu CJ, LiuTY, KuoLT, et al. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2008;214: 489–497.
- Lupini L1, Bassi C, Ferracin M, Bartonicek N, D'Abundo L, Zagatti B, Callegari E, Musa G, Moshiri F, Gramantieri L, Corrales FJ, Enright AJ, Sabbioni S, Negrini M. miR-

221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Front Genet.* 2013 Apr 25;4:64. doi: 10.3389/fgene.2013.00064. eCollection 2013.

Manikandan M1, Deva Magendhra Rao AK1, Rajkumar KS2, Rajaraman R2, Munirajan AK1. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med.* 2015 Nov;44(10):792-800. doi: 10.1111/jop.12300. Epub 2014 Dec 8.

Matsuyama, H. et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 118, 6881–6892 (2011).

Moshiri F1, Callegari E2, D'Abundo L2, Corrà F2, Lupini L2, Sabbioni S3, Negrini M2. Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014 Winter;7(1):43-54.

Nouraei N1, Van Roosbroeck K, Vasei M, Semnani S, Samaei NM, Naghshvar F, Omidi AA, Calin GA, Mowla SJ. Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2013 Sep 10;8(9):e73009. doi: 10.1371/journal.pone.0073009. eCollection 2013.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT:c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005,435:839-843.

Ramdas L1, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck.* 2009 May;31(5):642-54. doi: 10.1002/hed.21017.

Ren LH1, Chen WX2, Li S2, He XY2, Zhang ZM3, Li M4, Cao RS2, Hao B2, Zhang HJ2, Qiu HQ5, Shi RH2. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4. *Br J Cancer.* 2014 Nov 11;111(10):2003-13. doi: 10.1038/bjc.2014.485. Epub 2014 Sep 11.

Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordóñez B, Grénman R, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-

21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2010 Sep 10;9:238. doi: 10.1186/1476-4598-9-238.

Ribeiro-dos-Santos, Ândrea; Khayat, André S. ; Silva, Artur ; ALENCAR, Dayse O. ; Lobato, Jessé ; Luz, Larissa ; Pinheiro, Daniel G. ; Varuzza, Leonardo ; Assumpção, Monica ; Assumpção, Paulo ; Santos, Sidney ; Zanette, Dalila L. ; Silva, Wilson A. ; Burbano, Rommel ; Darnet, Sylvain . Ultra-Deep Sequencing Reveals the microRNA Expression Pattern of the Human Stomach. *Plos One*, v. 5, p. e13205, 2010.

Serrano NA, Xu C, Liu Y, Wang P, Fan W, Upton MP, Houck JR, Lohavanichbutr P, Kao M, Zhao LP, Schwartz SM, Chen C, Méndez E. Integrative analysis in oral squamous cell carcinoma reveals DNA copy number-associated miRNAs dysregulating target genes. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Sep;147(3):501-8. doi: 10.1177/0194599812442490. Epub 2012 Apr 2.

Slaughter PD, Southwick HW and Smejkal W (1953) "'Field cancerization'" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin." *Cancer* 65: 963-968.

Silveira A, Gonçalves J, Sequeira T, Ribeiro C, Lopes C, Monteiro E, Pimentel FL. [Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives]. *Rev Bras Epidemiol*. 2012 Mar;15(1):38-48.

Sun Y1,2, Liu Y1, Cogdell D1, Calin GA3,4, Sun B2, Kopetz S5, Hamilton SR1, Zhang W1,4. Examining plasma microRNA markers for colorectal cancer at different stages. *Oncotarget*. 2016 Feb 4. doi: 10.18632/oncotarget.7196. [Epub ahead of print]

Takes RP , A. Rinaldo, C.E. Silver, M. Haigentz Jr., J.A. Woolgar, A. Triantafyllou et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects *Oral Oncol*, 48 (2012), pp. 775–779.

van den Berg, A. V. ; Magalhães, LL.; Vidal AF. ; Cruz, Aline M. P. ; Ribeiro-dos-Santos, Ândrea . MicroRNAs as Biomarkers of the Response to Treatment with ABVD Scheme in Hodgkin Lymphoma. *Journal of Leukemia*, v. 3, p. 1-6, 2016.

Varol N1, Konac E, Gurocak OS, Sozen S. The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep*. 2011 Feb;38(2):1079-89. doi: 10.1007/s11033-010-0205-0. Epub 2010 Jun 20.

- Vidal AF, Cruz AMP, Magalhães L, Pereira AL, Anaissi AKM, Alves NCF *et al.* *hsa-miR-29c and hsa-miR-135b* differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 14, 22(6).
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, *et al.*, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
- Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck*. 2011 Apr;33(4):504-12. doi: 10.1002/hed.21475.
- Wang C, Liu X, Huang H, Ma H, Cai W, Hou J, Huang L, Dai Y, Yu T, Zhou X. Deregulation of *Snai2* is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012 May 15;130(10):2249-58. doi: 10.1002/ijc.26226. Epub 2011 Aug 16.
- Wang H, Zhu Y, Zhao M, Wu C, Zhang P, Tang L, *et al.* miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin $\beta 1$ and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) *PLoS One*. 2013;8:e70192
- Wang B, Li D, Sidler C, Rodriguez-Juarez R, Singh N, Heyns M, Ilnytsky Y, Bronson RT, Kovalchuk O. A suppressive role of ionizing radiation-responsive miR-29c in the development of liver carcinoma via targeting *WIP1*. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):9937-50.
- Wang Y1, Zhu Y2, Lv P3, Li L4. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):4555-63. eCollection 2015.
- Xu XM, Qian JC, Deng ZL, Cai Z, Tang T, Wang P, Zhang KH, Cai JP. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2012 Aug;4(2):339-345. Epub 2012 May 14.
- Xu Y, Zhao S, Cui M, Wang Q. Down-regulation of microRNA-135b inhibited growth of cervical cancer cells by targeting *FOXO1*. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep 1;8(9):10294-304. eCollection 2015.
- Yang CC, Hung PS, Wang PW, *et al.* miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011;40:397-404.

- Yen YC, Shiah SG, Chu HC, et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer* 2014;**13**:6.
- Yi, J.S. Kim, J.H. Lee, S.H. Choi, S.Y. Nam, S.Y. Kim et al. 18F-FDG PET/CT for detecting distant metastases in patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma *J Surg Oncol*, 106 (2012), pp. 708–712.
- Yu T1, Wang XY, Gong RG, Li A, Yang S, Cao YT, Wen YM, Wang CM, Yi XZ. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 May 13;28:64. doi: 10.1186/1756-9966-28-64.
- Zhou X1, Ren Y2, Liu A3, Han L4, Zhang K4, Li S3, Li P5, Li P3, Kang C4, Wang X6, Zhang L3. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2014.

2. Capítulo II

Este capítulo é a versão original do manuscrito “Sequenciamento massivo de microRNAs revela novos biomarcadores em câncer oral”. Artigo em preparação para submissão na Revista Dental Reasearch (ISSN: 9999-999x).

Sequenciamento massivo de alto desempenho de microRNAs revela novos biomarcadores em câncer oral.

Lopes CB¹; Teófilo CR², Alves APNN², Montenegro RC³, Sandoval GT¹, Ribeiro-dos-Santos, AKC¹

¹Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

³Departamento de Clínica Odontológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará.

⁴Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Correspondence: Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro-dos-Santos - Universidade Federal do Pará – UFPA, Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Genética Humana e Médica. Av. Augusto Corrêa, 01 – Guamá, 66.075-970 – Belém (PA), Brazil
Phone/Fax: +55 91 32017843. e-mail: akelyufpa@gmail.com / andrea.santos@pq.cnpq.br.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo e possui um caráter agressivo e de alta mortalidade. Os microRNAs (miRNAs) são um grande grupo de genes reguladores que desempenham um papel crítico na tumorigênese e a modificação de sua expressão tem sido implicado na carcinogênese de vários cânceres. Para a construção e análise dos perfis de expressão de miRNAs no CCEO, assim como explorar a participação no desenvolvimento e progressão do CCEO, aplicamos o sequenciamento massivo de alto desempenho utilizando amostras de tecido de CCEO e sem câncer. Observou-se 17 miRNAs diferencialmente expressos, os quais foram capazes de discriminar o tecido CCEO do sem câncer. Além disso, encontramos sete novos miRNAs (*hsa-let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* e *hsa-miR-941*), os quais não apresentam relato na literatura de suas participações no CCEO. Os resultados revelaram que esses miRNAs são potenciais biomarcadores de ocorrência no CCEO com a capacidade de identificar indivíduos com maior risco de desenvolver este câncer, e indicam sua utilidade como possíveis alvos terapêuticos.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo com e a causa de mais de 400.000 mortes/anuais relacionadas ao câncer, dos quais 80% dos óbitos ocorrem em países em desenvolvimento. A taxa de incidência de CCEO é crescente principalmente nos indivíduos jovens (Johnson *et al.*, 2011). O CCEO representa 90% das neoplasias na cavidade oral e caracteriza-se por um padrão de crescimento agressivo, invasivo e que se dissemina para os gânglios linfáticos cervicais (Kim *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços das pesquisas no diagnóstico e tratamento do CCEO, a taxa de sobrevivência de 50% em cinco anos não sofreu grandes alterações nas últimas três décadas (Jemal *et al.*, 2010; Majchrzak *et al.*, 2014). Fato atribuído pela complexidade anatômica e etiológica, o que dificulta a escolha da abordagem terapêutica mais adequada, assim como de técnicas mais eficazes para o seu diagnóstico (Périé *et al.*, 2014; Baxi *et al.*, 2014). Na maioria dos casos, o CCEO é de caráter mutilador, pois provoca sequelas irreversíveis na fala, respiração e deglutição, comprometendo a saúde, autoimagem e como consequência o isolamento social. Portanto, é o tipo de malignidade mais traumática e com maior impacto na qualidade de vida do paciente (Silveira *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes (18-25 nucleotídeos), de fita dupla que pertencem a uma longa família altamente conservada (Ambros, 2004; O'Donnell *et al.*, 2005; Ivey and Srivastava, 2010). A desregulação da expressão de miRNAs contribui para a manifestação de algumas doenças, dentre elas, o câncer (Yanaihara *et al.*, 2006; Calin *et al.*, 2006; Farazi *et al.*, 2011), uma vez que participa da oncogênese, desencadeando o aumento da proliferação celular, evasão à apoptose e aumento do potencial metastático das células afetadas, assim, favorecendo a progressão e invasão tumoral (Di Leva *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2015).

De acordo com banco de dados miRTarBase (<http://mirbase.org/>), o número de miRNAs conhecidos é de 3.786 miRNAs e em média 3.000 estão associados a cânceres (<http://mircancer.ecu.edu>). Para o CCEO, cerca de 60 miRNAs, incluindo *hsa-miR-21*, *hsa-miR-138*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-205*, e *hsa-miR-155*, estão hiperexpressos ou hipoexpressos (Chen *et al.*, 2013; Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015; Han *et*

al., 2016). Análise da expressão global destes miRNAs reportam que os mesmo podem agir como oncomiRs, os quais estão constantemente regulados positivamente em alguns tipos de cânceres, enquanto em outros, os miRNAs podem ser supressores tumorais (TS-miR) e tem sua expressão reuzida (Di Leva *et al.*, 2014).

A análise comparativa de miRNAs entre tecidos com câncer e sem câncer pode revelar marcadores de diagnóstico ou de alvos terapêuticos (Ramdas *et al.*, 2009). Estes perfis podem ser utilizados para classificação, determinação do estágio e da progressão do câncer, bem como para prognósticos e respostas ao tratamento (Calin *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2012; Streppel *et al.*, 2013).

A literatura mostra a participação dos miRNAs e os seus RNAs mensageiros alvos na iniciação e progressão do CCEO (Tran *et al.*, 2010; Sethi *et al.*, 2014, Avissar *et al.*, 2009; Cervigne *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2016). Assim como, na correlação com suas características e resultados clínicos (Chang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012; Shiiba *et al.*, 2013; Yen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Siow *et al.*, 2014).

Com o objetivo de carcterizar o perfil de expressão dos miRNAs associados a CCEO foi realizado o miRnoma por meio da plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho em amostras de tecidos sem e com CCEO.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização das amostras e aspectos éticos

O presente estudo foi composto por 16 amostras distribuídas em dois grupos: (i) Dez amostras de tecidos de pacientes com CCEO, congeladas e armazenadas em *RNAlater* (Ambion, TX, USA); (ii) Seis amostras de tecidos gengivais sem inflamação e sem câncer de pacientes voluntários, submetidos à exodontia do 3º molar, seguido de armazenagem em *RNAlater*.

Todos os procedimentos da pesquisa foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinki e do Código de Nuremberg, obedecendo as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde, respeitando as normas éticas e os direitos dos pacientes.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 77/09. Os dados foram coletados após esplanção da pesquisa e da assinatura dos pacientes ao termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras foram obtidas de paciente atendidas na clínica odontológica da Universidade Federal do Ceará, no período de 2011 a 2015. As amostras foram coletadas em um tubo de 2 mL contendo *RNAlater* e armazenadas até o momento da extração de RNA.

Extração RNA total e quantificação

O RNA total foi extraído utilizando o TRIzol® reagent (Invitrogen), diluído em água DEPC e armazenado a -80°C. A quantificação e qualidade do RNA total foram determinadas no equipamento Qubit®2.0 (Life Technologies, Foster City, CA, US) e plataforma Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, USA) usando os kit Qubit RNA BR Assay (Life Technologies, Foster City, CA, US) e RNA ScreenTape (© Agilent Technologies, USA), respectivamente.

Construção de bibliotecas e Sequenciamento massivo em plataforma de alto desempenho

Para a construção das bibliotecas utilizamos uma concentração de 1µg/5µL de cada amostra e o kit TruSeq Small RNA Library Preparation (Illumina®, Inc, USA) segundo as instruções do fabricante. O pool de bibliotecas foi quantificado no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystem, CA, USA) usando o KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Woburn, MA). Após a quantificação as amostras foram diluídas a uma concentração de 4 nM para serem adicionadas ao MiSeq Reagent Kit v3 150 cycle (Illumina®, Inc, USA) e levadas para o sequenciamento na plataforma de sequenciamento massivo de alto desempenho MiSeq System (Illumina Inc, US).

Análise de dados

Após o sequenciamento, um pipeline de pré-processamento foi usado para filtrar reads de baixa qualidade, trinar os extremos 3' das sequencias obtidas (Trim / Filter – p:80% q:30) e para remover RNA contaminantes. Em seguida foi realizado o mapeamento com base nas sequências de referências do banco de dados de microRNAs (miRBase database, version 19.0; LC Sciences, Houston, TX, USA) mediante a ferramenta de alinhamento de sequências STAR (Dobin *et al.*, 2013). A contagem de microRNAs foi realizada com a ferramenta htseq-count e os resultados obtidos em reads foram analisados através do software estatístico R, utilizando o pacote *DESeq2* (Love *et al.*, 2014). Valores de *p adjusted* ≤ 0,05 e *fold change* > 2 foram considerados estatisticamente significativos.

Identificação *in silico* dos genes alvos

A predição dos genes alvos regulados pelos miRNAs detectados pelo sequenciamento foi realizado por três ferramentas: i) TargetCompare (lghm.ufpa.br/targetcompare); ii) miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>); iii) miRNAMap (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>). Somente foram considerados os genes alvos que compartilham mais de um miRNA e que estão envolvidos na carcinogenese oral.

RESULTADOS

Visão geral dos miRNAs do resultado de sequenciamento

Para revelar o perfil de expression dos miRNAs no CCEO, foram sequenciadas um total de 16 amostras (10 de tecido tumoral e 6 de tecido sem câncer). Nas 16 bibliotecas sequenciadas o número médio de single-end reads por milhão foi de 3.662.324.

Após aplicar o filtro para remover as reads de baixa qualidade (<30%), as reads resultantes foram alinhadas usando o algoritmo STAR, obtendo mais de 90% de reads mapeadas no genoma humano (hg19, GRCh37). A contagem de miRNAs foi realizada usando o algoritmo *htseq-count* (Anders *et al.*, 2015) e o banco de dados miRBase v.19. Verificamos que 503 miRNAs possuíram pelo menos 10 reads de expressão por amostra.

Para a análise de expressão diferencial foi usado o pacote DESeq2 no software estatístico R, e encontrado um total de 17 miRNAs diferencialmente expresos (*padj.* < 0.05 e FoldChange > 2), com uma culsterização e padrões de expressão altamente diferenciados entre os tecidos com CCEO e normais (Figura 1 e 2).

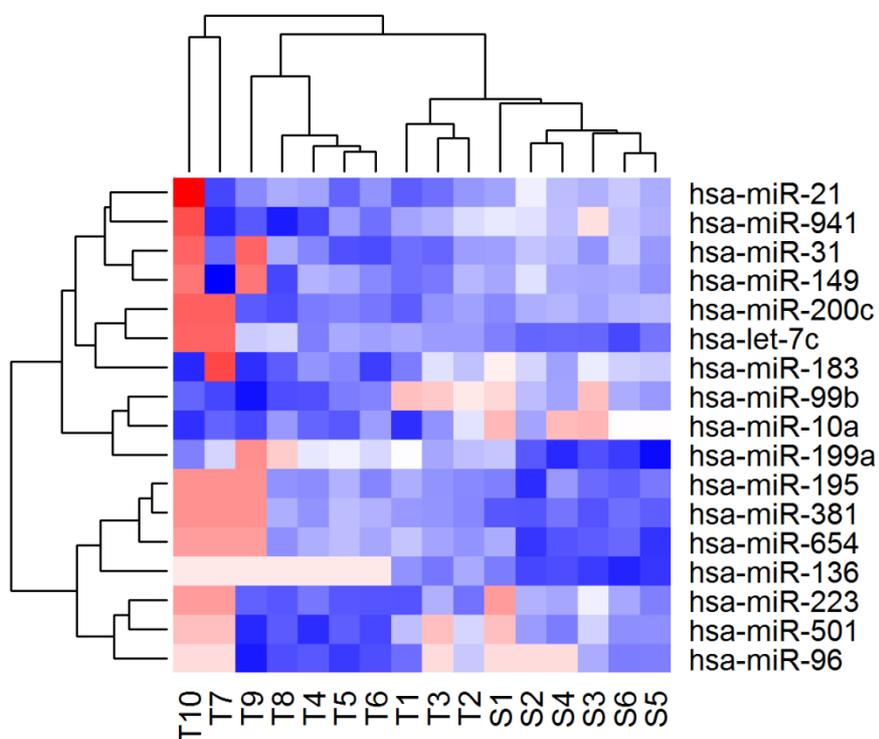


Figura 1. Heatmap em log10 da expressão normalizada (RPKM) de miRNAs diferenciados em tecido CCEO em comparação com o tecido sem câncer.

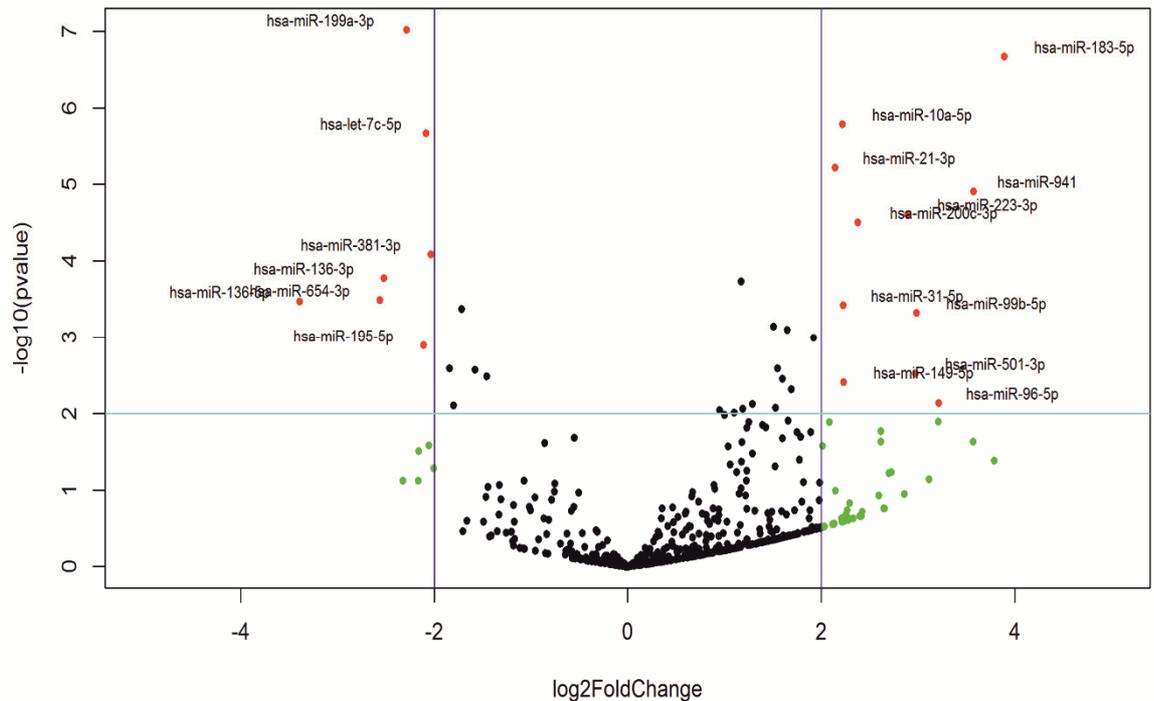


Figura 2. Perfil de expressão relativa de miRNAs em tecidos CCEO comparado com o sem câncer (os valores de log2FoldChange negativos representam os miRNAs hipoexpressos, o cor vermelha indica um $padj < 0,05$ e FoldChange > 2).

Expressão de miRNAs mensurados pelo sequenciamento e validados no CCEO

Dentre os resultados de miRNAs diferencialmente expressos, confrontamos com os miRNAs validados pela literatura para CCEO. Como resultado observou-se que dos 17 miRNAs, 10 já se encontravam descritos na literatura seja diretamente envolvido com a carcinogênese de CCEO ou em cânceres de cabeça e pescoço. Em nossos resultados encontramos a hiperexpressão em CCEO do *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-183*, *hsa-miR-200c* e *hsa-miR-223*. Enquanto que os miRNAs *hsa-miR-136* e *hsa-miR-195* foram hipoexpressos (Tabela 1).

Tabela 1. miRNAs diferencialmente expressos pelo sequenciamento e validados pela literatura para o CCEO.

MicroRNAs	log2FoldChange	Padj
<i>hsa-miR-136</i>	-3,3	0,0048
<i>hsa-miR-195</i>	-2,1	0,0119
<i>hsa-miR-21</i>	2,1	0,0002
<i>hsa-miR-31</i>	2,2	0,0050
<i>hsa-miR-149</i>	2,2	0,0269
<i>hsa-miR-200c</i>	2,3	0,0007
<i>hsa-miR-223</i>	2,8	0,0006
<i>hsa-miR-99b</i>	2,9	0,0055
<i>hsa-miR-96</i>	3,2	0,0468
<i>hsa-miR-183</i>	3,8	1,99E ⁻⁰⁵

Descoberta de novos miRNAs pelo Miseq sequencing

Nossos resultados detectaram sete miRNAs candidatos que não estavam descritos na literatura relacionados ao CCEO. Entre os resultados estatisticamente significante, observou-se a hipoexpressão de *let-7c*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, e *hsa-miR-654* e a hiperexpressão de *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-501*, e *hsa-miR-941* quando comparados com os dados de tecidos sem câncer (Figura 3).

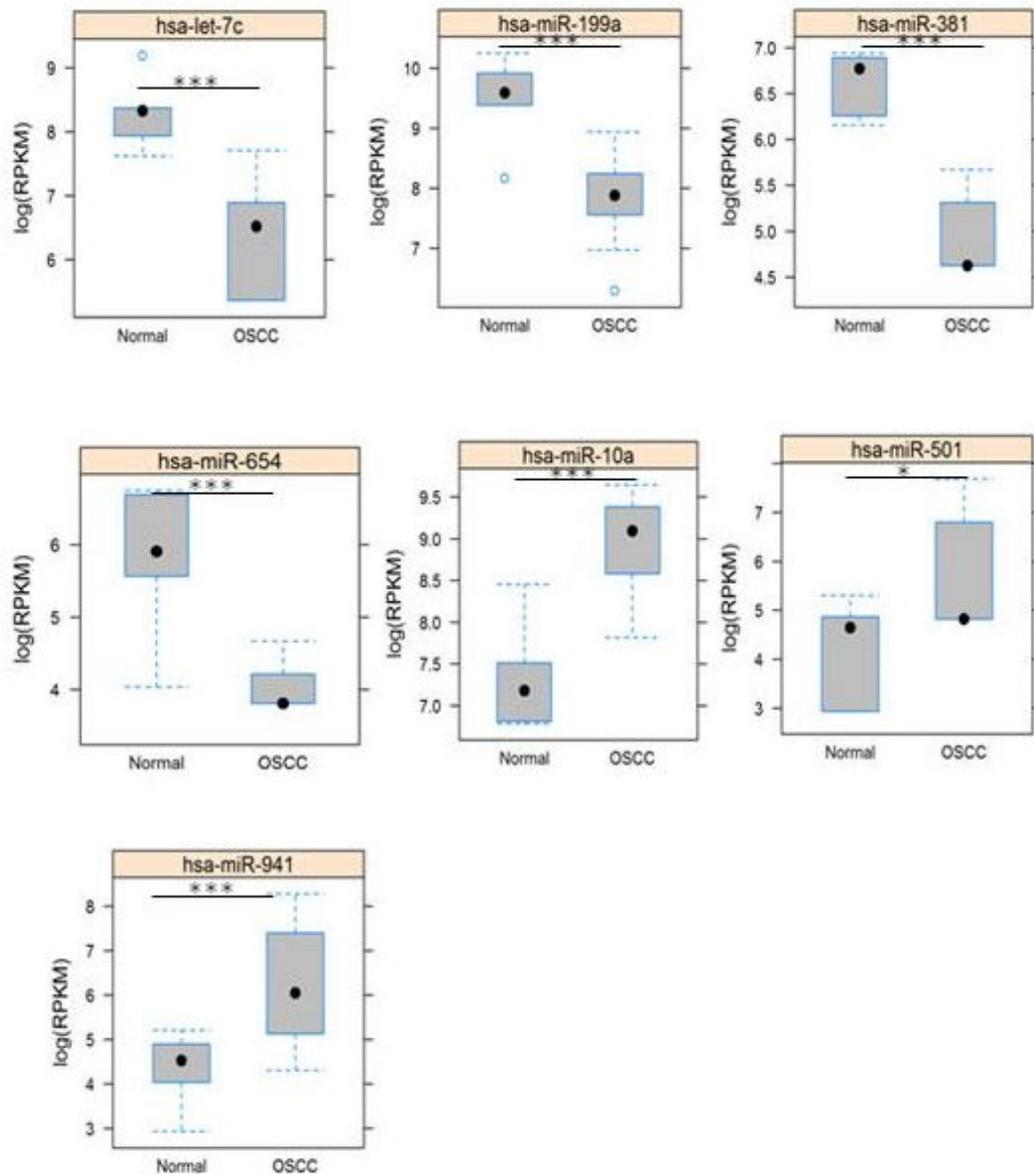


Figura 3. Boxplots dos miRNAs não correlatados na literatura, diferencialmente expressos entre entre CCEO tecido sem cancer.

Predição *in silico* dos genes alvos regulados pelos miRNAs detectados.

Para a predição dos genes alvos dos miRNAs envolvidos na carcinogênese oral (CCEO), e validados pelos nossos resultados e na literatura, utilizou-se três diferentes ferramentas (miRTarBase, TargetCompare, miRBase). Os genes selecionados

compartilhavam mais de um miRNA como alvo. Desta forma, identificamos 11 genes candidatos descritos na Tabela 2 e Figura 4.

Tabela 2. Genes alvos em comum dos miRNAs diferencialmente expressos em CCEO e validados pelo miR Tabase.

MicroRNAs	WEE1	MET	BCL2	CDKN1A	MTOR	IGF1R	IL6	BMI1	SNAI2	DICER1	VEGFA
<i>hsa-let-7c</i>						■	■			■	
<i>hsa-miR-10a</i>	■										
<i>hsa-miR-183</i>								■	■		
<i>hsa-miR-195</i>	■		■							■	■
<i>hsa-miR-21</i>			■								
<i>hsa-miR-223</i>						■	■				
<i>hsa-miR-654</i>				■							
<i>hsa-miR-136</i>			■								
<i>hsa-miR-199a</i>		■			■						
<i>hsa-miR-381</i>	■										
<i>hsa-miR-149</i>							■				
<i>hsa-miR-200c</i>		■	■					■			■
<i>hsa-miR-31</i>		■									
<i>hsa-miR-501</i>											
<i>hsa-miR-941</i>											
<i>hsa-miR-96</i>				■							
<i>hsa-miR-99b</i>					■				■		

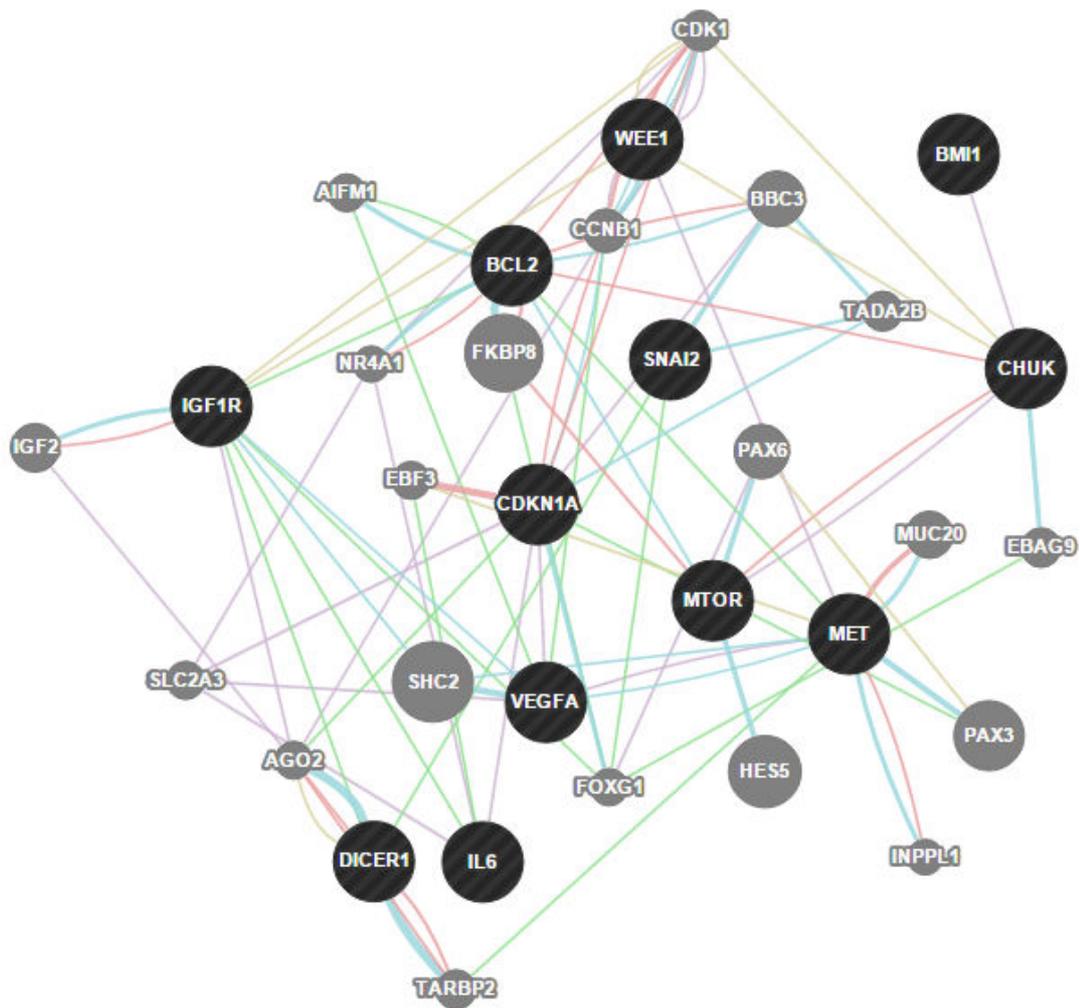


Figura 4. Interação gênica dos genes alvos que compartilharam mais de um miRNA como alvo e que participam da carcinogênese oral.

A predição dos genes alvos dos miRNAs identificados e relacionados ao CCEO, no presente estudo a partir da análise do algoritmo GeneOntology, observou que 8.1% participam de processos apoptóticos; 13.5% da regulação biológica; 21.6% de processos celulares; e 5.4% processos ligados ao sistema imune. Adicionalmente, os genes estavam envolvidos em processos biológicos como apoptose, angiogênese, proliferação celular, metástase e inflamação (Tabela 3).

Tabela 3. Lista dos genes alvos envolvidos na carcinogênese oral.

<i>Gene</i>	Expressão	Apoptose	Angiogênese	Proliferação celular	Inflamação	Metástase	Referências
<i>WEE1</i>	↓	●		●			Fumihiko <i>et al.</i> , 2012 Osman <i>et al.</i> , 2015
<i>MET</i>	↓			●		●	Zhao <i>et al.</i> , 2011; Lim <i>et al.</i> , 2014
<i>BCL2</i>	↑	●		●		●	de Sousa <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>MTOR</i>	↑			●		●	Naruse <i>et al.</i> , 2011; Vitale-Cross <i>et al.</i> , 2012
<i>IGF1R</i>	↑	●		●		●	Brady <i>et al.</i> , 2007; Yen <i>et al.</i> , 2014
<i>IL6</i>	↑		●		●	●	Shinriki <i>et al.</i> , 2011; Chih-Jung <i>et al.</i> , 2012
<i>BMI1</i>	↑	●		●		●	Häyry <i>et al.</i> , 2010; Li <i>et al.</i> , 2014
<i>SNAI2</i>	↑			●		●	Katafiasz <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>DICER1</i>	↑	●		●		●	Cantini <i>et al.</i> , 2014; Zeng <i>et al.</i> , 2014.
<i>VEGFA</i>	↑		●			●	Lin <i>et al.</i> , 2016; Sales <i>et al.</i> , 2016 .
<i>CHUK</i>	↑	●				●	Nakayama <i>et al.</i> , 2001; Maeda <i>et al.</i> , 2007.
<i>CDKN1A</i>	↑			●		●	Nagata <i>et al.</i> , 2015.

DISCUSSÃO

Utilizando a tecnologia dos sequenciadores de alto desempenho RNASeq (miRnoma), construímos perfis de expressão de miRNAs em CCEO. Ao analisar a expressão relativa ao conjunto de todos os miRNAs, verificou-se de forma significativa um perfil de hiperexpressão de *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-183*, *hsa-miR-200c*, *hsa-miR-223*, *hsa-miR-501* e *hsa-miR-941*, assim como a hipoexpressão de *hsa-let-7c*, *hsa-miR-136*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381* e *hsa-miR-654* em tecidos de CCEO, quando comparados com os tecidos sem câncer. Adicionalmente, 10 dos 17 miRNAs já haviam sido descritos na literatura ligado ao CCEO, o que corroborou os resultados observados.

O *hsa-miR-21* e *hsa-miR-31* são considerados oncomiRs, os quais encontram-se hiperexpresso em diversos cânceres incluindo o CCEO (Brito *et al.*, 2013; Hedbäck *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Kawakita *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Siao *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). A hiperexpressão do *hsa-miR-21* foi associada a progressão das desordens potencialmente malignas orais ao carcinoma, pobre prognóstico, proliferação, migração e invasão celular (Brito *et al.*, 2014; Hedbäck *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Kawakita *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2016). Dados da literatura mostram que o *hsa-miR-31* participa do processo inicial da carcinogese oral, assim como da transformação das desordens potencialmente malignas (Liu *et al.* 2012; Hung *et al.*, 2014; Hung *et al.*, 2016, Brito *et al.*, 2016). Nossos resultados concordaram com o perfil de hiperexpressão desses miRNAs (*hsa-miR-21* e *hsa-miR-31*) em amostras de CCEO.

O *hsa-miR-96* e *hsa-miR-183* pertencem à mesma família e compartilham o mesmo local de início da transcrição (CHR7: 129207158). Portanto, podem ser expressos de forma coordenada e desempenham um papel em conjunto durante a tumorigênese (Ozsolak *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2011; Ganci *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015). Nós observamos uma hiperexpressão de ambos os miRNAs com um *foldchange* maior que 2. Estes miRNAs tiveram expressão similares em outros estudos envolvendo CCEO (Santhi *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2016). Além disso, o *hsa-miR-96* teve participação no processo de proliferação celular durante o desenvolvimento craniofacial e dental (Gao *et al.*, 2015). Os estudos concluíram que estes miRNAs podem participar da tumorigênese de CCEO, controlando a proliferação celular e metástase.

De acordo com a literatura, o miRNA *hsa-miR-136* está envolvido na proliferação celular e desempenha diferentes papéis em vários tipos de células (Yang *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2015). No nosso resultado este miRNA foi encontrado hipoexpresso com um padrão altamente diferenciado entre os dois grupos de amostras (Figura 1), concordando com o observado no estudo de Momen-Heravi *et al.*, (2014) (Momen-Heravi *et al.*, 2014).

Os nossos dados demonstraram que o *hsa-miR-195* foi regulado negativamente no CCEO, o que corrobora o estudo de Jia *et al.*, (2013) que mostra o *hsa-miR-195* como um possível biomarcador de predição de prognóstico em pacientes com câncer de língua, assim como o estudo de Wong *et al.*, (2008) que evidenciou o mesmo perfil de expressão em câncer de língua.

A expressão elevada de *hsa-miR-223* foi observada em vários tipos de tumores sólidos, incluindo o câncer esofágico (Hu *et al.* 2014) e os cabeça e pescoço (Chen *et al.*, 2012, Hu *et al.*, 2015). Em nossa pesquisa, observamos a hiperexpressão do *hsa-miR-223*, também evidenciada no estudo de Lajer *et al.*, (2011). Além disso, este miRNA foi hiperexpresso no tecido gengival de pacientes com doença periodontal (Stoecklin-Wasmer *et al.*, 2012; Ogata *et al.*, 2014). Estes dados sugerem sua participação no processo inflamatório da carcinogênese oral.

Os miRNAs *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-149* e *hsa-miR-200c* foram hiperexpressos em nosso grupo de CCEO, contrastando com os perfis de expressão descritos na literatura - hipoexpressos (Wong *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2012; Zhang *et al.* 2014; He *et al.*, 2015; Jamali *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016). Esta discrepância pode ser explicada pelas diferentes populações estudadas, já que estes estudos são provenientes de populações asiáticas. Adicionalmente, infecções causadas por patógenos podem modular o sistema imune e, assim, desencadear padrões distintos de expressão.

Nós identificamos o perfil de expressão diferencial de sete novos miRNAs: *let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* e *hsa-miR-941* relacionados ao CCEO. Apesar de nunca terem sido relacionados com CCEO na literatura internacional, participam da carcinogênese de outros cânceres (Liu *et al.*, 2014; Streppel *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015). Os resultados do presente estudo sugere a existência de perfis de miRNAs relacionados ao câncer, como o CCEO, que ainda não foram descritos. Portanto, estudos mais amplos (de varredura) com throughput elevado, que utilizem tecnologia de seqüenciamento de nova geração (NGS)

são mais adequados para caracterizar perfis de expressão de todos os microRNAs envolvidos no processo da carcinogênese oral, assim como são mais indicados para a identificação de novos biomarcadores.

Independentemente, a averiguação de *let-7c*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-199a* e *hsa-miR-381* no CCEO, parece coerente, uma vez que foram descritos em processos inflamatórios da cavidade oral com o mesmo perfil de expressão (Ogata *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Adicionalmente, o *hsa-miR-199a* teve participação na carcinogênese do CCEO em modelo animal (Yu *et al.*, 2009). Esses dados reforçam que esses miRNAs podem ser novos biomarcadores em potencial implicados na tumorigênese oral.

A predição dos genes alvos dos miRNAs observados e relacionados ao CCEO, identificou 11 genes que participam da carcinogênese oral. Tais genes compartilham mais de um miRNA e participam dos processos biológicos relacionado ao câncer. Os genes *WEE1*, *BCL2* e *IL-6* foram alvos de mais de três miRNAs.

O gene *WEE1* foi alvo de três miRNAs o *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-195* e *hsa-miR-195*. *WEE1* atua na mitose na transição da fase G2 para M por proteção de *CDK1*, regula o crescimento de células tumorais e metástases, além de desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência à droga nas células tumorais. No CCEO, quando hiperexpressa aumenta a proliferação celular e diminuída o processo da apoptose (McCarthy, 2012; Fumihiko *et al.*, 2012, Osman *et al.*, 2015).

O *BCL2* compartilhou quatro miRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-136*, *hsa-miR-195* e *hsa-miR-200c*. O *BCL2* é uma das principais proteínas reguladoras da apoptose e confere uma vantagem de sobrevivência às células, protegendo-os da morte apoptótica. Vários estudos de histopatológicos e microarray em tecidos CCEO relatam a expressão anormal dos membros da família *BCL2* e sugeriram que estes fatores são marcadores de prognósticos (Coutinho-Camillo *et al.*, 2010; Rhamani *et al.*, 2012; Khan and Bisen, 2013; Coutinho-Camillo *et al.*, 2015).

Verificamos que *IL-6* é regulada pelos miRNAs *hsa-let-7c*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-223*. A participação da *IL-6* no CCEO foi elucidada por Jeng *et al.* (2003) o qual verificou que esta interleucina afeta a inflamação da mucosa oral e o crescimento de células epiteliais orais. Adicionalmente, *IL-6* participa da invasão celular e angiogênese (Fang *et al.*, 2015), além de ser um biomarcador importante no diagnóstico e prognóstico de CCEO (Lotfi *et al.*, 2015).

O sequenciamento de alto rendimento demonstrou um conjunto de miRNAs diferencialmente expressos no CCEO, proporcionando uma assinatura neste tecido tumoral. Além disso, foram identificados biomarcadores potenciais (*hsa-miR-21*, *hsa-miR-31*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-136*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-183*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-200c* e *hsa-miR-223*) já validados pela literatura e envolvidos na carcinogênese oral, assim como de novos potenciais marcadores (*hsa-let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* e *hsa-miR-941*) que ainda não foram relacionados diretamente com o CCEO. Estes resultados abrem novas perspectivas de aplicações clínicas e sugerem que alterações na expressão desses miRNAs podem desempenhar papéis no desenvolvimento e progressão do CCEO.

Referências

- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. (2003). A uniform system for miRNA annotation. *RNA*. 9 (3):277-9
- Anders S, Pyl PT1, Huber W1. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25.
- Avissar, B. C. Christensen, K. T. Kelsey, and C. J. Marsit, "MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 8, pp. 2850–2855, 2009.
- Brady G, Crean SJ, Naik P, Kapas S. Upregulation of IGF-2 and IGF-1 receptor expression in oral cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2007 Oct;31(4):875-81.
- Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. (2014) Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. May 15;120(10):1507-13. doi: 10.1002/cncr.28588. Epub 2014 Feb 22.
- Brito JA, Gomes CC, Guimarães AL, Campos K, Gomez RS. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2014 Mar;43(3):211-6. doi: 10.1111/jop.12112. Epub 2013 Sep 11.
- Brito BL, Lourenço SV3, Damascena AS1, Kowalski LP4, Soares FA2,3, Coutinho-Camillo CM1,2. Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and

- oropharynx squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016 Feb 3. doi: 10.1111/jop.12424.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). *Oncogene* 25, 6202–6210.
- Cantini LP, Andino LM, Attaway CC, Butler B, Dumitriu A, Blackshaw A, Jakymiw A1. Identification and characterization of Dicer1e, a Dicer1 protein variant, in oral cancer cells. *Mol Cancer*. 2014 Aug 13;13:190. doi: 10.1186/1476-4598-13-190.
- Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, et al: Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 2009,18:4818-4829.
- Chang KW, Liu CJ, Chu TH, et al. Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J Dent Res* 2008;**87**:1063–1068.
- Chen Z1, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, Liu X, Zhou X. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Aug;48(8):686-91. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.020. Epub 2012 Mar 17.
- Chen, D.R.J. Cabay, Y. Jin, A. Wang, Y. Lu, M. Shah-Khan, et al. MicroRNA deregulations in head and neck squamous cell carcinomas *J Oral Maxillofacial Res*, 4 (1) (2013), p. e2.
- Chih-Jung Chen, Wen-Wei Sung,1,2,5 Yueh-Min Lin,3,4 Mu-Kuan Chen,5,6 Ching-Hsiao Lee,4 Huei Lee, Kun-Tu Yeh and Jiunn-Liang Ko. Gender Difference in the Prognostic Role of Interleukin 6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2012; 7(11).
- Coutinho-Camillo CM1, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2010 Aug;57(2):304-16. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03621.x.
- Coutinho-Camillo CM1, Lourenço SV2, de Araújo Lima L3, Kowalski LP4, Soares FA5. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet*. 2015 Jul-Aug;208(7-8):382-9. doi: 10.1016/j.cancergen.2015.04.004. Epub 2015 Apr 17.

- De Sousa FA1, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2009 Oct;13(5):308-12. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2009.06.001. Epub 2009 Jul 10.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 2014; 9:287–314. Epub 2013/10/02. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715PMID:24079833.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;14:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Fang WY, Chen YW2, Hsiao JR3, Liu CS4, Kuo YZ1, Wang YC5, Chang KC4, Tsai ST3,6, Chang MZ3, Lin SH2, Wu LW2. Elevated S100A9 expression in tumor stroma functions as an early recurrence marker for early-stage oral cancer patients through increased tumor cell invasion, angiogenesis, macrophage recruitment and interleukin-6 production. *Oncotarget*. 2015 Sep 29;6(29):28401-24. doi: 10.18632/oncotarget.4951.
- Farazi TA1, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):102-15. doi: 10.1002/path.2806. Epub 2010 Nov 18.
- Gao S1, Moreno M2, Eliason S2, Cao H1, Li X2, Yu W2, Bidlack FB3, Margolis HC4, Baldini A5, Amendt BA6. TBX1 protein interactions and microRNA-96-5p regulation controls cell proliferation during craniofacial and dental development: implications for 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015 Apr 15;24(8):2330-48. doi: 10.1093/hmg/ddu750. Epub 2015 Jan 2.
- Ganci F1, Sacconi A1, Mancio V2, Sperduti I3, Battaglia P4, Covello R5, Muti P6,7, Strano S8, Spriano G2, Fontemaggi G1, Blandino G1. MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2014 Dec 22.
- Han M1, Wang F1, Gu Y1, Pei X1, Guo G1, Yu C2, Li L1, Zhu M1, Xiong Y1, Wang Y3. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- β pathways. *Oncol Rep*. 2016 Jan;35(1):73-80. doi: 10.3892/or.2015.4360. Epub 2015 Oct 29.

- Harding S, Sanipour F, Moss T. (2014) Existence of benefit finding and posttraumatic growth in people treated for head and neck cancer: a systematic review. *PeerJ*. Feb 11;2:e256. doi: 10.7717/peerj.256.
- Häyry V1, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):892-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605544. Epub 2010 Feb 9.
- He K1, Tong D2, Zhang S3, Cai D2, Wang L2, Yang Y2, Gao L4, Chang S2, Guo B2, Song T2, Li A1, Huang C2. miRNA-99b-3p functions as a potential tumor suppressor by targeting glycogen synthase kinase-3 β in oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cells. *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1528-36. doi: 10.3892/ijo.2015.3135. Epub 2015 Aug 27.
- Hedbäck N, Jensen DH1, Specht L2, Fiehn AM3, Therkildsen MH3, Friis-Hansen L4, Dabelsteen E5, von Buchwald C1. MiR-21 expression in the tumor stroma of oral squamous cell carcinoma: an independent biomarker of disease free survival. *PLoS One*. 2014 Apr 22;9(4):e95193. doi: 10.1371/journal.pone.0095193. eCollection 2014.
- Hu A, Huang JJ2, Xu WH1, Jin XJ3, Li JP3, Tang YJ4, Huang XF4, Cui HJ4, Sun GB5, Li RL2, Duan JL2. MiR-21/miR-375 ratio is an independent prognostic factor in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1775-85. eCollection 2015.
- Huang WC, Chan SH, Jang TH, et al. miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2014;74:751–764.
- Hung PS, Tu HF, Kao SY, Yang CC, Liu CJ, Huang TY, Chang KW, Lin SC. miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis* 2014. May;35(5):1162-71. doi: 10.1093/carcin/bgu024. Epub 2014 Jan 30.
- Hung KF, Liu CJ2, Chiu PC3, Lin JS2, Chang KW4, Shih WY4, Kao SY5, Tu HF6. MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncol*. 2016 Feb;53:42-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.017. Epub 2015 Dec 7.

- Huang DH, Wang GY², Zhang JW², Li Y², Zeng XC³, Jiang N⁴. MiR-501-5p regulates CYLD expression and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Aug;45(8):738-44. doi: 10.1093/jjco/hyv063. Epub 2015 Apr 27.
- Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):36-41.
- Jamali Z¹, Asl Aminabadi N², Attaran R¹, Pournagiazar F³, Ghertasi Oskouei S⁴, Ahmadpour F. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2015 Apr;51(4):321-31. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.01.008. Epub 2015 Feb 9.
- Jemal A¹, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Jul-Aug;59(4):225-49. doi: 10.3322/caac.20006. Epub 2009 May 27.
- Jia LF¹, Wei SB, Gong K, Gan YH, Yu GY. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e56634. doi:10.1371/journal.pone.0056634. Epub 2013 Feb 22.
- Jeng JH¹, Wang YJ, Chiang BL, Lee PH, Chan CP, Ho YS, Wang TM, Lee JJ, Hahn LJ, Chang MC. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E₂, interleukin-6 and TNF-alpha production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis*. 2003 Aug;24(8):1301-15. Epub 2003 May 22.
- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000*. 2011; 57:19-37.
- Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, Dimba E, Chindia M, Otoh EC, Sankaranarayanan R, Califano J, Kowalski L. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Adv Dent Res*. 2011; 23:237-246.
- Johnson J¹, Miller DL², Jiang R³, Liu Y¹, Shi Z¹, Tarwater L¹, Williams R⁴, Balsara R⁵, Sauter ER⁶, Stack MS⁷. Protease Activated Receptor-2 (PAR-2)-Mediated Nf-κB Activation Suppresses Inflammation-Associated Tumor Suppressor MicroRNAs in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Biol Chem*. 2016 Feb 2. pii: jbc.M115.692640.

- Katafiasz D, Smith LM, Wahl JK 3rd. Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adh Migr*. 2011 Jul-Aug;5(4):315-22. Epub 2011 Jul 1.
- Kawakita A1, Yanamoto S, Yamada S, Naruse T, Takahashi H, Kawasaki G, Umeda M. MicroRNA-21 promotes oral cancer invasion via the Wnt/ β -catenin pathway by targeting DKK2. *Pathol Oncol Res*. 2014 Apr;20(2):253-61. doi: 10.1007/s12253-013-9689-y. Epub 2013 Sep 3.
- Khan Z1, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1836(1):123-45. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.04.002. Epub 2013 Apr 17.
- Kim SY, Nam SY, Choi SH, Cho KJ, Roh JL. Prognostic value of lymph node density in node-positive patients with oral squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18:2310–2317.
- Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E, Rossing M, Specht L, Therkildsen MH, Nauntofte B, Dabelsteen S, von Buchwald C. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):830-40.
- Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang P, Song E. *Clin Cancer Res*. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. 2009 Jun 15;15(12):3998-4008. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3053. Epub 2009 Jun 9.
- Li Z1, Wang Y1, Yuan C2, Zhu Y3, Qiu J3, Zhang W4, Qi B4, Wu H5, Ye J5, Jiang H5, Yang J5, Cheng J6. Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer. *Lab Invest*. 2014 Dec;94(12):1431-45. doi: 10.1038/labinvest.2014.123. Epub 2014 Oct 6.
- Lim YC1, Han JH, Kang HJ, Kim YS, Lee BH, Choi EC, Kim CH. Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Nov;48(11):1114-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.013. Epub 2012 Jun 14.
- Lin CC1, Chen PC2,3, Lein MY2,4, Tsao CW2, Huang CC5, Wang SW6, Tang CH2, Tung KC1. WISP-1 promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by inhibiting miR-300 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget*. 2016 Jan 25.

- Liang Y1, Zhao Q1, Fan L1, Zhang Z1, Tan B1, Liu Y1, Li Y2. Down-regulation of MicroRNA-381 promotes cell proliferation and invasion in colon cancer through up-regulation of LRH-1. *Biomed Pharmacother.* 2015 Oct;75:137-41. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.020. Epub 2015 Aug 28.
- Liu CJ1, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012 Feb;34(2):219-24. doi: 10.1002/hed.21713. Epub 2011 Apr 15.
- Liu Z, Long X, Chao C, Yan C, Wu Q, Hua S, Zhang Y1, Wu A, Fang W. Knocking down CDK4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2014 Apr 21;14:274. doi: 10.1186/1471-2407-14-274.
- Lotfi A1, Shahidi N2, Bayazian G3, AbdollahiFakhim S2, Estakhri R4, Esfahani A1, Notash R2. Serum Level of Interleukin-6 in Patients with Oral Tongue Squamous cell Carcinoma. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2015 May;27(80):207-11.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
- Lu WC1, Kao SY2, Yang CC3, Tu HF4, Wu CH2, Chang KW3, Lin SC3. EGF up-regulates miR-31 through the C/EBP β signal cascade in oral carcinoma. *PLoS One.* 2014 Sep 17;9(9):e108049. doi: 10.1371/journal.pone.0108049. eCollection 2014.
- Maeda G1, Chiba T, Kawashiri S, Satoh T, Imai K. Epigenetic inactivation of IkappaB Kinase-alpha in oral carcinomas and tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5041-7.
- Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, Sowka M, Golusinski P, Malicki J, Golusinski W. (2014) Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol.* 2014 Jan 22;48(1):1-10.
- Manikandan M1, Deva Magendhra Rao AK1, Rajkumar KS2, Rajaraman R2, Munirajan AK1. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med.* 2015 Nov;44(10):792-800. doi: 10.1111/jop.12300. Epub 2014 Dec 8.

- McCarthy DJ1, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 2012 May;40(10):4288-97. doi: 10.1093/nar/gks042. Epub 2012 Jan 28.
- Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ2, Kuo WP3, Cheng YS4. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res.* 2014 Jul;93(7 Suppl):86S-93S. doi: 10.1177/0022034514531018. Epub 2014 Apr 9.
- Nagata M1, Kurita H2, Uematsu K1, Ogawa S1, Takahashi K3, Hoshina H1, Takagi R1. Diagnostic value of cyclin-dependent kinase/cyclin-dependent kinase inhibitor expression ratios as biomarkers of locoregional and hematogenous dissemination risks in oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2015 Sep;3(5):1007-1013. Epub 2015 Jun 10.
- Nakayama H1, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2001 Dec 15;92(12):3037-44.
- Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, Mizuno A, Umeda M. Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 α pathway. *Anticancer Res.* 2011 Dec;31(12):4429-37.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT:c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*2005,435:839-843.
- Ogata Y, Matsui S, Kato A, Zhou L, Nakayama Y, Takai H. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. *J Oral Sci.* 2014 Dec;56(4):253-60.
- Osman AA, Monroe MM, Ortega Alves MV, Patel AA, Katsonis P, Fitzgerald AL, Neskey DM *et al.*. Wee-1 kinase inhibition overcomes cisplatin resistance associated with high-risk TP53 mutations in head and neck cancer through mitotic arrest followed by senescence. *Mol Cancer Ther.* 2015 Feb;14(2):608-19.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008 Nov 15; 22(22):3172-83.
- Périé S, Meyers M, Mazzaschi O, De Crouy Chanel O, Baujat B, Lacau St Guily J. (2014) Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer.* May 1;101(5):404-410.

- Rahmani A1, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(9):965-71. Epub 2012 Oct 20.
- Ramdas L1, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*. 2009 May;31(5):642-54. doi: 10.1002/hed.21017.
- Ren LH1, Chen WX2, Li S2, He XY2, Zhang ZM3, Li M4, Cao RS2, Hao B2, Zhang HJ2, Qiu HQ5, Shi RH2. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4. *Br J Cancer*. 2014 Nov 11;111(10):2003-13. doi: 10.1038/bjc.2014.485. Epub 2014 Sep 11.
- Sales CB1, Buim ME2, de Souza RO1, de Faro Valverde L3, Mathias Machado MC3, Reis MG1,3, Soares FA2, Ramos EA1,3, Gurgel Rocha CA. Elevated VEGFA mRNA levels in oral squamous cell carcinomas and tumor margins: a preliminary study. *J Oral Pathol Med*. 2016 Feb 10. doi: 10.1111/jop.12398.
- Santhi WS1, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S, Jissa VT, Sebastian P, Radhakrishna Pillai M. Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. *Oral Oncol*. 2013 Jun;49(6):567-75. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.01.001. Epub 2013 Feb 4.
- Sethi, A. Wright, H. Wood, and P. Rabbitts, "MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research," *European Journal of Cancer*, vol. 50, no. 15, pp. 2619–2635, 2014.
- Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, et al. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108:1817–1821.
- Shinriki S1, Jono H, Ueda M, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Oike Y, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Shinohara M, Ando Y. Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2011 Sep;225(1):142-50. doi: 10.1002/path.2935. Epub 2011 Jun 25.
- Silveira A, Gonçalves J, Sequeira T, Ribeiro C, Lopes C, Monteiro E, Pimentel FL. [Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives]. *Rev Bras Epidemiol*. 2012 Mar;15(1):38-48.

- Siow MY, Ng LP, Chong VK, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis* 2014;**20**:345–351.
- Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papapanou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res*. 2012 Oct;**91**(10):934-40. Epub 2012 Aug 9.
- Streppel MM1, Pai S, Campbell NR, Hu C, Yabuuchi S, Canto MI, Wang JS, Montgomery EA, Maitra A. MicroRNA 223 is upregulated in the multistep progression of Barrett's esophagus and modulates sensitivity to chemotherapy by targeting PARP1. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 1;**19**(15):4067-78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0601. Epub 2013 Jun 11.
- Tran N, Rose BR, O'Brien CJ. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck*. 2007; **29**:64–70.
- Tu HF1, Liu CJ, Chang CL, Wang PW, Kao SY, Yang CC, Yu EH, Lin SC, Chang KW. The association between genetic polymorphism and the processing efficiency of miR-149 affects the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2012;**7**(12):e51606. doi: 10.1371/journal.pone.0051606. Epub 2012 Dec 14.
- Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, Chen W, Schneider A, Gutkind JS. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Apr;**5**(4):562-73. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0502. Epub 2012 Mar 31.
- Wang C, Liu X, Huang H, Ma H, Cai W, Hou J, Huang L, Dai Y, Yu T, Zhou X. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012 May 15;**130**(10):2249-58. doi: 10.1002/ijc.26226. Epub 2011 Aug 16.
- Wang Y1, Zhu Y2, Lv P3, Li L4. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;**8**(5):4555-63. eCollection 2015.
- Wong TS1, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;**14**(9):2588-92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0666. May;**31**(5):2173-80. doi: 10.3892/or.2014.3114. Epub 2014 Mar 27.

- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011;102(3):522–9
- Yan Guo,¹ Mei-Si Ren,² Chao Shang,³ Li Zhu,¹ and Ming Zhong. MTSS1 gene regulated by miR-96 inhibits cell proliferation and metastasis in tongue squamous cellular carcinoma Tca8113 cell line . *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(9): 15441–15449.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). *Cancer Cell* 9, 189–198.
- Yang Y, Wu J, Guan H, Cai J, Fang L, Li J, Li M. MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012 Oct 19; 586(20):3608-12.
- Yen YC, Shiah SG, Chu HC, et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer* 2014;**13**:6.
- Yu T1, Wang XY, Gong RG, Li A, Yang S, Cao YT, Wen YM, Wang CM, Yi XZ. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 May 13;28:64. doi: 10.1186/1756-9966-28-64.
- Yu T., Wu Y., Helman J. I., Wen Y., Wang C., Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. **Molecular Cancer Research**. 2011;9(2):161–172. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-10-0386.
- Yu T1, Liu L1, Li J1, Yan M1, Lin H1, Liu Y1, Chu D1, Tu H1, Gu A2, Yao M1. MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):30239-50. doi: 10.18632/oncotarget.4972.
- Zeng S1, Yang J1, Zhao J1, Liu Q2, Rong M1, Guo Z1, Gao W1. Silencing Dicer expression enhances cellular proliferative and invasive capacities in human tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2014 Feb;31(2):867-73. doi: 10.3892/or.2013.2903.
- Zhang B1, Liu M, Tang HK, Ma HB, Wang C, Chen X, Huang HZ. The expression and significance of MRP1, LRP, TOPOII β , and BCL2 in tongue squamous cell

carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012 Feb;41(2):141-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01066.x. Epub 2011 Jul 28.

Zhang PP1, Wang XL1, Zhao W2, Qi B1, Yang Q1, Wan HY1, Shuang ZY3, Liu M1, Li X1, Li S4, Tang H5. DNA methylation-mediated repression of miR-941 enhances lysine (K)-specific demethylase 6B expression in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2014 Aug 29;289(35):24724-35. doi: 10.1074/jbc.M114.567818. Epub 2014 Jul 21.

Zhang D1, Wang J2, Wang Z3, Zhang T1, Shi P4, Wang X1, Zhao F1, Liu X1, Lin X1, Pang X1. miR-136 modulates TGF- β 1-induced proliferation arrest by targeting PPP2R2A in keratinocytes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:453518. doi: 10.1155/2015/453518. Epub 2015 Jan 14.

Zhang B, Lin T3, He H4. Comparative analysis of blood and saliva expression profiles in chronic and refractory periodontitis patients. *BMC Oral Health.* 2015 Dec 24;15(1):166. doi: 10.1186/s12903-015-0150-3.

Zhao D1, Wang SH, Feng Y, Hua CG, Zhao J, Tang XF. Intratumoral c-Met expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. *Hum Pathol.* 2011 Oct;42(10):1514-23. doi: 10.1016/j.humpath.2010.03.012. Epub 2011 Apr 29.

Zhou X1, Ren Y2, Liu A3, Han L4, Zhang K4, Li S3, Li P5, Li P3, Kang C4, Wang X6, Zhang L3. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2014.

III. DISCUSSÃO

O CCEO é um dos cânceres mais agressivos, com alta ocorrência de metástase e prognóstico ruim. Inúmeros estudos mostram a alteração no padrão de expressão de miRNAs envolvidos na carcinogênese oral. Assinaturas específicas de miRNAs identificados a partir de amostras de tumor de pacientes com câncer, podem revelar biomarcadores úteis na clínica, com potencial poder no diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos em CCEO. No presente estudo verificou-se a hiperexpressão de *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31*, *hsa-miR-96*, *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-183*, *hsa-miR-200c*, *hsa-miR-223*, *hsa-miR-501* e *hsa-miR-941*, assim como a hipoexpressão de *hsa-let-7c*, *hsa-miR-136*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, e *hsa-miR-654* em tecidos de CCEO comparados com os sem câncer. Além disso, podemos identificar um efeito de campo de cancerização com a hiperexpressão de *hsa-miR-21*, *hsa-miR-29c*, *hsa-miR-135b* e *hsa-miR-221*.

O *hsa-miR-21* mostra-se hiperexpresso no CCEO e, portanto, age como um oncomiR, o qual regula várias funções biológica em linhagens celulares provenientes de CCEO (Brito *et al.*, 2013; Hedbäck *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Kawakita *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Siao *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). Este padrão de expressão também foi observado em desordens potencialmente malignas orais, indicando que a alteração em *hsa-miR-21* pode participar da iniciação e progressão ao CCEO (Brito *et al.*, 2014). Além disso, clinicamente, o aumento da expressão de *hsa-miR-21* está associado com um prognóstico ruim (Huan *et al.*, 2009).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstram o papel oncogênico deste miRNA em CCEO, promovendo a proliferação de células, invasão, antiapoptose, e quimiorresistência (Reis *et al.*, 2010; Bourguignon *et al.*, 2012; Kawakita *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Siao *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). Estas funções oncogênicas foram evidenciadas pela hiperexpressão de *hsa-miR-21* mediada por várias moléculas supressoras tumorais, como o *PTEN* (Meng *et al.*, 2007; Rahmani *et al.* 2012), *PDCD4* (Reis *et al.*, 2010), *RECK* (Jung *et al.*, 2012), *DKK2* (Kawakita *et al.*, 2014) e *BCL2* (Rahmani *et al.* 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Esses achados são concordantes com o presente estudo que identificou a hiperexpressão de *hsa-miR-21* por meio do sequenciamento de alto desempenho e pela qRT-PCR. Adicionalmente, a maioria dos estudos que investigaram a expressão do *hsa-miR-21* no CCEO utilizou o tecido adjacente ao tumor, como seu controle de normalidade

sem câncer, para uma análise comparativa ao tecido tumoral (Reis *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). Por outro lado, nossos resultados também apontaram a hiperexpressão do *hsa-miR-21* no tecido adjacente ao tumor, quando comparado com o sem câncer, revelando que o tecido adjacente compartilha alterações genéticas com o tecido tumoral OSCC. Deste forma, entende-se que existe efeito de campo de cancerização e portanto, as regiões adjacentes ao tumor não podem ser utilizados como controle sem câncer.

A hiperexpressão de *hsa-miR-31* foi evidenciada em diversos estudos de CCEO (Liu *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2014). Essas pesquisas indicam a participação deste miRNA na iniciação da oncogênese oral, pois foi associado a desordens potencialmente malignas e na imortalização de queratinócitos orais normais pela ação de *hTERT* (Xiao *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2014, Hung *et al.* 2016). Além disso, o *hsa-miR-31* tem como alvo *FIH* e *HIF*, os quais são reprimidos na presença da hiperexpressão deste miRNA, e conseqüentemente este mecanismo ativa a hipóxia tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Liu *et al.*, 2010). A cascata reguladora formada pelo *hsa-miR-31*, *FIH*, *HIF* e *VEGFA* direciona vários processos biológicos, tais como a proliferação de células, migração e Transição Epitelial Mesenquimal (EMT), em células de CCEO (Liu *et al.*, 2010). Da mesma forma, os genes alvos *FGF3* e *Rhoa* regulam a apoptose, proliferação celular, migração e invasão celular (Chang *et al.*, 2013). Esses estudos corroboram o nosso resultado de hiperexpressão do *hsa-miR-31*.

A hiperexpressão de *hsa-miR-96* e *hsa-miR-183* foram encontradas em vários cânceres humanos, tais como de mama, pulmão, cólon, fígado, ovário, próstata, e testículo. Esses miRNAs pertencem a mesma família e compartilham o mesmo local de início da transcrição (CHR7: 129207158). Portanto, podem ser expressos de forma coordenada e desempenham um papel em conjunto durante a tumorigênese (Ozsolak *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2011; Ganci *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015).

Santhi *et al.* (2013), encontraram a hiperexpressão de *hsa-miR-96* associada com a tumorigênese oral, o qual foi detectado na leucoplasia e no CCEO. O autor sugeriu o *hsa-miR-96* como um biomarcador útil para prever potenciais desordens de CCEO e também na detecção de células tumorais residuais nas margens cirúrgicas orais. Ganci *et al.*, (2014), verificou a hiperexpressão deste miRNA no CCEO, a qual foi capaz de prever a

insurgência de recorrências, que são frequentemente relacionados com a presença de células tumorais indetectáveis na histologia e, portanto, são fortes preditores de recidiva local, participando do efeito de campo de cancerização no tecido adjacente.

A hiperexpressão de *hsa-miR-96* participa da proliferação celular em células de CCEO. A inibição de *hsa-miR-96* concomitantemente com *hsa-miR-21*, *hsa-miR-141* e *hsa-miR-130b* levou a diminuição da proliferação através da redução da proteína CDKN1A. Adicionalmente, induziu a proliferação celular durante o desenvolvimento craniofacial e dental (Gao *et al.*, 2015).

Brito *et al.*, 2016 evidenciou a hiperexpressão *hsa-miR-183*, *hsa-miR-145* e *hsa-miR-205* e os associou à regulação de células tronco nos cânceres da cavidade oral e orofaringe, além de terem relevância com características clínicas e patológicas desses tumores, como estágios avançados do tumor, invasão vascular, e metástases em linfonodos.

De fato, em nosso estudo encontramos a hiperexpressão de *hsa-miR-96* e *hsa-miR-183* com os maiores *foldchange* de 3,2 e 3,8 respectivamente. Além disso, estes miRNAs regulam genes alvos que participam da proliferação celular como o *SNAI2*, *CDKN1A* e *BMII*.

SNAI2 desempenha um papel importante na transição mesenquimal epitelial, progressão do tumor e invasão celular em células CCEO (Joseph *et al.*, 2009; Katafiasz *et al.*, 2011). *BMII* é oncogene que contribui para a regulação epigenética do ciclo celular e senescência de células-tronco dos tecido através do locus INK4A (Kang *et al.*, 2007). *BMII* participa da transformação malignas das DPM e, portanto, associado com o desenvolvimento de CCEO (Kang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013, Dalley *et al.*, 2014)

De acordo com a literatura o miRNA *hsa-miR-136* está hipoexpresso em cânceres como gliomas e ovário (Chen *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015). Sugere-se que esteja envolvido na proliferação celular e desempenha diferentes papéis em vários tipos de células (Yang *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2015). Yang *et al.*, verificou em células de glioma, que os baixos níveis de *hsa-miR-136* promoveu altas expressões das proteínas anti-apoptóticas *BCL2* e *AEG1*.

BCL2 é uma das principais proteínas reguladoras da apoptose e confere uma vantagem de sobrevivência às células, protegendo-os da morte apoptótica A desregulação dos membros da família *BCL2* é comum em doenças malignas humanas e é uma causa

significativa de resistência à terapia. Um desequilíbrio entre a expressão de genes anti-apoptótica e proapoptótica da família *BCL2* promovem a sobrevivência de células CCEO. Vários estudos de histopatológicos e microarray em tecidos CCEO relatam a expressão anormal dos membros da família *BCL2* e sugeriram que estes fatores são marcadores prognósticos (Coutinho-Camillo *et al.*, 2010; Rhamani *et al.*, 2012; Khan and Bisen, 2013; Coutinho-Camillo *et al.*, 2015).

No presente estudo *hsa-miR-136* foi encontrado hipoexpresso e com um padrão de expressão altamente diferenciado entre os dois grupos de amostras (Figura 1). Até o presente momento, apenas Momen-Heravi *et al.*, (2014) investigou este miRNA no CCEO e seus resultados são concordante com os nosso. Além disso, o *hsa-miR-136* tem como alvo o *BCL2*.

Diversos estudos demonstram que a expressão de *hsa-miR-195* é reduzida em relação ao tecido sem câncer, em tumores sólidos, incluindo o câncer de bexiga (Zhao *et al.*, 2015), cervical (Li *et al.*, 2015), colorrectal (Chen *et al.*, 2015), e o carcinoma hepatocelular (Wang *et al.*, 2015). Este miRNA regula genes importantes que participam da carcinogênese oral, tais como *WEE1*, *BCL2*, *DICER1* e *VEGFA* (Nakayama *et al.*, 2001; Yusei *et al.*, 2009; de Sousa *et al.*, 2009; Fumihiko *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012, Cantini *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016; Sales *et al.*, 2016).

WEE1 atua na mitose na transição da fase G2 para M por proteção de *CDK1*, regula o crescimento de células tumorais e metástases, além de desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência à droga nas células tumorais. No CCEO, quando hiperexpressa aumenta a proliferação celular e diminuída o processo da apoptose (McCarthy, 2012; Fumihiko *et al.*, 2012, Osman *et al.*, 2015).

DICER1 é uma enzima altamente conservada responsável pelo processamento de precursores de miRNA (pré-miRNAs) em miRNAs maduros. As modificações na expressão de *DICER1* afeta o comportamento do câncer pela alteração da expressão de diversos miRNAs. No CCEO, a literatura ainda é controversa em relação a expressão de *DICER1*, Jakymiw *et al.*, 2010 verificou que esta enzima estava hiperexpressa e que em conjunto com a hipoexpressão *hsa-let-7b* aumentou a proliferação celular. Cantini *et al.*, 2014, observou que a hiperexpressão de *DICER1* alterou a resposta a quimiosensibilidade a cisplatina, apoiando assim a importância de *DICER 1* como um alvo terapêutico para CCEO. Por outro lado, Zeng *et al.*, 2014 e Kawara *et al.*, 2014 relataram que a

hipoexpressão de *DICER1* aumentou a proliferação e progressão celular, além de promover resistência ao quimioterápico 5-fluoruracil e pobre prognóstico.

O *VEGFA* é um regulador importante na angiogênese e crescimento tumoral. Patel *et al.*, (2015) observou que *VEGFA* foi significativamente maior nos tumores recorrentes, bem diferenciados e de fase inicial, em comparação com o tecido saudável e portanto, pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de CCEO, com participação na fase inicial até na recorrência do tumor. Além disso, promoveu a sobrevivência de células, mediada pela regulação positiva de *BCL2* células de CCEO. Outros estudos também foram capazes de demonstrar a hiperexpressão de *VEGFA* no CCEO, associando a fator de prognóstico e angiogênese (Jung *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2016).

Os nossos dados demonstraram que o *hsa-miR-195* foi regulado negativamente no CCEO, o que corrobora o estudo de Jia *et al.*, (2013) que demonstra o *hsa-miR-195* como um possível biomarcador de predição de prognóstico em pacientes com câncer de língua, assim como o estudo de Wong *et al.*, (2008) que evidenciou o mesmo perfil de expressão em câncer de língua.

A expressão elevada de *hsa-miR-223* foi observada em vários tipos de tumores sólidos, incluindo o câncer esofágico (Hu *et al.* 2014) e os de cabeça e pescoço (Chen *et al.*, 2012, Hu *et al.*, 2015). Este miRNA tem como genes alvos que participam do processo carcinogênico do CCEO como o *IGF1R* e a *IL6*.

O *IGF1R* é hiperexpresso em vários tipos de câncer, tanto em tecidos quanto em Linhares celulares de CCEO (Larsson *et al.*, 2007; Brady *et al.*, 2007). *IGF1R* é essencial para a transformação maligna e progressão celular, pois participa de vias de sinalização para proliferação, adesão, migração, apoptose e metástase (LeRoith *et al.*, 2003; Baserga *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007). No estudo de Lara *et al.*, a expressão *IGF1R* foi um preditor de resultado clínico em pacientes com CCEO localmente avançado. Assim como Brady *et al.*, 2007 verificou que *IGF1R* e *IGR2* são reguladores da proliferação celular em células de CCEO.

A *IL-6* sinaliza uma variedade de processos biológicos, incluindo a resposta imunitária, inflamação e carcinogênese por regulação do crescimento, sobrevivência e diferenciação de células-alvo (Jeng *et al.*, 2003, Iliopoulos *et al.*, 2009). A participação da *IL-6* no CCEO foi elucidada por Jeng *et al.* (2003) o qual verificou que esta interleucina afeta a inflamação da mucosa oral e o crescimento de células epiteliais orais.

Adicionalmente, *IL-6* participa da invasão celular e angiogênese (Fang *et al.*, 2015), além de ser um biomarcador importante no diagnóstico e prognóstico de CCE (Lotfi *et al.*, 2015).

Em nossa pesquisa, observamos a hiperexpressão do *hsa-miR-223*, também evidenciada nos estudos de Lajer *et al.*, (2011) e Patel *et al.*, (2011). Além disso, este miRNA foi superexpresso no tecido gengival de pacientes com doença periodontal (Stoecklin-Wasmer *et al.*, 2012; Ogata *et al.*, 2014). Estes dados sugerem que este miRNA pode participar do processo inflamatório e proliferativo na carcinogênese oral.

Os miRNAs *hsa-miR-99b*, *hsa-miR-149* e *hsa-miR-200c* foram hiperexpressos em nosso grupo de CCEO, no entanto na literatura seus perfis de expressão encontram-se hipoexpressos (Wong *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2012; He *et al.*, 2015; Jamali *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016). Esta discrepância pode ser explicada pelas diferentes populações estudadas, já que estes estudos são provenientes de populações asiáticas. Adicionalmente, infecções causadas por patógenos podem modular o sistema imune e, assim, desencadear padrões distintos de expressão.

Neste estudo, identificamos o perfil de expressão diferencial de sete novos miRNAs: *hsa-let-7c*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-199a*, *hsa-miR-381*, *hsa-miR-501*, *hsa-miR-654* e *hsa-miR-941* relacionados ao CCEO. Apesar de nunca terem sido descritos no CCEO, participam da carcinogênese de outros cânceres (Liu *et al.*, 2014; Streppel *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015). Este resultado sugere que existam alguns perfis de miRNAs relacionados ao câncer, como o CCEO que ainda não foram investigados. Portanto, estudos mais amplos (de varredura) com throughput elevado, que utilizem tecnologia de seqüenciamento de nova geração (NGS) são mais adequados para caracterizar perfis de expressão de todos os microRNAs envolvidos no processo da carcinogênese oral, assim como são mais indicados para a identificação de novos biomarcadores.

Apesar da ausência de estudos para averiguação de *let-7c*, *hsa-miR-199a* e *hsa-miR-381* no CCEO, estes miRNAs já foram descritos em processos inflamatórios da cavidade e portanto encontrados com o mesmo perfil de expressão nos tecidos orais (Ogata *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Adicionalmente, o *hsa-miR-199a* teve participação na carcinogênese do CCEO em modelo animal (Yu *et al.*, 2009). Esses dados reforçam que

esses miRNAs podem ser novos biomarcadores em potencial implicados na tumorigênese oral.

O *hsa-miR-199a* compartilha genes alvos implicados na carcinogênese oral como, *MET* e *MTOR*. O proto-oncogene *MET* quando hiperexpresso promove a invasão celular e metástase em células CCEO (Guessous *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012). *MET* também foi capaz de indicar a presença de células tronco tumorais facilitando o processo de radioresistência no tratamento de cânceres de cabeça e pescoço (Ettl *et al.*, 2015). A proteína quinase *MTOR* participa da via de sinalização de *PI3K/AKT* e regula o crescimento celular, proliferação e sobrevivência. O efeito da hiperexpressão de *MTOR* em células CCEO revela ser um biomarcador confiável para identificar subgrupos de risco elevado e como um alvo terapêutico promissor (Naruse *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2013)

Adicionalmente, a literatura mostra a maioria dos estudos de carcinogênese oral comparam amostras teciduais tumorais com amostras histopatológicas normais, mas adjacentes ao tumor, para investigação de marcadores genéticos e epigenéticos (Matsuyama *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). Para esta abordagem, consideraram o tecido adjacente ao tumor como amostras livres de câncer (Kawakita *et al.*, 2014; Manikandan *et al.*, 2015). No presente estudo, comparamos três grupos de amostras: (i) tecidos histopatológicos normais de pacientes sem câncer; (ii) tecidos tumorais; e (iii) tecidos adjacentes ao tumor. Nossos resultados mostraram diferenças significativas entre tecidos sem câncer e adjacentes, apoiando a existência do efeito de campo no CCEO para os miRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *O hsa-miR-135b* e *O hsa-miR-29c*.

Os dados dos perfis de expressão do *hsa-miR-221* em cânceres de cabeça e pescoço (HNSCC) mostraram sua relação com a oncogênese e invasão celular. Este padrão de expressão de *hsa-miR-221* aumentou a proliferação, crescimento e migração celular e, portanto, estaria envolvido na tumorigênese de CCEO. Consequentemente, estes marcadores poderiam ser úteis na definição de estratégias de prevenção e tratamento em cânceres de HNSCC (Avisar *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Wald *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Assim como os nossos resultados que mostraram o envolvimento do *hsa-miR-221* no processo de carcinogênese do CCEO.

O *hsa-miR-135b* encontra-se hiperexpresso em cânceres como o de pulmão (Lin *et al.*, 2013), cervical (Xu *et al.*, 2015), gástrico (Vidal *et al.*, 2016) e coloretal (Li *et al.*,

2015). No câncer de pulmão atua como oncomiR e promove o crescimento tumoral, invasão celular, contribui para a angiogênese e metástase, assim, sugere-se que desempenha um papel importante em múltiplos processos do desenvolvimento ao câncer (Matsuyama et al., 2011; Lin et al., 2013). A expressão de *hsa-miR-135b* até o presente estudo não foi descrita no CCEO, portanto esta é a primeira evidência de sua participação no CCEO.

A alta expressão de *hsa-miR-135b* nas lesões gástricas com *Helicobacter pylori* positivo demonstram que este miRNA esteja, provavelmente, envolvido com a modulação do sistema imune associada a infecção por *H.pylori* (Vidal et al., 2016). Alguns autores sugerem que a placa dentária e saliva podem ser um importante reservatório para o *H. pylori* e que a presença desta bactéria na cavidade oral podem contribuir para doenças orais e infecção gástrica por transmissão oral (Assumpção et al., 2010; Rasmussen et al., 2010; Rasmussen et al., 2012)

O *hsa-miR-29c* age como um Ts-miR por sua expressão reduzida em alguns cânceres como o gástrico (Vidal et al., 2016), fígado (Wang et al., 2015), hepatocelular (Bae et al., 2014) e o de pulmão metastático (Wang et al., 2013). No entanto, nossos resultados mostraram uma hiperexpressão do *hsa-miR-29c* no CCEO o que corrobora os resultados de outro estudo que relaciona a expressão deste miRNA ao CCEO, (Serrano et al., 2012) que observou que a hiperexpressão de *hsa-miR-29c*.

A análise conjunta dos resultados de expressão dos *hsa-miR-21*, *hsa-miR-221*, *hsa-miR-135b* and *hsa-miR-29c* em amostras de tecidos sem câncer, adjacente e CCEO, mostraram de forma inequívoca a observação do efeito de campo de cancerização na carcinogênese oral por uma abordagem epigenética. Assim como, foi possível identificar biomarcadores potenciais do processo de adoecimento envolvido no CCEO.

Portanto, os dados de expressão viabilizados pelo sequenciamento de alto desempenho, revelaram miRNAs envolvidos no processo carcinogênico de CCEO, assim como novos miRNAs que através de seus genes alvos, mostram-se como biomarcadores em potencial para CCEO e que direcionam para novas pesquisas com intuito de validar novos genes alvos que participem do processos biológicos e terapêuticos no CCEO.

IV. REFERÊNCIAS

- Agada FO, Alhamarneh O, Stafford ND, Greenman J. Immunotherapy in head and neck cancer: current practice and future possibilities. *J Laryngol Otol* 2009; 123: 19-28.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. (2003). A uniform system for miRNA annotation. *RNA*. 9 (3):277-9
- Anders S, Pyl PT1, Huber W1. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695-1709.
- Avissar, B. C. Christensen, K. T. Kelsey, and C. J. Marsit, "MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 8, pp. 2850–2855, 2009.
- Bae HJ, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Jung KH, Kim MG, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2014;33:2557–67.
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–97.
- Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*. 2003;107:873–877. doi: 10.1002/ijc.11487
- Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. (2014) Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. May 15;120(10):1507-13. doi: 10.1002/cncr.28588. Epub 2014 Feb 22.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):332-7.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA et al. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Research* 63(8): 1727-1730.
- Brady G, Crean SJ, Naik P, Kapas S. Upregulation of IGF-2 and IGF-1 receptor expression in oral cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2007 Oct;31(4):875-81.
- Brito JA, Gomes CC, Guimarães AL, Campos K, Gomez RS. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral

- leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2014 Mar;43(3):211-6. doi: 10.1111/jop.12112. Epub 2013 Sep 11.
- Brito BL, Lourenço SV³, Damascena AS¹, Kowalski LP⁴, Soares FA^{2,3}, Coutinho-Camillo CM^{1,2}. Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016 Feb 3. doi: 10.1111/jop.12424.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). *Oncogene* 25, 6202–6210.
- Cantini LP, Andino LM, Attaway CC, Butler B, Dumitriu A, Blackshaw A, Jakymiw A¹. Identification and characterization of Dicer1e, a Dicer1 protein variant, in oral cancer cells. *Mol Cancer*. 2014 Aug 13;13:190. doi: 10.1186/1476-4598-13-190.
- Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, et al: Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 2009,18:4818-4829.
- Chai H and Brown RE (2009). Field effect in cancer—an update. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 39(4): 331-337.
- Chang KW, Liu CJ, Chu TH, et al. Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J Dent Res* 2008;**87**:1063–1068.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008; 26:612–619.
- Chen W¹, Yang Y, Chen B, Lu P, Zhan L, Yu Q, Cao K, Li Q. MiR-136 targets E2F1 to reverse cisplatin chemosensitivity in glioma cells. *J Neurooncol*. 2014 Oct;120(1):43-53. doi: 10.1007/s11060-014-1535-x. Epub 2014 Aug 20.
- Chen XJ¹, Shi KQ², Wang YQ², Song M², Zhou W³, Tu HX³, Lin Z². Clinical value of integrated-signature miRNAs in colorectal cancer: miRNA expression profiling analysis and experimental validation. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37544-56. doi: 10.18632/oncotarget.6065.
- Chen YJ, Lin SC, Kao T, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2004;204: 326–332.

- Chen Z1, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, Liu X, Zhou X. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012 Aug;48(8):686-91. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.020. Epub 2012 Mar 17.
- Chen, D.R.J. Cabay, Y. Jin, A. Wang, Y. Lu, M. Shah-Khan, et al. MicroRNA deregulations in head and neck squamous cell carcinomas *J Oral Maxillofacial Res*, 4 (1) (2013), p. e2.
- Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* 2007;67:1979-87.
- Chih-Jung Chen, Wen-Wei Sung,1,2,5 Yueh-Min Lin,3,4 Mu-Kuan Chen,5,6 Ching-Hsiao Lee,4 Huei Lee, Kun-Tu Yeh and Jiunn-Liang Ko. Gender Difference in the Prognostic Role of Interleukin 6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2012; 7(11).
- Coutinho-Camillo CM, Lourenc,o SV, Nishimoto IN, et al. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clini-copathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2010;57:304e316
- Coutinho-Camillo CM1, Lourenço SV2, de Araújo Lima L3, Kowalski LP4, Soares FA5. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet.* 2015 Jul-Aug;208(7-8):382-9. doi: 10.1016/j.cancergen.2015.04.004. Epub 2015 Apr 17.
- Croce CM (2009) Causes and consequences of mirna dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* (10):704-14.
- Dalerba P., R.W. Cho, M.F. Clarke, Cancer stem cells: models and concepts, *Annu. Rev. Med.* 58 (2007) 267–284.
- Darnet, Sylvain ; Moreira FC. ; Hamoy IG; Burbano RMR; Khayat AS; Cruz A; Magalhães, LL. *et al.*, High-Throughput Sequencing of miRNAs Reveals a Tissue Signature in Gastric Cancer and Suggests Novel Potential Biomarkers. *Bioinformatics and Biology Insights*, v. 9, p. 1-8, 2015.
- de Sousa FA1, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen

- planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2009 Oct;13(5):308-12. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2009.06.001. Epub 2009 Jul 10.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology.* 2014; 9:287–314. Epub 2013/10/02. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715PMID:24079833.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;14:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Eckert MA, Yang J. Targeting invadopodia to block breast cancer metastasis. *Oncotarget.* 2011; 2:562-568.
- Edge SB, Compton CC. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010 Jun;17(6):1471-4. doi: 10.1245/s10434-010-0985-4.
- Fabris L1, Berton S1,2, Citron F1, D'Andrea S1, Segatto I1, Nicoloso MS1,3, Massarut S4, Armenia J1, Zafarana G2, Rossi S3, Ivan C3, Perin T5, Vaidya JS6, Avanzo M7, Roncadin M8, Schiappacassi M1, Bristow RG2, Calin G3, Baldassarre G1, Belletti B1. Radiotherapy-induced miR-223 prevents relapse of breast cancer by targeting the EGF pathway. *Oncogene.* 2016 Feb 15. doi: 10.1038/onc.2016.23.
- Fang WY1, Chen YW2, Hsiao JR3, Liu CS4, Kuo YZ1, Wang YC5, Chang KC4, Tsai ST3,6, Chang MZ3, Lin SH2, Wu LW2. Elevated S100A9 expression in tumor stroma functions as an early recurrence marker for early-stage oral cancer patients through increased tumor cell invasion, angiogenesis, macrophage recruitment and interleukin-6 production. *Oncotarget.* 2015 Sep 29;6(29):28401-24. doi: 10.18632/oncotarget.4951.
- Farazi TA1, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):102-15. doi: 10.1002/path.2806. Epub 2010 Nov 18.
- Fearon EF and Vogelstein B (1990) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007; 18:581-592.
- Ganci F1, Sacconi A1, Manciocco V2, Sperduti I3, Battaglia P4, Covello R5, Muti P6,7, Strano S8, Spriano G2, Fontemaggi G1, Blandino G1. MicroRNA expression as

predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2014 Dec 22.

- Gao S1, Moreno M2, Eliason S2, Cao H1, Li X2, Yu W2, Bidlack FB3, Margolis HC4, Baldini A5, Amendt BA6. TBX1 protein interactions and microRNA-96-5p regulation controls cell proliferation during craniofacial and dental development: implications for 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015 Apr 15;24(8):2330-48. doi: 10.1093/hmg/ddu750. Epub 2015 Jan 2.
- Gatenby AR and Vincent TL (2003) An Evolutionary Model Of Carcinogenesis. *Cancer Res* 63:6212-6220.
- Greaves M and Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381): 306–313.
- Ha, P.K., Benoit, N.E., Yochem, R., Sciubba, J., Zahurak, M., Sidransky, D., Pevsner, J., Westra, W.H. and Califano, J. (2003) A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9, 3058 –3064.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125: 887-901.
- Han M1, Wang F1, Gu Y1, Pei X1, Guo G1, Yu C2, Li L1, Zhu M1, Xiong Y1, Wang Y3. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- β pathways. *Oncol Rep*. 2016 Jan;35(1):73-80. doi: 10.3892/or.2015.4360. Epub 2015 Oct 29.
- Hanahan D, Weinberg RA.(2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 4;144(5):646-74. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review.
- Harding S, Sanipour F, Moss T. (2014) Existence of benefit finding and posttraumatic growth in people treated for head and neck cancer: a systematic review. *PeerJ*. Feb 11;2:e256. doi: 10.7717/peerj.256.
- Harding S, Sanipour F, Moss T. (2014) Existence of benefit finding and posttraumatic growth in people treated for head and neck cancer: a systematic review. *PeerJ*. Feb 11;2:e256. doi: 10.7717/peerj.256.
- Harris T, L. Jimenez, N. Kawachi et al., “Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas,” *The American Journal of Pathology*, vol. 180, no. 3, pp. 917–928, 2012.

- Häyry V1, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):892-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605544. Epub 2010 Feb 9.
- He K1, Tong D2, Zhang S3, Cai D2, Wang L2, Yang Y2, Gao L4, Chang S2, Guo B2, Song T2, Li A1, Huang C2. miRNA-99b-3p functions as a potential tumor suppressor by targeting glycogen synthase kinase-3 β in oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cells. *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1528-36. doi: 10.3892/ijo.2015.3135. Epub 2015 Aug 27.
- Hedbäck N, Jensen DH1, Specht L2, Fiehn AM3, Therkildsen MH3, Friis-Hansen L4, Dabelsteen E5, von Buchwald C1. MiR-21 expression in the tumor stroma of oral squamous cell carcinoma: an independent biomarker of disease free survival. *PLoS One*. 2014 Apr 22;9(4):e95193. doi: 10.1371/journal.pone.0095193. eCollection 2014.
- Higashikawa K, Yoneda S, Taki M, Shigeishi H, Ono S, Tobiume K, Kamata N. Gene expression profiling to identify genes associated with high-invasiveness in human squamous cell carcinoma with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett*. 2008; 264:256-264.
- Holmstrup, P., Vedtofte, P., Reibel, J. and Stoltze, K. (2006) Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol.*, 42, 461 –474.
- Hu A, Huang JJ2, Xu WH1, Jin XJ3, Li JP3, Tang YJ4, Huang XF4, Cui HJ4, Sun GB5, Li RL2, Duan JL2. MiR-21/miR-375 ratio is an independent prognostic factor in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1775-85. eCollection 2015.
- Huang DH, Wang GY2, Zhang JW2, Li Y2, Zeng XC3, Jiang N4. MiR-501-5p regulates CYLD expression and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Aug;45(8):738-44. doi: 10.1093/jjco/hyv063. Epub 2015 Apr 27.
- Huang WC, Chan SH, Jang TH, et al. miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2014;74:751–764.

- Hung KF, Liu CJ², Chiu PC³, Lin JS², Chang KW⁴, Shih WY⁴, Kao SY⁵, Tu HF⁶. MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncol.* 2016 Feb;⁵³:42-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.017. Epub 2015 Dec 7.
- Hung PS, Tu HF, Kao SY, Yang CC, Liu CJ, Huang TY, Chang KW, Lin SC. miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis.* 2014 May;³⁵(5):1162-71. doi: 10.1093/carcin/bgu024. Epub 2014 Jan 30.
- Hung PS, Tu HF, Kao SY, Yang CC, Liu CJ, Huang TY, Chang KW, Lin SC. miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis* 2014. May;³⁵(5):1162-71. doi: 10.1093/carcin/bgu024. Epub 2014 Jan 30.
- Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* 2011;⁵²: 115–125.
- Iliopoulos D, Hirsch HA and Struhl K (2009) An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139: 693–706.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer (2016) [Acessado em 01/02/2016] Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
- Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell.* 2010 Jul 2;⁷(1):36-41.
- Jakymiw A1, Patel RS, Deming N, Bhattacharyya I, Shah P, Lamont RJ, Stewart CM, Cohen DM, Chan EK. Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Jun;⁴⁹(6):549-59. doi: 10.1002/gcc.20765.
- Jamali Z1, Asl Aminabadi N2, Attaran R1, Pournagiazar F3, Ghertasi Oskouei S4, Ahmadpour F. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2015 Apr;⁵¹(4):321-31. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.01.008. Epub 2015 Feb 9.
- Jemal A1, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Jul-Aug;⁵⁹(4):225-49. doi: 10.3322/caac.20006. Epub 2009 May 27.
- Jeng JH¹, Wang YJ, Chiang BL, Lee PH, Chan CP, Ho YS, Wang TM, Lee JJ, Hahn LJ, Chang MC. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the

- prostaglandin E2, interleukin-6 and TNF-alpha production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis*. 2003 Aug;24(8):1301-15. Epub 2003 May 22.
- Jia LF1, Wei SB, Gong K, Gan YH, Yu GY. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e56634. doi:10.1371/journal.pone.0056634. Epub 2013 Feb 22.
- Johnson FM, Garden A, Palmer JL, Kies M, Clayman G, Brumfield B, et al. A phase II study of docetaxel and carboplatin as neoadjuvant therapy for nasopharyngeal carcinoma with early T status and advanced N status. *Cancer* 2004;100(5):991–8.
- Johnson J1, Miller DL2, Jiang R3, Liu Y1, Shi Z1, Tarwater L1, Williams R4, Balsara R5, Sauter ER6, Stack MS7. Protease Activated Receptor-2 (PAR-2)-Mediated Nf-κB Activation Suppresses Inflammation-Associated Tumor Suppressor MicroRNAs in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Biol Chem*. 2016 Feb 2. pii: jbc.M115.692640.
- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011;57:19-37.
- Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, Dimba E, Chindia M, Otoh EC, Sankaranarayanan R, Califano J, Kowalski L. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Adv Dent Res*. 2011; 23:237–246.
- Jung S1, Sielker S2, Purcz N3, Sproll C4, Acil Y3, Kleinheinz J1. Analysis of angiogenic markers in oral squamous cell carcinoma-gene and protein expression. *Head Face Med*. 2015 Jun 5;11:19. doi: 10.1186/s13005-015-0076-7.
- Karakatsanis A1, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog*. 2013 Apr;52(4):297-303. doi: 10.1002/mc.21864. Epub 2011 Dec 27.
- Katafiasz D, Smith LM, Wahl JK 3rd. Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adh Migr*. 2011 Jul-Aug;5(4):315-22. Epub 2011 Jul 1.
- Kawakita A1, Yanamoto S, Yamada S, Naruse T, Takahashi H, Kawasaki G, Umeda M. MicroRNA-21 promotes oral cancer invasion via the Wnt/β-catenin pathway by

- targeting DKK2. *Pathol Oncol Res.* 2014 Apr;20(2):253-61. doi: 10.1007/s12253-013-9689-y. Epub 2013 Sep 3.
- Khan Z, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1836:123e145.
- Kim SY, Nam SY, Choi SH, Cho KJ, Roh JL. Prognostic value of lymph node density in node-positive patients with oral squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18:2310–2317.
- Kinzler K and Vogelstein B. (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science.* 280: 1036-1037.
- Kuribayashi K, Miyata S, Fukuoka K, Murakami A, Yamada S, Tamura K, Hirayama N, Terada T, Tabata C, Fujimori Y, Nakano T. Methotrexate and gemcitabine combination chemotherapy for the treatment of malignant pleural mesothelioma *Mol Clin Oncol.* 2013 Jul;1(4):639-642.
- Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E, Rossing M, Specht L, Therkildsen MH, Nauntofte B, Dabelsteen S, von Buchwald C. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer.* 2011 Mar 1;104(5):830-40.
- Lara PC, Bordon E, Rey A, Moreno M, Lloret M, Henriquez-Hernandez LA. IGF-1R expression predicts clinical outcome in patients with locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012;47:615–619.
- Larsson O, Girnita A, Girnita L. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(Suppl):R2–R6.
- Lee Y, Ahn C, Han J, et al., (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates miRNA processing. *Nature* 425(6956):415-9.
- Lee, J.J., Hong, W.K., Hittelman, W.N., Mao, L., Lotan, R., Shin, D.M., Benner, S.E., Xu, X.C., Lee, J.S., Papadimitrakopoulou, V.M. et al. (2000) Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. *Clin. Cancer Res.*, 6, 1702 – 1710.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 9–22.
- Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol* 2005; 16Suppl 6: vi7-vi12.

- LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003;195:127–137. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00159-9.
- Li J, Liang H, Bai M, Ning T, Wang C, Fan Q, Wang Y, Fu Z, Wang N, Liu R, Zen K, Zhang CY, Chen X, Ba Y. miR-135b Promotes Cancer Progression by Targeting Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGFBR2) in Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2015 Jun 10;10(6):e0130194. doi: 10.1371/journal.pone.0130194. eCollection 2015.
- Li J., H. Huang, L. Sun et al., “MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor,” *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 12, pp. 3998–4008, 2009.
- Li Z1, Wang H2, Wang Z1, Cai H3. MiR-195 inhibits the proliferation of human cervical cancer cells by directly targeting cyclin D1. *Tumour Biol.* 2015 Dec 2. [Epub ahead of print]
- Li Z1, Wang Y1, Yuan C2, Zhu Y3, Qiu J3, Zhang W4, Qi B4, Wu H5, Ye J5, Jiang H5, Yang J5, Cheng J6. Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer. *Lab Invest.* 2014 Dec;94(12):1431-45. doi: 10.1038/labinvest.2014.123. Epub 2014 Oct 6.
- Liang Y1, Zhao Q1, Fan L1, Zhang Z1, Tan B1, Liu Y1, Li Y2. Down-regulation of MicroRNA-381 promotes cell proliferation and invasion in colon cancer through up-regulation of LRH-1. *Biomed Pharmacother.* 2015 Oct;75:137-41. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.020. Epub 2015 Aug 28.
- Lim YC1, Han JH, Kang HJ, Kim YS, Lee BH, Choi EC, Kim CH. Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma. *Oral Oncol.* 2012 Nov;48(11):1114-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.013. Epub 2012 Jun 14.
- Lin CC1, Chen PC2,3, Lein MY2,4, Tsao CW2, Huang CC5, Wang SW6, Tang CH2, Tung KC1. WISP-1 promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by inhibiting miR-300 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget.* 2016 Jan 25.
- Lin CW, Chang YL, Chang YC, Lin JC, Chen CC, Pan SH, Wu CT, Chen HY, Yang SC, Hong TM, Yang PC. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun.* 2013;4:1877. doi: 10.1038/ncomms2876.

- Liu CJ, LiuTY, KuoLT, et al. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2008;214: 489–497.
- Liu CJ1, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012 Feb;34(2):219-24. doi: 10.1002/hed.21713. Epub 2011 Apr 15.
- Liu Z, Long X, Chao C, Yan C, Wu Q, Hua S, Zhang Y1, Wu A, Fang W. Knocking down CDK4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2014 Apr 21;14:274. doi: 10.1186/1471-2407-14-274.
- Lo W., Cheng-Chia Yu, Guang-Yuh Chiou, Yi-Wei Chen, Pin-I Huang, Chian-Shiu Chien, Ling-Ming Tseng, Pen-Yuan Chu, Kai-Hsi Lu, Kuo-Wei Chang, Shou-Yen Kao and Shih-Hwa Chiou. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol* 2011;223:482–495.
- Lo WY, H.-J. Wang, C.-W. Chiu, and S.-F. Chen, “miR-27b regulated TCTP as a novel plasma biomarker for oral cancer: from quantitative proteomics to post-transcriptional study,” *Journal of Proteomics*, vol. 77, pp. 154–166, 2012
- Lotfi A1, Shahidi N2, Bayazian G3, Abdollah iFakhim S2, Estakhri R4, Esfahani A1, Notash R2. Serum Level of Interleukin-6 in Patients with Oral Tongue Squamous cell Carcinoma. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2015 May;27(80):207-11.
- Lu WC1, Kao SY2, Yang CC3, Tu HF4, Wu CH2, Chang KW3, Lin SC3. EGF up-regulates miR-31 through the C/EBP β signal cascade in oral carcinoma. *PLoS One*. 2014 Sep 17;9(9):e108049. doi: 10.1371/journal.pone.0108049. eCollection 2014.
- Luna-Ortiz K, Guemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqu-eda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. (2004) An 11-year retrospective study. *Oral Oncol*;40:992–999.
- Lung T, Tășcău OC, Almășan HA, Mureșan O. Head and neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival - Part 2: a decade's results 1993-2002. *J Craniomaxillofac Surg* 2007; 35: 126-131.
- Luo GQ, Li JH, Wen JF, Zhou YH, Hu YB, Zhou JH. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2008;14:2487-93.

- Lupini L1, Bassi C, Ferracin M, Bartonicek N, D'Abundo L, Zagatti B, Callegari E, Musa G, Moshiri F, Gramantieri L, Corrales FJ, Enright AJ, Sabbioni S, Negrini M. miR-221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Front Genet.* 2013 Apr 25;4:64. doi: 10.3389/fgene.2013.00064. eCollection 2013.
- Maeda G1, Chiba T, Kawashiri S, Satoh T, Imai K. Epigenetic inactivation of IkappaB Kinase-alpha in oral carcinomas and tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5041-7.
- Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, Sowka M, Golusinski P, Malicki J, Golusinski W. (2014) Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol.* 2014 Jan 22;48(1):1-10.
- Manikandan M1, Deva Magendhra Rao AK1, Rajkumar KS2, Rajaraman R2, Munirajan AK1. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med.* 2015 Nov;44(10):792-800. doi: 10.1111/jop.12300. Epub 2014 Dec 8.
- Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83:489-501.
- Matsuyama, H. et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 118, 6881–6892 (2011).
- McCarthy N. Cell cycle: a WEE pointer. *Nat Rev Cancer.* 2012 May 17;12(6):378-9. doi: 10.1038/nrc3286.
- McWhinney SR, McLeod HL. Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics.* 2009 Mar;10(3):489-93.
- Min A1, Zhu C2, Peng S3, Rajthala S4, Costea DE5, Sapkota D6. MicroRNAs as Important Players and Biomarkers in Oral Carcinogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:186904. doi: 10.1155/2015/186904. Epub 2015 Oct 4.
- Minicucci EM, da Silva GN, Salvadori DM. Relationship between head and neck cancer therapy and some genetic endpoints. *World J Clin Oncol.* 2014 May 10;5(2):93-102.

- Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, et al. (2009) Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49: 318–329.
- Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ2, Kuo WP3, Cheng YS4. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res.* 2014 Jul;93(7 Suppl):86S-93S. doi: 10.1177/0022034514531018. Epub 2014 Apr 9.
- Moody CA, Laimins LA. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* Aug;10(8):550-60.
- Moshiri F1, Callegari E2, D'Abundo L2, Corrà F2, Lupini L2, Sabbioni S3, Negrini M2. Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014 Winter;7(1):43-54.
- Nagadia, PR. Pandit, W. B. Coman, J. Cooper-White, and C.Punyadeera, “miRNAs in head and neck cancer revisited,”*Cel-lular Oncology*,vol.36,pp.1–7,2013
- Nagata M1, Kurita H2, Uematsu K1, Ogawa S1, Takahashi K3, Hoshina H1, Takagi R1. Diagnostic value of cyclin-dependent kinase/cyclin-dependent kinase inhibitor expression ratios as biomarkers of locoregional and hematogenous dissemination risks in oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2015 Sep;3(5):1007-1013. Epub 2015 Jun 10.
- Nakayama H1, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2001 Dec 15;92(12):3037-44.
- Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, Mizuno A, Umeda M. Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 α pathway. *Anticancer Res.* 2011 Dec;31(12):4429-37.
- Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, hrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparen P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T (2009) Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*125(2): 362–366.
- Neville, BW, Damm, DD, Allen, CM, Bouquot, JE. (2009) *Patologia Oral & Maxilofacial.* 3ª Edição. Ed. Guanabara Koogan.

- Nouraei NI, Van Roosbroeck K, Vasei M, Semnani S, Samaei NM, Naghshvar F, Omidi AA, Calin GA, Mowla SJ. Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013 Sep 10;8(9):e73009. doi: 10.1371/journal.pone.0073009. eCollection 2013.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435:839-843.
- Ogata Y, Matsui S, Kato A, Zhou L, Nakayama Y, Takai H. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. *J Oral Sci*. 2014 Dec;56(4):253-60.
- Osman AA, Monroe MM, Ortega Alves MV, Patel AA, Katsonis P, Fitzgerald AL, Neskey DM *et al.*. Wee-1 kinase inhibition overcomes cisplatin resistance associated with high-risk TP53 mutations in head and neck cancer through mitotic arrest followed by senescence. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb;14(2):608-19.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*. 2008 Nov 15;22(22):3172-83.
- Patel KR, Vajaria BN, Begum R, Patel JB, Shah FD, Joshi GM, Patel PS. VEGFA isoforms play a vital role in oral cancer progression. *Tumour Biol*. 2015 Aug;36(8):6321-32. doi: 10.1007/s13277-015-3318-1. Epub 2015 Mar 25.
- Perez, RS, Freitas, SM, Dedivitis, RA, Rapoport, A, Denardin, OVP, Sobrinho, JA. (2007) Estudo Epidemiológico do Carcinoma Espinocelular da Boca e Orofaringe. *Arq. Int. Otorrinolaringol*. Vol. 11(3).
- Périé S, Meyers M, Mazzaschi O, De Crouy Chanel O, Baujat B, Lacau St Guily J. (2014) Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer*. May 1;101(5):404-410.
- Piñera-Marques K, Lorencó SV, Silva LF, Sotto MN, Carneiro PC. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical, cytopathological and histopathologic analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65; 363–367.
- Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. (2009) Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*. Nov;38(10):737-52.
- Pogorzelski M, Ting S, Gauler TC, Breitenbuecher F, Vossebein I, Hoffarth S, Markowetz J, Lang S, Bergmann C, Brandau S, Jawad JA, Schmid KW, Schuler M, Kasper S.

- (2014) Impact of human papilloma virus infection on the response of head and neck cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy. *Cell Death Dis.* Feb 27;5:e1091. doi: 10.1038/cddis.2014.62.
- Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: A period analysis. *Oncologist.* 2010; 15:994-1001.
- Rahmani A1, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(9):965-71. Epub 2012 Oct 20.
- Ramdas LI, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck.* 2009 May;31(5):642-54. doi: 10.1002/hed.21017.
- Reibel, J. (2003) Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 14, 47 – 62.
- Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordonez B, Grénman R, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2010 Sep 10;9:238. doi: 10.1186/1476-4598-9-238.
- Ren LH1, Chen WX2, Li S2, He XY2, Zhang ZM3, Li M4, Cao RS2, Hao B2, Zhang HJ2, Qiu HQ5, Shi RH2. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4. *Br J Cancer.* 2014 Nov 11;111(10):2003-13. doi: 10.1038/bjc.2014.485. Epub 2014 Sep 11.
- Ren W, Wang X, Gao L, Li S, Yan X, Zhang J, Huang C, Zhang Y, Zhi K. MiR-21 modulates chemosensitivity of tongue squamous cell carcinoma cells to cisplatin by targeting PDCD4. *Mol Cell Biochem.* 2014 May;390(1-2):253-62. doi: 10.1007/s11010-014-1976-8. Epub 2014 Mar 11.
- Ribeiro-dos-Santos, Ândrea; Khayat, André S. ; Silva, Artur ; ALENCAR, Dayse O. ; Lobato, Jessé ; Luz, Larissa ; Pinheiro, Daniel G. ; Varuzza, Leonardo ; Assumpção, Monica ; Assumpção, Paulo ; Santos, Sidney ; Zanette, Dalila L. ; Silva, Wilson A. ;

- Burbano, Rommel ; Darnet, Sylvain . Ultra-Deep Sequencing Reveals the microRNA Expression Pattern of the Human Stomach. *Plos One*, v. 5, p. e13205, 2010.
- Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma – a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br. J. Dermatol.*2009;161(Suppl. 3); 107–115.
- Sales CB1, Buim ME2, de Souza RO1, de Faro Valverde L3, Mathias Machado MC3, Reis MG1,3, Soares FA2, Ramos EA1,3, Gurgel Rocha CA. Elevated VEGFA mRNA levels in oral squamous cell carcinomas and tumor margins: a preliminary study. *J Oral Pathol Med.* 2016 Feb 10. doi: 10.1111/jop.12398.
- Santhi WS1, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S, Jissa VT, Sebastian P, Radhakrishna Pillai M. Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. *Oral Oncol.* 2013 Jun;49(6):567-75. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.01.001. Epub 2013 Feb 4.
- Sarmiento D J de S, Almeida W L de, Miguel M C da C, Queiroz L M G, Godoy G P, Cruz M C F N, da Silveira EJD. *Histopathology*2013,63,371–377. DOI: 10.1111/his.12197.
- Scully C and Bagan JV: Recent advances in oral oncology 2008: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol* 44: 211-215, 2009.
- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009 Sep;15(6):388-99. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x. Epub 2009 Apr 2.
- Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schrodder H, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene.*2004;23:5095–5098.
- Serrano NA, Xu C, Liu Y, Wang P, Fan W, Upton MP, Houck JR, Lohavanichbutr P, Kao M, Zhao LP, Schwartz SM, Chen C, Méndez E. Integrative analysis in oral squamous cell carcinoma reveals DNA copy number-associated miRNAs dysregulating target genes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Sep;147(3):501-8. doi: 10.1177/0194599812442490. Epub 2012 Apr 2.
- Sethi, A. Wright, H. Wood, and P. Rabbitts, “MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research,” *European Journal of Cancer*, vol. 50, no. 15, pp. 2619–2635, 2014.

- Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, et al. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013;**108**:1817–1821.
- Shinriki S1, Jono H, Ueda M, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Oike Y, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Shinohara M, Ando Y. Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2011 Sep;225(1):142-50. doi: 10.1002/path.2935. Epub 2011 Jun 25.
- Silva BS, Yamamoto FP, Corrêa-Pontes FS, Cury SE, Fonseca FP, Pontes HA, Pinto-Júnior D. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Jan 1;17 (1):e29-34.
- Silveira A, Gonçalves J, Sequeira T, Ribeiro C, Lopes C, Monteiro E, Pimentel FL. [Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives]. *Rev Bras Epidemiol.* 2012 Mar;15(1):38-48.
- Siow MY, Ng LP, Chong VK, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis* 2014;**20**:345–351.
- Slaughter PD, Southwick HW and Smejkal W (1953) "'Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin." *Cancer* 65: 963-968.
- Souza LR, Fonseca-Silva T, Pereira C et al. Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2011;58; 352–360.
- Souza RL, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos CC et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med. Oral Pa-tol. Oral Cir. Bucal.* 2011;16; e757–e762.
- Speight PM, (2007) "Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer," *Head and neck pathology*, vol.1, no. 1, pp.61–66.
- Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papapanou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res.* 2012 Oct;91(10):934-40. Epub 2012 Aug 9.
- Streppel MM1, Pai S, Campbell NR, Hu C, Yabuuchi S, Canto MI, Wang JS, Montgomery EA, Maitra A. MicroRNA 223 is upregulated in the multistep progression of Barrett's

esophagus and modulates sensitivity to chemotherapy by targeting PARP1. *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 1;19(15):4067-78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0601. Epub 2013 Jun 11.

Sun Y1,2, Liu Y1, Cogdell D1, Calin GA3,4, Sun B2, Kopetz S5, Hamilton SR1, Zhang W1,4. Examining plasma microRNA markers for colorectal cancer at different stages. *Oncotarget.* 2016 Feb 4. doi: 10.18632/oncotarget.7196. [Epub ahead of print]

Takes RP , A. Rinaldo, C.E. Silver, M. Haigentz Jr., J.A. Woolgar, A. Triantafyllou et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects *Oral Oncol*, 48 (2012), pp. 775–779.

Tran N, Rose BR, O'Brien CJ. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck.* 2007; 29:64–70.

Tu HF1, Liu CJ, Chang CL, Wang PW, Kao SY, Yang CC, Yu EH, Lin SC, Chang KW. The association between genetic polymorphism and the processing efficiency of miR-149 affects the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(12):e51606. doi: 10.1371/journal.pone.0051606. Epub 2012 Dec 14.

van den Berg, A. V. ; Magalhães, LL.; Vidal AF. ; Cruz, Aline M. P. ; Ribeiro-dos-Santos, Ândrea . MicroRNAs as Biomarkers of the Response to Treatment with ABVD Scheme in Hodgkin Lymphoma. *Journal of Leukemia*, v. 3, p. 1-6, 2016.

van der Waal I. (2009) Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Jul 1;14(7):E310-4.

Van Leeuwen MT, Grulich AE, McDonald SP, McCredie MR, Amin J, Stewart JH, et al. Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:561-9.

Varol N1, Konac E, Gurocak OS, Sozen S. The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep.* 2011 Feb;38(2):1079-89. doi: 10.1007/s11033-010-0205-0. Epub 2010 Jun 20.

Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:2803-2808.

- Vermorken JB, Specenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(Suppl 7):252–261.
- Vidal AF, Cruz AMP, Magalhães L, Pereira AL, Anaissi AKM, Alves NCF *et al.* *hsa-miR-29c and hsa-miR-135b* differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 14, 22(6).
- Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, Chen W, Schneider A, Gutkind JS. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Apr;5(4):562-73. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0502. Epub 2012 Mar 31.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE *et al.* (2013) Cancer Genome Landscapes. *Science* 339 (6127): 1546–1558.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, *et al.*, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
- Wald AII, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck.* 2011 Apr;33(4):504-12. doi: 10.1002/hed.21475.
- Wald, AIBS, Elizabeth E. Hoskins, MS, Susanne I. Wells, PhD, Robert L. Ferris, MD, PhD, and Saleem A. Khan, PhD. Human papillomavirus alters microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Head Neck.* 2011 April ; 33(4): 504–512.
- Wang B, Li D, Sidler C, Rodriguez-Juarez R, Singh N, Heyns M, Ilnytskyy Y, Bronson RT, Kovalchuk O. A suppressive role of ionizing radiation-responsive miR-29c in the development of liver carcinoma via targeting WIP1. *Oncotarget.* 2015 Apr 30;6(12):9937-50.
- Wang C, Liu X, Huang H, Ma H, Cai W, Hou J, Huang L, Dai Y, Yu T, Zhou X. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2012 May 15;130(10):2249-58. doi: 10.1002/ijc.26226. Epub 2011 Aug 16.
- Wang H, Zhu Y, Zhao M, Wu C, Zhang P, Tang L, *et al.* miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin β 1 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) *PLoS One.* 2013;8:e70192

- Wang M1, Zhang J2, Tong L2, Ma X2, Qiu X3. miR-195 is a key negative regulator of hepatocellular carcinoma metastasis by targeting FGF2 and VEGFA. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Nov 1;8(11):14110-20. eCollection 2015.
- Wang Y1, Zhu Y2, Lv P3, Li L4. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 May 1;8(5):4555-63. eCollection 2015.
- Warnakulasuriya S. (2009) Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J.* Nov 28;207(10):471-5. doi: 10.1038/sj.bdj.2009.1009.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N.W. and van der Waal, I. (2007) Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.*, 36, 575 – 580.
- Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F, Veldeman L, Claes K, Van Eijkeren M, Boterberg T, Willems P, Vral A, De Neve W, Thierens H. Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and as-sociation with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*2009; 73: 1187-1195.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci.* 2008;121:727-35.
- Wicha MS, Liu S and Dontu G (2006) Cancer Stem Cells: An Old Idea--A Paradigm Shift. *Cancer Res* 66:1883-1890.
- Wong TS1, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res.* 2008 May 1;14(9):2588-92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0666. May;31(5):2173-80. doi: 10.3892/or.2014.3114. Epub 2014 Mar 27.
- World Health Organization (WHO). (2005) Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours: World Health Organization Classification of Tumours. 1ed. Lyon: IARC.
- Wu C, Li M, Hu C, Duan H. Clinical significance of serum miR-223, miR-25 and miR-375 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2014 Mar;41(3):1257-66. doi: 10.1007/s11033-013-2970-z. Epub 2014 Jan 5.
- Xie F, Li K, Ouyang X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26:1025-32.

- Xu XM, Qian JC, Deng ZL, Cai Z, Tang T, Wang P, Zhang KH, Cai JP. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2012 Aug;4(2):339-345. Epub 2012 May 14.
- Xu Y, Zhao S, Cui M, Wang Q. Down-regulation of microRNA-135b inhibited growth of cervical cancer cells by targeting FOXO1. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Sep 1;8(9):10294-304. eCollection 2015.
- Y. Shao, Y. Qu, S. Dang, B. Yao, and M. Ji, "MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting cMyc and Cdk6," *Cancer Cell International*, vol. 13, no. 1, article 51, 2013.
- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011;102(3):522–9
- Yan Guo,¹ Mei-Si Ren,² Chao Shang,³ Li Zhu,¹ and Ming Zhong. MTSS1 gene regulated by miR-96 inhibits cell proliferation and metastasis in tongue squamous cellular carcinoma Tca8113 cell line . *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(9): 15441–15449.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). *Cancer Cell* 9, 189–198.
- Yang CC, Hung PS, Wang PW, et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011;40:397–404.
- Yang W, Zhao S, Liu F, Sun M. Health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer: Reconstruction with free fibula flap. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 Mar 8.
- Yang Y, Wu J, Guan H, Cai J, Fang L, Li J, Li M. MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Lett.* 2012 Oct 19; 586(20):3608-12.
- Yasui W, Sentani K, Motoshita J et al., (2006) Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg.* 95(4):225-31.
- Yen YC, Shiah SG, Chu HC, et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer* 2014;13:6.

- Yi, J.S. Kim, J.H. Lee, S.H. Choi, S.Y. Nam, S.Y. Kim et al. 18F-FDG PET/CT for detecting distant metastases in patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma *J Surg Oncol*, 106 (2012), pp. 708–712.
- Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1472–1489. doi: 10.1093/jnci/92.18.147.
- Yu T., Wu Y., Helman J. I., Wen Y., Wang C., Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. **Molecular Cancer Research**. 2011;9(2):161–172. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-10-0386.
- Yu T1, Liu L1, Li J1, Yan M1, Lin H1, Liu Y1, Chu D1, Tu H1, Gu A2, Yao M1. MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):30239-50. doi: 10.18632/oncotarget.4972.
- Yu T1, Wang XY, Gong RG, Li A, Yang S, Cao YT, Wen YM, Wang CM, Yi XZ. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 May 13;28:64. doi: 10.1186/1756-9966-28-64.
- Yusei Fujita,¹ Itsuro Kato,¹ Soichi Iwai,¹ Koji Ono,² Minoru Suzuki,² Yoshinori Sakurai,² Ken Ohnishi,³ Takeo Ohnishi,³ and Yoshiaki Yura. Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol*. 2009; 4: 63. doi: 10.1186/1748-717X-4-63.
- Zeng S1, Yang J1, Zhao J1, Liu Q2, Rong M1, Guo Z1, Gao W1. Silencing Dicer expression enhances cellular proliferative and invasive capacities in human tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2014 Feb;31(2):867-73. doi: 10.3892/or.2013.2903.
- Zhang B, Lin T3, He H4. Comparative analysis of blood and saliva expression profiles in chronic and refractory periodontitis patients. *BMC Oral Health*. 2015 Dec 24;15(1):166. doi: 10.1186/s12903-015-0150-3.
- Zhang B1, Liu M, Tang HK, Ma HB, Wang C, Chen X, Huang HZ. The expression and significance of MRP1, LRP, TOPOII β , and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2012 Feb;41(2):141-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01066.x. Epub 2011 Jul 28.

- Zhang D1, Wang J2, Wang Z3, Zhang T1, Shi P4, Wang X1, Zhao F1, Liu X1, Lin X1, Pang X1. miR-136 modulates TGF- β 1-induced proliferation arrest by targeting PPP2R2A in keratinocytes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:453518. doi: 10.1155/2015/453518. Epub 2015 Jan 14.
- Zhang PP1, Wang XL1, Zhao W2, Qi B1, Yang Q1, Wan HY1, Shuang ZY3, Liu M1, Li X1, Li S4, Tang H5. DNA methylation-mediated repression of miR-941 enhances lysine (K)-specific demethylase 6B expression in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2014 Aug 29;289(35):24724-35. doi: 10.1074/jbc.M114.567818. Epub 2014 Jul 21.
- Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol.* 2007;38:598-606.
- Zhao C1, Qi L1, Chen M1, Liu L1, Yan W2, Tong S1, Zu X1. microRNA-195 inhibits cell proliferation in bladder cancer via inhibition of cell division control protein 42 homolog/signal transducer and activator of transcription-3 signaling. *Exp Ther Med.* 2015 Sep;10(3):1103-1108. Epub 2015 Jul 9.
- Zhao D1, Wang SH, Feng Y, Hua CG, Zhao J, Tang XF. Intratumoral c-Met expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. *Hum Pathol.* 2011 Oct;42(10):1514-23. doi: 10.1016/j.humpath.2010.03.012. Epub 2011 Apr 29.
- Zhao H1, Liu S1, Wang G1, Wu X1, Ding Y1, Guo G2, Jiang J3, Cui S1. Expression of miR-136 is associated with the primary cisplatin resistance of human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2015 Feb;33(2):591-8. doi: 10.3892/or.2014.3640. Epub 2014 Dec 2.
- Zhou X1, Ren Y2, Liu A3, Han L4, Zhang K4, Li S3, Li P5, Li P3, Kang C4, Wang X6, Zhang L3. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2014.

V. APÊNDICE

1. Ficha de dados clínicos

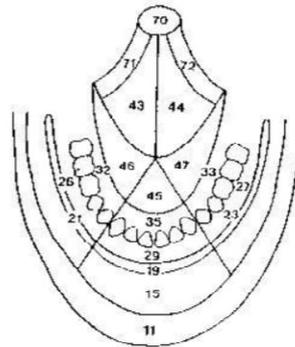
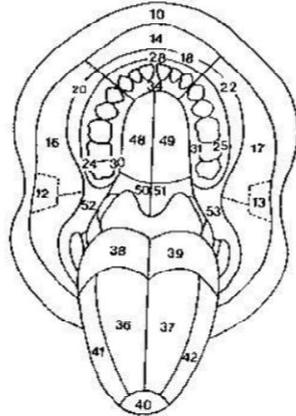


Universidade Federal do Ceará
Laboratório de Patologia Bucodental
Ficha para exame Histopatológico

Nome : _____
Idade: _____ Data de nascimento _____ Sexo : F () M () Cor _____
Naturalidade: _____ Telefones _____
Endereço: _____

História da lesão (tempo de evolução, fator causal, tratamento prévio)

Cor: _____ Forma: _____ Implantação: _____
Superfície: _____ Consistência: _____ Tamanho: _____
Localização: _____ Tipo de biópsia: () Incisional () Excisional



Aspecto imaginológico:

Diagnóstico clínico: _____

Diagnóstico diferencial: _____

Data: _____ Cirurgião-dentista (assinatura + carimbo): _____



Macroscopia:

Data:

Número de fragmentos: _____ Número de cápsulas _____ () Com reserva () Sem reserva

Microscopia:

Data:

Conclusão: _____

2. Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado Perfil de expressão de microRNAs no Câncer Oral.

Para tanto, necessitaremos de fragmentos de tecido de pacientes que possuam essas alterações, para que possamos compará-las. Durante o procedimento de biópsia, serão removidos dois fragmentos de tecido da região da lesão, sendo seguido de sutura local. Este procedimento não trará nenhum prejuízo à cicatrização nem trará qualquer desconforto adicional.

Neste estudo, não há benefício financeiro para o participante. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. Será guardado sigilo total sobre suas informações. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Carolina Rodrigues Teófilo, que pode ser encontrada no endereço: Rua Alexandre Baraúna S/N – UFC, no telefone 88041003.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações e concorde em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

3. PRODUÇÃO NO PERÍODO DO DOUTORADOS

PALESTRAS

Câncer De Boca

Curso de Especialização em Enfermagem Oncológica
Ophir Loyola, Maio - 2012

Genética Do Câncer

Disciplina Seminários temáticos regionais
Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas
UFPA, Janeiro – 2013

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

LOPES, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; MONTENEGRO, R. C.; SANTOS, S.E.B ; SALGADO, C.G.; GARCIA, P.A.; BARROSO, R. F. ; CRUZ, A. M. P. Polimorfismo dos Genes TNF alfa (G-308A) e IL-10 (A-1082G, C-819T) em indivíduos saudáveis do Estado do Pará. XVII Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, 2011, Gramado.

CRUZ, A. M. P.; **LOPES, C.**; GARCIA, P.A.; DARNET, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; SANTOS, S.E.B ; SALGADO, C.G ; MONTENEGRO, R. C. Polimorfismo do Gene da IL-17A (A-197G) em indivíduos saudáveis do Estado do Pará. XVII Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, 2011.

CRUZ, A. M. P.; **LOPES, C.**; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; MONTENEGRO, R. C.; DARNET, S. Pattern of differential expression of microRNA between gastric cancer cell line and health gastric mucosa. 10th Internacional Gastric Cancer, 2013

4.

LOPES CB, PA; MANGOLINI A,TEÓFILO CR, ALVES APNN, MONTENEGRO RC, NEGRINI M, RIBEIRO-DOS-SANTOS, AKC. MicroRNA

expression profile in oral lesions: benign, potentially malignant disorders and malignant. VI European Congress on Head and Neck Oncology, 2014.

LOPES CB, PA; MANGOLINI A, TEÓFILO CR, ALVES APNN, MONTENEGRO RC, NEGRINI M, RIBEIRO-DOS-SANTOS, AKC. Differential Expression Of Hsa-Mir-221 Suggests Field Effect In Oral Cancer. XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ESTOMATOLOGIA E PATOLOGIA ORAL, 2015.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS

Curso Aspectos Atuais e Multidisciplinares em Oncologia. (Carga horária: 88h). Hospital Ac Camargo. 2012

Manifestações Orais e Laserterapia no Paciente Oncológico (Carga horária: 27h). Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 2012

Terapia Celular: fundamentos e perspectivas. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. 2011

II Workshop de Aconselhamento genético do Câncer. (Carga horária: 18h). Universidade de São Paulo. 2011

PUBLICAÇÕES

Artigos Científicos:

Cook, D. C.; Bastos, M. Q. R.; **Lopes, C.**; Mendonça de Souza, S.; Santos, R. V.. Pretos Novos: EVIDENCE FOR AFRICAN ORAL HYGIENE PRACTICES IN BRAZIL, 1769-1830 (2012) International Journal of Osteoarchaeology (Print), v. 22,

Oliveira FA, Forte CP, Silva PG, **Lopes CB**, Montenegro RC, Santos ÂK, Sobrinho CR, Mota MR, Sousa FB, Alves AP. MOLECULAR ANALYSIS OF ORAL BACTERIA IN HEART VALVE OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (2015) *Medicine*, V94: 47.

Lopes, C. Barroso R. G., Garcia P. A, Santos S, Burbano R, Ribeiro dos Santos A. EFFECT OF ANCESTRY ON IL10 HAPLOTYPES IN CHRONIC PERIODONTITIS. Submetido Clinical and Experimental Dental Research.

Capítulo De Livro

Camile Lopes, Andrea Lessa, Sidney Santos, Ândrea Ribeiro–dos-Santos. DNA HUMANO ANTIGO: ORIENTAÇÕES PARA COLETAS EM SAMBAQUIS. In: GASPAR, Maria Dulce (Org.); Souza, Sheila Mendonça de (Org.). *Abordagens Estratégicas em Sambaquis*. 1. ed. Erechim: Habilis, 2013. v. 1. 312p.