

LESÕES PRECURSORAS DO CANCER ORAL E DE OROFARINGE

VANESSA SIMÃO DE ALMEIDA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Almeida, Vanessa Simão de

Lesões precursoras do câncer oral e de orofarínge / Vanessa Simão de Almeida – São Paulo, 2013.

117p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. CÂNCER ORAL. 2. LEUCOPLASIA. 3. MicroRNAs. 4. NEOPLASIAS OROFARÍNGEAS. 5. LESÕES PRÉ-CANCEROSAS. 6. EXPRESSÃO GÊNICA. 7. BIOLOGIA MOLECULAR

DEDICATÓRIA

À minha família, meu pai **Antonio**, minha mãe **Marcia**, minha irmã **Bruna**, ao meu “cunhado” **Pedro** e às minhas tias **Odete** e **Sumaia** por sempre me apoiarem e me encorajarem nos momentos difíceis, pela força quando precisei, pelos conselhos, pelas broncas e por sempre me acolherem e me darem o suporte em todos os momentos. Amo vocês e serei eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim.

*“Em delícias eternas vive a alma que encontra
em si mesma a fonte da felicidade.”*

Dr. Celso Charuri

*“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la
como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la
como se tudo fosse milagre.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, pela oportunidade de ter colocado em meu caminho, o lugar e as pessoas com quem convivi nestes últimos anos e pela oportunidade de viver as experiências que vivi neste período.

Agradeço ao meu mestre **Dr. Celso Charuri** pelo conhecimento transmitido, o qual me ajudou a passar por tudo e a colher os resultados das experiências da melhor forma que eu consegui. Foi um período maravilhoso e de grande crescimento pessoal que com certeza levarei pela minha vida.

À **minha família** por ser minha base, sempre me dando força e coragem de seguir em frente.

À minha orientadora **Dr^a. Silvia Regina Rogatto** por ter me aceitado em seu grupo e ter me dado a oportunidade de viver e aprender tudo que vivi e aprendi. Um exemplo de profissional e mulher.

Agradeço **a todo o grupo NeoGene** (Ana Carolina, André, Andreia, Caroline, Fabiana, Fábio, Graziela, Hellen, Juan, Luisa, Maísa, Mariana, Mateus, Marco, Priscila, Tatiane e Sarah) por toda ajuda, por tudo que me ensinaram. Sem vocês não conseguiria chegar aonde cheguei.

Agradeço, em especial, à minha “nova irmã”, “bff”, **Priscila**, por todo companheirismo, pela força, por todo apoio, pelos conselhos e por toda ajuda em todo o período. Descobri em você uma amizade que ficará por toda a vida.

À minha “mãe” **Hellen Kuasne** que além de me proteger e defender sempre que precisei, também me ajudou e me ensinou muito. Sem você não teria conseguido.

Agradeço por toda a ajuda, paciência e por tudo mais que me ensinaram: **Fábio, Mateus, Márcia, Graziela, André.**

Agradeço pela amizade, apoio, força e pelos momentos maravilhosos que todos me proporcionaram, fazendo do meu dia-a-dia uma alegria e nunca uma rotina: **Priscila, Fernanda, Caroline, Mateus, Fábio, Hellen, Júlia, Felipe, Karina, Graziela, Roberto, Deborah, Iara e Rogério.** Adoro demais todos vocês e os levarei sempre comigo. Obrigada por tudo !!!

Agradeço também aos meus sempre amigos: **Leandro, Carol, Renato, Gabriela, Rodrigo e Vinícius** que apesar de não estarem envolvidos neste processo, só o fato de fazerem parte da minha vida já me fazem muito bem. Amo vocês.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ao **Departamento de Estomatologia** (ao **Prof. Dr. Fábio Alves** e à **Julia Toyota**), aos **pesquisadores e funcionários** do CIPE, à Biblioteca e à Pós-Graduação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo suporte financeiro.

RESUMO

Almeida VS. **Lesões precursoras do câncer oral e da orofaringe**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O comportamento biológico das lesões orais e de orofaringe e o seu potencial para sofrerem transformação maligna é pouco conhecido. Há um número muito limitado de estudos que buscam a identificação de marcadores moleculares de avaliação de risco de progressão tumoral. Neste estudo foram selecionadas 39 amostras de lesões orais não malignas das quais 30 foram analisadas para a expressão gênica global (4x44K, Agilent Technologies). Um total de 12 casos de amostras pareadas de leucoplasias e tecido normal contralateral foram avaliados para a expressão global de microRNAs (8x60K, *Agilent Human miRNA Microarray*), seis delas foram também avaliadas para a expressão de transcritos na busca de marcadores de leucoplasias. Em adição, foram realizadas meta-análises utilizando dados da literatura para selecionar candidatos para serem confirmados por RT-qPCR. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado dos 30 casos de lesões orais analisados revelou 208 genes com expressão aumentada e 1.914 com expressão diminuída. Não foram observados grupos separando as leucoplasias das demais lesões. A análise exclusiva das leucoplasias (16 casos) revelou 5.364 genes com expressão diminuída e 2.673 genes com expressão aumentada. A comparação destes casos quanto ao hábito tabagista e etilista mostrou diferenças significativas na expressão dos transcritos. Utilizando o *software BRB arrays tools* e *Gene Spring GX* foram obtidos 13 miRNAs com expressão diminuída nas leucoplasias. Seis deles foram selecionados (FDR <0,08) para a análise *in silico* (*TargetScan*) sendo identificados 1.688 genes alvos candidatos para serem regulados por esses miRNAs. A análise integrada entre a expressão de transcritos e miRNAs revelou 131 genes com expressão aumentada regulados pelos seis miRNAs com expressão diminuída (*hsa-miR-191*, *hsa-*

miR-940, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-1234*, *hsa-miR-1238* e *hsa-miR-4313*). A meta-análise mostrou concordância com 71 genes e dois miRNAs diferencialmente expressos. Três miRNAs (*hsa-miR-191*, *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-4313*) e sete genes (*CARD8*, *CASP10*, *ZNF784*, *MADCAM1*, *MADD*, *TERT* e *SOX4*) foram selecionados para confirmação dos achados. Foi observado aumento significativo da expressão dos transcritos *MADD* ($p = 0,042$) e *ZNF784* ($p = 0,009$) confirmando os resultados obtidos na análise de expressão global dos transcritos. Os demais genes e miRNAs avaliados não apresentaram resultados significativos embora a maioria mantivesse o sentido esperado da expressão quando comparados com o tecido normal contralateral. Neste estudo, foram detectados potenciais marcadores moleculares em leucoplasias, porém devido ao número limitado de casos, alguns transcritos e miRNAs não foram confirmados, o que reforça a continuidade destas análises.

SUMMARY

Almeida VS. **[Precursor lesions of oral and oropharyngeal cancer]**. São Paulo, 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The biological behavior of oral and oropharyngeal lesions and their potential to become malignant it is not well known. There is a very limited number of studies searching for molecular markers that are related to tumor progression risk. In this study, 39 benign oral lesions were selected and global gene expression analysis was performed in 30 of them (4x44K, Agilent Technologies). Paired leukoplakia and normal contralateral tissue from 12 cases were evaluated for microRNA expression analysis (8x60K, Agilent Human miRNA Microarray), six of which were also evaluated for transcripts expression. In addition, meta-analysis was performed aiming to select candidates to be confirmed by RT-qPCR. The unsupervised hierarchical clustering analysis in 30 oral lesions revealed 208 overexpressed and 1,914 downexpressed genes. It is not detected clusters according to the histopathological analysis. The same analysis using leukoplakia samples (16) revealed 2,673 overexpressed and 5,364 downexpressed genes. Significant differences in gene expression profile were observed according to smoking and alcohol intake. From the 24 samples analyzed for microRNA expression, seven were excluded due to poor quality. miRNA analysis was performed using BRB arrays tools and Gene Spring GX software and revealed 13 downexpressed miRNAs. Six of them were selected (FDR <0.08) for the *in silico* analysis (TargetScan), identifying 1,688 putative target genes regulated by these miRNAs. Integrative transcripts and miRNA expression analysis revealed 131 overexpressed genes regulated by those six downexpressed miRNAs (*hsa-miR-191*, *hsa-miR-940*, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-1234*, *hsa-miR-1238* e *hsa-miR-4313*). The meta-analysis of two large-scale transcripts and two miRNA expression studies showed agreement of 71 genes and two miRNAs differentially expressed, respectively. Three miRNAs (*hsa-miR-191*,

hsa-miR-1228 e o *hsa-miR-4313*) and seven genes (*CARD8*, *CASP10*, *ZNF784*, *MADCAM1*, *MADD*, *TERT* e *SOX4*) were selected for data confirmation. Significant overexpression of *MADD* ($p = 0.042$) and *ZNF784* ($p = 0.009$) were detected confirming the results obtained in the global transcript expression analysis. The other genes and miRNAs evaluated showed no significant differences in comparison with matched normal tissue although they maintained the expected expression direction. In this study, potential molecular markers were described in oral leukoplakia, however due to the limited number of cases evaluated, some transcripts and miRNAs have not been confirmed, which reinforces the need for new collections and the continuity of this investigation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de progressao tumoral molecular para cabeça e pescoço de células escamosas de pescoço. Genes e vias envolvidas representadas.....	3
Figura 2	O processo de biogênese dos miRNAs.....	22
Figura 3	Interpretação dos resultados provenientes da genotipagem de HPV.....	38
Figura 4	Fluxograma das etapas realizadas neste projeto com número de casos utilizados.....	49
Figura 5	Agrupamento hierárquico não supervisionado dos 30 casos de lesões orais. Não foram observados agrupamentos dos casos em classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica.....	51
Figura 6	Agrupamento hierárquico não supervisionado dos 16 casos de leucoplasias. Não foram observados agrupamentos dos casos em classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica.....	52
Figura 7	Agrupamento hierárquico não supervisionado de 24 casos de lesões precursoras: 18 leucoplasias (16 L e duas LVPs) e 6 líquen plano (LP). Esta análise não permitiu observar a separação entre estes grupos.....	52
Figura 8	Agrupamento hierárquico supervisionado de 16 leucoplasias segundo o hábito tabagista.....	54

Figura 9	Agrupamento hierárquico supervisionado de 16 leucoplasias segundo o hábito etilista.....	54
Figura 10	Comparação entre as vias enriquecidas para genes diferencialmente expressos com relação ao habito tabagista e etilista.....	57
Figura 11	Classificação das amostras utilizando a análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis – PCA</i>) nos ensaios de expressão de miRNA.....	58
Figura 12	<i>Heatmap</i> mostrando as alterações nos níveis de expressão de miRNAs em oito leucoplasias e sete tecidos normais contralaterais.....	60
Figura 13	Comparação entre vias enriquecidas para genes alvos de miRNA e genes diferencialmente expressos das análises considerando o hábito tabagista e etilista.....	62
Figura 14	Diagrama de Venn representando a intersecção entre as análises de expressão gênica global e análise de predição <i>in silico</i>	63
Figura 15	Interação entre os miRNAs com expressão diminuída e transcritos com aumento da expressão (imagem gerada usando o <i>software NAViGaTOR</i>).....	65
Figura 16	Análise de expressão dos transcritos em amostras de leucoplasias e tecido da mucosa oral normal contralateral após a análise integrada e meta-análise.....	72

Figura 17	Análise da expressão dos miRNAs por RT-qPCR nas lesões leucoplásicas comparadas com o tecido normal contralateral.....	73
------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estudos descritos em literatura que avaliaram amostras de leucoplasias. Estão apresentados os genes diferencialmente expressos.....	19
Quadro 2	Dados clínicos dos 37 pacientes incluídos neste estudo.....	34
Quadro 3	Genes selecionados para confirmação dos achados, com o gene referência utilizado, iniciadores, número de acesso do transcrito e o tamanho do amplicon (pb).....	46
Quadro 4	miRNAs selecionados para confirmação dos achados, com o miRNA referência utilizado, sequência de referência, código do ensaio TaqMan, e as sequências maduras e <i>stem-loop</i>	47
Quadro 5	Genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de pacientes com hábitos tabagistas e etilistas.....	55
Quadro 6	Análise <i>in silico</i> dos miRNAs alterados. A predição dos genes alvos dos miRNAs foi realizada utilizando o banco de dados <i>TargetScan</i>	61
Quadro 7	Resultado da análise integrada entre os resultados da expressão de transcritos e dos miRNAs diferencialmente expressos.....	64
Quadro 8	Genes identificados após a meta-análise utilizando os resultados do presente estudo e os descritos por GUMUS et al. (2008) e SAINTIGNY et al. (2011).....	67

Quadro 9	miRNAs indicados pela meta-análise utilizando os dados de XIAO et al. (2012), CERVIGNE et al. (2009) e os obtidos no presente estudo.....	68
Quadro 10	miRNAs e genes alvos resultantes da análise integrada presentes nas meta-análises que apresentaram correlação inversa e concordância com os achados deste estudo.....	70
Quadro 11	Relatos em literatura que associaram os miRNAs selecionados para a confirmação dos achados.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes diferencialmente expressos obtidos a partir da análise de 16 leucoplasias comparadas com tecido normal contralateral.....	53
Tabela 2	Enriquecimento para os 533 genes diferencialmente expressos obtidos na análise considerando habito etilista.....	56
Tabela 3	Relação dos 13 miRNAs que apresentaram expressão diminuída nas leucoplasias em relação ao tecido normal.....	59
Tabela 4	Principais funções biológicas e genes encontrados no enriquecimento realizado pelo IPA.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ago	Argonauta
CBO	Cânceres de cavidade oral e de orofaringe
CCE	Carcinomas de Células Escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cDNA*	Complementary DNA
CIP*	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
cRNA*	Complementary RNA
Ct*	Cycle Threshold
Cy*	Cyanine
DGCR8*	Di George syndrome Critical Region 8
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
dNTP*	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT*	Dithiothreitol
EDTA*	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FDR*	False Discovery Rate
GEO*	Gene Expression Omnibus
HCl	Ácido Clorídrico
HCL*	Hierarchical Clustering
HPV*	Human Papilloma Virus
IMC	Índice de Massa corporea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA*	Ingenuity Pathways Analysis
KCl	Cloreto de Potássio
L	Leucoplasia
Log	Logaritmo
LOH*	Loss of Heterozygosity
LP	Líquen Plano
LVP	Leucoplasia Verrucosa Proliferativa

MgCl₂	Cloreto de Magnésio
miRNA*	microRNA
mRNA*	Messenger RNA
NA*	Not Avaliable
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kb*	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
pb	pares de base
PB	Processo Biológico
PCA*	Principal Component Analysis
PCR*	Polymerase Chain Reaction
PPP1	Proteína fosfatase 1
PSA*	Prostate-specific antigen
RISC*	RNA-Induced Silencing Complex
RNA*	Ribonucleic Acid
RT-qPCR*	Reverse Transcription – qPCR
SAM*	Significance Analysis of Microarray
SNP*	Single-Nucleotide Polymorphism
TRAIL*	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRBP*	Transactivating Tesponse RNA-Binding Protein
TUCAN*	Tumor up-regulated CARD
UTR*	Untranslated Region
VC	Vias canônicas

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês;

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Cânceres de Cavidade Oral e de Orofaringe (CBO)	1
1.2	Características gerais das lesões pré-cancerosas e seu potencial de malignização.....	3
1.3	Fatores de risco para o CBO e lesões precursoras	8
1.4	Diagnóstico, tratamento e prognóstico	13
1.5	Características moleculares das leucoplasias	15
1.6	Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs nas lesões orais e CCEs	20
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Casuística.....	31
3.2	Metodologias	35
3.2.1	Extração do RNA total e expressão gênica global.....	35
3.2.2	Genotipagem do Vírus do Papiloma Humano (HPV).....	37
3.2.3	Expressão global de microRNA	38
3.2.4	Análise Integrada de dados transcriptômicos e de expressão de miRNAs	41
3.2.5	Síntese de cDNA e Análise da expressão de transcritos (RT-qPCR)....	42
3.2.6	Crerérios para a seleção de candidatos para confirmação dos resultados	45
3.2.7	Análise dos dados de expressão gênica segundo parâmetros clínicos e patológicos	47

4	RESULTADOS	48
4.1	Análise de expressão de gênica.....	50
4.2	Análise do perfil de expressão de miRNAS	58
4.3	Análise Integrada.....	63
4.4	Meta-Análise	67
4.5	Análise de confirmação dos achados por RT-qPCR	69
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	97
6.1	Conclusão geral.....	97
6.2	Conclusões específicas	97
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.	100

ANEXO

Anexo 1 Aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCERES DE CAVIDADE ORAL E DE OROFARINGE (CCO)

Os cânceres de cavidade oral e de orofaringe (CCO) são as neoplasias malignas mais comuns da cabeça e pescoço. Apesar da localização privilegiada, sendo possível a prevenção primária e a higienização diária, os tumores de boca e orofaringe geralmente não são diagnosticados em sua fase inicial de crescimento (CASTRO JÚNIOR et al. 2008). Aproximadamente 73% dos pacientes com câncer de cavidade oral são diagnosticados em estágios avançados, o que implica em uma redução na sobrevida dos pacientes (CASTRO JÚNIOR et al. 2008; HOLMES et al. 2010).

O CCO é o sexto câncer em incidência no mundo e o quinto na população brasileira (WARNAKULASURIYA 2009). A estimativa anual do carcinoma oral é de 275 mil casos e de 130 mil casos para o câncer de orofaringe e laringofaringe (WARNAKULASURIYA 2009). Na população brasileira, foram estimados para 2013, 41.380 mil casos novos de câncer oral e 7.890 mil mortes pela doença (Ministério da Saúde 2011).

Os principais fatores de risco para CCO são o uso de tabaco, o consumo de álcool e o uso de betel, comum no sul da Ásia. Aproximadamente 80% do risco de desenvolver câncer oral são atribuídos ao uso de tabaco e álcool, sendo ativos tanto separadamente quanto em

sinergismo. Outro fator de risco é a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), principalmente em jovens. Estima-se uma incidência de 25% de infecção pelo HPV nos tumores de cabeça e pescoço e de 50 a 60% considerando apenas cânceres de orofaringe (JOO et al. 2011; TROTTA et al. 2011). Entretanto, aproximadamente 25% dos casos de CCO não estão expostos aos fatores de risco conhecidos, formando um subgrupo de tumores de etiologia desconhecida (WARNAKULASURIYA 2009).

Evidências em literatura apontam um modelo de progressão tumoral em carcinomas de cavidade oral. A primeira etapa ocorreria a partir de um precursor inicial, conhecido como lesões pré-cancerosas ou pré-malignas, com subsequente desenvolvimento para carcinomas de células escamosas (CCE) (REIBEL 2003; LIU et al. 2012). Entretanto, não se sabe exatamente se os CCOs evoluem a partir de lesões precursoras ou de células normais da mucosa oral (REIBEL 2003; TROTTA et al. 2011) (Figura 1). Acredita-se que a evolução tumoral ocorra pelo acúmulo de alterações genéticas, iniciando-se por mutações em genes críticos, por exemplo *TP53*, permitindo o aparecimento de hiperplasias e/ou displasias de variados graus, podendo progredir para um carcinoma invasivo (ARGIRIS et al. 2008). Essa evolução tumoral pode se dar pela expansão de células modificadas geneticamente, que substitui as células do epitélio da mucosa normal, podendo ser pelo ganho de características que levam a um crescimento celular anormal e/ou pelo ganho de uma vantagem de crescimento sobre as células da mucosa normal (LEEMANS et al. 2011).

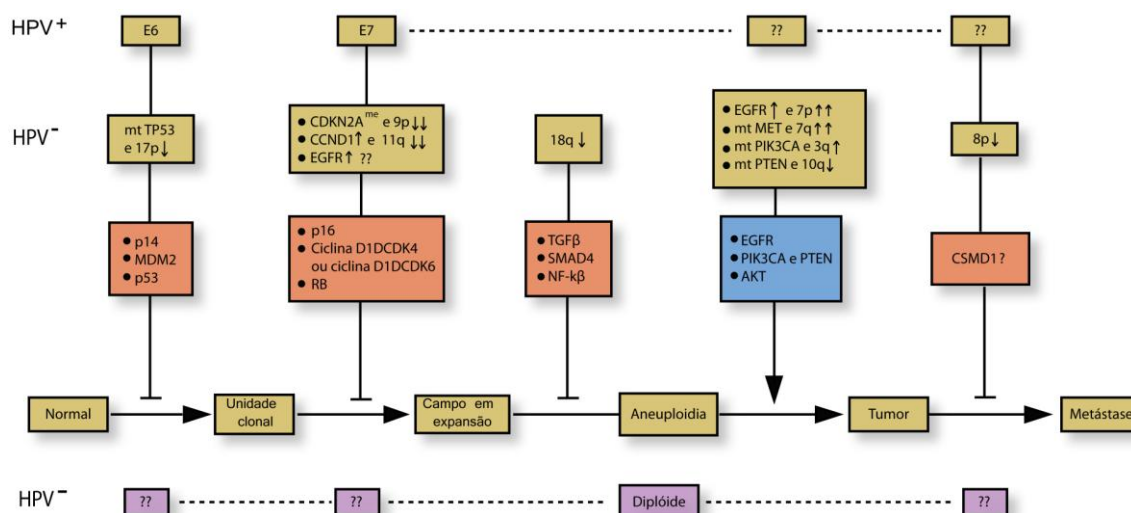


Figura 1 – Modelo de progressão tumoral molecular descrito em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Os genes e as vias moleculares envolvidas estão indicadas no esquema. Esquema adaptado de LEEMANS et al. (2011).

1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E SEU POTENCIAL DE MALIGNIZAÇÃO

O risco de transformação das lesões precursoras de cavidade oral para os tumores malignos varia de 0,13% a 36,4%, sendo os principais fatores de risco: sexo masculino (REDDI e SHAFER 2006), tempo de persistência da lesão, leucoplasia idiopática (surgimento espontâneo ou desconhecido), sítio anatômico (ocorrendo principalmente na língua e/ou no assoalho bucal) e tamanho da lesão maior que 200mm² (lesões maiores apresentam risco 5,4 vezes maior de transformação que lesões menores). Em pacientes não fumantes, os principais fatores relacionados à transformação envolvem lesão não homogênea, alto grau de displasia,

subtipo verrucoso e presença de *Candida albicans* (CASTRO JÚNIOR et al. 2008; HO et al. 2012; ARDUINO et al. 2013).

As principais lesões precursoras ou pré-malignas que acometem a cavidade oral correspondem as leucoplasias, eritroplasias e líquen plano. Todas elas apresentam potencial de malignização para carcinoma de células escamosas (CCE). As lesões pré-cancerosas são muitas vezes assintomáticas, apresentando leves alterações na cor (vermelha, branca ou mista) e na textura de superfícies (erosão, queratose granulação ou fissura). As leucoplasias são definidas como lesões predominantemente brancas na mucosa oral e são as lesões pré-cancerosas mais frequentes na boca, apresentando prevalência global de 0,5% a 3,4% e a taxa de transformação maligna de 0,13% a 17,5%. A prevalência das leucoplasias aumenta com o avanço da idade, sendo que homens mais jovens (menos que 30 anos) apresentam prevalência inferior a 1%, e homens mais velhos (mais que 70 anos) apresentam uma prevalência de 8%, enquanto que nas mulheres com mais de 70 anos essa taxa é de cerca de 2% (KUMAR et al. 2013).

As leucoplasias podem ser classificadas macroscopicamente como lesões homogêneas (lesões planas, finas e uniformemente brancas) e não homogêneas (lesões com manchas ou nódulos e leucoplasias verrucosas – um subtipo de lesão caracterizada por apresentação multifocal, resistência a tratamentos e com elevada taxa de malignização) (HO et al. 2012).

Histologicamente, as leucoplasias são distinguidas como displásicas ou não displásicas. Pacientes com lesões displásicas apresentam risco cinco vezes maior de progressão para o câncer (VAN DER WALL et al.

1997). Segundo CASTRO JÚNIOR et al. (2008), os exames histopatológicos em leucoplasias servem para excluir outros tipos de lesões e estabelecer o grau da displasia epitelial. Geralmente os achados histológicos são de uma lesão intra-epitelial consistindo de hiperplasia epitelial, associada ou não a hiperqueratose, acantose e processo inflamatório, apresentando ou não diversos graus de displasia.

Por não haver muito conhecimento e a graduação da displasia ser subjetiva, criou-se um sistema binário de graduação para reduzir a variabilidade entre os observadores. Neste sistema lesões de baixo risco são displasias leves e moderadas, e as de alto risco são displasias severas e carcinomas *in situ*, dependendo da arquitetura e das mudanças citológicas (KUJAN et al. 2006). Segundo LIU et al. (2012), a taxa de sobrevida livre de câncer em 5 anos para os pacientes que apresentavam displasia de alto grau é de 59%, enquanto que nos pacientes com displasia de baixo grau, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 90,5%.

O desenvolvimento, a estabilização e/ou a regressão das lesões ainda é difícil de prever devido a heterogeneidade das lesões (ARDUINO et al. 2013). Além disso, muitas lesões não são associadas aos fatores de risco conhecidos, indicando que fatores adicionais podem estar influenciando na transformação. Sabe-se que a instabilidade genômica e o acúmulo de alterações genéticas ocasionadas ou não pela exposição aos fatores de risco podem preceder fenótipos displásicos. A aquisição de múltiplas alterações genéticas na região da lesão pode levar a um processo

de transformação tumoral ou recidiva local após a cirurgia (ARDUINO et al. 2013).

O conceito de “cancerização de campo” foi estabelecido por SLAUGHTER et al. (1953) baseado na observação de altas taxas de recidivas locais após tratamentos em cânceres orais e a grande probabilidade de desenvolvimento de múltiplos tumores independentes na mucosa oral. De acordo com a revisão de LEEMANS et al. (2011), este termo foi reformulado, considerando-se a presença de alterações genéticas específicas associadas à carcinogênese. Atualmente, o termo cancerização de campo é definido como uma ou mais áreas da mucosa com células epiteliais que possuem associação com alterações genéticas e epigenéticas (LEEMANS et al. 2011).

A cancerização de campo ocorre principalmente nos queratinócitos do tecido epitelial, os quais podem sofrer um grande número de alterações durante os vários estágios de transformação, conferindo vantagem proliferativa sobre os queratinócitos circundantes normais (FELLER e LEMMER 2011). Este processo se inicia em células progenitoras basais e/ou parabasais do epitélio. Essas células adquirem alterações moleculares com consequentes alterações funcionais em genes que mantêm a estabilidade genômica, podendo gerar um queratinócito transformado como resultado do acúmulo destas alterações (FELLER e LEMMER 2011).

A clonalidade é uma das características do fenômeno da cancerização de campo. Segundo a teoria da policlonalidade, múltiplas células podem sofrer alterações independentes e algumas células

progenitoras basais sofrem uma expansão clonal independente gerando células com perfis moleculares distintos e outras que podem compartilhar algumas alterações, já que estas células estão expostas aos mesmos carcinógenos e ao mesmo microambiente (FELLER e LEMMER 2011). Na teoria da monoclonalidade, os eventos moleculares podem ocorrer em uma única célula progenitora com ampla expansão lateral, ou seja, uma população de células provenientes de uma célula basal transformada passa por expansão clonal e se espalha lateralmente, resultando em queratinócitos transformados com perfil molecular idêntico ou relacionado com o monoclonal original (FELLER e LEMMER 2011; ANGADI et al. 2012). Estes eventos moleculares que culminam com o desenvolvimento da cancerização de campo podem ser espontâneos ou induzidos pelo microambiente ou desencadeados pela exposição à carcinógenos. Porém, é possível também que algumas células-tronco ectodérmicas estejam destinadas a se tornarem células progenitoras transformadas (FELLER e LEMMER 2011).

Os segundos tumores primários são distintos geograficamente, não havendo relação com a neoplasia original, podendo ser sincrônicos ou metacrônicos (ANGADI et al. 2012). A recorrência tumoral pode ressurgir após cirurgias de ressecção total da lesão devido a sobra de ilhas microscópicas distantes dos sítios cirúrgicos, por conter um campo pré-condicionado do epitélio. As células tumorais presas na matriz da lesão, por fibrinas e outros substratos do sítio cirúrgico, migram direcionadas por quimiocinas e fatores de pró-migração (fatores de crescimento e produtos da degradação da matriz) se concentrando no local da ressecção, podendo

assim ativar a transição epitélio-mesênquima e resultando nas recorrências tumorais (ANGADI et al. 2012).

1.3 FATORES DE RISCO PARA O CCO E LESÕES PRECURSORAS

Além do consumo de álcool e tabaco, a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) foi associado como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, especialmente em orofaringe (TRIBIUS e HOFFMANN 2013).

O HPV pertence à família *Papilloma viridae* e é composto por um DNA em dupla fita pequeno (DE VILLIERS et al. 2004). Até o momento foram descritos mais de 120 subtipos de HPVs associados principalmente a infecções no trato genital (SHUKLA et al. 2009; SYRJANEN et al. 2011). O HPV tem como alvo células basais proliferativas que sofreram algum tipo de trauma e são expostas, possibilitando a invasão do vírus. Neste processo ocorre a interação das oncoproteínas virais E6 e E7 com proteínas reguladoras do ciclo celular das células hospedeiras (p53 e Rb), estimulando assim a proliferação celular (SYRJANEN et al. 2011). O grau de afinidade das proteínas do HPV com as proteínas do hospedeiro é o que determina se o HPV é de alto ou de baixo risco. Os chamados HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82) possuem uma alta afinidade entre suas proteínas com as proteínas supressoras tumorais, resultando em infecções persistentes e aumentando o risco de câncer.

Outros subtipos de HPV praticamente não possuem associação com câncer ou possuem um baixo potencial oncogênico, podendo estar associados a lesões benignas, os chamados HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) (SHUKLA et al. 2009; SYRJANEN et al. 2011). O HPV16 é o subtipo mais comumente encontrado em carcinomas orais e de orofaringe, sendo detectado em 16% dos CCEs, o que representa 70% dos casos de HPV-positivos. O subtipo HPV18 é o segundo mais comumente detectado em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, sendo descrito em aproximadamente 8% dos casos (SYRJANEN et al. 2011). Em uma meta-análise em carcinomas orais, MILLER e JOHNSTONE (2001) demonstraram que as lesões pré-cancerosas apresentavam uma prevalência do vírus HPV de 2 a 3 vezes maior quando comparados com a mucosa normal. O mesmo foi observado nos CCEs, nos quais a probabilidade de detectar HPV foi 4,7 vezes maior. Assim como no estudo de SYRJANEN et al. (2011), o grupo das lesões pré-malignas apresentou uma forte associação com o HPV, incluindo leucoplasias, líquen plano e no epitélio displásico.

KRISTOFFERSEN et al. (2012) relataram alta prevalência de HPV em leucoplasias, entretanto a mucosa normal também apresentou taxas similares do vírus. Considerando-se que, em carcinomas orais, a infecção é transiente, os autores sugeriram que o HPV não tem papel etiológico nas leucoplasias. Aparentemente a presença do vírus não é responsável pela transformação maligna no epitélio da cavidade oral. Os pacientes HPV-positivos possuem um melhor prognóstico, com uma melhor sobrevida livre

de câncer, uma melhor taxa de cura no tratamento com radiação ionizante com ou sem quimioterapia quando comparados com pacientes HPV-negativos (KOSTARELI et al. 2012; TRIBIUS e HOFFMANN 2013).

Aproximadamente 25% dos carcinomas na orofaringe não estão expostos aos fatores de risco mencionados, formando um subgrupo de tumores de etiologia desconhecida (WARNAKULASURIYA 2009). Dieta deficiente em antioxidantes é um fator adicional para a predisposição ao desenvolvimento de câncer oral, visto que o consumo de frutas e vegetais pode reduzir o risco em até 25% do desenvolvimento da doença (WARNAKULASURIYA 2009). A perda de dentes, doenças periodontais, exposição a irradiações crônicas, anemia, baixo índice de massa corpórea (IMC), imunossupressão e infecção por *C. albicans* também podem estar associadas ao desenvolvimento de câncer de cavidade oral (WARNAKULASURIYA 2009; CURADO e HASHIBE 2009; JABER 2010).

Diversos estudos concordam que tanto o câncer oral quanto as leucoplasias podem ser induzidas pelo uso de tabaco (BANOCZY et al. 2001; GUMUS et al. 2008; JABER 2012; LIMA et al. 2012; SUJATHA et al. 2012). A frequência e a duração do hábito de fumar possui efeito significativo sobre o desenvolvimento de lesões orais, pois foi observado que quanto maior o tempo de exposição ao tabaco maior o número de lesões observadas (SUJATHA et al. 2012).

Nos últimos 30 anos a prevalência de leucoplasias variou entre 1,1% a 11,7% nos diferentes países, sendo que na Índia e Dinamarca, devido a alta frequência de leucoplasias em fumantes, o hábito tabagista passou a

ser considerado a causa do aparecimento das leucoplasias orais. Na Hungria, 80% a 100% dos pacientes com leucoplasia são tabagistas (BANOCZY et al. 2001).

Lesões com características displásicas tem um potencial de transformação maligna de aproximadamente 36% (MORSE et al. 2007). As maiores taxas de leucoplasias displásicas em fumantes está entre os homens, afetando principalmente a mucosa oral e o assoalho bucal (especialmente quando associado ao álcool) (LIMA et al. 2012). Já em indivíduos não fumantes, as leucoplasias displásicas são mais frequentes em mulheres, com uma maior incidência na língua (JABER 2010; LIMA et al. 2012). A idade média do aparecimento de leucoplasias em fumantes é mais baixa que em não fumantes, tanto para o aparecimento de lesões displásicas quanto para as não displásicas (LIMA et al. 2012).

Alguns estudos mostraram regressão ou desaparecimento de lesões orais com a parada do uso de tabaco (SHIU et al. 2000; BANOCZY et al. 2001; ARDUINO 2013). A taxa de diminuição das leucoplasias varia de 43% a 58% entre os ex-fumantes. SHIU et al. (2000) reportaram um redução de 36% dos casos de leucoplasias em ex-fumantes (BANOCZY et al. 2001; ARDUINO 2013).

Ainda há muita controvérsia quanto ao papel do tabaco no risco de desenvolvimento das leucoplasias e na progressão destas para carcinomas, principalmente devido à presença das lesões em não tabagistas e não etilistas, formando um subgrupo que pode revelar outros fatores de risco,

sendo necessários mais estudos, que talvez revele características clínicas diferentes dos fumantes e dos etilistas (JABER 2010).

O álcool é um fator de risco que pode agir tanto isoladamente quanto em sinergismo com o tabaco. Os dados são contraditórios em relação ao consumo de álcool e o desenvolvimento de leucoplasias. Alguns autores sugerem que o álcool é um fator de risco importante, enquanto outros mostram uma associação nula, fraca ou moderada em relação ao surgimento de leucoplasias (HASHIBE et al. 2000). Para MORSE et al. (2007), o hábito de consumir bebida alcoólica está mais fortemente associado ao câncer do que às leucoplasias displásicas. Entretanto, o impacto do consumo do álcool na carcinogênese não se limita somente aos estágios finais; um histórico de etilismo pode estar associado com um maior risco de desenvolvimento de câncer a partir de displasias, enquanto o tabaco parece possuir um maior impacto em estágios iniciais da carcinogênese (MORSE et al. 2007).

Os mecanismos da ação do álcool no surgimento das leucoplasias ainda não estão estabelecidos, entretanto se sabe que o produto metabolizado do etanol, o acetaldeído, é carcinogênico (MORSE et al. 2007). Em adição a outros componentes como aflotoxinas, arsênico, asbestos e benzopireno, o álcool pode aumentar a penetração de carcinógenos na mucosa, diminuir a entrada e absorção de nutrientes protetores provenientes de vegetais e frutas, e suprimir o sistema imunológico, episódios que podem auxiliar no aumento de danos ao DNA (HASHIBE et al. 2000; MORSE et al. 2007).

1.4 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O diagnóstico de leucoplasias ainda é muito difícil de ser realizado, principalmente para prever se uma lesão terá uma evolução maligna ou não. Um diagnóstico provisório é realizado retirando-se possíveis fatores de risco (hábito tabagista e etilista) e observando possíveis regressões após 2 a 4 semanas. O diagnóstico pode ser feito por biópsias, o que é essencial para caracterizar a lesão e descartar outras doenças da mucosa oral. A biópsia incisional é feita em lesões grandes, maiores que 01 (um) cm, em lesões múltiplas ou difusas (CHAN e WOLF 2012). Uma técnica que pode reduzir variações no diagnóstico histopatológico é a análise da imagem multi-espectral e espectroscopia trimodal no qual é possível diagnosticar lesões pré-malignas e cancerosas com precisão. Entretanto, esta é uma técnica cara e demorada, o que limita sua utilização na prática clínica (SWINSON et al. 2006).

Há diversas modalidades de tratamento para as lesões orais, incluindo medicamentos como retinóides e antimicóticos, excisão cirúrgica, criocirurgia, ablação a laser, eletrocauterização, uso de carotenoides (B-caroteno, licopeno), vitaminas A, C e K, fenretina, bleomicina e terapias fotodinâmicas (HOLMSTRUP et al. 2006; KUMAR et al. 2013). A mudança no estilo de vida também é recomendada, como mudanças no hábito de fumar e consumir álcool, e mudança nos hábitos alimentares (CASTRO JÚNIOR et al. 2008). Entre os métodos mais utilizados para o tratamento de leucoplasias estão as ressecções cirúrgicas, eletrocoagulação, criocirurgia,

excisão a laser por CO₂ e o uso de medicação tópica (CASTRO JÚNIOR et al. 2008). Não há evidência de que qualquer tratamento seja capaz de prevenir o aparecimento dos CCEs em pacientes com leucoplasias, e apesar das displasias epiteliais serem caracterizadas como lesões pré-malignas, em alguns casos estas lesões acabam regredindo. Dentre as lesões já tratadas cirurgicamente, a taxa de recorrência é de 10 a 20%, e de desenvolvimento para câncer é de 3 a 9% dos casos (GILLISON 2004; HOLMSTRUP et al. 2006).

No estudo de HOLMSTRUP et al. (2006), o tratamento cirúrgico de todos os tipos de lesões pré-malignas estudadas no trabalho não mostrou ser protetor para o desenvolvimento do câncer, com resultados sugerindo um aumento no risco de malignização após a cirurgia. Segundo os autores, é possível que a cirurgia seja um estímulo para promover a transição de leucoplasias para CCEs, ou ainda poderia haver células cancerosas fora da área removida. Neste estudo, 55% das lesões não homogêneas se tornaram homogêneas e desapareceram em 20% dos casos em que não houve intervenção cirúrgica. HOLMSTRUP et al. (2006) também concluíram que os únicos fatores significativos associados com a transformação maligna é o tipo clínico e o tamanho da lesão.

Os principais fatores de risco descritos como associados com essas lesões são a idade acima de 60 anos, lesões não homogêneas e generalizadas, localização na borda de língua, tamanho maior que 200mm² e displasia epitelial histologicamente confirmada. Estas características são consideradas como de pior prognóstico, porém não é possível definir o curso

das lesões. Mesmo sob tratamento, as lesões podem recorrer ou sofrer novas transformações, sendo assim, é necessário tanto para lesões de alto risco quanto para as de baixo risco, fazer um seguimento por toda a vida. Esses achados enfatizam a necessidade de novos tratamentos que de fato previnam o desenvolvimento do câncer, e outros métodos para predição de desenvolvimento de lesões suscetíveis (HOLMSTRUP et al. 2006; KUMAR et al. 2013).

1.5 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS LEUCOPLASIAS

A identificação de marcadores biológicos tem potencial para permitir a detecção de neoplasias em um estágio inicial e pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias (SMEETS et al. 2009). Alguns marcadores tem potencial para determinar o potencial das lesões pré-malignas evoluírem para câncer. Entre eles, encontram-se os marcadores genômicos que incluem alterações cromossômicas e na ploidia; mudanças na expressão de oncogenes ou genes supressores de tumor (como por exemplo, o aumento da expressão do TP53, encontrado em 50% dos casos de CCEs e em 47% de lesões pré-malignas); marcadores de proliferação e marcadores de diferenciação, incluindo queratina e antígenos de glicoproteínas de membrana (REIBEL 2003). Nas lesões premalignas orais as perdas de heterozigose, polissomias, desregulação de TP53, aumento da expressão de dopoplanina, p63 e EGFR foram relatadas como associadas a um aumento no risco de desenvolvimento de tumores (SAINTIGNY et al.

2011). Perdas cromossômicas em 3p, 9p e 17p relatadas em leucoplasias foram associadas com o risco de progressão tumoral (LEEMANS et al. 2011).

Embora não haja muitos marcadores de progressão relacionados à leucoplasia, há alguns marcadores prognósticos descritos em CCEs de cavidade oral, como CDKN2A, TP53, EGFR e STAT3 (DU et al. 2012). O TGFB1 e SMAD4 possuem papel fundamental no crescimento e progressão tumoral nos CCEs. A via PI3K foi considerada o principal alvo molecular das alterações nos CCEs, incluindo o oncogene PIK3KA e o supressor tumoral PTEN. Dados em literatura sugerem um possível envolvimento da via PI3K no desenvolvimento e progressão dos CCEs de cavidade oral e de orofaringe (DU et al. 2012).

Entre os inúmeros estudos relatando o potencial de biomarcadores em carcinomas orais e de orofaringe, a análise da expressão do EGFR é útil na avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico (MINOR et al. 2012). A identificação e a genotipagem do HPV também contribuem para a avaliação do prognóstico dos pacientes, pois tumores positivos para a infecção pelo HPV são considerados como uma nova entidade, com características clínicas e histopatológicas distintas, ocorrendo principalmente em indivíduos jovens (MINOR et al. 2012; WANG et al. 2012). Os tumores HPV positivos acometem os sítios anatômicos primários de orofaringe, tem tamanho pequeno, frequente acometimento de linfonodos, e não há relatos do envolvimento dos fatores de risco comumente descritos em literatura. Na última década houve um aumento da incidência dos tumores HPV positivos.

Estes tumores parecem ser negativos para mutações no gene TP53, apresentam baixo nível de perdas alélicas e distintos perfis de expressão de mRNA, independente se o paciente apresenta hábito tabagista ou não, e apresentam melhor resposta a tratamentos e a uma maior taxa de sobrevivência (SMEETS et al. 2009; WANG et al. 2012; KOSTARELI et al. 2012).

Há poucos relatos em literatura de perfis de transcritos em leucoplasias e que associem a progressão destas lesões para CCEs. ODANI et al. (2006) analisaram o perfil de expressão gênica global pela plataforma da Affymetrix GeneChip em quatro casos de leucoplasias orais e em dois CCEs orais, e encontraram 18 genes diferencialmente expressos em todas as leucoplasias, destes, oito genes apresentaram aumento de expressão e dez apresentaram diminuição de expressão (Quadro 1). KONDOH et al. (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica de 46 casos, sendo 19 tecidos leucoplásicos e 27 de CCEs orais por análise de microarray (IntelliGene HS Human expression chip – Takara, Japan) e encontraram 4.600 genes diferencialmente expressos. Os autores identificaram 27 genes diferencialmente expressos (12 apresentavam aumento de expressão e 15 diminuição de expressão) que foram capazes de diferenciar os CCEs das leucoplasias e diferenciar graus histológicos.

KURIBAYASHI et al. (2009) avaliaram 10 leucoplasias orais utilizando uma plataforma de arrays de 29K. Os autores compararam o perfil de expressão das displasias moderadas e severas e relataram 96 genes com expressão aumentada em displasias severas. Os autores confirmaram o

envolvimento dos genes SLC25A11, TXNIP e FZR1 nos casos de pior prognóstico e descreveram 16 genes candidatos a biomarcadores.

Recentemente, SAINTIGNY et al. (2011) determinaram o perfil de expressão em lesões pré-malignas de 162 leucoplasias orais, das quais 39 evoluíram para CCE em um período de seguimento aproximado de 7,5 anos. Os autores utilizaram 29 transcritos como modelos de predição. Entre aqueles com maior significância estavam o TP53 e CDKN1B com diminuição de expressão, e a DNMT3B com aumento da expressão. O Quadro 1 mostra os principais genes encontrados como diferencialmente expressos em relatos que descreveram a análise da expressão de transcritos em amostras de leucoplasias.

Para o nosso conhecimento, há poucos relatos em literatura que avaliaram o perfil de expressão dos miRNAs em leucoplasias e que associaram a progressão das leucoplasias para CCEs.

Quadro 1 - Estudos descritos em literatura que avaliaram amostras de leucoplasias. Estão apresentados os genes diferencialmente expressos.

Estudos	Tipo de tecidos	Plataforma utilizada	Testes de Validação ou Confirmação dos resultados
Odani et al. 2006	Leucoplasias x tecido normal		
Expressão Aumentada	<i>CLSP, K10, K2e, LOR, GLRX, HAL, ARG1, PTPRZ1</i>	Affymetrix GeneChip	RT-qPCR
Expressão Diminuída	<i>CEACAM5, CLDN7, RAI3, CEACAM6, PSCA, SCEL, ECM1, ESE1, IL1- RA, RHCG</i>		
Kondoh et al. 2007	Leucoplasias x CCEs orais		
Expressão Aumentada	<i>MGP, NR2F2, SLIT3, KRT1, KRT13, PRELP, C1orf10, FOSB, DPT, TG3, FXYD6, MFAP4, DPYSL3, CLU, CRIP1</i>	IntelliGene HS Human expression chip	RT-qPCR
Gumus et al. 2008	Linhagem celular MSK-leuk1**		
Expressão Aumentada	<i>CYP1A1, CYP1B1, PTHLH, IL1B, EREG, ALD-H1A3, IL6, IL24, GCLM, TXNRD1, NQO1, PIR, AKR1C1, AKR1C2</i>	Affymetrix HGU133 Plus 2 arrays	RT-qPCR de 10 genes.
Kuribayashi et al. 2009	Leucoplasia x normal		
Expressão Aumentada	<i>KIAA1632, SLC25A11, SEPX1, ANXA13, MC2R, FPGS, SLC7A4, BCAN, DBNDD2, TCL1B, RABAC1, PDE6H, PGAM5, TXNIP, CSNK1G2, FZR1</i>	AceGene Human 30 K 1Chip	RT-qPCR e PCR para <i>SLC25A11</i> , <i>TXNIP</i> e <i>FZR1</i> .
Saintigny et al. 2011	Leucoplasias x normal		
Expressão Aumentada	<i>SIBLINGS, DNMT3B, CSN1S2A, CCDC11, KCNMB2, MKNK1, PDK1, PTK2, MED14, RNU2-1, SDCCAG1, FAM163A, CSN1S2A, DENND2C, SS18L1, TCEA1, PDK1, AKR1C4.</i>	Human Gene 1.ST	-
Expressão Diminuída	<i>AK128090, OR4B1, STAT6, SNCA, PLEKHA9, SNRPA1, CYP2G1P, CPSF4, GLS2.</i>		

*Linhagem celular de leucoplasia displásica adjacente a um CCE (carcinoma de células escamosas) de língua; ** linhagem celular tratada com extrato de tabaco.

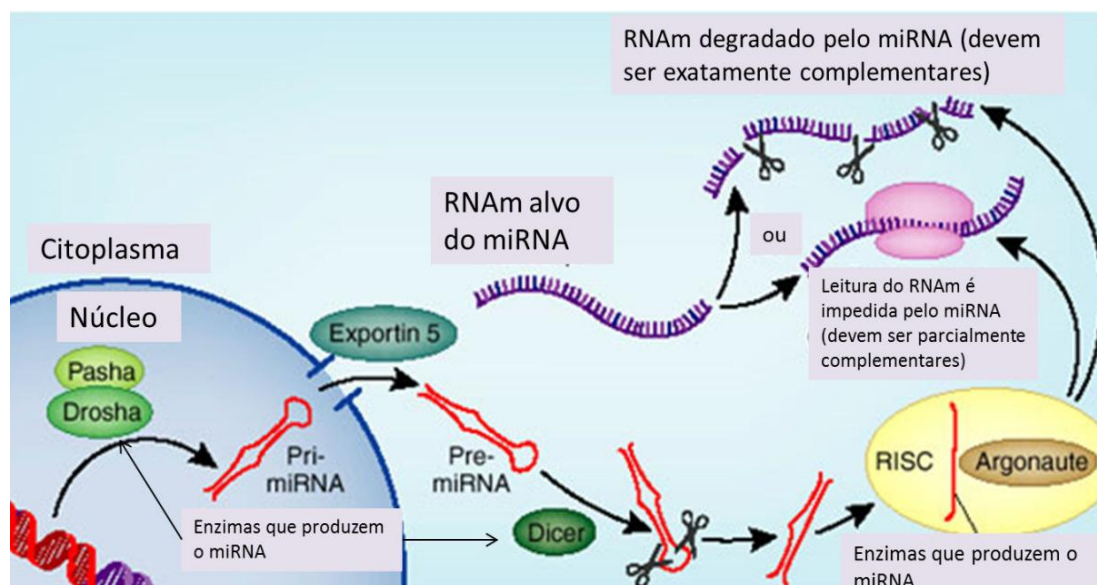
1.6 BIOGÊNESE E MECANISMO DE AÇÃO DOS MIRNAS NAS LESÕES ORAIS E CCEs

Os microRNAs (miRNAs) correspondem a pequenas sequências de 20 a 25 nucleotídeos, codificados por genes específicos, os quais atuam na regulação da expressão de mRNAs pela repressão da tradução ou degradação do mRNA (GROSSHANS e FILIPOWICZ 2008). Acredita-se que 10% a 30% dos transcritos humanos sejam alvos dos miRNAs (DI LEVA et al. 2012).

Segundo o banco de dados mirBase (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, dados atualizados em outubro de 2013, version 20) estão descritos mais de 2.578 miRNAs maduros no genoma humano, e segundo o banco de dados MirTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/statistics.php>) há 38.113 interações de miRNAs-alvos. Os miRNAs têm um importante papel nos processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com o início e desenvolvimento de diversos tipos tumorais (DI LEVA et al. 2012; NOHATA et al. 2013). Atualmente, tem sido demonstrado que os miRNAs são fundamentais na pesquisa do câncer (DI LEVA et al. 2012; NOHATA et al. 2013).

A maioria dos miRNAs é transcrito a partir de regiões intrônicas de genes codificadores ou não-codificadores, enquanto a minoria pode ser transcrita a partir de sítios isolados no genoma ou na região 3' UTR do gene (BARTEL e CHEN 2004). O processo de biogênese dos miRNAs se inicia no

núcleo pela transcrição do pri-miRNA pela RNA polimerase II (LANDGRAF et al. 2007). Este pri-miRNA apresenta uma região de aproximadamente 2kb e sua estrutura é composta por um *loop* (forma de grampo), “CAP” na região 5’ e cauda poli adenina na região 3’ (CAI et al. 2004). O complexo Drosha-DGCR8 cliva o pri-miRNA produzindo o pré-miRNA. O pré-miRNA (70 pb) é formado por dupla-fita ainda em forma de grampo que apresenta dois nucleotídeos na região 3’ que permitem seu reconhecimento pela exportina-5 para ser transportado para o citoplasma. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pelo duplex TRBP-Dicer perdendo o *loop* e se transformando em um miRNA maduro de dupla-fita, com cerca de 22 nucleotídeos (LAU et al. 2001; RICARTE-FILHO et al. 2009). A complementariedade na região 5’ entre as duas fitas é instável, a fita madura do miRNA se associa a proteína Argonauta (Ago) dentro do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) e a outra fita é separada do dúpex. A fita simples madura associada ao complexo multiprotéico RISC torna-se apta a regular a expressão do mRNA-alvo, ocorrendo o alinhamento miRNA-mRNA parcialmente na região 3’UTR. Este alinhamento irá provocar a repressão da tradução proteica, tanto por alinhamento perfeito, onde ocorrerá a degradação do mRNA, ou por ligação imperfeita entre miRNA-mRNA, o que irá induzir a repressão translacional (HUTVÁGNER e ZAMORE 2002; NEGRINI e CALIN 2008; NOHATA et al. 2013). Para uma maturação mais eficiente do pri-miRNA para o pré-miRNA há uma associação entre o complexo Drosha/DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*) com as RNA helicases p68 e p72, facilitando a conversão (KWAK et al. 2010).



Fonte: GOULART et al. (2013).

Figura 2 - O processo de biogênese dos miRNAs. Este processo inicia-se no núcleo, a sequência é transcrita pela RNA polimerase II em pri-miRNA, clivada pelo complexo DROSHA, resultando no pré-miRNA. Este é transportado para o citoplasma pela exportina-5, é clivado novamente pelo complexo DICER perde o *loop*, resultando em um miRNA maduro de dupla-fita instável. A fita madura se associa a proteína Argonauta dentro do complexo RISC, tornando-se apta para regular a expressão do mRNA.

A presença de mutações na via do miRNA ou que envolvam a via podem afetar a interação entre os RNA helicase p68/p72 e a Drosha/DGCR8, diminuindo a conversão do pri- para o pré-miRNA levando a uma diminuição de miRNAs maduros. Outro mecanismo que afeta a biogênese do miRNA é a interação da Dicer com a fosfoproteína TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*), que atua no processo de formação do pré-miRNA para o duplex miRNA/miRNA sendo que uma mutação nesta proteína diminui a produção do miRNA maduro (KWAK et al. 2010).

A metilação também é um mecanismo de regulação dos miRNAs. Hipermetilação nas ilhas CpGs nos promotores de miRNAs supressores

tumorais (anti-oncomiRs) leva ao silenciamento de genes reguladores do ciclo celular, resultando em câncer (GORENCHTEIN et al. 2012). Os miRNAs também apresentam um importante papel em genes reguladores de metástases, agindo indiretamente na aquisição da capacidade invasiva e na geração de fenótipo maligno, resultando na perda de adesão celular, na aquisição de motilidade celular, intra- e extravasamento, e na proliferação em um local distante (DI LEVA et al. 2012).

Outro aspecto importante da atividade dos miRNAs é que eles atuam de forma pleiotrópica, ou seja, um único miRNA pode regular a tradução de centenas de mRNAs alvo, devido a sua complementariedade (GORENCHTEIN et al. 2012; DI LEVA et al. 2012). Cinco a oito nucleotídeos do miRNA fazem complementariedade perfeita com o mRNA, permitindo maior diversidade de ligações e o controle de diversos mRNAs (GORENCHTEIN et al. 2012; DI LEVA et al. 2012).

Os microRNAs que participam de processos importantes no câncer são divididos em oncomiRs e anti-oncomiRs, sendo que os oncomiRs regulam genes supressores e os anti-oncomiRs regulam oncogenes (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; ZHANG et al. 2007; KWAK et al. 2010).

Centenas de miRNAs estão mapeados em regiões cromossômicas conhecidas por estarem alteradas em cânceres, como em regiões de perda de heterozigose (LOH), regiões amplificadas, quebras cromossômicas e sítios frágeis (DI LEVA et al. 2012). Uma amplificação em uma região cromossômica envolvendo miRNAs que regulam negativamente a

transcrição gênica, resultaria no aumento da expressão do miRNA, silenciando por exemplo um gene supressor do tumor. Por outro lado, miRNAs localizados em regiões de sítios frágeis que sofreram deleções ou mutações podem resultar em uma diminuição nos níveis de miRNA que regulam, por exemplo, oncogenes, resultando na formação de tumores (IORIO e CROCE 2011).

Os miRNAs são capazes também de fornecer informações a respeito da origem dos tumores, subtipos, mutações oncogênicas, predisposição ao câncer. Eles tem sido descritos como sendo responsáveis pela regulação de processos celulares tendo sido úteis como marcadores prognósticos da doença e /ou resposta a terapias específicas (IORIO e CROCE 2011, GORENCHTEIN et al. 2012).

Devido seu papel já estabelecido na oncogênese, alguns grupos começaram a investigar a viabilidade dos miRNAs em terapias, silenciando oncogenes ou administrando-os terapeuticamente em supressores tumorais utilizando vetores ou introduzindo-os diretamente no tecido. Um estudo com o miRNA oncogênico *hsa-miR-21* demonstrou reduzir drasticamente tumores de CCEs de laringe e língua quando administrados intravenosamente oligonucleotídeos antisense desse miRNA em modelo animal (GORENCHTEIN et al. 2012). Novas abordagens terapêuticas utilizando miRNAs consistem na redução ou aumento dos níveis de miRNA e/ou interferir na interação do miRNA com o mRNA. Os miRNAs podem ser utilizados como moléculas individuais ou de forma combinatória para um ou vários genes alvos (DI LEVA et al. 2012).

Os miRNAs também têm se mostrado marcadores efetivos para determinar o tecido de origem de metástases. Foi observado que o perfil de expressão dos miRs é similar em tumores primários e metástases, sendo mais precisos para a classificação de diferentes subsítios anatômicos que os perfis de mRNAs (IORIO e CROCE 2010; GORENCHTEIN et al. 2012).

Ainda não há muitos estudos de miRNAs relacionados com câncer oral e de orofaringe, porém sabe-se que os miRNAs são anormalmente expressos em tumores de cabeça e pescoço comparados com tecidos normais (GAO et al. 2013). São encontradas também alterações na expressão dos miRNAs em células tumorais HPV-positivas, de pacientes fumantes e etilistas, sendo possível explorar biomarcadores com potencial de malignização em fluidos corpóreos. Recentemente, os miRNAs *hsa-miR-31*, *hsa-miR-200a*, *hsa-miR-125a*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-184* foram descritos como alterados na saliva coletada de pacientes com câncer oral (GORENCHTEIN et al. 2012; GAO et al. 2013; NAGADIA et al. 2013).

NOHATA et al. (2013) descreveram os miRNAs anormalmente expressos em CCEs orais e de orofaringe, com destaque para os miRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-155*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-223* com aumento de expressão, e o *hsa-miR-375*, *hsa-miR-1*, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-99a*, *hsa-miR-125b*, *hsa-miR-100*, *hsa-miR-143* e *hsa-miR-204* com expressão diminuída, no qual os miRs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-181* e o *hsa-miR-345* estavam correlacionados com a progressão das lesões leucoplásicas para CCEs. Dentre os miRNA alterados, o *hsa-miR-181a/b* está correlacionado

com metástases linfonodais e invasão vascular, e o *hsa-miR-200c* também está correlacionado com metástase em cânceres orais.

GAO et al. (2013) identificaram novos miRNAs como biomarcadores associados com pacientes com alto risco de desenvolver CCE de orofaringe. Os autores relataram que o *hsa-miR-31* desempenha um papel de oncogene na carcinogênese oral. O *hsa-miR-24* foi outro miRNA associado ao aumento da proliferação celular e redução da apoptose. Em adição, ambos os miRNAs foram associados com pior prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe. Outro achado foi o *hsa-miR-146a*, que atua como um supressor tumoral em diversos tipos de cânceres, como câncer gástrico, de pâncreas, de mama e da tireoide, tendo sido associado com um prognóstico favorável. Os autores também relataram cinco miRNAs associados com a atividade transcricional do HPV, sendo que em um deles (*hsa-miR-31*) apresentou valor prognóstico em pacientes com carcinomas de orofaringe.

Há um número limitado de estudos que descreveram miRNAs envolvidos em leucoplasias. CERVIGNE et al. (2009) relataram pela primeira vez microRNAs com potencial de predizer quais leucoplasias possuem maior risco de progressão para carcinoma oral. Os autores utilizaram amostras de leucoplasias que progrediram para CCE oral do mesmo paciente e no mesmo local. Esta análise permitiu seguir as alterações dos miRs durante a progressão do tecido do estado benigno até o carcinoma invasivo. Os autores sugeriram que os microRNAs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-181b* e *hsa-miR-345* podem estar potencialmente envolvidos na progressão do câncer oral.

Estes achados foram confirmados recentemente por BRITO et al. (2013). Estes autores avaliaram 22 amostras de leucoplasias com diferentes graus de displasia, 17 casos de CCEs orais e 6 amostras normais. Os autores encontraram os miRs *hsa-miR-21*, *hsa-miR-181b* e *hsa-miR-345* com expressão aumentada em CCEs em comparação com as leucoplasias. Nesse estudo, alguns parâmetros citológicos e histopatológicos utilizados para a graduação das displasias estavam associados com a expressão alterada desses miRNAs, como hipercromasia, aumento do número de mitoses, aumento da relação núcleo/citoplasma, mitoses anormais, ou aumento do número ou tamanho do nucléolo. Cada lesão apresentou mais que uma alteração morfológica, sendo esperada alguma sobreposição de dados moleculares, contudo, nem todos os parâmetros morfológicos estavam associados com alterações moleculares significativas. O miR *hsa-miR-21* regula o supressor tumoral *TPM1* e o *PTEN*, envolvidos na indução de proliferação celular e inibição da apoptose. O miR *hsa-miR-181* participa da progressão e sobrevivência celular, regulando genes como o *BCL-2*.

Em outro estudo que associa miRNAs com leucoplasias, XIAO et al. (2012) identificaram alterações em miRNAs de 20 leucoplasias orais e sete leucoplasias que apresentavam maior similaridade com células tumorais. Os autores relataram 25 miRNAs com expressão aumentada e 9 miRNAs com expressão diminuída capazes de diferenciar este dois grupos. Entre os miRs diferencialmente expressos, estava o *hsa-miR-31* que apresentou *fold change* significativo e foi relatado como frequentemente alterado em cânceres. A região 3'-UTR do gene *FGF3* é alvo do *hsa-miR-31*. No estudo,

os autores concluíram que a expressão aumentada do *hsa-miR-31* está correlacionada negativamente com recorrência e com novas leucoplasias orais, possuindo assim um importante papel na progressão das leucoplasias pela regulação do *FGF3*.

A descoberta de novos miRNAs abre uma nova era para diagnóstico e terapias em cânceres, além disso, miRNAs que atuam como supressores ou oncogenes podem contribuir para a elucidação de novos mecanismos moleculares dos tumores orais e orofaringe.

Sendo assim, este estudo busca encontrar transcritos e miRNAs como potenciais biomarcadores em leucoplasias. Estes marcadores podem ser úteis para o delineamento de estratégias mais eficazes de tratamento e alguns podem evidenciar pacientes com risco aumentado de progressão para carcinomas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão global de transcritos e de miRNAs em leucoplasias e outras lesões precursoras, comparar o perfil de expressão entre as amostras de pacientes que apresentavam hábitos tabagistas e etilistas, e identificar os genes alvos preditos por análise integrada e *in silico* de serem regulados pelos miRNAs para identificar potenciais biomarcadores destas lesões.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os dados de expressão gênica global em lesões orais para verificar a existência de grupos segundo o subtipo de lesão oral;
- Comparar o perfil de expressão global de transcritos nas leucoplasias com o tecido normal contralateral de cada paciente e comparar os achados com hábitos tabagista e etilista;
- Comparar o perfil global de expressão das leucoplasias com líquen plano;
- Avaliar o perfil de expressão global de miRNAs em leucoplasias e em tecidos normais contralaterais;

- Buscar em banco de dados os genes alvos preditos pelos miRNAs alterados e comparar estes genes aos obtidos na análise de expressão gênica global;
- Integrar os dados da análise global de expressão de miRNAs com os transcritos;
- Realizar uma meta-análise utilizando dados publicados em literatura e os obtidos neste estudo para selecionar transcritos e miRNAs para a confirmação dos achados;
- Confirmar a expressão de um conjunto selecionado de transcritos e de miRNAs por RT-qPCR nas leucoplasias.
- Identificar potenciais biomarcadores para leucoplasias por análise integrada e *in silico* do perfil global de expressão de transcritos e de miRNAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

As amostras foram obtidas de pacientes de ambos os sexos que se apresentaram ao A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, sendo acompanhados em consultas pré-agendadas com retornos a cada seis meses (total de 3 coletas). Foram estudadas amostras de lesões orais incluindo lesões brancas e vermelhas após a triagem inicial realizada por um médico colaborador. Como controle normal, foram utilizadas amostras de tecido contralateral da mucosa oral de cada um dos pacientes. As coletas foram realizadas utilizando a escova OralCDx® (OralScanLaboratories, NJ, EUA), que permite coletar amostras tanto da camada superficial como da camada basal da mucosa oral.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com idade maior ou igual a 21 anos; com ausência de câncer oral e de orofaringe prévios ou concomitantes nos últimos 5 anos e que apresentaram história negativa para lesões orais nos últimos 6 meses, antes da primeira coleta. Os critérios de exclusão foram: pacientes com CCE oral anterior no mesmo local da lesão e tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia por no mínimo um ano a partir da data da coleta. Os dados clínicos dos pacientes selecionados estão descritos no Quadro 2. Este estudo é afiliado ao projeto “Estudo piloto sobre

a história natural das lesões precursoras do câncer oral e de orofaringe” aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (CEP nº 980/07).

Neste estudo, foram selecionados 37 pacientes de 82 coletados, por se enquadrarem nos critérios de inclusão. Entre os 37 pacientes selecionados, 25 tinham leucoplasias (dos quais seis apresentavam displasias), duas leucoplasias verrucosas proliferativas, seis líquen planos, duas queilites actínicas, duas eritroplasias, um fibroma e um papiloma escamoso. O perfil de expressão de transcritos codificadores foi realizado em 30 amostras pela plataforma 4x44K (*Agilent Technologies*). O perfil de expressão de miRNA (8x60K, *Agilent Technologies*) foi realizado em 12 casos de leucoplasias. Seis destes 12 casos foram avaliados pelas duas estratégias. Infelizmente não havia material disponível em qualidade e quantidade para a realização dos dois experimentos no mesmo conjunto de amostras. Todas as análises foram realizadas pela comparação com o tecido normal contralateral do mesmo paciente.

Entre os 37 casos, 22 eram de pacientes do sexo feminino e 15 do sexo masculino, 59% apresentavam hábito tabagista e 49% apresentavam hábito etilista. Quatorze pacientes eram tabagistas e etilistas e dez casos não eram usuários de álcool e tabaco. Na análise de HPV, apenas um caso apresentou positividade para o vírus (subtipo não oncogênico - CP6108).

Os dados dos pacientes que apresentaram hábitos tabagistas e/ou etilistas foram coletados dos questionários. Para a categorização do hábito tabagista, realizou-se o seguinte cálculo: consumo médio diário de tabaco dividido por 20 e multiplicado pelo período (em anos) do hábito, resultando

na medida “maços por ano”. Foi considerado como não tabagista o indivíduo que consumia menos de um cigarro por dia durante um ano. Formou-se outras três variáveis correspondentes aos quartis de consumo do grupo, considerando-se como *tabagistas leve* resultados que se encontraram no quartil 1, *moderado* o intervalo interquartil, e tabagista *pesado* no quartil 4. Para o hábito etilista, considerando-se o teor alcóolico de cada bebida (cerveja = 5%; vinho = 12%, destilados = 41% e licores = 30%), com base no volume de álcool ingerido (copo = 200 mL; taça = 150 mL; dose de destilado = 40 mL), calculou-se o peso (em gramas) de etanol consumido, considerando-se cada mL de álcool equivalente a 0,798g de etanol. O valor encontrado foi multiplicado pelo número de anos do hábito, resultado na medida “g de etanol por ano”. A divisão das categorias em leve, moderado e pesado foi realizada da mesma semelhante à descrita quanto ao hábito tabagista (TOPORCOV et al. 2012; NISHIMOTO et al. 2004).

A confirmação da expressão dos genes e miRNAs selecionados foi realizada respectivamente pelos ensaios de RT-qPCR e *Taqman miRNA Reverse Transcription* (AppliedBiosystems) onde havia material disponível além de um grupo de amostras independentes. Apenas amostras de leucoplasias foram utilizadas para a confirmação dos resultados por RT-qPCR. A expressão dos transcritos codificadores e miRNAs foi avaliada em dez e oito dos 23 casos, respectivamente. No Quadro 2 estão apresentadas as amostras avaliadas para a expressão de transcritos e de miRNAs assim como para a confirmação dos achados.

Quadro 2 - Dados clínicos dos 37 pacientes incluídos neste estudo. Estão assinalados os casos avaliados para expressão de miRNAs e de transcritos usando plataformas de *arrays* (Agilent Technologies), e os casos utilizados para as RT-qPCRs.

ID	Idade/ Sexo	Tabagismo	Consumo de Álcool	Infecção pelo HPV	Transcritos (4x44K) 30 casos	miRNAs (8x60K) 12 casos	RT-qPCR Transcrito 10 casos	RT-qPCR miRNA 8 casos
LEUCOPLASIAS								
1 [§]	71/M	L	P	negativo	X	X		
19 [§]	81/M	-	P	negativo	X	X	X	
44 [§]	74/F	-	-	negativo		X		
52 [§]	40/F	P	-	negativo	X	X	X	X
75 [§]	42/M	M	L	negativo		X		
79 [§]	44/F	-	-	negativo		X		
3*	55/M	M	M	negativo	X			
4*	79/F	-	-	negativo	X			
12	38/M	M	M	negativo	X			
21	68/F	-	-	negativo	X		X	
22	61/M	M	M	negativo	X			
29	69/M	-	M	negativo	X		X	X
33	69/F	-	-	negativo	X	X	X	X
37	74/F	M	-	negativo	X	X	X	
38	54/M	P	M	negativo	X			
39	67/F	-	-	negativo	X	X		
50	75/F	-	-	negativo	X		X	X
55	62/M	P	P	negativo	X			
59**	52/M	M	M	negativo	X			X
60	48/F	-	-	negativo			X	X
64	71/F	L	-	negativo		X		
72	69/M	-	M	negativo		X		
73	50/M	P	P	HPV CP6108		X	X	X
7	78/F	L	-	negativo	X		X	X
18	60/F	M	-	negativo	X			
QUEILITE ACTÍNICA								
5	59/F	-	L	negativo	X			
63	56/M	L	-	negativo	X			
ERITROPLASIA								
9	68/F	-	-	negativo	X			
30*	68/F	-	-	negativo	X			
LÍQUEN PLANO								
2	57/F	-	L	negativo	X			
43	50/F	+	-	negativo	X			
46	64/F	L	-	negativo	X			
51	52/F	L	-	negativo	X			
53	58/F	P	P	negativo	X			
62	57/F	L	M	negativo	X			
FIBROMA								
61	32/M	L	L	negativo	X			
PAPILOMA ESCAMOSO								
41	43/M	M	L	negativo	X			

* Dados histopatológicos não confirmados clinicamente.** Paciente com história de CCE.

§: Diagnóstico de Leucoplasia com displasia leve ou moderada; (+) Tabagista, sem dado do período do hábito; (-) Não; X: análise realizada. L = leve; M = moderado; P = pesado.

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Extração do RNA total e expressão gênica global

O RNA total das lesões e tecido normal contralateral foram obtidos utilizando o *Kit Master Pure Complete DNA e RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA), de acordo com especificações do fabricante. A quantificação do RNA foi avaliada utilizando-se o NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade).

O perfil de expressão gênica foi avaliado utilizando-se a plataforma *Whole Human Genome 4x44K* (Agilent Technologies), composta por 43.376 sequências biológicas e 32 sondas para controles positivos *Spike in* (<http://www.genomics.agilent.com>). Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies). Como controle foi utilizado o RNA de tecido normal contralateral do mesmo indivíduo. Durante a pré-síntese de cDNA, na reação de marcação, as amostras apresentavam uma concentração de 25ng de RNA total diluídos em um volume de 1,5µL. Foram adicionados 1,8µL de T7 *Primer* em cada tubo contendo o RNA total, 2µL de *Spike A* da diluição para o Cy3 e de *Spike B* para o Cy5, totalizando um volume final de 5,3µL. Os iniciadores foram desnaturados a 65°C em um termociclador por 10 minutos, e, em seguida, incubados a gelo por 5 minutos. Para a síntese de cDNA foram adicionados 2µL de 5x *First Strand Buffer*, 1µL de 0,1M *DTT*, 0,5µL de 10mM *dNTP Mix* e 1,2µL do *Affinity Script RNaseBlock Mix*, em um volume final de 10µL. As reações foram

incubadas em um termociclador por 2 horas a 40°C e 15 minutos a 70°C e então transferidas para o gelo por 5 minutos. A transcrição de cDNA para cRNA ocorreu pela adição de 0,75µL de *Nuclease-free water*, 3,2µL de 5x *Transcription Buffer*, 0,6µL de 0,1M *DTT*, 1µL de *NTP Mix*, 0,21 µL de *T7 RNA Polymerase Blend* e 0,24µL de Cy3-CTP ou Cy5-CTP, totalizando um volume final de 16µL. As amostras foram mantidas por 2 horas em um termociclador a 40°C. A purificação das sondas foi realizada com a utilização do *RNeasy Mini Kit*, seguindo as especificações do fabricante. A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando-se NanoDrop 1000 (*ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade*) e 825ng de cada amostra foi combinada à mesma massa da referência. Foram adicionados 55µL 2x *Hi-RPM Hybridization Buffer*. As lâminas foram confeccionadas e a hibridização foi realizada a 65°C por 17 horas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos em soluções de *Wash Buffer 1* e *Wash Buffer 2* por 1 minuto cada, acetonitrila por 10 segundos e *Stabilization e drying solution* por 30 segundos. As lâminas foram escaneadas no *Microarray Scanner System (Agilent Technologies)* utilizando o software *ScanControl 8.1 (Agilent Technologies)* e os dados foram extraídos utilizando programa *Feature Extraction 10.1.1.1 (Agilent Technologies)*.

Para a análise dos dados de expressão gênica foi utilizado o programa *R version 2.10.1* para a remoção de controles e dados com baixa reprodutibilidade (NA) para os 30 casos avaliados quanto à expressão de transcritos. Para todos os sinais de expressão foram calculados os *logRatios*

(Red/Green) na base 2 e foi realizada a média entre as sondas que cobriam a plataforma, resultando em um único valor. Esses dados serviram de entrada para o programa *TMeV version 4.8* (<http://www.tm4.org>), onde foi utilizado o teste estatístico paramétrico (teste t), $P < 0,05$. O teste de Bonferroni foi utilizado para identificar genes diferencialmente expressos para todos os casos. Em seguida os resultados dos testes foram agrupados pelo *Hierarchical Clustering* (HCL) utilizando a métrica de distância pela correlação de *Pearson*.

3.2.2 Genotipagem do Vírus do Papiloma Humano (HPV)

A genotipagem do HPV foi realizada utilizando o teste *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test* (Roche, Branchburg, USA), o qual se baseia na amplificação do DNA alvo pela PCR utilizando iniciadores para 37 subtipos de vírus. A hibridação dos produtos amplificados foi realizada com sondas de oligonucleotídeos e a detecção dos produtos amplificados e ligados às sondas foi realizada por determinação colorimétrica, de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação de um grande espectro de genótipos do HPV, incluindo 13 genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), utilizou iniciadores biotinilados em uma região polimórfica conservada entre os diferentes genótipos do HPV. O controle de qualidade do DNA foi feito por um conjunto de iniciadores para o gene da *β -globina* humana (268pb). Após a amplificação, uma solução de desnaturação foi acrescida ao produto amplificado, tornando as cadeias dos amplicons de fita simples para serem hibridadas por

complementariedade na tira de genotipagem, a qual é revestida com sondas para os 37 subtipos de HPV e β -globina. Foram realizados os procedimentos de hibridação, lavagem e detecção de acordo com as especificações do fabricante e o resultado foi interpretado com o auxílio do Guia de Referência do Teste de Genotipagem *LINEAR ARRAY HPV*. Foram considerados positivos apenas os casos com positividade para o gene de referência β -globina. A Figura 3 representa o resultado do teste de genotipagem demonstrando resultado positivo para o HPV CP6108 (genótipo de baixo risco oncogênico), que obtivemos em um único caso (caso 73), e a segunda fita representando os demais casos analisados, com o resultado negativo.

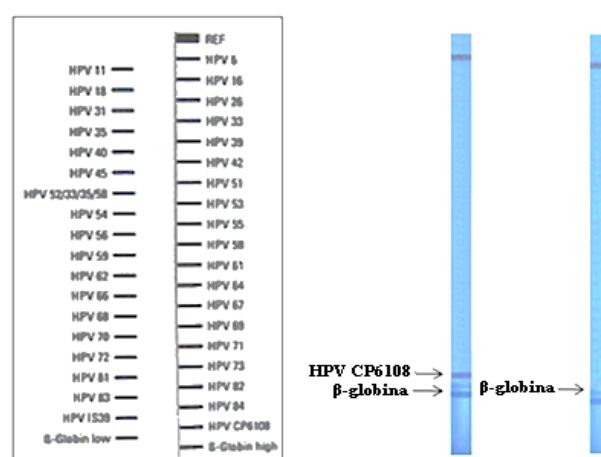


Figura 3 - Interpretação dos resultados provenientes da genotipagem de HPV. Primeira fita caso 73: HPV CP6108; Segunda fita: HPV-.

3.2.3 Expressão global de microRNA

A plataforma *Agilent Human miRNA Microarray (G4870A – ID 031181; 8x60K, Agilent Technologies)* foi utilizada para a avaliação de expressão de miRNA em 24 amostras (12 leucoplasias e 12 tecidos normais

contralaterais pareados). Essa plataforma é capaz de detectar até 1.205 miRNAs humanos e 144 miRNAs virais. Após a avaliação dos miRNAs, os dados de expressão dos transcritos e dos miRNAs realizado nas leucoplasias foram integrados para a identificação de possíveis genes *drivers*.

O RNA da lesão e do tecido normal contralateral foram processados como descrito acima. Foram utilizados 100ng de RNA total. Foi utilizado o *Kit MicroRNA Agilent Spike-In* como controle. O uso das soluções *Spike-In* permite a distinção entre resultados biologicamente significativos de resultados provenientes de problemas metodológicos. A solução *Labeling Spike-In* foi utilizada na reação de marcação, enquanto a solução *Hyb Spike-In* foi utilizada na reação de hibridação. Foram realizadas três diluições seriadas de cada uma das soluções (*Labeling Spike-In* e *Hyb Spike-In*). Na primeira diluição foram adicionados 198µL do tampão de diluição a dois microlitros de cada *Spike-In* em tubos independentes. Na segunda diluição foram adicionados 198 µL do tampão de diluição a dois microlitros do conteúdo da primeira diluição, e na terceira diluição foram adicionados 198 µL do tampão de diluição a dois microlitros do conteúdo da segunda diluição. Para a marcação e hibridação foi utilizado o Kit *Agilent's miRNA Complete Labeling and Hyb*. Esse processo consiste da ligação de uma molécula de Cianina 3-pCp na extremidade 3' da molécula de RNA com eficiência superior a 90%. Dois microlitros (100 ng) de RNA total [na concentração de 50 ng/µL diluídos em Tris-EDTA (1X pH 7,5)] foram colocados em tubos 2µL do Master Mix *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)*, contendo 0,4µL de

Tampão 10X, 1,1µL de *Labeling Spike-In* e 0,5µL de *Calf Intestinal Phosphatase*. Para esta reação de desfosforilação os tubos foram mantidos a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de desnaturação pela adição de 2,8µL de dimetilssulfóxido (DMSO) 100% e aquecimento a 100°C por 10 minutos. Imediatamente após essa fase, as amostras foram colocadas no gelo para a manutenção do estado desnaturado. Após a fase de desnaturação, as amostras foram submetidas a uma fase de ligação pela adição de 4,5µL do Master Mix de ligação contendo T4 RNA Ligase. Essa mistura de reação é composta de 1µL de Tampão 10X, 3µL de Cianina 3-pCp e 0,5µL de T4 RNA Ligase. Essa reação foi incubada a 16°C por 2 horas. Após a secagem em concentrador à vácuo a 55°C (aproximadamente 3 horas), as amostras foram preparadas para a hibridação. Essas foram ressuspensas em 17µL de água livre de nucleasse e foi adicionado 1,0µL da solução *Hyb Spike-In* (terceira diluição), 4,5µL de 10X GE *Blocking Agent* e 22,5µL de 2X *Hi-RPM Hybridization Buffer* num total de 45µL e incubadas a 100°C por 5 minutos e posteriormente em gelo por 5 minutos. Após breve centrifugação, 45µL de cada amostra foram dispensados no centro do *gasket* e as lâminas foram posicionadas para posterior hibridação em forno a 55°C por 20 horas a 20 rpm. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas e escaneadas. A lavagem consistiu de banhos consecutivos em soluções de *Wash Buffer 1* por 5 min e *Wash Buffer 2* por 5 min a 37°C. A captura das imagens foi realizada no *Microarray Scanner System (Agilent Technologies)*, utilizando-se o *Scan Control Software 9.X*. A extração e a normalização dos dados foram realizadas usando o *Software Feature Extraction v10.7.3*

(*Agilent Technologies*). Os dados extraídos foram analisados pelo *software BRB array tools* e os gráficos foram gerados pelo *software GeneSpring GX (Agilent Technologies)*.

3.2.4 Análise Integrada de dados transcriptômicos e de expressão de miRNAs

Os miRNAs que apresentaram expressão alterada foram avaliados por algoritmos de predição de alvos *in silico* utilizando o banco de dados *TargetScan*. Este banco foi o que apresentou melhor resultado nas buscas individuais dos diferentes bancos de dados testados. Os genes alvo preditos dos miRNAs alterados foram comparados com a lista de genes diferencialmente expressos pela análise de microarrays de expressão. Em seguida, foi realizada uma correlação com os dados da expressão gênica em larga escala com os dados da expressão de miRNAs.

Para a análise integrada foi utilizada a ferramenta R (www.r-project.org/). A correlação foi considerada positiva quando $R > 0,5$ e negativa quando o $R < 0,5$. Por essa estratégia foram identificados miRNAs significativos com correlação positiva e negativa com os genes encontrados na análise de expressão global. Para a seleção de genes e miRNAs para serem validados, foram selecionados aqueles que apresentaram correlação inversa quanto a expressão.

Para caracterizar as interações e associações entre os genes e miRNAs foi implementado um algoritmo que realiza uma busca por interações proteína-proteína nos seguintes bancos de dados, encontrados

no software *Ingenuity Pathway Analyses* (IPA): DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu>), HiMAP (<https://lib.stanford.edu/himap>), intAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>), MIPS / MPPI (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/>), pSTIING (<http://pstiing.licr.org/>) e STRING (<http://string-db.org/>). Estes bancos de dados armazenam as interações e diversas anotações a respeito da técnica utilizada (como por exemplo: sistema de duplo híbrido, co-imunoprecipitação, purificação por afinidade em tandem e espectrometria de massa). Em seguida, foi realizada a análise de vias canônicas e redes de interação entre genes obtidos da análise integrada com o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA v8.0, Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA; <http://www.ingenuity.com>) e a imagem foi gerada pelo software *Navigator* (ophid.utoronto.ca/navigator/).

3.2.5 Síntese de cDNA e Análise da expressão de transcritos (RT-qPCR)

Para a avaliação de alterações na expressão dos transcritos, as amostras de RNA foram digeridas com 1U de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25mM de EDTA pH 8.0. As amostras foram incubadas por 15min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por 10min em um termociclador PTC-100 (*Peltier - EffectCycling - MJ Research*). A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20µl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 10mM de cada dNTP,

0,5µg/µl de Oligo(dT), 0,1M ditiotretol e 200U da transcriptase reversa *SuperScript™ III* (Invitrogen). As condições de incubação foram: 42°C por 60min e 70°C por 15min.

Para a avaliação de miRNAs foi utilizado RNA total das lesões e tecidos normais obtidos a partir do Kit *Master Pure Complete DNA e RNA Purification Kit* Epicentre Biotechnologies. O RNA total obtido, foi diluído para a concentração de 2ng/µL e a síntese de cDNA foi realizada usando o kit *Taqman miRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), conforme especificações do fabricante.

Foi utilizado o termociclador automático (ABI *Prism 7500 Sequence Detection System*) para a amplificação de RT-qPCR. Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene ou miRNA de interesse e o gene ou miRNA de referência. Para a análise de expressão dos transcritos, foram usados os genes de referência selecionados a partir de testes realizados com controles endógenos testados no nosso laboratório. Os iniciadores para a amplificação dos transcritos foram desenhados utilizando o programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As reações foram realizadas utilizando o corante fluorescente *Power SYBR Green* (AppliedBiosystems), o qual contém todos os reagentes necessários para a reação. Os miRNAs foram obtidos comercialmente pela empresa Applied Biosystems e foram amplificados utilizando o *TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems).

Para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores para os genes foram construídas curvas-padrão com diluições em série de amostras de cDNA de tecido tumoral e normal (*pool* de cDNA puro e diluições: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625). Essas diluições foram testadas em duplicatas para todos os genes. Os valores dos Cts para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de RNA ($\log_{10}$ RNA) foram plotados num gráfico para obtenção da curva-padrão. A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*. A eficiência de amplificação foi calculada pela fórmula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$.

A quantificação dos genes alvos ou miRNA alvos nas amostras foi obtida pelos valores de Ct aplicados na fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene ou miRNA de interesse, da média das duplicatas dos valores de Ct do gene ou miRNA referência. Posteriormente, para determinar o $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído do valor da média de ΔCt das amostras normais. Este último valor foi adicionado a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e para cada amostra a quantidade de transcrito (N vezes > ou < que o normal) foi determinada pela comparação com amostras de tecido normal.

As condições de reação para a análise dos transcritos foram: 40 ciclos, com a temperatura de desnaturação a 95°C por 15 segundos e a de anelamento de 60°C por 1 minuto. As condições de reação para a amplificação dos miRNAs foram 40 ciclos de 95°C por 10 minutos e 60°C por 1 minuto. O Quadro 3 apresenta a lista dos genes selecionados para a

confirmação dos achados, com a referência utilizada e os iniciadores. O Quadro 4 mostra os miRNAs selecionados para confirmação dos achados, o miRNA endógeno, com as sequências de referência, o código do ensaio TaqMan utilizado, e as sequências maduras e de *stem-loop*.

3.2.6 Critérios para a seleção de candidatos para confirmação dos resultados

Para a seleção dos genes e dos miRNAs para a confirmação dos achados, foram utilizados os seguintes critérios: genes e miRNAs que apresentavam correlação inversa na análise integrada, concordância com os resultados obtidos na meta-análise e que apresentavam funções relacionadas ao câncer.

Os critérios utilizados para a realização das meta-análises foram relatos que realizaram perfil de expressão de transcritos e de expressão de miRNA em leucoplasias orais e que haviam depositados seus dados no banco de dados do GEO (*Gene Expression Omnibus*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Quadro 3 - Genes selecionados para confirmação dos achados, com o gene referência utilizado, iniciadores, número de acesso do transcrito e o tamanho do amplicon (pb).

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	Número de acesso dos transcritos avaliados	Tamanho do amplicon (pb)
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	F: 5' AGAAACCTGCTCTACGAACTGT 3'	NM_001206524.1; NM_001206542.1; NM_001230.4; NM_032974.4; NM_032976.3; NM_032977.3; XM_005246907.1; XM_005246909.1; XM_005246910.1; XM_005246911.1	122
		R: 5' AGAAATGCCAGGAACTTAGGGA 3'		
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	F: 5' CCCAGCAAGAAGGCGAGTTA 3'	NM_003107.2	189
		R: 5' CATCGGCCAAATTCGTCACC 3'		
CARD8	caspase recruitment domain family, member 8	F: 5' CATCAGCCCCTCCTCCTTTC 3'	NM_001184900.1; NM_001184901.1; NM_001184902.1; NM_001184903.1; NM_014959.3	91
		R: 5' AGCACCCCTTTCAGGTCC 3'		
MADCAM1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	F: 5' CACGCAGGGAGAAGTGATCC 3'	NM_130760.2	136
		R: 5' GCAGCGTTTCCAGAGGTGAT 3'		
MADD	MAP-kinase activating death domain	F: 5' ACCTGAAGACTGGTGAGGGT 3'	NM_001135943.1; NM_001135944.1; NM_003682.3; NM_130470.2; NM_130471.2; NM_130472.2; NM_130473.2; NM_130476.2; XM_005253189.1; XM_005253196.1; XM_005253199.1; XM_005253201.1; XM_005253203.1; XM_005253204.1	87
		R: 5' GCTCTATGAAAACCTGATTGTGCA 3'		
TERT	telomerase reverse transcriptase	F: 5' CCACCAAGCATTCCTGCTCA 3'	NM_001193376.1; NM_198253.2	85
		R: 5' CTGCGTCTGGGCTGTCCT 3'		
ZNF784	zinc finger protein 784	F: 5' GAGGAGCCAGGATCGAATGG 3'	NM_203374.1	130
		R: 5' ATAGGCATCCCAGGTCCAGT 3'		
HPRT*	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	F: 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'	NM_000194.2	101
		R: 5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'		

*Transcrito de referência

Quadro 4 - miRNAs selecionados para confirmação dos achados, com o miRNA referência utilizado, sequência de referência, código do ensaio TaqMan, e as sequências maduras e *stem-loop*.

miRNAs selecionados para a confirmação dos níveis de expressão dos miRNAs				
miRNAs	Sequência referência	Código ensaio Taqman	Sequência madura	Sequência <i>Stem-loop</i>
hsa-miR-191	NR_029690.1	002299	CAACGGAAUCCC AAAAGCAGCUG	CGGCUGGACAGCGGGCA ACGGAAUCCCAAAAGCAG CUGUUGUCUCCAGAGCAU UCCAGCUGCGCUUGGAU UUCGUCCCCUGCUCUCCU GCCU
hsa-miR-1228	NR_031597.1	002919	UCACACCUGC CUCGCCCCC	GUGGGCGGGGGCAGGUG UGUGGUGGGUGGUGGCC UGCGGUGAGCAGGGCCC UCACACCUGCCUCGCCCC CCAG
hsa-miR-4313	NR_036198.1	243064_mat	AGCCCCCUGG CCCCAAACCC	GAUCAGGCCCCAGCCCCCU GGCCCCAAACCCUGCAGC CCCAGCUGGAGGAUGAG GAGAUGCUGGGCUUGGG UGGGGGAAUCAGGGGUG UAAAGGGGCCUGCU
RNU44	NR_002750	001094	-	-

3.2.7 Análise dos dados de expressão gênica segundo parâmetros clínicos e patológicos

As comparações entre os valores de expressão de transcritos e miRNA determinados por RT-qPCR entre os grupos amostrais e entre as variáveis clínicas e patológicas foram feitas pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* quando consideradas duas variáveis, e os valores extremos (*outliers*) foram removidos das análises. Todas as análises estatísticas consideraram o nível de significância de 5% e foram realizadas com auxílio do software *Graphpad Prism* versão 5.0.

4 RESULTADOS

O perfil de expressão de transcritos foi realizado em 30 das 82 amostras coletadas. Os dados de expressão gênica global foram obtidos de um estudo prévio da equipe (dados não publicados) e foram analisados novamente e utilizados para diversas comparações neste estudo. Dezesesseis destes 30 casos avaliados foram confirmados como leucoplasias durante a revisão das lâminas e prontuários. O perfil de expressão de miRNAs foi realizado em 12 amostras de leucoplasias onde havia RNA em quantidade suficiente para esta análise.

Os dados resultantes da análise de expressão gênica foram utilizados para a realização de comparações entre os grupos tabagistas *versus* não tabagistas, etilistas *versus* não etilistas e pacientes com leucoplasias *versus* pacientes com líquen plano. O fluxograma abaixo resume todas as etapas realizadas neste trabalho e o número de amostras utilizado em cada comparação.

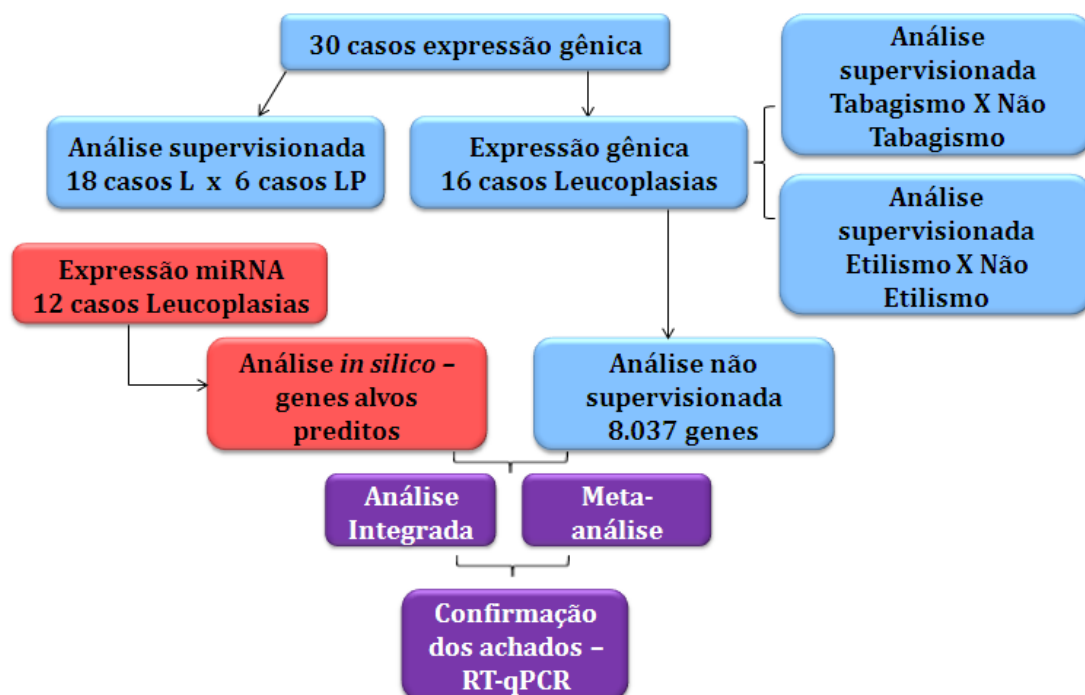


Figura 4 - Fluxograma das etapas realizadas neste estudo e o número de casos utilizados em cada estratégia. Foram realizados ensaios de expressão gênica em 30 casos de lesões precursoras. A maioria das amostras foi utilizada na comparação de de leucoplasias *versus* líquen plano. Das 30 amostras com dados de expressão gênica global, 16 eram lesões leucoplásicas. A análise de agrupamento hierárquico supervisionado destas leucoplasias identificou 8037 genes diferencialmente expressos na comparação com o tecido normal contralateral. Foram realizadas comparações destes casos quanto ao uso de tabaco e álcool. O perfil de expressão de microRNAs foi realizado em 12 casos, 6 deles foram também analisados para expressão gênica global. A partir de análises *in silico*, integração dos dados e meta-análises, foram selecionados os genes e miRNAs para validação por RT-qPCR. L: leucoplasia; LP: líquen plano; Tab.: Tabagista; Etil.: Etilista.

4.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GÊNICA

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado dos 30 casos de lesões orais analisados revelou 208 genes com expressão aumentada e 1.914 com expressão diminuída (Figura 5). Não foram observados agrupamentos de acordo com as características das lesões. O dendograma da Figura 5 demonstra que não foram observados grupos separando as leucoplasias de líquen plano, processo inflamatório ou outras lesões.

Embora as leucoplasias não apresentassem um perfil característico que as distinguisse das demais lesões estudadas, elas foram analisadas separadamente com o objetivo de tornar o conjunto amostral mais homogêneo. Foi utilizado o programa R (*version* 2.10.1) para remoção de controles e sondas contendo dados *not available* (NA). Foi calculada a razão entre (Cy3/Cy5) em Log na base 2 para todas as sequências e foi realizada a média entre as *probes* que cobriam a plataforma, resultando em um único valor. Esses dados serviram de entrada para o programa TMeV *version* 4.5 (<http://www.tm4.org>) sendo utilizada a análise pelo teste SAM (*Significance Analysis of Microarray*) *one-class* (FDR 5% e 1000 permutações).

A Figura 6 representa um *heatmap* com os genes diferencialmente expressos presentes exclusivamente nas leucoplasias (16 casos). A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado identificou 8.037 genes com expressão alterada, sendo 5.364 com expressão diminuída e 2.673 genes com expressão aumentada em relação ao tecido normal contralateral dos

mesmos pacientes. Essa análise não revelou agrupamentos distintos. A Tabela 1 mostra os principais genes alterados (log2 das maiores médias de intensidades) na análise de expressão gênica global das 16 amostras de leucoplasias.

O *heatmap* proveniente da análise supervisionada dos dados de expressão gênica comparando os grupos de leucoplasias (18 casos: 16 leucoplasias clássicas + 2 LVPs) e líquen plano (6 casos) não foi capaz de separar estes dois grupos de lesões (Figura 7).

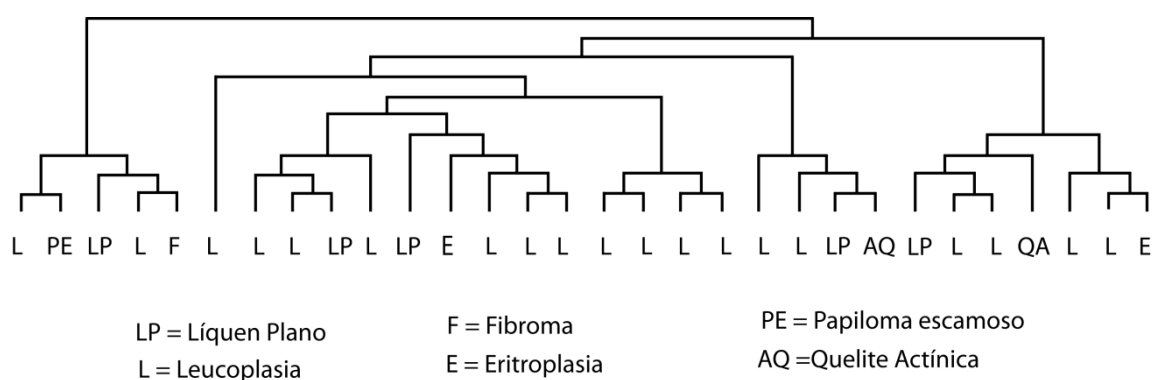


Figura 5 - Agrupamento hierárquico não supervisionado de 30 casos de lesões orais. Não foram observados agrupamentos dos casos em classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica.

Figura 7 - Agrupamento hierárquico não supervisionado de 24 casos de lesões precursoras: 18 leucoplasias (16 L e duas LVPs) e 6 líquen plano (LP). Esta análise não permitiu observar a separação entre estes grupos.

Tabela 1 - Genes diferencialmente expressos obtidos a partir da análise de 16 leucoplasias comparadas com tecido normal contralateral.

GENES			
Expressão aumentada	Log ₂ média	Expressão diminuída	Log ₂ média
<i>CARD8</i>	1,89	<i>AMFR</i>	-1,62
<i>MAGEE1</i>	1,33	<i>MT2A</i>	-1,45
<i>ND6</i>	1,31	<i>MFN2</i>	-1,42
<i>MUC3A</i>	1,29	<i>SLC9A3R1</i>	-1,40
<i>SCTR</i>	1,23	<i>AI219192</i>	-1,39
<i>EDG5</i>	1,19	<i>KRT4</i>	-1,39
<i>CLCF1</i>	1,10	<i>PSKH1</i>	-1,38
<i>IGKV2-24</i>	1,08	<i>DDT</i>	-1,37
<i>ZNF784</i>	1,04	<i>CDKN1C</i>	-1,36
<i>BU561469</i>	1,03	<i>MBP</i>	-1,36
<i>MYO7A</i>	1,00	<i>USP33</i>	-1,34
<i>SCGB3A2</i>	1,00	<i>LAYN</i>	-1,32
<i>DUX2</i>	0,99	<i>BCAP29</i>	-1,31
<i>PRKAR1B</i>	0,99	<i>ATP9A</i>	-1,27
<i>TMEM174</i>	0,97	<i>SFRS2IP</i>	-1,27
<i>REXO1L1</i>	0,97	<i>CTGF</i>	-1,26
<i>BC055421</i>	0,96	<i>CBR3</i>	-1,25
<i>PAQR6</i>	0,94	<i>SFRS10</i>	-1,23
<i>TRAF1</i>	0,94	<i>PRDX5</i>	-1,23
<i>SCARA5</i>	0,93	<i>LGALS3</i>	-1,22

A tabela apresenta os 40 principais genes com maior média de intensidade de sinal (log₂) entre os 8.037 genes alterados.

Foram realizadas duas análises supervisionadas dos dados de expressão gênica considerando somente os 16 pacientes com leucoplasias. Na primeira análise foi realizada a comparação entre indivíduos que apresentavam o hábito tabagista *versus* não tabagista (Figura 8). Na segunda análise os pacientes que apresentavam hábito etilista foram comparados com que não eram etilistas (Figura 9). Nas duas análises foi possível verificar grupos distintos entre os usuários de tabaco e álcool e aqueles não usuários, porém não foi possível observar um agrupamento de categorias dos hábitos.

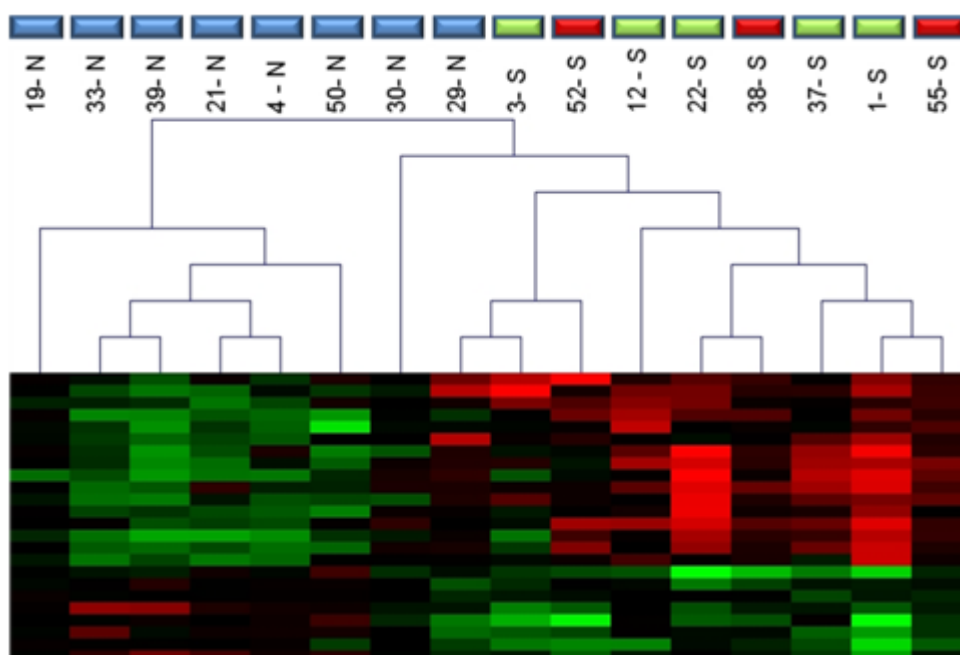


Figura 8 - Agrupamento hierárquico supervisionado de 16 leucoplasias segundo o hábito tabagista. Foram observadas duas classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica. N = não apresenta hábito tabagista, S = apresenta hábito tabagista. As cores representam: azul = não apresenta hábito tabagista; verde = hábito leve ou moderado; vermelho = hábito pesado.

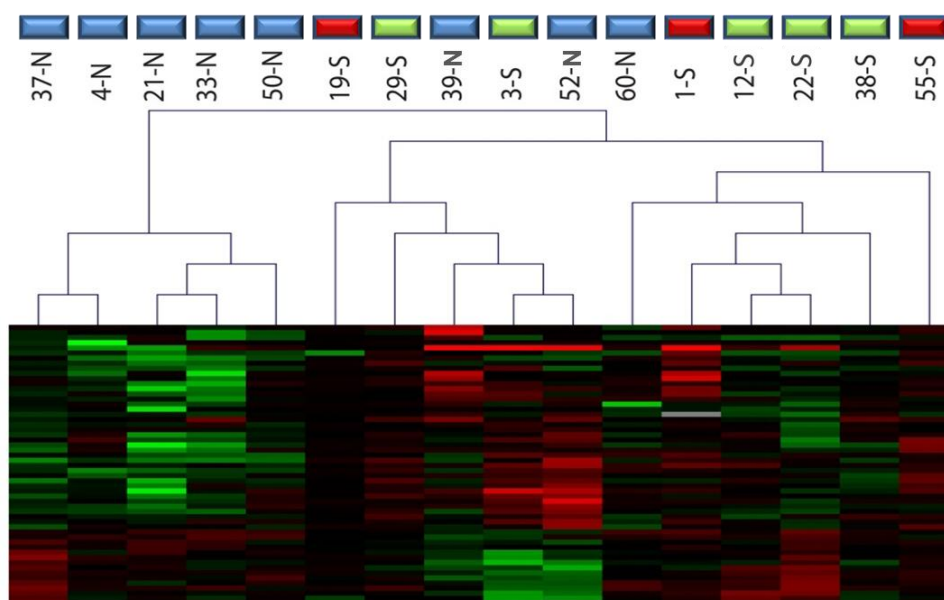


Figura 9 - Agrupamento hierárquico supervisionado de 16 leucoplasias segundo o hábito etilista. Foram observadas duas classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica. N = não apresenta hábito de consumo de álcool, S = hábito etilista. As

cores representam: azul = não apresenta hábito etílico; verde = hábito leve ou moderado; vermelho = hábito pesado.

O Quadro 5 apresenta os 24 genes alterados obtidos pela comparação entre pacientes com e sem o hábito tabagista, destes, oito genes apresentaram expressão diminuída e 16 expressão aumentada. Em relação ao hábito etilista, 533 genes apresentaram expressão diferenciada, sendo 41 genes com expressão aumentada e 492 genes com expressão diminuída. No Quadro 5 estão representados os 20 genes de ambas as análises com maiores *fold change*.

Ainda com relação aos genes diferencialmente expressos dessa análise, foi realizado um enriquecimento gênico com a utilização do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) para identificar as vias e processos biológicos significativamente relacionados ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados na Tabela 2.

Quadro 5 - Genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de pacientes com hábitos tabagistas e etilistas.

Análise	Genes	
	Expressão aumentada	Expressão diminuída
Tabagistas versus não tabagistas	FOXF1, THC2612796, SULT1A3, HRH3, C20orf108, THC2644672, SLC22A15, FSCN2, SLC34A1, ALG1, OR8U1, GRIK5, ENST00000337025, OR52K2, FLJ22659, OR7E5P	ADAM9, FOSL2, RAB1A, PPP1R3B, C16orf69, INPP5A, LOC732221, BTN2A1
Etilistas versus não etilistas	HBB, KIAA0404, SOCS3, CXCL14, FPGS, LOC641522, AK094571, SDF2L1, GPR68, PXMP4, GGN, CTA-246H3.1, AKR1B10, AJ295984, THC2563227, HSPG2, TRMT1, PLA2G2F, THC2644870, C20orf185	BQ184357, YOD1, SLC24A3, DKFZp761P0423, ZDHHC20, CR601694, AK025704, PARD6B, DUSP4, FCHO2, AK098478, ALS2CR2, OBFC2A, SLC31A2, THC2545456, SWAP70, CR621447, RNF141, HECTD1, C18orf25

Foram detectados 24 genes diferencialmente expressos na comparação com o hábito tabagista, os quais são apresentados abaixo; e 533 genes relacionados ao consumo de álcool, sendo apresentados apenas os 20 genes com maior *fold-change*.

Tabela 2 - Enriquecimento para os 533 genes diferencialmente expressos obtidos na análise considerando habito etilista.

Anotação	Categoria	p-valor	Gene
PB	Biosíntese de carboidratos	0,013	<i>B4GALT2, GMDS, MAT2B, MGAT1, PPP1R3C</i>
PB	Metabolismo de prostaglandinas	0,026	<i>ACOX1, CYP4F8, HPGD</i>
PB	Metabolismo de polissacarídeos	0,027	<i>FBS1, MAT2B, PPP1CB, PPP1CC, PPP1R3C</i>
PB	Catabolismo de macromoléculas	0,034	<i>ADAM20, ADAM33, ADAM9, ARIH2, CASP10, CTSB, CTSL2, DEDD2, FBXO3, METAP2, NEDD4L, NPEPPS, PCSK5, PRSS2, PSMD14, SERPINB6, UBAP1, UCHL5, USP16, USP25</i>
PB	Catabolismo proteico	0,047	<i>ADAM20, ADAM33, ADAM9, ARIH2, CASP10, CTSB, CTSL2, FBXO3, METAP2, NEDD4L, NPEPPS, PCSK5, PRSS2, PSMD14, SERPINB6, UBAP1, UCHL5, USP16, USP25</i>
VC	Sinalização AMPK	0,021	<i>KAT2B, PFKP, ADRA1D</i>
VC	Via da apoptose	0,021	<i>ACIN1, CASP10</i>
VC	Sinalização CDC42	0,021	<i>ITGB1, RALA, PPP1CB</i>
VC	Biossíntese de folato	0,021	<i>FPGS</i>
VC	Controle do ciclo celular G1/S	0,033	<i>CDK7, MYC, CDKN2B, HDAC5, KAT2B, CDK7</i>
VC	Sinalização ERK/MAPK	0,035	<i>ITGB1, MYC, PPP1CC, PLA2G2F, MOS, PPP1R3C, PPP1CB, PPP1R11, DUSP4, RAP1A, EIF4E</i>
VC	Sinalização da CD27 em linfócitos	0,036	<i>MAP3K9, MAP3K10</i>
VC	Degradação da acetona e Bupropion	0,038	<i>CYP4F8</i>
VC	Sinalização CDK5	0,045	<i>ITGB1, PPP1CC, PPP1R3C, PPP1CB, PPP1R11</i>
VC	Sinalização NOTCH	0,047	<i>LFNG, PSENEN</i>

PB=Processo Biológico; VC=Vias canônicas

Análise realizada pelo software Ingenuity Pathway.

Foram obtidos cinco processos biológicos significativos associados aos genes diferencialmente expressos (biossíntese de carboidratos, metabolismo de prostaglandinas, metabolismo de polissacarídeos e catabolismo de macromoléculas) e dez vias canônicas (sinalização da AMPK, via da apoptose, sinalização da CDC42, biossíntese de folato, controle do ciclo celular G1/S, sinalização do ERK/MAPK, sinalização da CD27 em linfócitos, degradação da acetona e bupropion, sinalização da CDK5 e sinalização do NOTCH). Dentre os genes avaliados é possível destacar o *PPP1R3C* e *PPP1CB*, identificados em maior frequência, seguidos pelos genes *ITGB1*, *CASP10* e *PPP1C*.

Ainda com relação aos genes diferencialmente expressos obtidos pela análise dos pacientes com hábito tabagista e etilista, foi avaliada a diferença entre as vias enriquecidas desses genes, em ambas as análises, pelo software IPA (Figura 10).

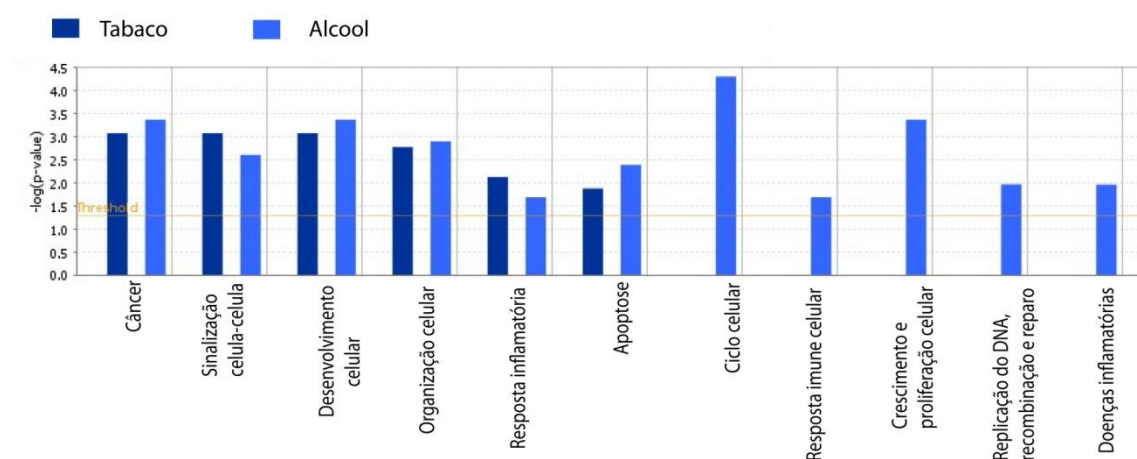


Figura 10 - Comparação entre as vias enriquecidas para genes diferencialmente expressos com relação ao hábito tabagista e etilista.

4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAS

Para a análise do perfil de expressão de miRNAs foram utilizadas amostras de doze pacientes com leucoplasias e 12 amostras de tecido normal contralateral; seis leucoplasias foram também avaliadas para a expressão de transcritos. Dentre as 24 amostras utilizadas (leucoplasia e controle contralateral), sete foram excluídas (duas amostras de leucoplasia e cinco amostras de tecido normal contralateral) por apresentarem baixa intensidade de marcação e não passarem nos critérios de qualidade do fabricante (Figura 11).

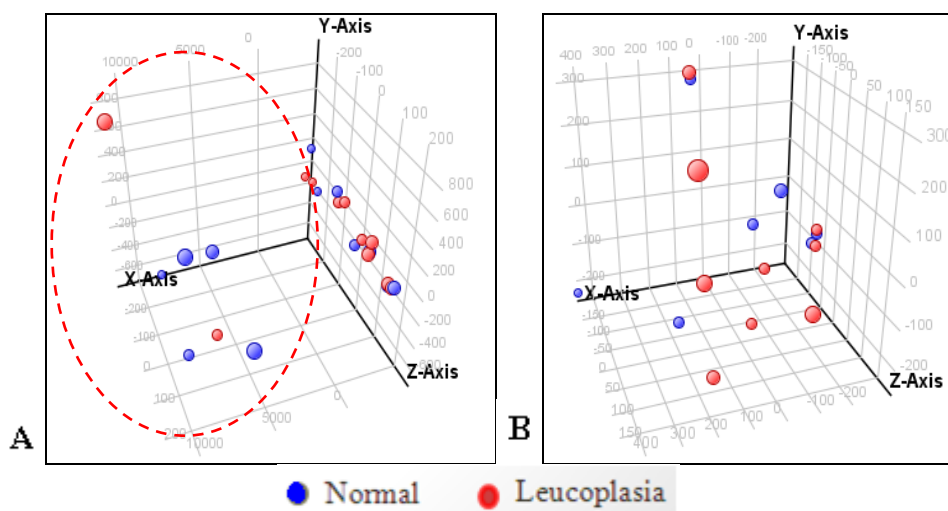


Figura 11 - Classificação das amostras utilizando a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA) nos ensaios de expressão de miRNA. (A): o grupo destacado pelo círculo vermelho pontilhado apresentava baixo sinal de marcação e não atingiu todos os critérios de qualidade exigidos pelo fabricante. Estas amostras foram removidas da análise. (B): PCA incluindo apenas as amostras com boa qualidade segundo as recomendações do fabricante. Não foi observada uma separação perfeita entre as amostras normais e as leucoplasias.

Após a análise estatística (comparação de classes – teste t) utilizando o software *BRB arrays tools* e *Gene Spring GX*, foram obtidos 13 miRNAs com expressão diminuída nas leucoplasias em relação aos tecidos normais (Tabela 3). A Figura 12 representa um *heatmap* da análise supervisionada dos miRNAs alterados nas leucoplasias.

Tabela 3 - Relação dos 13 miRNAs que apresentaram expressão diminuída nas leucoplasias em relação ao tecido normal.

Valor de <i>p</i>	FDR	Média de intensidade nas leucoplasias	Média de intensidade no tecido normal contralateral	<i>Fold- change</i>	miRNA
0,001	0,057	93,69	126,16	0,74	<i>hsa-miR1238</i>
0,001	0,057	85,7	119,08	0,72	<i>hsa-miR-1280</i>
0,002	0,057	114,98	140,4	0,82	<i>hsa-miR-1234</i>
0,002	0,057	126,83	164,74	0,77	<i>hsa-miR-940</i>
0,003	0,057	105,62	132,53	0,8	<i>hsa-miR-1228</i>
0,004	0,070	92,89	118,09	0,79	<i>hsa-miR-191</i>
0,005	0,077	101,94	127,64	0,8	<i>hsa-miR-4313</i>
0,021	0,251	64,67	94,79	0,68	<i>hsa-miR-149</i>
0,024	0,251	66,87	93,92	0,71	<i>hsa-let-7f-1</i>
0,028	0,251	7,34	45,05	0,16	<i>hsa-miR-550a</i>
0,030	0,251	66,4	94,66	0,7	<i>hsv2-miR-H24</i>
0,030	0,251	6,14	45,77	0,13	<i>hsa-miR-563</i>
0,049	0,374	3,75	30,66	0,12	<i>hsa-miR-4312</i>

FDR: *False Discovery Rate*; L: Leucoplasia; N: Normal;

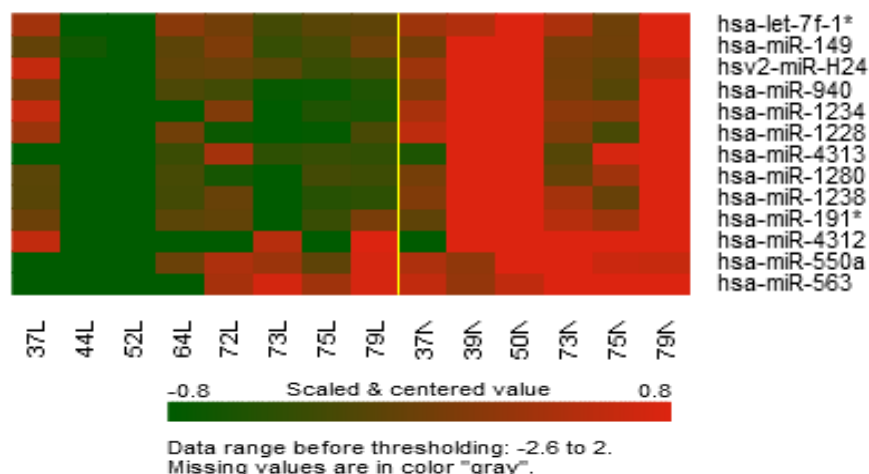


Figura 12 - *Heatmap* mostrando as alterações nos níveis de expressão de miRNAs em oito leucoplasias e sete tecidos normais contralaterais.

Entre os 13 miRNAs encontrados com expressão diminuída nas leucoplasias, sete apresentaram $FDR < 0,08$: *hsa-miR-1238*, *hsa-miR-1280*, *hsa-miR-1234*, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-191*, *hsa-miR-4313* e *hsa-miR-940*. Estes sete miRNAs foram submetidos a análise *in silico* utilizando o banco de dados *TargetScan*. O objetivo dessa estratégia foi identificar os genes alvos preditos para serem regulados por estes miRNAs. Não foram detectados alvos preditos para o *hsa-miR-1280* e, portanto, os dados foram obtidos para seis miRNAs (*hsa-miR-1238*, *hsa-miR-1234*, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-191*, *hsa-miR-4313* e *hsa-miR-940*) (Quadro 6).

Foram identificados 1.688 genes alvos na análise *in silico* utilizando o banco de dados *TargetScan*, porém foram selecionados somente os genes com alta e moderada predição e genes experimentalmente preditos, resultando em 726 genes. Os miRNA *hsa-miR-4313*, *hsa-miR-940* e *hsa-miR-1228* regulam um maior número de transcritos, 267, 213 e 118 transcritos, respectivamente. Os seis miRNA avaliados e os dados da análise *in silico* estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - Análise *in silico* dos miRNAs alterados. A predição dos genes alvos dos miRNAs foi realizada utilizando o algoritmo de predição de alvos TargetScan.

miRNA	Nº de genes preditos	Gene preditos	
		Predição alta	Predição moderada
hsa-miR-1228	118	CUX1, CYP1A2, INSIG2, MKRN1 , NFE2L1, P4HA2, PCBD2, SERBP1, SNRNP48, SSC5D , UBE2D2, ZNF2, ZNF554	AAK1, ABLIM2, AMFR, DDX3X , ANXA8L2, ATP1B3, BCL2L2 , BCLAF1, CRIPT, BIRC3, BNIPL, CARD8, CASP10 , CRY2, CD59, CEBPG, CLIP1, COX16, CCDC115, CCNL2
hsa-miR-1234	59	ATP6V0B, C20orf112, CD59, EFHD2, GNE, PAQR6, PLA2G15, PTC1, STX18, SYDE1, ZC3H4	ANKS1A, ATF3, ATP6V0A1, C1orf56, GSE1, CAMK2N1 , CDH23, CDKN1C, CEBPG, GPD1 , CORO2A, CREB3L2, CRY2, CRYL1, CTSA, D2HGDH, EHD1, EHF, FAM129B, FGD4
hsa-miR-1238	25	SH3D19, ZNF92	BRWD1, BTBD7, C16orf52, CD55, ERBB3, FAM120AOS , FBLN1, FBXL16, ID4, ILDR1, LAMB3, NEMF, NT5C2, NUP50 , PABPN1, PTPRA, RCC2, RECQL5, RNASE7, SASH1, SRSF4 , VASP, YTHDF2
hsa-miR-191	44	CTDSP2, DCTN4, LRRC8A, NFIA, OXSRI , PHC2, PLCD1, RCC2, SOX4, WSB1, ZCCHC8, ZNF362	ADAM9, ASTN2, ATP6V1D, BICD2, NKX3-1, C16orf52, CAPZA1, COPS4, DDX6 , EGR1, FCHO2 , FOPNL, GNG4, HARS, ITPR3, KIAA0930 , MCUR1, MGST3, MORF4L2, NCOR1
hsa-miR-4313	267	ABHD2, AIF1L, ALG1, AMICA1, AQP1, ATOX1, ATP6V1E1, ATP9A, B4GALT2 , BCL2L11, C19orf25, CRHR1, CTDSP1, CUX1, D2HGDH, DGCR2, EMC8, ENTHD2, ESRRA , FAM214B	ALDH4A1, ARHGEF4, HM13, MEX3D, ADAM8, ADCY9, AHNAK, AKT2, ALPP, ANKS1A, APOPT1, AQP3, ARF6, ARHGEF18, ARL8A, ATG12, ATP2B3, B4GALT1, BAG1, B4GALT3
hsa-miR-940	213	ABLIM2, AMFR, BAIAP2, BMS1 , NCOA4, C11orf31, CALCOCO2, CPA4, CTDSP1, CXCR2, CYP1A2, CYP2B6, DNAJC5, FUT6, GTF2H5, KCNK3, LPIN1, NHSL1 , MAPKBP1, NDUFB4	OTOF, TPM3, AGFG2, AKR7A2, AKT2, ALG1, ALS2CL , AP2S1, ARHGAP1, ASAP2, ATG9B , BBS5, BIRC3, BNIPL, BSPRY, BTG2, C12orf44, C16orf70, C20orf112, C6orf106, SLC34A1

Genes diferencialmente expressos na análise de pacientes com hábito tabagista estão destacados em **vermelho** e genes diferencialmente expressos na análise de pacientes com hábito etilista estão destacados em azul.

Na tabela estão representados até 20 dos genes alvos preditos de serem regulados por esses miRNAs.

Foi realizada uma comparação entre os genes alvos dos miRNAs descritos no algoritmo de predição de alvos de miRNAs *TargetScan*, com os genes diferencialmente expressos identificados nas análises considerando o hábito tabagista (24 genes diferencialmente expressos) e etilista (533 genes diferencialmente expressos) obtidos do presente estudo. Essa análise resultou em dois genes alvos de miRNAs (*SLC34A1* e *ADAM9*) relacionados ao hábito tabagista e 96 genes alvos de miRNA relacionados com o hábito etilista (Quadro 6). As vias relacionadas a estes genes está apresentada na Figura 13.

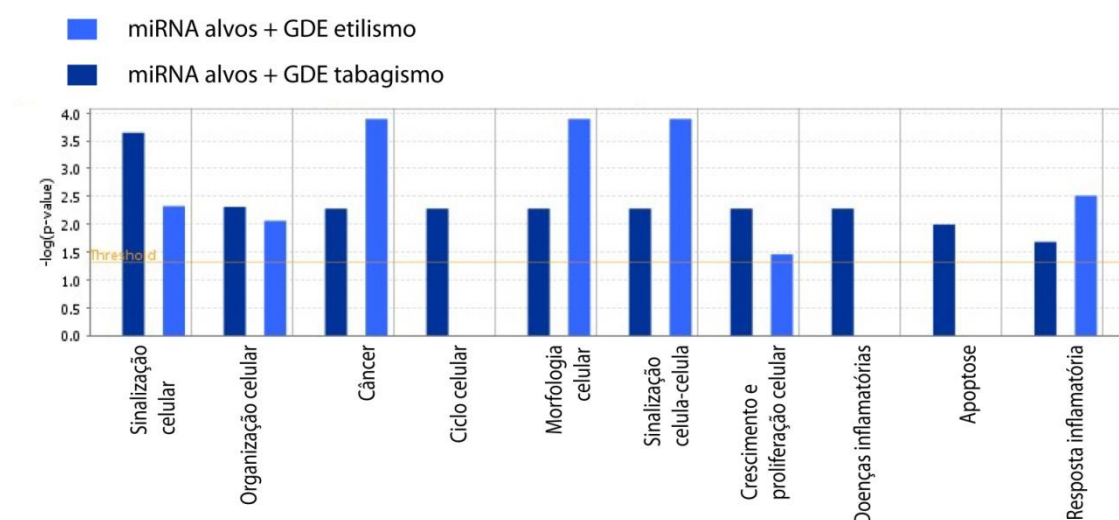


Figura 13 - Comparação entre vias enriquecidas para genes alvos de miRNA e genes diferencialmente expressos das análises considerando o hábito tabagista e etilista. Para essa análise foi utilizado o software *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. GDE=Genes diferencialmente expressos.

4.3 ANÁLISE INTEGRADA

Foi realizada uma análise integrada utilizando os 2.673 genes com expressão aumentada (resultantes da análise dos 16 casos de leucoplasias) e os seis miRNAs que apresentaram expressão diminuída (*hsa-miR-1238*, *hsa-miR-1234*, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-191*, *hsa-miR-4313* e *hsa-miR-940*). Para a identificação dos genes regulados pelos miRNAs alterados, inicialmente foi realizada uma análise *in silico* que identificou 726 alvos preditos a serem regulados por esses miRNAs (predição alta e moderada; Quadro 9). Considerando apenas a integração entre os 2.673 genes com expressão aumentada e os 726 alvos de miRNAs, foram identificados 131 genes, apresentados na Figura 14 e no Quadro 7.

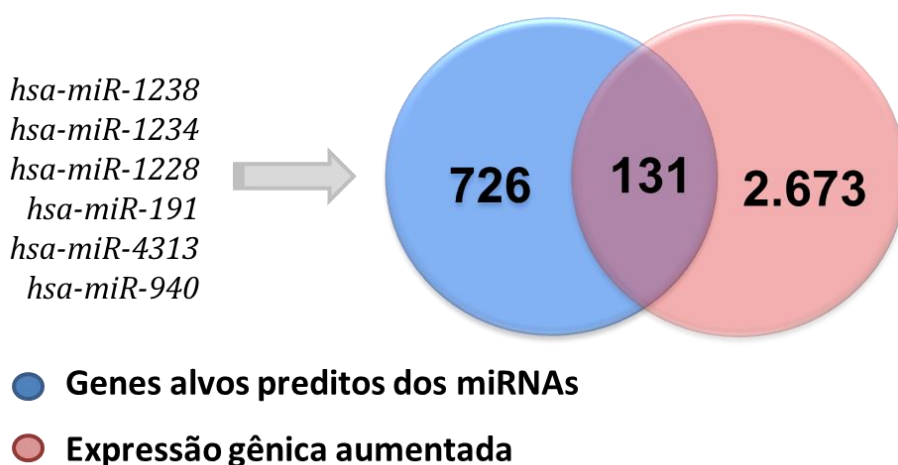


Figura 14 – Diagrama de Venn representando a intersecção entre as análises de expressão gênica global e análise de predição *in silico*. Interação entre os genes alvos preditos dos miRNAs com expressão diminuída (miRNAs *hsa-mir-1238*, *hsa-mir-1234*, *hsa-mir-1228*, *hsa-mir-191*, *hsa-mir-4313* e *hsa-mir-940*) e os genes com expressão aumentada na análise de expressão gênica global. A integração destes dados resultou em 131 genes com expressão aumentada regulada pelos seis miRNAs.

Quadro 7 - Resultado da análise integrada entre os resultados da expressão de transcritos e dos miRNAs diferencialmente expressos.

miRNA	Cromossomo	Genes
<i>hsa-miR-1228</i>	22	<i>CYP1A2, ZNF2, LYRM4, NBPF3, HCAR3, RABEP1, TMEM35, SFXN3, PPID, FAM90A1, GPR37L1, H6PD, ZNF784, CARD8,</i>
<i>hsa-miR-1234</i>	8	<i>PTCD1, SYDE1, PLA2G15, PAQR6, MEX3D, D2HGDH, PLEKHG5, PRR11, CDH23, POLR3H, TERT, GPD1, SCARA5, LOC100288562/RE, XO1L1, PRKAR1B</i>
<i>hsa-miR-1238</i>		<i>ILDR1</i>
<i>hsa-miR-191</i>	3	<i>DCTN4, ZNF362, ASTN2, SIN3B</i>
<i>hsa-miR-4313</i>	15	<i>AQP1, FAM214B, D2HGDH, ALG1, PDE4C, NRSN2, MYOG, NLGN2, SYDE1, TMEM164, ID1, MADD, GPC2, NAT9, ZDHHC8, ZNF362, CRHR1, ABHD2, C19orf25, MEX3D, ALDH4A1, DCTN2, PTCD1, KLK2, GSTM5, ARL8A, CPN2, PLEKHG5, ALPP, PRSS53, SMYD5, ATP2B3, NAB2, MAN1A2, SYT2, DUSP15, C11orf42, DCTN2, PTCD1, KLK2, GSTM5, ARL8A, CPN2, PLEKHG5, ALPP, PRSS53, SMYD5, ATP2B3, NAB2, MAN1A2, SYT2, DUSP15, C11orf42, TBKBP1, GPR114, PIP5K1C, GIPR, NPHS1, BCAM, EGFL8, GPD1, OPA3, TAOK2, MEF2D, NAGS, STMN2, IL10RA, SH3BP2, MESP1, CPNE7, ZDHHC22, S1PR2</i>
<i>hsa-miR-940</i>	16	<i>NHSL1, CYP1A2, THEM5, TBCD, CYP2B6, PFKFB3, STMN2, SEMA4B, OTOF, OTOF, SSR3, NCEH1, TJP2, CD4, CPN2, GBP6, BBS5, ALG1, PLEKHG5, SV2A, PSPH, SFXN3, SYT2, ZNF418, THY1, TNK2, CCDC120, ZFP36L1, NUDT16L1, GPR37L1, ODF4, PLAC4, ALS2CL, RTEL1, IL10RA, NCKAP5L, TEAD3, MADCAM1, CRHR1, KRT71, METTL21B, ZNF784</i>

Foram detectados 131 genes e 6 miRNAs que apresentavam correlação inversa e que apresentavam predição alta a moderada.

A relação entre os genes alvos e miRNAs identificados na análise de integração de dados, está apresentada na Figura 15. A maioria dos genes alterados estavam relacionados com as funções de manutenção gênica, organização e destino celular, tradução, transcrição e metabolismo.

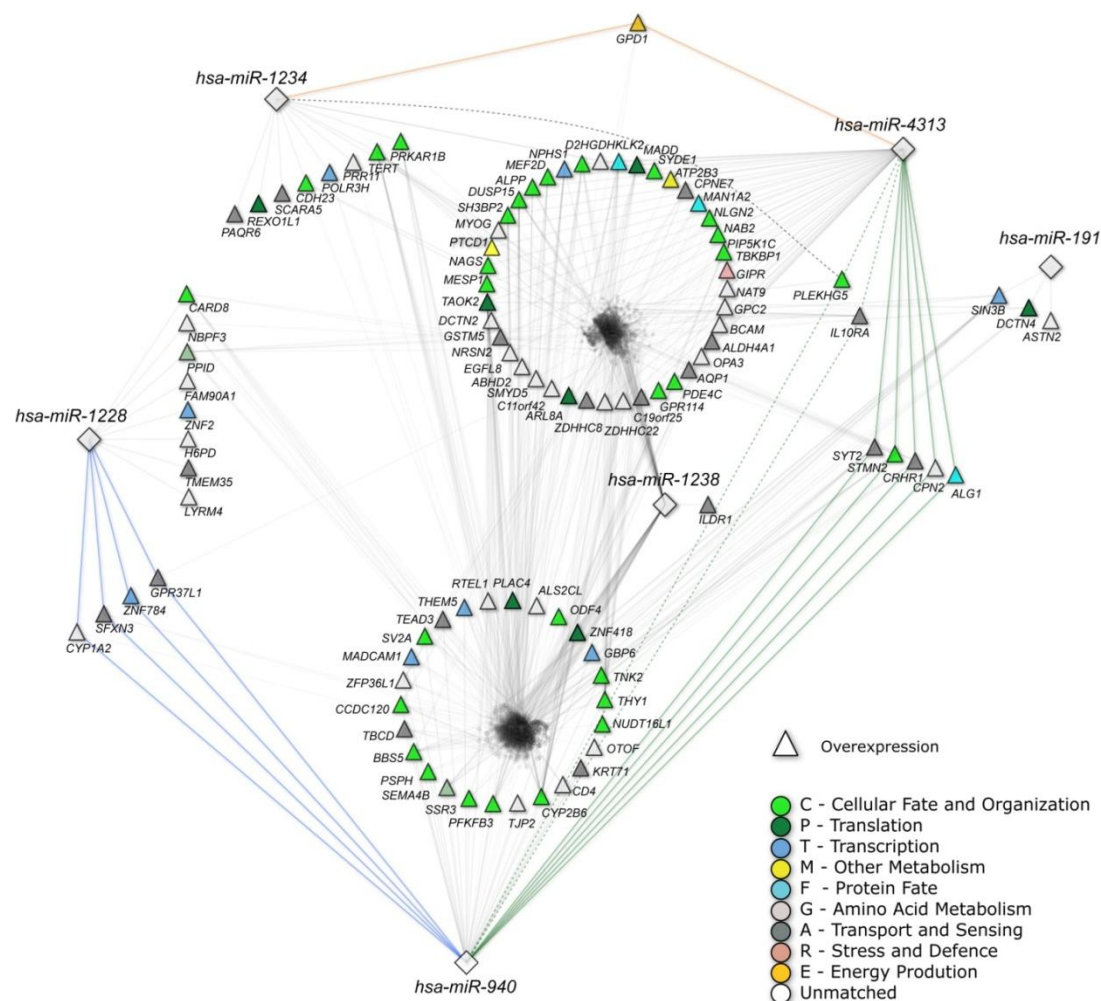


Figura 15 - Interação entre os miRNAs com expressão diminuída e transcritos com aumento da expressão (imagem gerada usando o *software NAViGaTOR*). O triângulo para cima representa os genes com expressão aumentada e os losangos representam os miRNAs. A linha pontilhada representa a interação de um gene alvo com mais de um miRNA regulador. Os processos biológicos foram representados por cores, de acordo com a legenda.

Os genes resultantes desta análise foram avaliados pelo programa *Ingenuity Pathway Analysis*, identificando redes de interações envolvidas com metabolismo de drogas, sinalização e interação celular, resposta celular a terapêuticos, transporte molecular, resposta inflamatória, doenças hereditárias e metabolismos de carboidratos. A Tabela 4 apresenta os dados do enriquecimento gênico como resultado das alterações encontradas no estudo com as leucoplasias.

Tabela 4 - Principais funções biológicas e genes encontrados no enriquecimento realizado pelo IPA.

Principais biofunções nas leucoplasias		
Biofunções	p-valor	Genes
Montagem e organização celular	1,19E-04	<i>OTOF, PIP5K1C, SV2A, SYT2</i>
Transporte molecular	1,19E-04	<i>OTOF, PIP5K1C, SV2A, SYT2</i>
Movimento celular	2,67E-04	<i>OTOF, PIP5K1C, SYT2</i>
Metabolismos de drogas	4,89E-04	<i>CYP1A2, CYP2B6</i>
Câncer	9,07E-04	<i>ID1, TERT</i>

As principais funções biológicas representadas no Quadro 8 são das categorias montagem e organização celular, sendo a exocitose de vesículas a mais significativa, envolvendo os genes *OTOF, PIP5K1C, SV2A* e *SYT2*. Na categoria do metabolismo de drogas, os genes alterados mais importantes foram o *CYP1A2* e *CYP2B6* do complexo do citocromo 450. Com relação ao câncer, a imortalização de queratinócitos envolvendo os genes *ID1* e *TERT* foi mais representativa nas leucoplasias.

4.4 META-ANALISE

Para comparar se a expressão de transcritos obtidos no presente estudo corroboram com os estudos de leucoplasias da literatura, foi realizada uma meta-análise considerando os estudos de GUMUS et al. (2008) (GSE10063) (realizado em 30 amostras pareadas de linhagens de leucoplasias e amostra controle) e SAINTIGNY et al. (2011) (GSE26549) (realizada em 86 amostras de leucoplasias), disponíveis no GEO. Foram selecionados os estudos que haviam realizados análise de expressão de transcritos e de miRNAs em amostras de leucoplasias, e que haviam depositados seus dados no GEO. Vinte e sete genes apresentaram expressão aumentada e 44 genes apresentaram expressão diminuída concordantes com os achados do presente estudo (Quadro 8).

Quadro 8 - Genes identificados após a meta-análise utilizando os resultados do presente estudo e os descritos por GUMUS et al. (2008) e SAINTIGNY et al. (2011).

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	
Expressão diminuída	<i>ZNF554, ESRRB, PPCDC, KCNG1, SYNPO2L, SOX4, C20orf112, CXCR2, CASP10, ZNF493, MRPL49, RALGPS1, TBC1D9B, RFX1, CAMKK1, NUBP2, ZNF219, FUT2, CRYL1, RECQL5, FUT5, PQLC1, HS6ST1, MEFV, PTPRU, NFE2, PHLDA3, KCNK3, KIAA1522, FUT7, CRY2, GPT2, TMEM95, DGCR2, PTDSS2, ECEL1, CDC42BPG, GNAZ</i>
Expressão aumentada	<i>SSR3, DCTN4, NHSL1, NCEH1, TJP2, NBPFF3, AQP1, MEX3D, ARL8A, RABEP1, PSPH, NAB2, TERT, ZFP36L1, TMEM164, ID1, MADD, MEF2D, PFKFB3, NAGS, NCKAP5L, MADCAM1, ABHD2, ZNF784, S1PR2, CARD8</i>

Também foi realizada uma meta-análise para avaliar se a expressão dos miRNAs identificados no nosso estudo estavam de acordo com os dados disponíveis em literatura. Foram utilizados os dados de XIAO et al. (2012) e de CERVIGNE et al. (2009) cujos resultados estavam disponíveis em banco de dados do GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Foi observado concordância entre dois miRNAs do estudo de XIAO et al. (2012) (*hsa-miR-1228* e *hsa-miR-191*) e um miRNA do relato de CERVIGNE et al. (2009) (*hsa-miR-191*) que também apresentaram expressão diminuída no nosso estudo (Quadro 9). Sendo assim, foram selecionados os miRNAs *hsa-miR-1228* e *hsa-miR-191* encontrados na meta-análise no presente estudo, e o *hsa-miR-4313* também encontrado na análise integrada e com maior número de genes preditos na análise *in silico*.

Quadro 9 - miRNAs indicados pela meta-análise utilizando os dados de XIAO et al. (2012), CERVIGNE et al. (2009) e os obtidos no presente estudo.

miRNA	Estudo atual	XIAO et al. (2012)	CERVIGNE et al. (2009)
<i>hsa-miR-1228</i>	expressão diminuída	expressão diminuída	
<i>hsa-miR-191</i>	expressão diminuída	expressão diminuída	expressão diminuída

4.5 ANÁLISE DE CONFIRMAÇÃO DOS ACHADOS POR RT-qPCR

Foram selecionados os miRNAs *hsa-miR-191*, *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-4313* e os genes *CARD8*, *CASP10*, *MADCAM1*, *MADD*, *TERT*, *SOX4* e *ZNF784* para a confirmação dos achados por RT-qPCR. O critério utilizado foi a inclusão de genes e miRNAs que apresentavam correlação inversa na análise integrada e concordância com os resultados obtidos na meta-análise.

Na análise de expressão global dos miRNAs, foram selecionados aqueles que apresentaram expressão diminuída (*hsa-miR-191*, *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-4313*). O Quadro 10 apresenta os miRNAs e os genes alvos preditos. Foram também selecionados os genes *SOX4* e *CASP10* que apresentaram baixos níveis de transcritos por estarem relacionados com vários processos envolvidos em doenças proliferativas como por exemplo apoptose, sistema imune e diferenciação celular.

A confirmação dos miRNA e transcritos foi realizada por ensaios de RT-qPCR apenas em amostras de leucoplasias. Oito amostras de leucoplasias foram utilizadas para os ensaios de miRNA, sendo 5 amostras independentes, enquanto que para os ensaios de expressão dos transcritos foram avaliadas dez amostras, das quais duas não foram avaliadas para expressão gênica global. Havia uma quantidade muito limitada de RNA para a realização dos ensaios.

Quadro 10 - miRNAs e genes alvos resultantes da análise integrada presentes nas meta-análises que apresentaram correlação inversa e concordância com os achados deste estudo.

miRNA	Gene
<i>hsa-miR-1228</i> ↓	<i>NBPF3</i> , <i>RABEP1</i> , <i>ZNF784</i> , <i>CARD8</i> ↑
<i>hsa-miR-191</i> ↓	<i>DCTN4</i> ↑
<i>hsa-miR-4313</i> ↓	<i>AQP1</i> , <i>ARL8A</i> , <i>NAB2</i> , <i>TMEM164</i> , <i>ID1</i> , <i>MADD</i> , <i>MEF2D</i> , <i>NAGS</i> , <i>ABHD2</i> , <i>S1PR2</i> ↑
<i>hsa-miR-1234</i> ↓	<i>MEX3D</i> , <i>TERT</i> ↑
<i>hsa-miR-940</i> ↓	<i>SSR3</i> , <i>NHSL1</i> , <i>NCEH1</i> , <i>TJP2</i> , <i>PSPH</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>PFKFB3</i> , <i>NCKAP5L</i> , <i>MADCAM1</i> ↑

Em negrito os genes/miRNAs selecionados para validação.

Além dos descritos na tabela, os genes *SOX4* e *CASP10* foram incluídos para a confirmação dos achados.

Todos os miRNAs identificados no estudo aparecem envolvidos em processos tumorais, em especial o *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-191* (Quadro 11).

Quadro 11 - Relatos em literatura que associaram os miRNAs selecionados para a confirmação dos achados.

miRNAs	Genes alvo	Literatura	Cânceres associados
<i>hsa-miR-1228</i>	<i>NBPF3, RABEP1, CARD8</i>	Jia et al. 2013; Torres et al. 2013; Katayama et al. 2012; Guled et al. 2009	Gástrico, fígado, endométrio.
<i>hsa-miR-191</i>	<i>DCTN4</i>	Izzotti et al. 2009; Patnaik et al. 2010; Shen et al. 2010; Colamaio et al. 2011; He et al. 2011; Poliseno et al. 2012; Di Leva et al. 2012; Garzon et al. 2008; Qin et al. 2013	Mama, leucemia mielóide, colorretal, melanoma, tireóide, fígado, ovário, pulmão.
<i>hsa-miR-4313</i>	<i>AQP1, TMEM164, ID1, MADD, ABHD2, ARL8A, NAB2, MEF2D, NAGS</i>	-	-
<i>hsa-miR-1234</i>	<i>MEX3D, TERT</i>	Liu et al. 2014	Nasofaringe
<i>hsa-miR-940</i>	<i>NHSL1, PFKFB3, SSR3, NCEH1, TJP2, PSPH, ZFP36L1, NCKAP5L, MADCAM1, ZNF784</i>	Lui et al. 2007	Renal

Estes miRNAs foram obtidos após a análise integrada e meta-análise.

Foi detectada expressão aumentada dos genes *MADD* ($p = 0,042$) e *ZNF784* ($p = 0,009$) na comparação com o tecido normal contralateral e usando o *HPRT* como gene endógeno (baseado em resultados anteriores do grupo em amostras da cavidade oral). Foi observado aumento marginalmente significativo da expressão do gene *MADCAM1* ($p = 0,071$). Os demais genes não apresentaram diferenças significativas: *CARD8* ($p = 1,00$), *CASP10* ($p = 0,934$), *SOX4* ($p = 0,905$) e *TERT* ($p = 0,829$) (Figura 16).

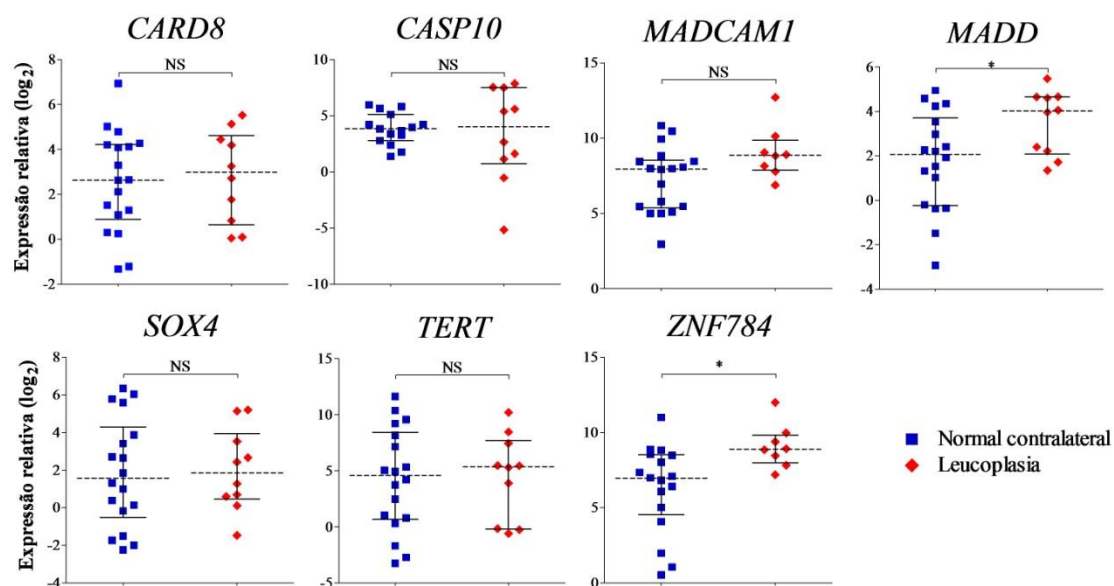


Figura 16 - Análise de expressão dos transcritos em amostras de leucoplasias e tecido da mucosa oral normal contralateral após a análise integrada e meta-análise. Foi observado aumento significativo nos níveis de expressão para os genes *MADD* e *ZNF784* (* $p < 0,05$) nas amostras de leucoplasias.

Os miRNAs alvos foram normalizados pelo miRNA endógeno RNU44 (baseado em resultados anteriores do grupo em amostras da cavidade oral). Os miRNAs *hsa-miR-1228* e *hsa-miR-4313* não apresentaram diferenças significativas na comparação com o tecido normal contralateral ($p = 0,976$ e $p = 0,799$, respectivamente), embora apresentassem tendência a expressão diminuída nas leucoplasias (Figura 17). Não foi possível analisar o *hsa-miR-191*, pois os Cts foram indeterminados.

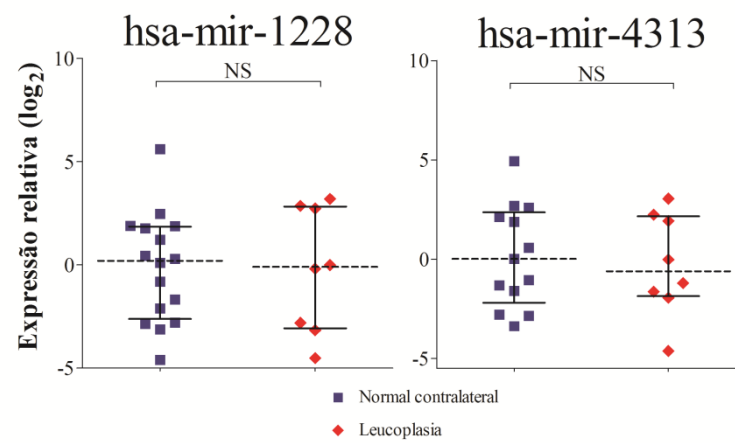


Figura 17 - Análise da expressão dos miRNAs por RT-qPCR nas lesões leucoplásicas comparadas com o tecido normal contralateral. Não foram observadas diferenças significativas.

5 DISCUSSÃO

Vários dados em literatura indicam que os carcinomas orais podem surgir a partir de lesões potencialmente malignas, envolvendo um processo de múltiplas etapas seguido por vários graus de displasia epitelial até o carcinoma invasivo (REDDI e SHAFER 2006; CASTRO JÚNIOR et al. 2008; HO et al 2012; ARDUINO et al. 2013). A leucoplasia é uma das lesões orais mais comuns e a detecção de marcadores moleculares pode ser útil para identificar estágios iniciais do processo tumoral e também novos alvos terapêuticos.

As coletas das lesões e tecidos normais contralaterais foram realizadas com o auxílio de uma escova e a quantidade de células obtidas era limitada. As células eram armazenadas em tubos de 10mL contendo solução salina, o que dificultava a precipitação. A obtenção das células por centrifugação. A partir deste material, deviam ser extraídos o DNA e o RNA, e conseqüentemente a quantidade obtida de ácidos nucleicos era baixa, além de qualidade muitas vezes indesejável para os procedimentos. O método de obtenção da amostra foi adotado por ter sido aprovado entre os grupos colaborativos de um projeto internacional do qual este faz parte. O kit pré-definido para as extrações era baseado na digestão enzimática com proteinase K e precipitação com cloreto de sódio, o que comprometia a qualidade das amostras e apontava a necessidade de purificação por estratégias baseadas em colunas, levando a perda de mais material. O fato

das amostras terem sido purificadas para a realização dos ensaios de expressão global levou ao término da maioria delas, justificando o baixo número amostral utilizado nas análises de miRNA e de RT-qPCR usada para a confirmação dos resultados. Vale ressaltar que estas amostras foram coletadas em período de dois anos antes do seu início.

Neste estudo utilizamos dados de expressão gênica global de 30 casos de lesões pré-malignas variadas e avaliamos a expressão de miRNAs em 12 casos de leucoplasias. Entre os 30 casos avaliados, 53,3% apresentavam leucoplasias, 20% líquen plano, 6,6% eritroplasias, 6,6% queilite actínica, 6,6% leucoplasia verrucosa proliferativa, 3,3% fibroma e 3,3% papiloma escamoso. Embora ocorram diferenças morfológicas e clínicas, o resultado do perfil de expressão dos transcritos codificadores não mostrou diferenças entre as lesões. Uma possível explicação é o número limitado de amostras dos diferentes subtipos incluídos no estudo.

Pelo fato da maioria das amostras avaliadas ser leucoplasias (N = 18, 16 leucoplasias puras + 2 leucoplasias verrucosas proliferativas) e líquen planos (N = 6), a primeira análise realizada foi um agrupamento hierárquico supervisionado entre estes dois grupos. As leucoplasias correspondem às lesões predominantemente brancas, podendo ser homogêneas ou não, com ou sem displasias, sendo a presença de displasia associada ao risco aumentado de progressão para o câncer (AXELL et al. 1996; WARNAKULASURIYA et al. 2007; RIBEIRO et al. 2010). O risco das leucoplasias progredirem para o câncer varia de 0,13 a 17,5%. Neste estudo apenas um caso evoluiu para CCE, e nele estavam presentes todos os

genes selecionados para validação, além de outros genes como o *HBD* e *HBB* envolvidos com hemoglobina, o *IL18* que codifica interleucina, o *LNx1* associado à ubiquitina e o gene *SAMD9*, com função de regulação da proliferação celular e apoptose.

O líquen plano é uma lesão resultante de uma inflamação crônica e que raramente sofre regressão espontânea. Devido à falta de conhecimento sobre o líquen plano, recomenda-se que o seu diagnóstico clínico e histopatológico seja baseado nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (RAD et al. 2009; GARCÍA-GARCÍA et al. 2012), o qual foi adotado neste estudo. A lesão se inicia por agentes endógenos ou exógenos, que podem induzir necrose em células basais. Uma série de fatores pode modificar o curso da lesão, afetando a recuperação e a resposta à terapia. No estudo de GARCÍA-GARCÍA et al. (2012), a taxa de transformação maligna do líquen plano variou de 0% a 12,5%.

O presente estudo demonstrou não haver uma assinatura genética específica para as leucoplasias e os líquen planos. Sabe-se que as duas lesões tem potencial para progredir para estágios malignos (CASTRO JÚNIOR et al. 2008), porém poucos relatos em literatura avaliaram a expressão gênica global em amostras de lesões orais (ODANI et al. 2006; KONDOH et al. 2007; GUMUS et al. 2008; KURIBAYASHI et al. 2009; SAINTIGNY et al. 2011). Os relatos que possuem dados disponíveis em bancos de dados públicos (GUMUS et al. 2008; SAINTIGNY et al. 2011) avaliaram amostras ou linhagens de leucoplasias, mas nenhum avaliou amostras de líquen plano. SAINTIGNY et al. (2011) avaliaram o perfil de

expressão gênica em 86 pacientes com leucoplasias, dos quais 35 desenvolveram CCE (média de seguimento de seis anos). Os autores encontraram 2.182 genes diferencialmente expressos e a análise de vias funcionais mostrou associação com a maquinaria proteassômica, *MYC* e componentes ribossomais associados ao câncer. Além disso, os genes com expressão diminuída foram relatados em outros estudos associados ao desenvolvimento tumoral. Em nosso estudo, o tempo de seguimento dos pacientes avaliados foi, em média, de três anos, havendo apenas um único caso que evoluiu para CCE, não sendo possível fazer a comparação entre os casos que evoluíram e não evoluíram, nem uma avaliação de progressão das lesões.

Considerando que o consumo de álcool e o uso de tabaco são os principais fatores etiológicos associados com os carcinomas de vias aéreas digestivas superiores, foi avaliado se havia uma assinatura genética característica dessas lesões quanto aos dois hábitos. Os resultados aqui obtidos demonstraram, confirmando dados da literatura, que há diferença nos níveis de expressão gênica entre os grupos de pacientes que apresentavam ou não o hábito tabagista e ou etilista (BANOCZY et al. 2001; LEE et al. 2003; DU et al. 2007; ZHANG et al. 2007; GUMUS et al. 2008; WARNAKULASURIYA 2009; LIMA et al. 2012; SUJATHA et al. 2012). Em relação ao hábito tabagista, foi detectado no presente estudo o aumento de expressão de 16 genes, entre eles o *EML2*, descrito previamente com aumento de expressão em epitélio de fumantes (SRIDHAR et al. 2008). O gene *FOXF1* foi relacionado com consumo excessivo de cigarro e o câncer

de esôfago (DURA et al. 2013). A diminuição de expressão foi verificada em oito genes, entre eles o gene *RAB1A*, apresentando também expressão aberrante em câncer de língua (SHIMADA et al. 2005).

GUMUS et al. (2008), investigaram os efeitos do tabaco em modelos celulares de leucoplasias orais. Os autores avaliaram linhagens sob efeito do tratamento com extrato de tabaco e encontraram aumento nos níveis de mRNA dos genes *CYP1A1*, *CYP1B1*, *PTHLH*, *IL1B*, *EREG*, *ALDH1A3*, *IL6* e *IL24*, e redução da expressão dos genes *TNFSF10* e *CCL5*. Os autores também confirmaram o aumento da expressão dos genes *CYP1A1* e *CYP1B1* em mucosas orais de tabagistas. Simultaneamente com suas análises, foram empregados diferentes bancos de dados para analisar as mudanças em termos de funções biológicas e vias na presença do tabaco. Como conclusão, os autores sugeriram que o tabaco afetava as vias envolvidas na proliferação celular, movimento celular, inflamação, apoptose e injúrias em tecidos. Corroborando os dados de GUMUS et al. (2008), no nosso estudo, genes relacionados à proliferação celular e inflamação também se encontraram alterados (Tabela 2). Como pode ser observado no Quadro 5, nosso estudo concorda com um gene do estudo de GUMUS et al. (2008), o *ADAM9*, que codifica uma proteína metalopeptidase, envolvida em processos de adesão celular, proliferação e migração (VINCENT-CHONG et al. 2013). Embora a maioria dos relatos em literatura relacione o aumento da expressão de *ADAM9* com o desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer, a diminuição de expressão observada no nosso estudo e no

de GUMUS et al. (2008) pode estar relacionada com o hábito tabagista e à não agressividade das leucoplasias.

A comparação dos resultados de expressão gênica global das leucoplasias com o consumo de álcool revelou 533 genes diferencialmente expressos na comparação com o tecido normal contralateral. Os principais genes alterados com aumento de expressão incluem *HBB*, *SOCS3*, *CXCL14* e *SDF2L1* e com diminuição da expressão os genes *SLC24A3*, *CYP4F8*, *PAR6B* e *DUSP4*. Avaliando-se as principais funções biológicas envolvidas na análise de etilismo, foram encontradas alteradas as vias de ciclo celular, desenvolvimento, crescimento, transporte e proliferação celular.

MORSE et al. (2007) verificaram que pacientes que possuíam hábitos tabagistas e etilistas apresentavam maior potencial para o desenvolvimento de tumores a partir de leucoplasias. Os autores relataram que os hábitos etilistas e tabagistas estavam fortemente associados com o desenvolvimento de tumores a partir de lesões, o que pode ser justificado por alterações em genes importantes relacionados à regulação do ciclo celular, como ciclinas e proto-oncogenes. HASHIBE et al. (2000) relataram que o consumo de álcool é um fator de risco independente para o desenvolvimento das leucoplasias. Porém, no estudo de JABER (2010), 4% dos usuários de tabaco e álcool apresentaram transformação maligna, contra 10% dos não usuários, apesar de não ser significativa esta diferença. Segundo LIMA et al. (2012), o consumo do álcool é um fator de risco questionável, e seus resultados não mostram correlação do consumo de álcool com displasias e progressão para câncer.

Um resultado interessante do nosso estudo foi a detecção de alteração na expressão de alguns genes codificadores de enzimas metabolizadoras de drogas incluindo o *GSTA2* (diminuição de expressão) e o *CYP4F8* (aumento de expressão) em pacientes com o hábito etilista. Destas, somente o gene *GST2* parece estar relacionado com o metabolismo de álcool e tabaco. O gene *GSTA2* é um dos responsáveis por codificar enzimas essenciais na desintoxicação de compostos eletrofílicos. Variações polimórficas neste gene podem alterar a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer, bem como afetar a toxicidade e a eficácia de alguns medicamentos (ZHANG et al. 2010). CANOVA et al. (2010) relataram que um alelo variante de *GSTA2* modifica o risco de desenvolvimento de câncer do trato aéreo digestivo em pacientes com hábito tabagista e etilista. Semelhante ao nosso estudo, altos níveis de expressão do gene *CYP4F8* foram também relatados em amostras de câncer de próstata (VAINIO et al. 2011).

Nas análises de enriquecimento realizadas entre os genes diferencialmente expressos obtidos nas comparações entre hábitos tabagista e etilista, houve uma diferença considerável entre os genes presentes nas vias do ciclo celular nos pacientes com hábito etilista. É possível que essa diferença tenha relação com a quantidade de genes utilizada em ambas as análises (24 genes alterados para hábito tabagista e 533 genes para o hábito etilista). Vale ressaltar que houve sobreposição de algumas vias encontradas nesta análise com tabaco e com álcool (Figura 10).

Dentre os genes presentes na via do ciclo celular destacam-se o *ITGB1* (diminuição de expressão), *PPP1R3C* (diminuição de expressão), *PPP1CB* (diminuição de expressão) e o *PPP1CC* (diminuição de expressão), identificados em maior frequência nos pacientes com hábito etilista. O *ITGB1* codifica um tipo de integrina (Beta 1), o qual já foi descrito em câncer de pulmão com importante papel no desenvolvimento tumoral, migração e invasão tumoral (WANG et al. 2013). Os genes *PPP1R3C*, *PPP1CB* e *PPP1CC* codificam subunidades de uma proteína fosfatase 1 (PP1), envolvida na regulação de diversos processos celulares como divisão celular, metabolismo do glicogênio e síntese protéica. O *PPP1R3C*, como descrito acima, foi identificado com expressão diminuída em maior frequência em etilistas (Tabela 2). A maioria dos estudos envolvendo *PPP1R3C* relata a associação deste com o metabolismo energético e situações de hipóxia (SHEN et al. 2010; MONTORI-GRAU et al. 2011; MOHINDRA et al. 2013). Corroborando com nossos achados, em carcinomas escamosos de língua, foi relatado que *PPP1R3C* apresentou expressão diminuída (YE et al. 2008). É possível que este gene tenha um papel relevante em pacientes com leucoplasias e que consomem álcool. Para o nosso conhecimento, o gene *PPP1CC* não foi descrito em estudos relacionados com o câncer.

Sabe-se que a regulação gênica por miRNAs é um mecanismo importante tanto em condições normais quanto em tumorais (KWAK et al. 2010; DI LEVA et al. 2012). Neste estudo foram identificados 13 miRNAs com níveis diminuídos de expressão nas leucoplasias quando comparados

com os tecidos normais contralaterais. Entre eles, sete apresentaram $FDR < 0,08$ (*hsa-miR-1238*; *hsa-miR-1280*; *hsa-miR-1234*; *hsa-miR-191*, *hsa-miR-1228*, *hsa-miR-4313* e *hsa-miR-940*) e seis já foram preditos como reguladores de transcritos específicos. Na análise comparando estes seis com seus transcritos alvos, verificou-se que a maioria dos genes alterados estavam relacionados com as funções de manutenção gênica, organização e destino celular, tradução, transcrição e metabolismo.

A função biológica do *hsa-miR-1228* ainda não é totalmente conhecida. Semelhante ao nosso estudo, a expressão diminuída do *hsa-miR-1228* foi também relatada em carcinomas gástricos comparados com tecidos normais (JIA et al. 2013). Os autores demonstraram que o *hsa-miR-1228* pode funcionar como um supressor do tumor regulando negativamente a transição epitélio-mesênquima. Neste estudo, os autores também demonstraram que o aumento da expressão do *hsa-miR-1228* suprime a formação do tumor em animais xenotransplantados.

No presente estudo, a integração de dados transcriptômicos e de expressão global de miRNAs demonstrou o papel regulador do *hsa-miR-1228* para diversos genes, em especial, o *CARD8* e o *CYP1A2*. O gene *CARD8* apresentou expressão aumentada na análise de expressão gênica global do presente estudo. A proteína codificada por esse gene pertence à família de proteínas contendo o domínio de recrutamento da caspase (CARD), as quais estão envolvidas nas vias que levam a ativação das caspases ou fator nuclear Kappa-B (NFkB). Esta proteína pode ser um componente do inflamasoma, um complexo de proteínas que tem um papel

na ativação das caspases pró-inflamatórias. Acredita-se que esta proteína age com uma molécula adaptadora que regula negativamente a ativação de NFkB, secreção de CASP1-dependente da secreção de IL1B e apoptose. O papel desta proteína teria grande relevância em leucoplasias e por essa razão, o gene *CARD8* foi selecionado para a confirmação dos achados por RT-qPCR. Embora não significativo, foi observado uma tendência a aumento da expressão do gene *CARD8* nas poucas amostras em que havia material disponível para esta análise.

O gene *CYP1A2*, um candidato a ser regulado pelo *hsa-mir-1228*, apresentou aumento de expressão. O *CYP1A2* codifica uma das principais enzimas envolvidas no metabolismo do complexo do citocromo *P450*. A proteína codificada por este gene localiza-se no retículo endoplasmático e sua expressão é induzida por alguns hidrocarbonetos aromáticos (PAH), alguns dos quais encontrados na fumaça do cigarro. O substrato endógeno desta enzima é desconhecido, contudo ela é capaz de metabolizar alguns PAHs para carcinógenos intermediários. Além disso, a enzima *CYP1A2* metaboliza um número considerável de fármacos, pró-carcinógenos e compostos endógenos. O gene está mapeado em 15q24.1 e possui estreita ligação com *CYP1A1*, partilhando a mesma região franqueadora 5'. Tem sido observada uma grande variabilidade interindividual na expressão e atividade de *CYP1A2* em diferentes populações, principalmente devido a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, como por exemplo, o tabagismo (ZHOU et al. 2012). Polimorfismos genéticos no gene *CYP1A2* parecem influenciar na capacidade de indução da expressão da enzima. Em

especial o polimorfismo rs762551, aumenta a expressão deste gene e está associado com o desenvolvimento de vários tipos de tumores, como o câncer de pulmão, mama, colorretal e estômago (OSAWA et al. 2007; WANG et al. 2012). Assim, o aumento de expressão deste transcrito poderia estar associado com o aumento da sua capacidade em metabolizar os PHAs e consequentemente aumentar a produção de carcinógenos intermediários e que teriam um papel relevante na proliferação celular das leucoplasias. Neste estudo foi mostrado que *CYP1A2* também é candidato para ser regulado pelo *hsa-miR-940*.

O *hsa-miR-940* foi detectado como candidato a regulador de genes envolvidos com o biometabolismo de drogas, como por exemplo, o *CYP1A2* e o *CYP2B6*, entretanto para o nosso conhecimento não há outros relatos em literatura sobre o papel deste miRNA. Polimorfismos alterando a expressão do gene *CYP2B6* tem um papel importante no metabolismo de antidepressivos, tamoxifeno e na conversão do analgésico codeína em morfina (INGELMAN-SUNDBERG et al. 2007). Além disso, variantes deste gene estão associados com o desenvolvimento de tumores relacionados ao tabaco, como os tumores de cabeça e pescoço (KHLIFI et al. 2013). O miRNA *hsa-miR-940* é predito para regular o gene *MADCAM1*, incluído na análise de confirmação dos achados deste estudo, o qual será discutido abaixo.

O *hsa-miR-1238* foi relacionado com a instabilidade de microssatélites em câncer colorretal, podendo ser um marcador para a Síndrome de Lynch (BALAGUER et al. 2011). O único gene regulado por este miRNA e que está

presente com expressão aumentada no nosso estudo é o *ILDR1*, um receptor contendo um domínio tipo imunoglobulina. Este gene codifica quatro variantes diferentes por *splicing* e o transcrito mais curto não é detectado em tecidos normais, mas apenas em amostras tumorais (HAUGE et al. 2004). ZAGARIA et al. (2012) identificou uma nova translocação cromossômica na síndrome mielodisplásica t(3,11)(q13,q14) que envolve o gene *ILDR1* e está associada com o aumento expressão de mesmo. As implicações biológicas da expressão aumentada de *ILDR1* em leucoplasias precisam ser melhor investigadas.

A função do *hsa-miR-4313* ou o seu envolvimento em doenças ainda não foi descrito em literatura. A análise integrada aqui realizada revelou que o *hsa-miR-4313* possui o maior número de genes alvos preditos quando comparado com os outros miRs (Quadro 6 e Figura 12). Dentre os principais genes, os participantes das vias de metabolismo de drogas *NAT9* e *GSTM5* estavam presentes. O gene *NAT9* está localizado em 17q25.2 e tem 6 exons e, para o nosso conhecimento, não há relatos descritos em literatura que tenham avaliado seu papel em lesões precursoras ou tumores.

O gene *GSTM5* está relatado como alterado em câncer de glândulas salivares e é descrito como regulado por metilação do DNA (BELL et al. 2011). Este gene codifica uma glutathione S-transferase que pertence a classe mu. A classe mu dessas enzimas atua na detoxificação de componentes eletrolíticos, incluindo carcinógenos, agentes terapêuticos, toxinas ambientais e produtos de estresse oxidativo, pela conjugação com a glutathione.

Outro gene regulado pelo *hsa-miR-4313* é o *ALDH4A1*, que codifica uma enzima envolvida na degradação do álcool. Mutações neste gene podem levar a uma deficiência desta enzima e levar a quadros de anomalias renais, nefropatia hereditária, surdez entre outras doenças (MITSUBUCHI et al. 2008). Assim, o aumento da expressão deste gene pode ter um papel relevante em leucoplasias em pacientes que fazem uso do álcool.

O gene *KLK2* também é regulado pelo *hsa-miR-4313* e tem sido amplamente investigado e sugerido como um marcador de tumores de próstata (THOREK et al. 2013). A proteína KLK2 pode ser mensurada no sangue assim como a KLK3 (mais conhecida como PSA (antígeno específico da próstata) e parece ter função biológica semelhante a KLK3 (SHANG et al. 2013) sendo sua expressão relacionada ao pior prognóstico em pacientes com esse tumor (STEUBER et al. 2007).

O *hsa-miR-4313* é também predito em regular o gene *ZNF784* (um codificador de proteínas *zinc finger*) e o gene *MADD* (uma proteína anti-apoptótica), que foram selecionados para a confirmação dos resultados e serão discutidos em detalhes abaixo.

A análise integrada ainda mostrou correlação inversa entre a expressão do *hsa-miR-1234* e o gene *TERT*. CHEN et al. (2007) relataram a expressão desse gene em carcinomas orais, mas o transcrito não foi detectado em amostras normais. Em um estudo realizado por PALANI et al. (2011), a proteína TERT apresentou um aumento de expressão em leucoplasias e carcinoma de células escamosas quando comparado ao tecido de mucosa normal. Este gene foi relatado como um possível alvo

terapêutico em câncer oral por LIU et al. (2011), já que esses autores conseguiram demonstrar que o silenciamento de *TERT* por siRNA resultou em inibição do crescimento celular, induziu apoptose *in vitro* e foi capaz de atenuar o crescimento tumoral *in vivo*. Estes achados em literatura dão suporte para sugerir que o gene *TERT* está envolvido em leucoplasias e pode ser um importante alvo para terapia.

Dados em literatura descrevem que em câncer de tireoide o *hsa-miR-191* apresenta diminuição da expressão e afeta o ciclo celular, morfologia e migração celular além de atuar como supressor tumoral (COLAMAIO et al. 2011). Os alvos do *hsa-miR-191* descritos no presente estudo foram *DCTN4*, *ZNF362*, *ASTN2*, *SIN3B*. Recentemente foi descrito que variantes do *DCTN4*, o qual codifica a proteína *dynactin*, estão associados com a infecção aérea por *P. aeruginosa*, infecção crônica e mucoide com *P. aeruginosa* em indivíduos com fibrose cística (EMOND et al. 2012). É possível que a expressão aumentada deste gene em amostras de leucoplasias também estejam associadas com a infecção por *P. aeruginosa*. Outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese. O gene *ZNF362*, que apresentou expressão aumentada neste estudo na análise de expressão gênica global, foi selecionado para confirmação dos achados e será discutido em detalhes.

Há um número limitado de relatos relacionando a expressão de miRNAs com leucoplasias. CERVIGNE et al. (2009) investigaram a expressão de miRNAs em amostras de leucoplasias e CCE no mesmo sítio e encontraram 365 miRNAs diferencialmente expressos. Os autores

relataram que 125 miRNAs estavam desregulados em leucoplasias que progrediram para câncer enquanto 55 miRNAs apresentavam baixo nível de expressão em leucoplasias que não progrediram para CCE. Quando agrupados (leucoplasias e CCEs), quatro miRNAs (*hsa-miR-21*, *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-345*, *hsa-miR-146a*) apresentavam expressão aumentada em leucoplasias que progrediram para CCEs, o que pode indicar o envolvimento destes em vias moleculares ligadas a progressão tumoral. Os autores relataram que o *hsa-miR-21*, *hsa-miR-181b* e *hsa-miR-345* (desreguladas em todas as leucoplasias e nos CCEs) apresentaram um aumento consistente no nível de expressão associado com o grau de severidade da lesão. Estes dados mostraram que esses miRNAs podem ter um papel relevante na progressão maligna. O grupo também validou mais oito miRNAs com expressão aumentada em leucoplasias progressivas e em CCEs: *hsa-miR-146a*, *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-345*, *hsa-miR-518b*, *hsa-miR-520g* e *hsa-miR-649*. O *hsa-miR-191* descrito por CERVIGNE et al. (2009) também foi encontrado com aumento de expressão na análise global deste estudo.

Em um estudo mais recente, XIAO et al. (2012) avaliaram 25 miRNAs com expressão aumentada e nove miRNAs com expressão diminuída em leucoplasias orais e leucoplasias que sofreram transformação para CCE. O *hsa-miR-31* apresentou expressão aumentada e, segundo os autores, pode ter um importante papel na progressão das leucoplasias por regular o gene *FGF3* (membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos, com atividade mitogênica e na sobrevivência celular). No presente estudo

não foram observadas diferenças no nível de expressão deste miRNA quando as leucoplasias foram comparadas com as amostras de tecido normal contralateral. Em concordância com os achados de XIAO et al. (2012), o presente estudo também identificou o *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-191* com expressão diminuída nos casos avaliados. Não foi possível realizar uma análise de progressão nos nossos casos, pois até o momento apenas um paciente progrediu para CCE (Caso 1-L).

Foi realizada uma análise integrada entre os transcritos codificadores que apresentaram expressão aumentada nas leucoplasias com os miRNAs que apresentaram níveis diminuídos de expressão. No total, 131 genes apresentaram expressão aumentada sendo alvos preditos de serem regulados por 6 miRNAs.

O enriquecimento para vias biológicas utilizando os genes alvos dos miRNAs que também foram identificados com alteração nas análises considerando o hábito tabagista e etilista demonstrou que o genes *ADAM9* (já discutido acima) e *SLC34A1* foram os mais frequentemente associados com as vias encontradas (Figura 11). O gene *SLC34A1* codifica uma proteína co-transportadora de sódio e fosfato. O transporte do fosfato inorgânico através da membrana plasmática é essencial para a função celular normal. As proteínas SLC34 são expressas em órgão específicas e são importantes na Pi homeostase do fosfato inorgânico. Mutações neste gene foram identificadas em pacientes com a síndrome de Fanconi autossômica recessiva e no raquitismo hipofosfatemia (FORSTER et al.

2013). Seu papel em lesões tumorais não é descrito, até o momento, em literatura.

Foi também realizada uma meta-análise para possibilitar a comparação entre os dados de expressão dos transcritos codificadores e de miRNAs deste estudo com os relatados em literatura cujos valores de expressão estivessem depositados em banco de dados. Foram utilizados os dados de GUMUS et al. (2008) (GSE10063) e SAINTIGNY et al. (2011) (GSE26549) para análise de expressão de transcritos, e de XIAO et al. (2012) e de CERVIGNE et al. (2009) para a comparação com os dados de expressão de miRNAs. Sessenta e quatro genes foram obtidos como resultado da meta-análise (Quadro 11), dentre eles os genes *ESRRA*, *SOX4*, *CXCR2* e *CASP10* que apresentaram expressão diminuída, e os genes *TERT*, *TMEM164*, *ID1*, *MADD* e *CARD8* que apresentaram expressão aumentada. Entre os miRNAs, apenas os *hsa-miR-1228* e *hsa-miR-191* foram comuns na comparação entre os resultados da meta-análise e o presente estudo.

Com o objetivo de identificar candidatos potenciais para a confirmação dos achados, foram investigados os genes alterados quanto ao nível de expressão na análise integrada e na meta-análise. Vinte e seis genes e seis miRNAs apresentaram correlação inversa, os quais também estavam presentes na meta-análise. Para a confirmação dos achados por RT-qPCR, foram selecionados cinco dos 26 genes e três dos seis miRNAs além de dois genes (*SOX4* e *CASP10*, ambos com expressão diminuída) que apresentaram alto *fold change* e já tinham sido amplamente descritos

em literatura como alterados em tumores de mama, coloretal, pulmão e leucemias (YAN et al. 2012; VERVOORT et al. 2013). Os níveis de expressão dos transcritos e dos miRNAs candidatos a sua regulação eram inversos. Os genes selecionados foram: *MADCAM1*, que apresentou expressão aumentada e é regulado pelo miRNA *hsa-miR-940*; o gene *TERT*, com expressão aumentada e regulado pelo *hsa-miR-1234*; os genes *ZNF784* e *MADD*, ambos com expressão aumentada e regulados pelo *hsa-miR-4313* e o gene *CARD8*, com expressão aumentada e regulado pelo miRNA *hsa-miR-1228*.

Os genes *MADD* e *ZNF784* apresentaram aumento significativo nos níveis de expressão por RT-qPCR confirmando os achados de expressão gênica global. O gene *MADD* codifica uma proteína anti-apoptótica e está relacionado à sobrevivência celular tumoral. O aumento de expressão deste gene foi relatado em câncer de pulmão e em tumores coloretais (WEI et al. 2012; JAYARAMA et al. 2014). Estudos realizados em linhagens de adenocarcinoma de pulmão mostraram que o aumento da expressão do gene *MADD* era capaz de promover a sobrevivência dessas células por inibição do processo de apoptose (BI et al. 2013). LI et al. (2013) mostraram que em linhagens de carcinoma de tireoide folicular e papilífero (FTC133 e KTC1, respectivamente), o gene *MADD* apresenta uma alta expressão e está associado a resistência ao tratamento TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (TURNER et al. 2013). Uma vez que a proteína traduzida por *MADD* liga-se a receptores de morte (DR – *death receptors*, presentes na superfamília dos receptores do fator de necrose

tumoral), ocorre o impedimento de todo o processo posterior da cascata de sinalização que levaria a apoptose das células tratadas. O gene *ZNF784* pertence à família das proteínas com domínio *zinc finger* que são capazes de interagir com o DNA por átomos de zinco que estabelecem ligações com aminoácidos da região peptídica das proteínas (cisteína, histidina). As proteínas *zinc fingers* estão envolvidas em vários aspectos da regulação da transcrição dependente de DNA e, portanto, no controle de crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose (VOSTROV et al. 2002; JOU et al. 2011). Para o nosso conhecimento, não há dados em literatura do envolvimento deste gene em processos tumorais ou lesões proliferativas. Os achados do presente estudo demonstraram o envolvimento dos genes *MADD* e *ZNF784* nas leucoplasias avaliadas, tornando-os potenciais marcadores moleculares dessas lesões.

Foi observado um aumento da expressão do gene *MADCAM1* nas leucoplasias ($p = 0,071$), embora não estatisticamente significativo. Este gene codifica moléculas de adesão de células endoteliais as quais foram relatadas como interagindo preferencialmente com alguns leucócitos em células mielóides (AMBRUZOVA et al. 2009). *MADCAM1* é altamente expresso no endotélio do intestino e é considerado um importante determinante para resposta inflamatória crônica (CONNOR et al. 1999). MLECNIK et al. (2010), avaliando pacientes com câncer colorretal, relataram que a alta expressão de moléculas de adesão, incluindo *MADCAM1* (além de *ICAM1*, *VCAM1*) associadas com diferentes subconjuntos de células do sistema imunológico estão relacionados com aumento na sobrevida livre da

doença nestes pacientes. Desta forma, o gene *MADCAM1* é um potencial marcador de leucoplasias podendo estar associado com a resposta imunológica inflamatória do tecido ao estresse gerado pela lesão.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão dos transcritos *CARD8*, *CASP10*, *TERT*, e *SOX4*, embora o sentido da alteração tenha sido mantido para os genes *CARD8* e *TERT* (Figura 14) como o detectado na análise de expressão gênica global.

O gene *CARD8* codifica a proteína TUCAN (*tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase-nine*), pertencente à família de proteínas que contêm domínio de recrutamento de caspases (*CARD*). Atua inibindo apoptose induzida pela via mitocondrial ao interferir com a ligação da proteína APAF1 a procaspase-9 (PATHAN et al. 2001). PATHAN et al. (2001) demonstraram o aumento na expressão desta proteína nas linhagens de câncer de mama MCF-7, câncer de ovário OVCAR-8 e de câncer de pulmão NCI-H322M. Em câncer colorretal, foi relatado aumento da expressão de TUCAN 7,7 vezes maior do que amostras controle (KRAJEWSKA et al. 2005). A *CASP10* é uma proteína membro da família das caspases, com papel central na apoptose celular, ativando e clivando as caspases 3 e 7, e a própria proteína é processada pela caspase 8. Sua perda ou diminuição de expressão tem sido relacionado com o desenvolvimento de câncer (YAN et al. 2012). XU et al. (2008) avaliaram a expressão de *CASP10* por RT-qPCR em 93 amostras de câncer de reto e em 93 amostras normais e identificaram expressão diminuída nos tumores. SHEN et al. (2011) avaliaram 120 amostras de

câncer colorretal e verificaram a expressão diminuída da *CASP10* e a correlacionaram como um fator preditivo de pior prognóstico em pacientes com estágio II de câncer colorretal. O aumento no número de amostras pode demonstrar se há diminuição significativa da expressão da *CASP10* é se este é um marcador de leucoplasias.

Como descrito anteriormente, o gene *TERT* está envolvido na expressão da telomerase e possui papel essencial na senescência celular, imortalização, transformação e transição epitélio-mesênquima (DING et al. 2013). Diversos autores tem avaliado o papel de *TERT* em tumores de cabeça e pescoço. PALANI et al. (2011) verificaram o aumento da expressão da proteína *TERT* em amostras de tumores da cavidade oral e em leucoplasias comparados com o tecido normal. No nosso estudo, foi verificado o aumento da expressão do gene *TERT* na análise de expressão gênica global, entretanto, não foi verificada diferença significativa na análise de RT-qPCR, apenas foi mantido o mesmo sentido de aumento de expressão.

O gene *SOX4* tem sido relatado como alterado em diversos tipos de tumores como câncer de estômago, pâncreas, mama, colorretal e próstata (BILIR et al. 2013; LIN et al. 2013). Embora a maioria dos estudos na literatura tenham identificado o aumento de expressão de *SOX4* em tumores (VERVOORT et al. 2013), alguns autores demonstraram que de modo tecido específico, o *SOX4* pode promover a interrupção do ciclo celular e apoptose sugerindo um papel de supressor tumoral (PAN et al. 2009). JAFARNEJAD et al. (2010) avaliaram a expressão de *SOX4* em amostras de melanomas e

nevos e mostraram que a expressão deste gene foi notavelmente reduzida nos melanoma metastáticos. Além disso, a baixa expressão de *SOX4* foi correlacionada com uma pior sobrevida livre de doença. No nosso estudo, o gene *SOX4* apresentou expressão diminuída na análise de expressão gênica global e não foi observada diferença significativa na análise de RT-qPCR.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão do *hsa-miR-1228* e *hsa-miR-4313* na análise de RT-qPCR, embora seja possível observar uma tendência à diminuição da expressão.

Os miRNAs e os transcritos selecionados para a confirmação dos achados estavam presentes na análise integrada e na meta-análise, o que é uma ferramenta importante usada para a seleção destes candidatos. A principal limitação deste estudo foi o número de casos para serem testados para as três metodologias. Novas amostras estão sendo coletadas para ampliar o estudo, entretanto, vale ressaltar que foram necessários quatro anos para a coleta do grupo amostral incluído no estudo. Especificamente, os miRNAs serão analisados usando amostras fixadas em formalina e e em blocos de parafina em um conjunto adicional de casos. Apesar das limitações, foi possível demonstrar candidatos potenciais envolvidos no desenvolvimento das leucoplasias.

Avaliar o perfil de expressão gênica e de miRNA em amostras de leucoplasias é relevante para o entendimento do comportamento dessas lesões. Considerando-se que carcinomas orais podem se desenvolver a partir de lesões leucoplásicas, identificar marcadores moleculares para estas

lesões poderá contribuir para a identificação de pacientes com risco para o desenvolvimento do tumor. Os dados de expressão gênica e de miRNAs deste estudo, mostraram o envolvimento de potenciais marcadores moleculares envolvidos nas leucoplasias. Em especial, os transcritos *MADD* e *ZNF784*, e os miRNAs *hsa-miR-1228* e *hsa-miR-4313* mostraram-se fortes candidatos a estarem envolvidos no desenvolvimento dessas lesões.

6 CONCLUSÃO

6.1 CONCLUSÃO GERAL

A análise de expressão global de transcritos e de miRNAs em conjunto com a análise integrada e meta-análises permitiu a identificação de potenciais marcadores para leucoplasias. A comparação do perfil de expressão entre os pacientes que apresentavam hábitos tabagistas e etilistas mostrou grupamentos distintos.

6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- Os experimentos de expressão gênica global utilizando amostras de lesões orais não identificaram genes diferencialmente expressos segundo o subtipo de lesão oral, entretanto a comparação do perfil de expressão global das leucoplasias em relação ao tecido normal contralateral identificou 8.037 genes alterados, muitos descritos previamente em leucoplasias ou em tumores.
- A análise supervisionada de leucoplasias *versus* líquen plano não conseguiu separar estes dois grupos, mostrando que apesar das lesões serem morfológicamente diferentes, as variações em nível de transcritos não difere de modo significativo.

- Foi possível observar agrupamentos em relação ao hábito tabagista e etilista. Concordante com este perfil foi identificados genes diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de drogas. Assim como nos tumores de cabeça e pescoço, o desenvolvimento e progressão das leucoplasias parecem ter relação com os hábitos tabagistas e etilistas.
- A avaliação do perfil de miRNAs em leucoplasias identificou 13 miRNAs com expressão diminuída. As análises *in silico*, somadas à integração de dados e meta-análises foram determinantes para a escolha dos candidatos e confirmação dos resultados.
- A análise *in silico* consistiu na busca dos genes alvos preditos para serem regulados pelos miRNAs alterados. Estes genes foram comparados com aqueles obtidos na análise de expressão gênica global obtidas do presente estudo, resultando em 726 genes alvos preditos.
- Após a integração dos dados de expressão gênica e miRNAs, 131 genes apresentaram correlação inversa. Entre os transcritos (*CARD8*, *CASP10*, *ZNF784*, *MADCAM1*, *MADD*, *TERT* e *SOX4*) e os miRNAs (*hsa-miR-191*, *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-4313*) selecionados para a confirmação dos resultados por RT-qPCR, apenas *MADD* e *ZNF784* confirmaram os resultados de expressão em larga escala.
- Embora os miRNAs *hsa-miR-1228* e o *hsa-miR-4313* e os transcritos *CARD8*, *CASP10*, *MADCAM1*, *TERT* e *SOX4* não tenham apresentado resultados significativos, a maioria deles manteve o

sentido esperado da expressão quando comparados com o tecido normal contralateral.

- Apesar do número limitado de casos estudados, diversos potenciais marcadores moleculares em leucoplasias foram identificados, principalmente porque tanto na meta-análise quanto na análise integrada a maioria destes genes estava presente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, et al. Possible impact of MADCAM1 gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Hum Immunol** 2009; 70:457-60.

Angadi PV, Savitha JK, Rao SS, Sivaranjini Y. Oral field cancerization: current evidence and future perspectives. **Oral Maxillofac Surg** 2012; 16:171-80.

Arduino PG, Bagan J, El-Naggar AK, Carrozzo M. Urban legends series: oral leukoplakia. **Oral Dis** 2013; 19:642-59.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. **Lancet** 2008 May;371:1695-709.

Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden May18–21 1994. An International Collaborative Group on Oral White Lesions. **J Oral Pathol Med** 1996; 25:49–54.

Balaguer F, Moreira L, Lozano JJ, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display unique miRNA profiles. **Clin Cancer Res** 2011; 17:6239-49.

Banoczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. **J Dent Educ** 2001; 65:322-7.

Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. **Nat Rev Genet** 2004; 5:396-400.

Bell A, Bell D, Weber RS, El-Naggar AK. CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Cancer** 2011; 117:2898-909.

Bi W, Wei Y, Wu J, et al. MADD promotes the survival of human lung adenocarcinoma cells by inhibiting apoptosis. **Oncol Rep** 2013; 29:1533-9.

Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **J Transl Med** 2013; 11:280.

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** 2013 Sep 11. [Epub ahead of print]

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA** 2004; 10:1957-66.

Canova C, Richiardi L, Merletti F, et al. Alcohol, tobacco and genetic susceptibility in relation to cancers of the upper aerodigestive tract in northern Italy. **Tumori** 2010; 96:1-10.

Castro Júnior FM, Trindade JWM, Esmeraldo M, Lima SB, Leite WP, Silva U. Diagnóstico e estadiamento do câncer de boca e orofaringe. In: Parise O, Kowalski LP, Lehn C, editores. **Diagnóstico e tratamento - Câncer de cabeça e pescoço**. São Paulo: Âmbito Editores; 2008. p.93-105.

Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. **Hum Mol Genet** 2009; 18:4818-29.

Chan MH, Wolf JC. Biopsy techniques and diagnoses and treatment of mucocutaneous lesions. **Dent Clin North Am** 2012; 56:43-73.

Chen HH, Yu CH, Wang JT, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **Oral Oncol** 2007; 43:122-9.

Colamaio M, Borbone E, Russo L, et al. miR-191 down-regulation plays a role in thyroid follicular tumors through CDK6 targeting. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:E1915-24.

Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN, Grisham MB. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. **J Leukoc Biol** 1999; 65:349-55.

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr Opin Oncol** 2009; 21:194-200.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

Di Leva G, Briskin D, Croce CM. MicroRNA in cancer: New hopes for antineoplastic chemotherapy. **Ups J Med Sci** 2012; 117:202-16.

Ding D, Zhou J, Wang M, Cong YS. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. **FEBS J** 2013; 280:3205-11.

Du B, Leung H, Khan KM, et al. Tobacco smoke induces urokinase-type plasminogen activator and cell invasiveness: evidence for an epidermal growth factor receptor dependent mechanism. **Cancer Res** 2007; 67:8966-72.

Du L, Shen J, Weems A, Lu SL. Role of phosphatidylinositol-3-kinase pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **J Oncol** 2012; 2012:450179.

Dura P, van Veen EM, Salomon J, et al. Barrett associated MHC and FOXF1 variants also increase esophageal carcinoma risk. **Int J Cancer** 2013; 133:1751-5.

Emond MJ, Louie T, Emerson J, et al. Exome sequencing of extreme phenotypes identifies DCTN4 as a modifier of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **Nat Genet** 2012; 44:886-9.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Feller L, Lemmer J. Cell transformation and the evolution of a field of precancerization as it relates to oral leukoplakia. **Int J Dent** 2011; 2011:321750.

Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. **Mol Aspects Med** 2013; 34:386-95.

Gao G, Gay HA, Chernock RD, et al. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancer** 2013; 119:72-80.

García-García V, Bascones Martínez A, Martinelli-Kläy CP, et al. New perspectives on the dynamic behaviour of oral lichen planus. **Eur J Dermatol** 2012; 22:172-7.

Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. **Blood** 2008; 111:3183-9.

Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. **Semin Oncol** 2004; 31:744-54.

Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context - from basic biology to clinical utility. **J Dent Res** 2012; 91:440-6.

Grosshans H, Filipowicz W. Proteomics joins the search for microRNA targets. **Cell** 2008; 134:560-2.

Guled M, Lahti L, Lindholm PM, et al. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:615-23.

Gumus ZH, Du B, Kacker A, et al. Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. **Cancer Prev Res (Phila)** 2008; 1:100-11.

Hashibe M, Sankaranarayanan R, Thomas G, et al. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leukoplakia in an Indian population. **Int J Cancer** 2000; 88:129-34.

Hauge H, Patzke S, Delabie J, Aasheim HC. Characterization of a novel immunoglobulin-like domain containing receptor. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 323:970-8.

He Y, Cui Y, Wang W, et al. Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Neoplasia** 2011; 13:841-53.

Ho MW, Risk JM, Woolgar JA, et al. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncol** 2012; 48:969-76.

Holmes JD, Martin RA, Gutta R. Characteristics of head and neck cancer patients referred to an oral and maxillofacial surgeon in the United States for management. **J Oral Maxillofac Surg** 2010; 68:555-61.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol** 2006; 42:461-74.

Hutvágner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science** 2002; 297:2056-60.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. **Pharmacol Ther** 2007; 116:496-526.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics: a comprehensive review. **EMBO Mol Med** 2012; 4:143-59.

Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. **FASEB J** 2009; 23:806-12.

Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. **J Oral Sci** 2010; 52:13-21.

Jafarnejad SM, Wani AA, Martinka M, Li G. Prognostic significance of Sox4 expression in human cutaneous melanoma and its role in cell migration and invasion. **Am J Pathol** 2010; 177:2741-52.

Jayarama S, Li LC, Ganesh L, et al. MADD is a downstream target of PTEN in triggering apoptosis. **J Cell Biochem** 2014; 115:261-70.

Jia L, Wu J, Zhang L, et al. Restoration of miR-1228* expression suppresses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **PLoS One** 2013; 8:e58637.

Joo YH, Jung CK, Sun DI, et al. High-risk human papillomavirus and cervical lymph node metastasis in patients with oropharyngeal cancer. **Head Neck** 2011; 34:10-4.

Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. **Clin Chim Acta** 2011; 412:1357-65.

Katayama Y, Maeda M, Miyaguchi K, et al. Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling. **Oncol Lett** 2012; 4:817-823.

Khelifi R, Messaoud O, Rebai A, Hamza-Chaffai A. Polymorphisms in the Human Cytochrome P450 and Arylamine N-Acetyltransferase: Susceptibility to Head and Neck Cancers. **Biomed Res Int** 2013; 2013:582768.

Kondoh N, Ohkura S, Arai M, et al. Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2007; 43:455-62.

Kostareli E, Holzinger D, Hess J. New concepts for translational head and neck oncology: lessons from HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Front Oncol** 2012; 2:36.

Krajewska M, Kim H, Kim C, et al. Analysis of apoptosis protein expression in early-stage colorectal cancer suggests opportunities for new prognostic biomarkers. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5451-61.

Kristoffersen AK, Enersen M, Kverndokk E, et al. Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. **J Clin Virol** 2012; 53:364-6.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol** 2006; 42:987-93.

Kumar A, Cascarini L, McCaul JA, et al. How should we manage oral leukoplakia? **Br J Oral Maxillofac Surg** 2013; 51:377-83.

Kuribayashi Y, Morita K, Tomioka H, Uekusa M, Ito D, Omura K. Gene expression analysis by oligonucleotide microarray in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med** 2009; 38:356-61.

Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. **Cancer Sci** 2010; 101:2309-15.

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell** 2007; 129:1401-14.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 2001; 294:858-62.

Lee CH, Ko YC, Huang HL, et al. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. **Br J Cancer** 2003; 88:366-72.

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:9-22.

Li LC, Jayarama S, Pilli T, et al. Down-modulation of expression, or dephosphorylation, of IG20/MADD in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant thyroid cancer cells makes them susceptible to treatment with this ligand. **Thyroid** 2013; 23:70-8.

Lima JS, Pinto Ddos S Jr, Sousa SO, Corrêa L. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non-smokers. **Braz Oral Res** 2012; 26:543-9.

Lin CM, Fang CL, Hseu YC, et al. Clinical and prognostic implications of transcription factor sox4 in patients with colon cancer. **PLoS One** 2013; 27:e67128.

Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2012; 34:219-24.

Liu N, Cui RX, Sun Y, et al. A four-miRNA signature identified from genome-wide serum miRNA profiling predicts survival in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Int J Cancer** 2014; 134:1359-68.

Liu W, Shi LJ, Wu L, et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia-clinicopathological factors affecting outcome. **PLoS One** 2012; 7:e34773.

Liu Z, Ma H, Wei S, et al. Telomere length and TERT functional polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2011; 20:2642-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:622-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Minor J, Wang X, Zhang F, et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2012; 48:73-8.

mirBase: **Homo sapiens miRNAs**. Available from: <URL:http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa> [2012 15 ago].

miRTarBase: **The experimentally validated microRNA-target interactions database.** Available from:

<URL:<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>> [2013 out].

Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. Inborn errors of proline metabolism. **J Nutr** 2008; 138:2016S-2020S.

Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:1429-40.

Mohindra V, Tripathi RK, Singh RK, Lal KK. Molecular characterization and expression analysis of PPP1R3C in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) under hypoxia. **Gene** 2013; 530:127-33

Montori-Grau M, Guitart M, García-Martínez C, Orozco A, Gómez-Foix AM. Differential pattern of glycogen accumulation after protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit PPP1R6 overexpression, compared to PPP1R3C and PPP1R3A, in skeletal muscle cells. **BMC Biochem** 2011; 12:57.

Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, et al. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. **Cancer Causes Control** 2007; 18:919-29.

Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. **Cell Oncol (Dordr)** 2013; 36:1-7.

Negrini M, Calin GA. Breast cancer metastasis: a microRNA story. **Breast Cancer Res** 2008; 10:203.

Nishimoto IN, Pinheiro NA, Rogatto SR, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype as a risk factor for upper aerodigestive tract cancers. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2004; 130:78-82.

Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Okamoto Y, Seki N. MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx** 2013; 40:143-9.

Odani T, Ito D, Li MH, et al. Gene expression profiles of oral leukoplakia and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology. **Int J Oncol** 2006; 28:619-24.

Osawa Y, Osawa KK, Miyaishi A, et al. NAT2 and CYP1A2 polymorphisms and lung cancer risk in relation to smoking status. **Asian Pac J Cancer Prev** 2007; 8:103-8.

Palani J, Lakshminarayanan V, Kannan R. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in oral cancer and pre-cancer. **Indian J Dent Res** 2011; 22:362.

Pan X, Zhao J, Zhang WN, et al. Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009; 106:3788-93.

Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. **J Biol Chem** 2001; 276:32220-9.

Patnaik SK, Kannisto E, Yendamuri S. Overexpression of microRNA miR-30a or miR-191 in A549 lung cancer or BEAS-2B normal lung cell lines does not alter phenotype. **PLoS One** 2010; 5:e9219.

Poliseno L, Haimovic A, Segura MF, Hanniford D, Christos PJ, Darvishian F, Wang J, Shapiro RL, Pavlick AC, Berman RS, Hernando E, Zavadil J, Osman I. Histology-specific microRNA alterations in melanoma. **J Invest Dermatol** 2012; 132:1860-8.

Qin LJ, Lv Y, Huang QY. Meta-analysis of association of common variants in the KCNJ11-ABCC8 region with type 2 diabetes. **Genet Mol Res** 2013; 12:2990-3002.

Rad M, Hashemipour MA, Mojtahedi A, et al. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2009; 107:796-800.

Reddi SP, Shafer AT. Oral premalignant lesions: management considerations. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am** 2006; 18:425-33.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med** 2003; 14:47-62.

Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. **Int J Dent** 2010; 2010:186018.

Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. **Cancer Res** 2009; 69:4885-93.

Saintigny P, Zhang L, Fan YH, et al. Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)** 2011; 4:218-29.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer** 1953; 6:963-8.

Smeets SJ, Brakenhoff RH, Ylstra B, et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. **Cell Oncol** 2009; 31:291-300.

Shang Z, Niu Y, Cai Q, et al. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. **Tumour Biol** 2013 Oct 11. [Epub ahead of print]

Shen XG, Wang C, Li Y, et al. Down regulation of caspase-10 predicting poor survival after resection of stage II colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis** 2011; 26:1519-24.

Shen GM, Zhang FL, Liu XL, Zhang JW. Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia. **FEBS Lett** 2010; 584:4366-72.

Shimada K, Uzawa K, Kato M, et al. Aberrant expression of RAB1A in human tongue cancer. **Br J Cancer** 2005; 92:1915-21.

Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. **Br J Cancer** 2000; 82:1871-4.

Shukla S, Bharti AC, Mahata S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **Indian J Med Res** 2009; 130:222-33.

Sridhar S, Schembri F, Zeskind J, et al. Smoking-induced gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium. **BMC Genomics** 2008; 9:259.

Steuber T, Vickers AJ, Serio AM, et al. Comparison of free and total forms of serum human kallikrein 2 and prostate-specific antigen for prediction of locally advanced and recurrent prostate cancer. **Clin Chem** 2007; 53:233-40.

Sujatha D, Hebbar PB, Pai A. Prevalence and correlation of oral lesions among tobacco smokers, tobacco chewers, areca nut and alcohol users. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:1633-7.

Syrjanen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. **Oral Dis** 2011; 17 suppl 1:58-72.

Swinson B, Jerjes W, El-Maaytah M, Norris P, Hopper C. Optical techniques in diagnosis of head and neck malignancy. **Oral Oncol** 2006; 42:221–8.

Targetscan human: Prediction of microRNA targets. **TargetScan 6.2 information**. Available from: <URL:<http://www.targetscan.org/>> [2013 set 12].

Thorek DL, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles. **Thromb Haemost** 2013; 110:484-92.

Toporcov TN, Biazevic MG, Rotundo LD, et al. Consumption of animal-derived foods and mouth and oropharyngeal cancer. **Rev Panam Salud Publica** 2012; 32:185-91.

Torres A, Torres K, Pesci A, et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. **Int J Cancer** 2013; 132:1633-45.

Tribius S, Hoffmann M. Human papilloma virus infection in head and neck cancer. **Dtsch Arztebl Int.** 2013; 110:184-90.

Trotta BM, Pease CS, Rasamny JJ, et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer: key imaging findings for staging and treatment planning. **Radiographics** 2011; 31:339-54.

Turner A, Li LC, Pilli T, et al. MADD knock-down enhances doxorubicin and TRAIL induced apoptosis in breast cancer cells. **PLoS One** 2013; 8:e56817.

Vainio P, Gupta S, Ketola K, et al. Arachidonic acid pathway members PLA2G7, HPGD, EPHX2, and CYP4F8 identified as putative novel therapeutic targets in prostate cancer. **Am J Pathol** 2011; 178:525-36.

van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol** 1997; 33:291-301.

Goulart VAM, Araújo AR, Resende RR. Micro-RNAs: Uma nova esperança para o tratamento do câncer [periódico on-line]. **Nanocell News** 2013; 1(1). Disponível em <URL:<http://sbsc.org.br/nanocell/micro-rnas-uma-nova-esperanca-para-o-tratamento-do-cancer/>> [2013 dez 16]

Vervoort SJ, van Boxtel R, Coffey PJ. The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe? **Oncogene** 2013; 32:3397-409.

Vincent-Chong VK, Anwar A, Karen-Ng LP, et al. Genome wide analysis of chromosomal alterations in oral squamous cell carcinomas revealed over expression of MGAM and ADAM9. **PLoS One** 2013; 8:e54705.

Vostrov AA, Taheny MJ, Quitschke WW. A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. **J Biol Chem** 2002; 277:1619-27.

Wang XM, Li J, Yan MX, et al. Integrative analyses identify osteopontin, LAMB3 and ITGB1 as critical pro-metastatic genes for lung cancer. **PLoS One** 2013; 8:e55714.

Wang Z, Sturgis EM, Guo W, et al. Association of combined p73 and p53 genetic variants with tumor HPV16-positive oropharyngeal cancer. **PLoS One** 2012; 7:e35522.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol** 2009; 45:309-16.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:575–80.

Wei YP, Wu JX, Guo YF, et al. Expression of MADD in lung adenocarcinoma tissues and its effects on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells [abstract]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi** 2012; 28:354-7.

Xiao W, Bao ZX, Zhang CY, et al. Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. **PLoS One** 2012; 7:e38648.

Xu B, Zhou ZG, Li Y, et al. Clinicopathological significance of caspase-8 and caspase-10 expression in rectal cancer. **Oncology** 2008; 74:229-36.

Yan S, Li YZ, Zhu JW, Liu CL, Wang P, Liu YL. Role of CASP-10 gene polymorphisms in cancer susceptibility: a HuGE review and meta-analysis. **Genet Mol Res** 2012; 11:3998-4007.

Ye H, Yu T, Temam S, et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. **BMC Genomics** 2008; 9:69.

Zagaria A, Anelli L, Coccaro N, et al. A new recurrent chromosomal translocation t(3;11)(q13;q14) in myelodysplastic syndromes associated with overexpression of the ILDR1 gene. **Leuk Res** 2012; 36:852-6.

Zhang W, Modén O, Mannervik B. Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine. **Chem Biol Interact** 2010; 186:110-7.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol** 2007; 302:1-12.

Zhou D, Sunzel M, Ribadeneira MD, et al. A clinical study to assess CYP1A2 and CYP3A4 induction by AZD7325, a selective GABA(A) receptor modulator - an in vitro and in vivo comparison. **Br J Clin Pharmacol** 2012; 74:98-108.

Anexo 1 – Aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa

São Paulo, 12 de dezembro de 2012.

A
Dra. Silvia Regina Rogatto.

Aluna: Vanessa Simão de Almeida

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 980/07B
“Lesões precursoras do Câncer oral e de orofaringe”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/12/2012, tomaram conhecimento e aprovaram a seguinte documentação:

- Solicitação de dispensa de análise ética do projeto supracitado, em razão de se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Estudo piloto sobre a história natural das lesões precursoras do câncer oral e de orofaringe”, registrado neste CEP sob o nº 980/07 – o projeto afiliado trata-se do Mestrado da aluna Vanessa Simão de Almeida;
- Projeto de Mestrado da aluna Vanessa Simão de Almeida, datado de 21 de novembro de 2012;
- Orçamento Financeiro detalhado.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa