

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAS  
REGULADORES DE CÉLULAS-TRONCO EM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E  
PESCOÇO E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS  
CLINICOPATOLÓGICAS**

**BÁRBARA DE LIMA BRITO**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho  
Camillo**

**São Paulo**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Brito, Bárbara de Lima

**Avaliação da expressão de miRNAs reguladores de células-tronco em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e associação com características clinicopatológicas / Bárbara de Lima**

Brito - São Paulo, 2014.

67p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 2. NEOPLASIAS DE CABECA E PESCOÇO. 3. CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS. 4. MicroRNAs. 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King)*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos e amados filhos Ana Luiza e Danilo, meus dois fatores de estímulo e inibição, que modulam de diversas formas todas as vias da minha vida.*

*Aos pacientes envolvidos neste trabalho que lutaram ou lutam arduamente uma batalha contra o câncer todos os dias. O meu carinho e desejo de encontrar melhorias e expectativa de vida, se torna presente a cada dia e se revela neste estudo.*

## AGRADECIMENTOS

*Depois de tantas dificuldades na subida, sempre mostrando que não seria possível. Mesmo assim, sempre ouvi uma voz lá no fundo me dizendo: Não desista, continue, vai alcançar... Todas as vezes que me senti abalada, causada na subida, sempre pude contar com "anjos" que ergueram-me do chão e não deixaram o cansaço e as dificuldades me vencer... Agora, já posso ver o resultado de um sonho tão almejado. O topo da montanha, e só tenho que agradecer primeiramente a Deus por me dar saúde e uma certa inquietação em sempre procurar saber mais. Minha querida e amada família que sempre me deu forças e ânimo para sair de casa e a imensa vontade de retornar ao lar depois de uma árdua luta diária. E o que dizer dos meus amigos? Posso resumir no poema de Albert Einstein:*

*"Pode ser que um dia deixemos de nos falar... Mas, enquanto houver amizade, faremos as pazes de novo. Pode ser que um dia o tempo passe... Mas, se a amizade permanecer, Um de outro se há de lembrar. Pode ser que um dia nos afastemos... Mas, se formos amigos de verdade, a amizade nos reaproximará. Pode ser que um dia não mais existamos... Mas, se ainda sobrar amizade, Nasceremos de novo, um para o outro. Pode ser que um dia tudo acabe... Mas, com a amizade construiremos tudo novamente. Cada vez de forma diferente. Sendo único e inesquecível cada momento Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre. Há duas formas para viver a sua*

*vida: Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre."*

*Obrigada a todos que estiveram, estão e estarão comigo em minhas "aventuras" por conhecimento. Sei que nada seria possível sem a ajuda de todos. O que eu aprendi neste período, não se resume apenas em uma dissertação. Sei que sempre haverá uma outra montanha a ser escalada, sempre será difícil... O mais importante é o que nós encontramos em nossa subida, os amigos que fazemos em meio as dificuldades. É destes momentos que eu vou mais me lembrar, descobri que é muito bom alcançar o topo da montanha, mais o mais importante é saber apreciar a paisagem.*

## RESUMO

Brito BL. **Avaliação da expressão de miRNAs reguladores de células-tronco em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e associação com características clinicopatológicas.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Estudos recentes têm demonstrado que a capacidade de iniciar a tumores pode ser devido à presença de células-tronco tumorais (CSC), que exibem características tanto de células-tronco como de células tumorais. O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é o quinto tumor mais comum em todo o mundo e apresenta um comportamento histológico heterogêneo sendo composto por diferentes tipos de células, incluindo células tumorais, células do estroma, células inflamatórias. Alguns estudos têm demonstrado a presença de marcadores de células-tronco nestes tumores. MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica de maneira pós-transcricional e muitos miRNAs têm sido descritos como reguladores de células-tronco em diferentes tipos de câncer, controlando o potencial de auto-renovação e diferenciação dessas células. No presente estudo, usando 35 amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e 10 amostras de mucosa oral normal, foi analisada a expressão dos miRNAs let- 7a, miR-34, miR-125b, miR-138, miR-145, miR-183, miR-200b, miR-203 e miR-205 por RT-PCR em tempo real, a fim de determinar possíveis associações entre a expressão destes miRNAs e características clinicopatológicas destes tumores. Considerando-se o aumento ou a diminuição da expressão como uma diferença de duas vezes na expressão relativa comparada ao tecido normal, foi observada diminuição da expressão de miR-200b e miR-203 em 60,0% e 71,4% das amostras, respectivamente. O aumento da expressão de miR-138 e miR-183 foi observado em 50,0% das amostras. Expressão semelhante à do tecido normal foi observada para os miRNAs let-7a, miR-34a, miR-125b, miR-145 e miR-205 em 48,6%, 60,0%,

77,1%, 51,4% e 40,0% das amostras, respectivamente. Diminuição da expressão de let-7a foi associada com a presença de invasão perineural. O aumento da expressão de miR-138 foi associado a tumores em estágio avançado. O aumento da expressão de miR-145 foi associado com a presença de invasão vascular e aumento da expressão de miR-205 foi associado com a presença de metástase em linfonodos. Nosso estudo evidencia a expressão dos miRNAs associados à regulação de células-tronco em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e a associação desses miRNAs com características clínico-patológicas destes tumores.



## SUMMARY

Brito BL. **[Analysis of the expression of stem-cell regulating miRNAs in head and neck squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Recent studies have shown that the ability to initiate tumors may be due to the presence of cancer stem-cells (CSCs) which exhibit characteristics of both stem-cells and cancer cells. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common tumor worldwide and is histologically heterogeneous, consisting of different types of cells, including tumor cells, stromal cells, inflammatory cells and some studies have demonstrated the presence of stem-cell markers in these tumors. MicroRNAs (miRNAs) are approximately 22 nucleotide non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally and many miRNAs have been described as regulators of stem-cells in different types of cancer, controlling their self-renewal and differentiation. In this study, using 35 HNSCC and 10 normal oral mucosa tissue samples, we have analyzed the expression of let-7a, miR-34, miR-125b, miR-138, miR-145, miR-183, miR-200b, miR-203 and miR-205 by Real Time RT-PCR in order to determine possible associations between the expression of these miRNAs and clinicopathologic features of these tumors. Considering up- or down-regulation as a 2-fold difference in expression relative to the normal tissue, we observed down-regulation of miR-200b and miR-203 in 60.0% and 71.4% of the samples, respectively. Increased expression of miR-138 and miR-183 was observed in 50.0% of the samples. Normal-like expression was observed for let-7a, miR-34a, miR-125b, miR-145 and miR-205 in 48.6%, 60.0%, 77.1%, 51.4% and 40.0% of the samples, respectively. Decreased expression of let-7a was associated with the presence of perineural invasion. Increased expression of miR-138 was associated with advanced tumor stages. Increased expression of

miRNA-145 was associated with the presence of vascular invasion and increased expression of miR-205 was associated with the presence of lymph node metastasis. Our study provides evidence of the expression of miRNAs associated with stem-cell regulation in head and neck squamous cell carcinoma and the association of these miRNAs with clinicopathological features of these tumors.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Biogênese dos miRNAs.....	8
<b>Figura 2</b>	Gráficos representativos da análise da porcentagem de miRNAs presentes em amostras de RNA total provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço realizada no aparelho Bio analyzer.....	30
<b>Figura 3</b>	Resultado representativo da análise da expressão de miRNAs em amostras de cDNA provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	32
<b>Figura 4</b>	Análise da expressão de miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	34

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Descrição das características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	26
<b>Tabela 2</b>	Quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e determinação da porcentagem estimada de miRNAs.....	28
<b>Tabela 3</b>	Quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes sem evidência de neoplasia.....	29
<b>Tabela 4</b>	Perfil da expressão relativa de miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em comparação com amostras sem evidência de neoplasia.....	33
<b>Tabela 5</b>	Associação da expressão do miRNA let-7a com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	35
<b>Tabela 6</b>	Associação da expressão do miRNA-138 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	36
<b>Tabela 7</b>	Associação da expressão do miRNA-145 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	37
<b>Tabela 8</b>	Associação da expressão do miRNA-205 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	38

<b>Tabela 9</b>	Associação da expressão do miRNA-34a com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	39
<b>Tabela 10</b>	Associação da expressão do miRNA-125b com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	40
<b>Tabela 11</b>	Associação da expressão do miRNA-183 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	41
<b>Tabela 12</b>	Associação da expressão do miRNA-200b com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	42
<b>Tabela 13</b>	Associação da expressão do miRNA-203 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	43
<b>Quadro 1</b>	miRNAs relacionados à regulação de células-tronco em câncer e seus genes alvo.....	12
<b>Quadro 2</b>	Lista dos ensaios utilizados para os experimentos de RT-qPCR.....	23

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CIPE</b>	Centro Internacional de Pesquisa
<b>Ct*</b>	CycleThreshold
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos trifosfatados
<b>EMT*</b>	Epithelial-mesenchymal transition
<b>HE</b>	Hematoxilina Eosina
<b>HPV</b>	Vírus do papiloma humano
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mRNA*</b>	RNA mensageiro
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR*</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>pri-miRNA</b>	microRNA primário
<b>RISC*</b>	RNA-Induced Silencing Complex
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-qPCR*</b>	Reverse Transcription-quantitative PCR
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
<b>SNPs*</b>	Single-Nucleotide Polymorphism
<b>UTR*</b>	Untranslated Region

\* Siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço .....	1
1.2	Células-Tronco e células-tronco Tumorais .....	4
1.3	miRNAs .....	7
1.3.1	Biogênese dos miRNAs.....	7
1.3.2	miRNAs e câncer.....	9
1.3.3	miRNAs e a regulação de células-tronco.....	11
1.4	Justificativa .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo geral .....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	Local de estudo .....	18
3.2	Casuística.....	18
3.3	Extração do RNA total .....	20
3.4	Síntese do cDNA .....	21
3.5	Amplificação do cDNAe análise da expressão gênica.....	22
3.6	Análise estatística.....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	Dados clínicopatológicos.....	25
4.2	Extração do RNA total .....	27
4.3	Síntese do cDNA .....	31
4.4	Amplificação do cDNAe análise da expressão gênica.....	31
4.5	Análise Estatística .....	34

5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

### **ANEXOS**

**Anexo 1** Ficha de coleta de dados dos pacientes

**Anexo 2** Aprovação Comitê de Ética

**Anexo 3** Código Internacional de Doenças/CID-10

**Anexo 4** Sistema TNM



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

O carcinoma de cabeça e pescoço é o quinto tumor mais comum no mundo sendo 90% das neoplasias são correspondentes ao tipo histológico epidermóide. Os sítios anatômicos que podem ser acometidos pela doença incluem a cavidade oral, lábios, laringe orofaringe, hipofaringe e nasofaringe. No Brasil são estimados para o ano de 2014 aproximadamente 15290 mil casos novos, considerando apenas os tumores de cavidade oral. A maioria dos casos diagnosticados corresponde à pacientes do sexo masculino, cuja idade varia entre a quinta e sétima década de vida (Ministério da Saúde 2011).

Na literatura, os fatores de risco juntamente com estimativas para novos casos e mortes de indivíduos acometidos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço divergem de acordo com cada país devido a diferentes costumes. Em países como a Índia, há uma grande incidência de câncer oral devido ao hábito de mascar uma mistura de folha de betel e noz de areca com tabaco juntamente com fumar bidis (cigarros indianos) e mascar tabaco (SELLAPPA et al. 2009). O tabaco, independentemente da sua forma de uso (mastigação ou fumo) e o uso sinérgico com o álcool, estão bem descritos como principais fatores de risco no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (ANSARY-MOGHADDAM et al. 2009). Outros fatores

importantes relacionados são maus hábitos alimentares (PETRIDOU et al. 2002), exposição a agentes carcinogênicos ocupacionais e ambientais (KHLIFI e HAMZA-CHAFFAI 2010; LUCE et al. 2011) entre outros.

A infecção das células basais do epitélio das vias aéreas digestivas superiores pelo vírus do papiloma humano (HPV), principalmente pelos tipos de alto risco 16 e 18 está intimamente relacionada à carcinogênese, principalmente pela atividade das oncoproteínas virais E6 e E7. A proteína E6 é capaz de induzir a degradação proteossomal de p53 e a proteína E7 pode se ligar a pRB inibindo a ligação da mesma à *E2F* que, ativo, levará a transcrição de genes relacionados à progressão do ciclo celular. Além disso, a possível integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro pode levar à mutagênese insercional de genes supressores de tumor ou oncogenes, eventos associados também a carcinogênese. E por fim, a infecção viral persistente leva à inflamação crônica do tecido e à consequente produção de fatores inflamatórios com ação proliferativa, pró-angiogênica e outras, que contribuirão para a promoção e progressão da carcinogênese (WITTEKINDT et al. 2012).

A carcinogênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço sem HPV é conhecida como um processo de múltiplos passos. Geralmente observam-se as seguintes alterações de acordo com a etapa da carcinogênese: perda de controle do ciclo celular, reativação da telomerase e instabilidade genômica. Ganhos de 11q13 e perdas em 8p17p 13q e 18q são encontradas em carcinomas *in situ*. A inativação de p16, mutação em TP53 aumento do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR),

survivina e ciclina D1 é frequentemente observado em carcinoma invasivo. Já a ação do fator transformador de crescimento *beta* (TGF- $\beta$ ), do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e superexpressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9 tem sido associados com os processos de invasão e metástase (PARK et al. 2010). No entanto, é o acúmulo e não necessariamente a ordem dos eventos genéticos que determina a progressão do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (DA SILVA et al. 2011). A detecção precoce desta neoplasia é o fator primordial para obtenção de um bom resultado nos tratamentos (ADRIEN et al. 2013).

Infelizmente em muitos ambulatorios de serviços de cabeça e pescoço é observado que a maioria da população é diagnosticada tardiamente por fatores como situação social, falta de informações ou mesmo porque a doença pode ser assintomática devido à localização anatômica do tumor primário (UNDERWOOD 1995).

O surgimento de sintomas como feridas que não cicatrizam, nódulos no pescoço ou rouquidão, podem ser indícios da doença. Quando constatado, o paciente é submetido ao tratamento padrão que corresponde à cirurgia e radio/quimioterapia (DE AGUIAR et al. 2007). Apesar destes tratamentos, o prognóstico do câncer de cabeça e pescoço continua ruim; em inúmeras vezes, este tipo de tratamento causa danos anatômicos e funcionais na região acometida pela doença promovendo problemas de mastigação, fonação, deglutição e estima pessoal (DWIVEDI et al. 2012).

As variáveis clinicopatológicas são utilizadas para avaliação de prognóstico dos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. Nesta

avaliação, é observado o tamanho do tumor, presença de linfonodos, metástases, invasão perineural e vascular, grau histológico entre outros. Apesar da importância das características clinicopatológicas, torna-se evidente que parâmetros clinicopatológicos isolados não são suficientes para determinar as características biológicas do tumor. Nesse contexto, torna-se necessária a busca de biomarcadores moleculares clinicamente significativos que permitam identificar alterações do tumor e comportamento da lesão e com o potencial para o desenvolvimento de novos protocolos diagnósticos e terapêuticos (BOSE et al. 2013).

## **1.2 CÉLULAS-TRONCO E CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS**

Na literatura, são descritos dois modelos de carcinogênese. O primeiro é denominado modelo estocástico, que sugere um acúmulo de numerosas e variadas mutações individuais e sinais do microambiente que proporcionam uma vantagem seletiva a certas células tumorais. No entanto, todas as células do tumor possuem capacidade de propagação tumoral. O segundo propõe um modelo hierárquico de iniciação e progressão tumoral, sugerindo que apenas uma subpopulação específica de células cancerosas tem a capacidade de propagação tumoral e que tais células possuem características similares as células-tronco (MONROE et al. 2011). Há duas teorias para a existência destas células: elas podem surgir por mutação em células-tronco normais ou se originar de células tumorais diferenciadas que

sofrem alterações genéticas tornando-se desdiferenciadas e adquirindo características de células-tronco (COSTEA et al. 2006).

Células-tronco tumorais foram identificadas em tumores sólidos, primeiramente por AL-HAJJ et al. (2003) que observaram células de câncer de mama humano em camundongos imunodeficientes. Foram identificados sinais diferenciados em uma pequena fração das células tumorais que cresceu nestes camundongos e era capaz de formar novos tumores e disseminar a doença. Essas células expressaram o fenótipo  $CD44^+/CD24^-$ .

A glicoproteína de superfície celular CD44 é um dos marcadores mais conhecidos para identificação de células-tronco e está envolvido na adesão celular e migração, sendo um receptor do hialuronano (HA) e um importante componente da matriz extracelular. WANG et al. (2009), observaram que a expressão das isoformas de CD44 (V3, V6 e V10) em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço foi associada a estágio avançado, metástase regional e à distância, invasão perineural e menor sobrevida livre de doença.

Em um recente estudo, JOSHUA et al. (2012), evidenciaram uma subpopulação de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que expressavam o fenótipo  $CD44^+$ . Foi observado que tais células possuíam características de células-tronco e que a presença dessas células estava associada a um pior prognóstico e recorrência da doença.

Um estudo prévio do nosso grupo evidenciou a expressão de marcadores de células-tronco nas amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço selecionadas para este estudo. Na análise, foi observado

que, 5 de 35 amostras (14,3%) apresentaram marcação citoplasmática de aldeído desidrogenase (ALDH1); integrina- $\beta$ 1 (CD29) foi expressa em 32 de 33 amostras (97,0%); 24 das 35 amostras (68,6%) apresentaram expressão de CD44; CD24 foi expresso em 30 dos 35 casos (88,2%) e 2 dos 35 casos (5,7%) apresentaram a expressão de CD133. Estes resultados sugerem que, nessas amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, há evidências da presença de células com características de células-tronco (dados não publicados).

As células-tronco são de grande importância para estudos sobre iniciação e progressão tumoral, pois em cultura elas apresentam resistência aumentada a agentes quimioterápicos e radiação ionizante, representando, portanto, um importante papel na ocorrência de recidiva tumoral (PRINCE et al. 2007). Contudo, as células-tronco são difíceis de estudar, pois rapidamente se diferenciam quando cultivadas *in vitro*. Uma população celular enriquecida em células-tronco possui as seguintes características: pode ser isolada utilizando-se perfis de marcadores de superfície celular e forma colônias esféricas em culturas em suspensão.

A modulação de células-tronco pode estar relacionada aos microRNAs (miRNAs) pois estes atuam na regulação da proliferação e morte celular, promovendo a iniciação e progressão tumoral (ZHAO et al. 2011). Muitos miRNAs são descritos como importantes fatores na reprogramação de células-tronco (MIYOSHI et al. 2011).

### 1.3 miRNAs

Os miRNAs representam uma classe de pequenos RNAs não codificantes evolutivamente conservados em muitas espécies. Seus transcritos são sequências curtas de RNA de fita simples de 19 a 25 nucleotídeos, e podem induzir o silenciamento gênico e a expressão de seus genes alvos, por complementariedade de bases (TU et al. 2013). Sabe-se que mais de um terço dos genes codificadores de proteína em humanos são regulados por miRNAs (HUPPI et al. 2007).

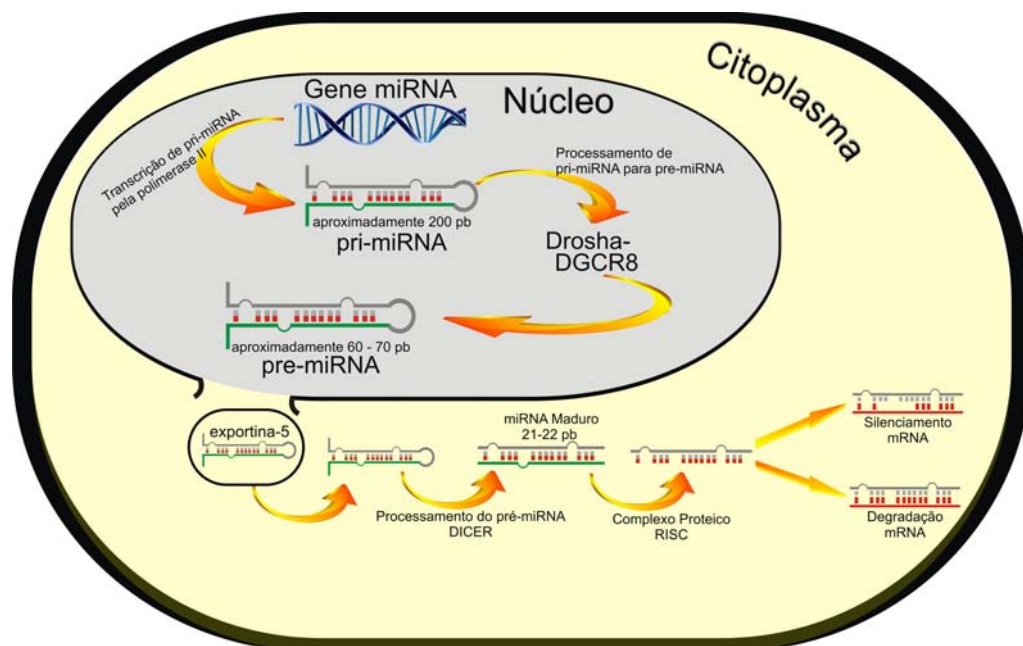
No banco de dados do miRBase (junho de 2013) são descritos 24521 miRNAs em cerca de 206 espécies. Esses miRNAs estão envolvidos na regulação de inúmeros processos biológicos incluindo o ciclo celular, apoptose e diferenciação (WU BH et al. 2011; LIU J et al. 2011).

#### 1.3.1 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são transcritos como um miRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II formando uma molécula com aproximadamente 70 a 130pb. Após ser processado pela enzima Rnase III DROSHA e seu co-fator DGCR8 é formado um pré-miRNA com 60 a 70pb, que é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina-5. No citoplasma esse pré-miRNA é processado por outra enzima chamada DICER, formando uma molécula dupla fita conhecida como um miRNA maduro com 21-22 nucleotídeos.

Estas pequenas moléculas dupla fita ligam-se ao complexo protéico *RNA-induced silencing complex* (RISC). Após esta ligação ocorre a

degradação de uma das fitas do miRNA e ligação do mesmo ao mRNA alvo na região 3' UTR. A seleção da fita ativa depende dos nucleotídeos na extremidade 5' e da assimetria termodinâmica (KAWAMATA e TOMARI 2010). Quando um miRNA e um mRNA exibem complementaridade, este mRNA será degradado pela ação catalítica de uma das subunidades de RISC: a enzima denominada Argonauta. Quando o pareamento entre a fita do miRNA e o mRNA alvo é incompleta, o mRNA tem a tradução prejudicada, levando a baixos níveis de proteína (BARTEL 2004) (Figura 1).



**Fonte:** Modificado de DESANO e XU (2009).

**Figura 1** - Biogênese dos miRNAs. Esquema demonstrando a transcrição no núcleo celular, transporte para o citoplasma e subsequente processamento e maturação dos miRNAs.



### 1.3.2 miRNAs e Câncer

Aproximadamente 50% dos miRNAs estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer (BOURGUIGNON et al. 2012). Um dos primeiros relatos de miRNAs no desenvolvimento do câncer foi descrito por CALIN et al. (2002), em um estudo sobre leucemia linfocítica crônica de células B (LLC-B), demonstrando o envolvimento dos miRNAs 15 e 16 que apresentam expressão diminuída em aproximadamente 70% das leucemias. Esses miRNAs regulam negativamente a expressão de BCL-2 (proteína anti-apoptótica), sugerindo que poderiam contribuir com a capacidade das células tumorais em evitar a apoptose. Desde então, muitos estudos têm evidenciado o papel da regulação de miRNAs no crescimento tumoral, diferenciação, adesão, progressão, apoptose, invasão e metástase (NEGRINI e CALIN 2008; MISHRA e MERLINO 2009; SOTILLO e THOMAS-TIKHONENKO 2011; CHEN et al. 2012; XU et al. 2012; ZHANG et al. 2014).

Um fato interessante é que os miRNAs tanto podem agir como oncogenes quanto genes supressores de tumor. A literatura tem apresentado os miRNAs que atuam diretamente nos processos neoplásicos divididos em duas classes: Reguladores de genes supressores de tumores (oncomiRs) e reguladores de oncogenes (antioncomiRs) (GASCHE e GOEL 2012).

Os miRNAs revelam perfis característicos da célula normal e da célula tumoral demonstrando que estes perfis podem ser utilizados para prognóstico e tratamento (CALIN et al. 2002). Alguns estudos têm avaliado a expressão e o papel de miRNAs no desenvolvimento do carcinoma

epidermóide de cabeça e pescoço relacionando suas funções à proliferação, apoptose (XU et al. 2012), metástase (LEE et al. 2010) e resistência a quimioterápicos (YU et al. 2011). De acordo com o banco de dados do câncer de cabeça e pescoço HNOCDDB (<http://gyanxet.com>) existem 109 miRNAs associados com o câncer de cabeça e pescoço, estes miRNAs são distribuídos de acordo com o sítio acometido pelo câncer, sendo a maioria (63 miRNAs) associados ao câncer oral, 18 miRNAs em câncer de língua, 11 de tireóide, 7 em laringe e 20 de nasofaringe. Desses 109 miRNAs, 48% apresentaram diminuição de expressão em cabeça e pescoço; 35% apresentaram aumento de expressão; 2% apresentaram polimorfismos e 15% apresentaram alteração no padrão de metilação (MITRA et al. 2012).

SCAPOLI et al. (2010) sugerem que os miRNAs possam representar possíveis indicadores de prognóstico e progressão tumoral, por demonstrarem expressão diferenciada em muitos tumores incluindo câncer de cabeça e pescoço. Nesse estudo foi observado o aumento da expressão de 13 miRNAs e diminuição da expressão de 6 miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide oral, sugerindo que a diferença entre os perfis de expressão de miRNAs em carcinoma epidermóide oral possa contribuir para melhora no diagnóstico e tratamento dos pacientes no futuro. Em um estudo de CERVIGNE et al. (2009) foi observado o aumento da expressão de oito miRNAs (miRNA-21, -345, -181b, -184, -520, -649, -518b e -146a) durante a progressão do carcinoma epidermóide oral. SHIIBA et al. (2010) publicaram uma revisão sobre os principais miRNAs associados à tumorigênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, mostrando alteração

consistente de miRNA-21, miRNA-31, miRNA-221 e miRNA-18 (aumento de expressão) e miRNA-133a, miRNA-133b, miRNA-138, miRNA-125a, miRNA-139, miRNA-200c, miRNA-26b, miRNA-302b, miRNA-373, miRNA-375 (diminuição da expressão).

### **1.3.3 miRNAs e a Regulação de Células-Tronco**

Diante da importância clínica das células-tronco no desenvolvimento tumoral e do papel dos miRNAs na tumorigênese, torna-se necessária a investigação da possível regulação das células-tronco pelos miRNAs (HAO et al. 2013).

Os miRNAs que serão avaliados neste trabalho demonstram associação com alguns tipos de câncer e regulação de células-tronco, conforme descrição no Quadro 1.

**Quadro 1** - miRNAs relacionados à regulação de células-tronco em câncer e seus genes alvo.

miRNAS	Genes alvo	Tumores em que foi observada alteração na expressão	Referências
hsa-let-7a	<i>HMGA2, LIN 28, RAS, NANOG e OCT4</i>	Mama, pulmão, próstata e cabeça e pescoço	Johnson et al. 2005; Yu et al. 2007; Dröge e Davey 2008; Büssing et al. 2008; Yu et al. 2011; Sung et al. 2013
hsa-miR-34a	<i>NANOG, OCT4, N-MYC, SOX2 e P53</i>	Pâncreas, colorretal e próstata	Ji et al. 2009; Scapoli et al. 2010; Choi et al. 2011
hsa-miR-125b	<i>BAK1, IGFBP3, ITCH, PUMA, PRKRA TP53, INP1, ZAC1, CYCLIN C, CDC25C, CDKN2C, EDN1, PPP1CA e SEL1L</i>	Glioblastoma, mama e câncer cervical	Le et al. 2011; Shi et al. 2012; Wang HJ et al. 2013; Wang YD et al. 2013
hsa-miR-138	<i>EZH2, P53</i>	Pulmão, pâncreas, mama e cabeça e pescoço	Liu X et al. 2011; Ye et al. 2012; Chan et al. 2012; Jin Y et al. 2013
hsa-miR-145	<i>C-MYC, OCT4, SOX2 e KLF4</i>	Mama, cólon, próstata e pulmão	Sachdeva e Mo 2010; Xu et al. 2012
hsa-miR-183	<i>INTEGRINA B1</i>	Pulmão, mama e cabeça e pescoço	Lin et al. 2012, 2013; Eke et al. 2012
hsa-miR-200b	<i>BM-1, ZEB1, ZEB2, CD133</i>	Mama e ovário	Lo et al. 2011; Sun et al. 2012; Nam 2012; Lim et al. 2013
hsa-miR-203	<i>DKK1</i>	Mama, colorretal e cabeça e pescoço	Ju et al. 2013; Taube et al. 2013
hsa-miR-205	<i>ZEB1 e ZEB2</i>	Pulmão	Tellez et al. 2011

O miRNA let-7 representa uma família de 13 membros que é altamente conservada em diversas espécies animais (PASQUINELLI et al. 2000). Atua na regulação da proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento em diferentes espécies, sendo a desregulação deste miRNA descrita em diferentes tumores. let-7 é considerado um supressor

tumoral. CHILDS et al. (2009) demonstraram que a baixa expressão de let-7 foi associada a menor sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

O miRNA-34a está localizado no cromossomo 1 e possui três homólogos: miR-34 a, b e c. CHOI et al. (2011) observaram que o miRNA-34a reprime a expressão dos fatores *NANOG*, *SOX2* e *N-MYC* que, juntamente com outros alvos de p53, atuam mediando a supressão da reprogramação de células-tronco pluripotentes induzidas (IPS). Além disso, o miRNA-34a foi considerado por SCAPOLI et al. (2010) como um importante indicador de prognóstico.

O miRNA-125b é um homólogo do lin-4 de *C. elegans*, sendo sua atuação relacionada à regulação de células-tronco hematopoiéticas (O'CONNELL et al. 2010). LE et al. (2011) identificaram mais de 20 genes na rede de p53 (considerada uma rede central dos processos de proliferação e apoptose) regulados pelo miRNA-125b. Dentre os genes envolvidos estão os genes associados ao processo de apoptose: *BAK1*, *IGFBP3*, *ITCH*, *PUMA*, *PRKRA*, *TP53INP1*, *TP53*, *ZAC1* e os genes reguladores do ciclo celular: *CYCLIN C*, *CDC25C*, *CDKN2C*, *EDN1*, *PPP1CA*, *SEL1L*. SHI et al. (2012) abordam o tema da quimioresistência: o miRNA-125b tem sua expressão aumentada em glioblastoma multiforme e nas células-tronco tumorais correspondentes. O tratamento com agente quimioterápico associado ao inibidor desse miRNA levou as células à apoptose.

O miRNA-138 possui dois homólogos sendo o miRNA-138-1 e miRNA-138-2 localizados no cromossomo 16q13 e 3p21.33,

respectivamente. Considerado como um supressor tumoral, a diminuição da expressão desse miRNA tem sido observada em vários tipos de câncer, incluindo cabeça e pescoço. O miRNA-138 participa da regulação de processos associados a migração celular, senescência, ciclo celular e transição epitélio mesênquima (EMT) (LIU X et al. 2011; JIN Y et al. 2013). Além disso, o miRNA-138 é expresso em células-tronco embrionárias, sendo responsável por manter seu estado indiferenciado. YE et al. (2012) associaram o miRNA-138 à geração de células pluripotentes induzidas (IPS) via regulação da via de p53.

O miRNA-145 está localizado no cromossomo 5 (5q32-33). Considerado como um supressor de tumor, a diminuição da sua expressão está associada aos processos de invasão celular e metástase (SACHDEVA e MO 2010). O aumento da expressão deste miRNA reprime a expressão de importantes fatores de transcrição (*SOX2*, *OCT4* e *KLF4*), regulando a pluripotência e auto-renovação das células-tronco (XU et al. 2009).

O miRNA-183 está localizado no cromossomo 7 (7q32.2) e está associado aos processos de migração celular e invasão devido a inibição da integrina- $\beta$ 1 (CD29) (LI et al. 2010). CD29 tem sido considerado um importante marcador de células-tronco tumorais: população celular CD29<sup>+</sup> era mais tumorigênica que células CD29<sup>-</sup>, em estudos com carcinoma epidermóide de boca (LIN et al. 2013). No estudo de EKE et al. (2012), foi observada que a expressão de CD29 era capaz de conferir radorresistência células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

LO et al. (2011) avaliaram a expressão do miRNA-200c em amostras de linfonodos metastáticos e tumores primários de cabeça e pescoço e observaram que o aumento de expressão desse miRNA promovia a redução da tumorigênese e metástase *in vivo* em células ALDH1<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>. Foi também evidenciado que o miRNA-200c estava envolvido na sinalização molecular da EMT e ocorrência de metástase à distância através da modulação de seus genes alvo *BMI-1*, *ZEB1* e *ZEB2* conhecidos por serem indutores de EMT.

TELLEZ et al. (2011) observaram que as células epiteliais de câncer de pulmão durante a EMT apresentavam baixa expressão do miRNA-200 e miRNA-205, que são conhecidos por atuar na regulação da expressão de E-caderina. A baixa expressão destes miRNAs conferiu supressão de E-caderina, inibindo a expressão de *ZEB1* e *ZEB2*, possibilitando que as células adquiram capacidade de invasão e metástase. O miRNA-205 também foi descrito como um importante marcador molecular para metástase em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (FLETCHER et al. 2008). SUN et al. (2012) estabeleceram uma linhagem de carcinoma de língua resistente a quimioterapia e observaram diminuição da expressão do miRNA-200b, sugerindo que o miRNA-200b possa servir como alvo terapêutico para reverter a resistência a quimioterapia no câncer de língua.

JU et al. (2013) demonstraram que a diminuição da expressão do miRNA-203, conferia maior poder de invasão, metástase e diferenciação em carcinoma colorretal. TAUBE et al. (2013) observaram que o silenciamento

do miRNA-203 era suficiente para células tumorais adquirirem propriedades de células-tronco e EMT.

#### **1.4 JUSTIFICATIVA**

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço consiste de uma população celular heterogênea com variado comportamento biológico. Parâmetros clínico-patológicos isolados não são suficientes para determinar as características biológicas do tumor. Nesse contexto, torna-se necessária a busca de marcadores moleculares que permitam estabelecimento do prognóstico dos pacientes. As células-tronco tumorais parecem ter um papel importante no processo tumoral e a avaliação de miRNAs envolvidos na regulação da auto renovação e diferenciação de tais células em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, pode futuramente ajudar a otimizar a seleção de intervenções terapêuticas mais eficazes, melhorando o prognóstico dos pacientes.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a expressão de miRNAs relacionados à regulação de células-tronco em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e associar os resultados obtidos com características clinicopatológicas desses tumores

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar quantitativamente o padrão de expressão dos miRNAs let-7a, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-138, miRNA-145, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203 e miRNA-205 por RT-qPCR em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
- Associar os padrões de expressão destes miRNAs com as características clinicopatológicas dos pacientes

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DE ESTUDO**

Os pacientes relacionados ao estudo foram submetidos à cirurgia no A.C. Camargo Cancer Center com espécimes cirúrgicos disponíveis em parafina e armazenados no setor de Anatomia Patológica. Dados demográficos e clinicopatológicos de cada paciente foram estudados nos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) da instituição, conforme Ficha de Coleta de Dados (Anexo 1). Os experimentos descritos abaixo foram desenvolvidos no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C. Camargo Cancer Center. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da instituição (CEP) sob o n°. 1664/12, no dia 08 de Maio de 2012 (Anexo 2).

#### **3.2 CASUÍSTICA**

Foram selecionadas 35 amostras de pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço primário submetidos a cirurgia entre os anos de 2000 a 2005, com material emblocado em parafina, que apresentavam quantidade disponível para as análises, procedentes dos seguintes sítios anatômicos: 11 amostras de tumores de língua, 5 amostras de tumores de gengiva, 2 amostras de tumores de assoalho bucal, 11

amostras de orofaringe e 6 amostras provenientes de outros sítios anatômicos (Lista contendo a Classificação Internacional de Doenças pode ser visualizada no Anexo 3). Foram incluídas somente amostras de pacientes que não foram submetidos a tratamento adjuvante e/ou neoadjuvante de quimioterapia e radioterapia antes da coleta das amostras. Foram incluídas 10 amostras de mucosa oral normal, provenientes de outros pacientes sem evidência de qualquer neoplasia para fins de comparação dos resultados de RT-qPCR.

Os blocos de parafina relacionados a cada paciente foram selecionados para a confecção de uma lâmina corada com Hematoxilina e Eosina (HE) com intuito de serem submetidas à análise histológica em um microscópio óptico por um patologista qualificado (Dra. Silvia Vanessa Lourenço) com a finalidade de marcação da região de interesse, levando em consideração a região com maior número de células tumorais e sem a presença de infiltrado inflamatório extenso.

Após a escolha da região mais apropriada à análise, os blocos de parafina foram separados e realizados cortes histológicos, com 3mm de espessura. Foram confeccionadas 10 lâminas para a extração do RNA total. Com o auxílio de um bisturi estéril, as lâminas referentes aos 35 pacientes, foram submetidas à raspagem da região selecionada (*scrape*). Esse material foi armazenado em tubos 1,5mL e seguiu para o processo de extração do RNA. Da mesma forma, os blocos de parafina com as amostras de mucosa oral normal foram submetidos a *scrape* sendo necessário a confecção de 20 lâminas de cada amostra normal devido a pequena quantidade de amostra.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Para a extração do RNA total, foi utilizado o *kit* de extração *RecoverAll* (Ambion®), de acordo com as recomendações do fabricante: Foi adicionado 1mL de xilol em cada tubo contendo o *scrape* das lâminas. As amostras foram então homogeneizadas vigorosamente e centrifugadas, em seguida incubadas por 3 minutos a 50°C sob agitação. Após centrifugação a 14000rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1mL de etanol 100% ao tubo contendo a amostra precipitada (*pellet*). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em centrífuga a vácuo (CENTROVAC) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a secagem do *pellet*, foi adicionado 100µL do tampão *Digestion buffer* e 4µL de protease e as amostras foram incubadas por 15 minutos a 50°C, seguido por incubação por 15 minutos a 80°C. Posteriormente, foi adicionada a solução aditivo/etanol e utilizou-se tubos de 1,5mL contendo uma coluna de sílica inserida, passando o sobrenadante do tubo primário para o secundário, centrifugando a 10000rpm por 30 segundos. Após 2 lavagens com tampão *Wash1* e *Wash2*, foi realizado um tratamento com DNase por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, realizou-se mais uma sequência de lavagem com *Wash1* e *Wash2*, submetendo as amostras à centrifugação. A coluna foi então transferida para outro tubo e foi adicionado 20µL de água livre de nuclease, deixando a temperatura ambiente por um minuto, seguido por centrifugação por mais 30 segundos a 14000 rpm.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a determinação da porcentagem de miRNAs foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA), utilizando-se o *chip small RNA* específico para miRNA. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

### 3.4 SÍNTESE DO cDNA

A reação de síntese do cDNA foi realizada utilizando o *kit* TaqMan microRNA RT (LifeTechnologies ®), de acordo com as recomendações do fabricante: A reação foi feita em volume final de 15 µl contendo 10ng de RNA total (para as amostras não neoplásicas foi utilizado um *pool* contendo 1ng de cada uma das 10 amostras), 1,5 µl de RT Buffer, 0,15µl de dNTP Mix (100mM), 3,0µl de RT Primer (*stem-loop* primer, específico para miRNAs maduros), 1,0µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,19µl de inibidor de RNase. A reação foi incubada a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos em um termociclador. Após o término da síntese, as amostras foram armazenadas no freezer -20° C.

### 3.5 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit* TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), conforme descrição a seguir:

A reação foi feita em duplicata, em um volume final de 20 µl contendo 1,33 µl de cDNA, 10 µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaq Gold), 1µl de cada ensaio (TaqMan MicroRNA Assays contendo a sonda e os oligonucleotídeos específicos para os miRNAs a serem estudados, Quadro 2).

A amplificação foi realizada no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por um período de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos.

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão de miRNAs referência RNU44 e RNU48, e também normalizado de acordo com uma amostra calibradora (pool de 10 amostras de mucosa

oral não neoplásica). O resultado final ( $n_{\text{miRNA}}$ ) é expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao calibrador, da seguinte forma:  $n_{\text{miRNA}} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$ , onde  $\Delta\text{Ct}$  da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do miRNA estudado do valor médio de Ct do miRNA usado como referência.

**Quadro 2** - Lista dos ensaios utilizados para os experimentos de RT-qPCR

<b>miRNA</b>	<b>Código fornecedor</b>	<b>Nome oficial</b>	<b>Localização</b>
<b>let-7a</b>	ID 000377	MIRLET7A1	Cromossomo 9
<b>miR-34a</b>	TM000426	MIR34A	Cromossomo 1
<b>miR-125b</b>	ID 000449	MIR125B1	Cromossomo 11
<b>miR-138</b>	ID 002284	MIR138-1	Cromossomo 3
<b>miR-145</b>	ID 002278	MIR145	Cromossomo 5
<b>miR-183</b>	ID 002269	MIR183	Cromossomo 7
<b>miR-200b</b>	ID 002251	MIR200B	Cromossomo 1
<b>miR-203</b>	ID 000507	MIR203	Cromossomo 14
<b>miR-205</b>	ID 000509	MIR205	Cromossomo 1
<b>RNU44</b>	TM001094	SNORD44	Cromossomo 1
<b>RNU48</b>	TM001006	SNORD48	Cromossomo 6

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para comparação da expressão dos miRNAs com características clinicopatológicas, a expressão relativa foi categorizada ( $\leq 0.5$ ,  $0.5-2$ , e  $\geq 2$ ) e foi utilizado o teste Qui-Quadrado. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R versão 2.3.1 (R Development Core Team 2010).



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 DADOS CLÍNICOPATOLÓGICOS**

Os dados clínicopatológicos de cada paciente foram obtidos através da análise dos prontuários arquivados no SAME, seguindo os critérios pré-estabelecidos contidos na Ficha de coleta de dados dos pacientes (Anexo 1). A maioria dos pacientes apresentou idade inferior a 60 anos (57,1%). O gênero mais acometido foi o masculino (80,0%). Os tumores em estadiamento T3/T4 corresponderam a 54,3% (Lista com a classificação TNM em cabeça e pescoço pode ser visualizada no Anexo 4). Foi observado que 94,3% dos pacientes não apresentaram metástase em linfonodos. Invasão perineural foi observada em 54,3% dos pacientes e 77,1% não apresentaram invasão vascular. O grau histológico bem diferenciado foi o mais observado (54,3%) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Descrição das características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

<b>Características</b>	<b>Categorias</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Idade</b>	<=60	20 (57,1)
	>60	15 (42,9)
<b>Gênero</b>	Feminino	7 (20,0)
	Masculino	28 (80,0)
<b>Estádio clínico</b>	T1/T2	11 (31,4)
	T3/T4	19 (54,3)
	N/D*	5 (14,3)
<b>Estádio patológico</b>	I/II	11 (31,4)
	III/IV	21 (60,0)
	N/D	3 (8,6)
<b>Local do tumor</b>	Língua	11 (31,4)
	Assoalho da boca	2 (5,7)
	Orofaringe	11 (31,4)
	Gengiva	5 (14,3)
	Outros	6 (17,1)
<b>Metástase em linfonodo</b>	Sim	18 (51,4)
	Não	11 (31,4)
	N/D	6 (17,1)
<b>Metástase</b>	Sim	6 (17,1)
	Não	29 (82,9)
<b>Invasão perineural</b>	Sim	19 (54,3)
	Não	14 (40,0)
	N/D*	2 (5,7)
<b>Invasão vascular</b>	Sim	8 (22,9)
	Não	27 (77,1)
<b>Margens</b>	Livres	32 (91,4)
	Comprometidas	2 (5,7)
	N/D	1 (2,9)
<b>Grau histológico</b>	Bem diferenciado	19 (54,3)
	Moderadamente diferenciado	13 (37,1)
	Pouco diferenciado	1 (2,9)
	N/D*	2 (5,7)

\*, N/D informação não disponível

## 4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

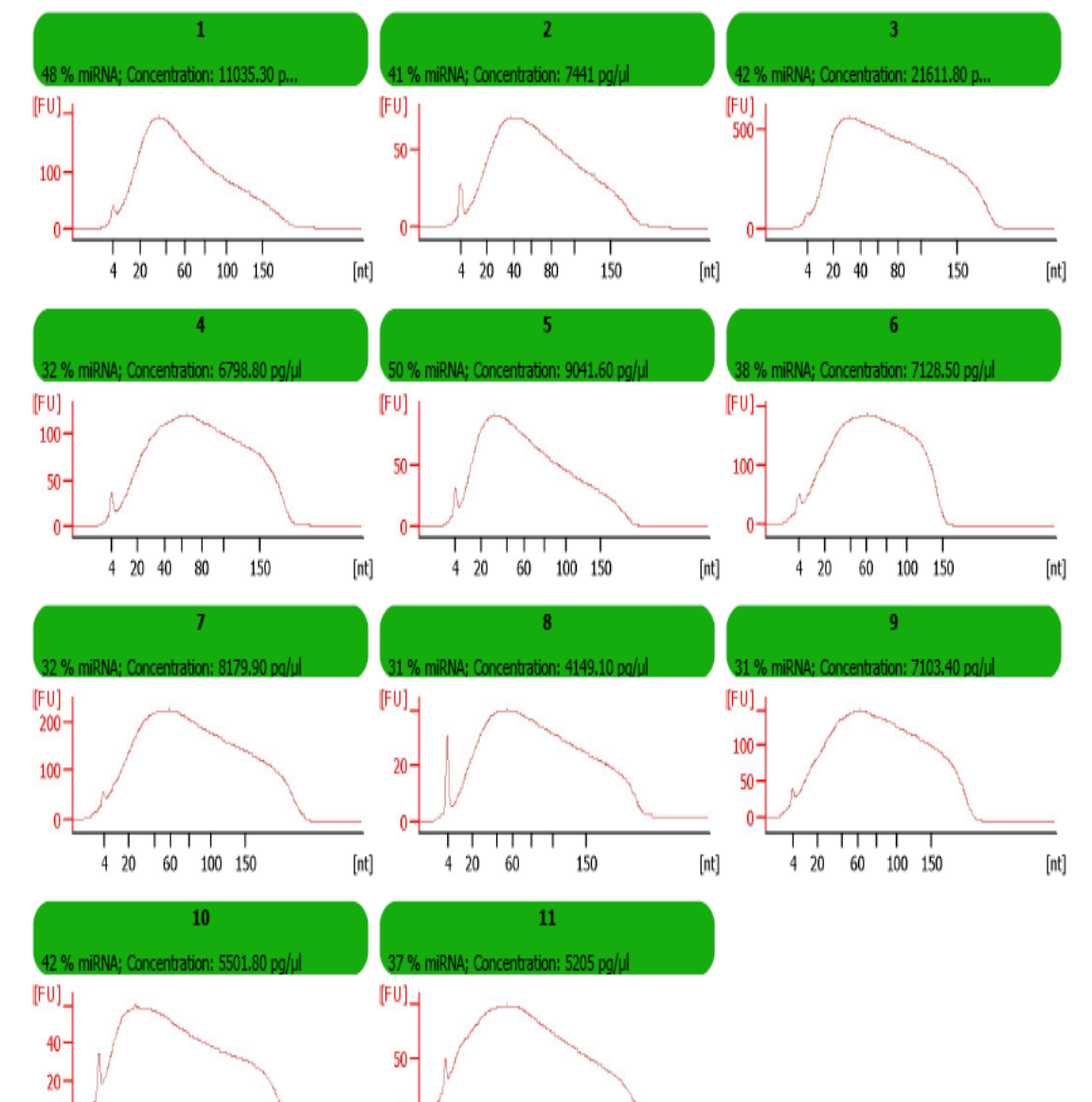
O RNA extraído das amostras normais e tumorais foi submetido a quantificação no equipamento Nanodrop e posteriormente análise no equipamento Bioanalyzer utilizando-se o chip *smallRNAs* que fornece a porcentagem de miRNAs presentes no RNA total. A análise pelo equipamento Nanodrop demonstrou que a concentração de RNA total nas amostras tumorais variou de 22,85 ng/μl a 311,62 ng/μl (Tabela 2). As amostras normais apresentaram valores com o mínimo de 25,94ng/μl e máximo de 188,85 ng/μl (Tabela 3). A porcentagem de miRNAs variou de 27 a 50% nas amostras tumorais (Tabela 2). Na Figura 2 podemos observar imagens representativas desta análise.

**Tabela 2** - Quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e determinação da porcentagem estimada de miRNAs

Pacientes	Concentração ng/μl	Absorbância 260/280	Absorbância 260/230	% miRNAs
1	77,92	1,94	0,97	36,0%
2	114,86	1,97	1,81	28,0%
3	37,66	1,89	0,38	48,0%
4	311,62	2,00	2,03	41,0%
5	80,03	1,93	1,28	42,0%
6	119,64	1,90	1,15	32,0%
7	48,96	1,96	0,21	50,0%
8	141,70	1,93	1,09	38,0%
9	197,52	1,93	1,82	32,0%
10	22,85	1,84	1,03	31,0%
11	133,82	1,93	1,00	31,0%
12	123,88	1,83	1,34	42,0%
13	61,11	1,80	0,64	37,0%
14	258,34	1,94	1,69	49,0%
15	94,78	1,93	1,31	44,0%
16	121,74	1,89	1,55	42,0%
17	37,10	1,78	0,60	38,0%
18	174,91	2,06	0,84	27,0%
19	43,64	2,05	0,39	35,0%
20	66,81	1,97	0,25	35,0%
21	60,58	1,92	0,81	38,0%
22	81,77	1,98	0,99	43,0%
23	166,01	1,92	1,41	37,0%
24	228,40	1,98	1,90	47,0%
25	74,94	1,97	1,03	49,0%
26	43,91	1,89	1,39	49,0%
27	247,27	1,97	1,80	42,0%
28	99,75	1,97	1,29	36,0%
29	103,59	1,92	0,96	41,0%
30	103,94	1,96	1,59	39,0%
31	89,46	1,96	1,73	44,0%
32	100,08	1,89	1,46	39,0%
33	136,56	1,96	1,76	38,0%
34	148,91	2,00	1,69	28,0%
35	207,80	1,96	1,80	37,0%

**Tabela 3** - Quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes sem evidência de neoplasia

<b>Pacientes</b>	<b>Concentração ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>Absorbância 260/280</b>	<b>Absorbância 260/230</b>
Normal 2	84,39	1,70	0,32
Normal 3	29,89	1,92	0,55
Normal 4	25,94	1,88	0,09
Normal 5	30,72	2,19	0,08
Normal 6	32,83	2,42	0,10
Normal 7	32,50	2,00	0,10
Normal 8	39,68	2,12	0,09
Normal 9	57,10	2,08	0,14
Normal 10	188,85	1,64	0,59
Normal 11	102,80	1,75	0,44



**Figura 2** - Gráficos representativos da análise da porcentagem de miRNAs presentes em amostras de RNA total provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço realizada no aparelho Bioanalyzer.

### 4.3 SÍNTESE DO cDNA

Foi realizada a síntese dos cDNAs referentes aos miRNAs let-7a, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-138, miRNA-145, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203, miRNA-205, RNU44 e RNU48 para as 35 amostras tumorais e para o *pool* de amostras normais.

### 4.4 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs

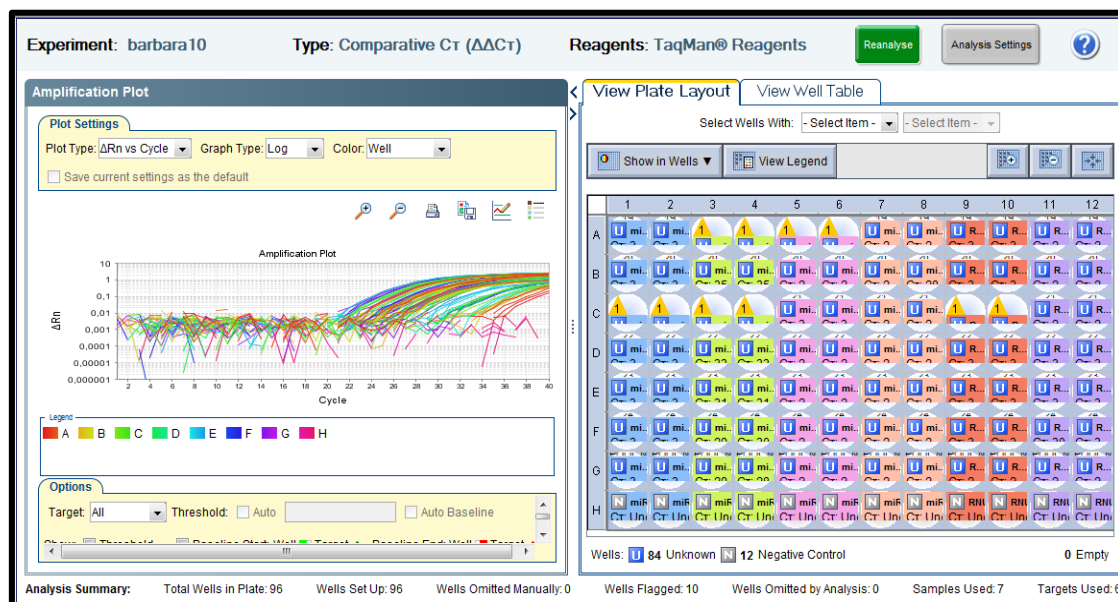
Os ensaios de RT-qPCR permitiram a quantificação da expressão dos miRNAs nos 35 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e no *pool* de amostras normais. A expressão relativa dos miRNAs foi normalizada considerando-se a média geométrica da expressão dos miRNAs RNU44 e RNU48. Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos miRNAs nas amostras tumorais em comparação com as amostras normais foi utilizado o seguinte valor:

Diminuição de expressão: Expressão  $\leq 0,5$

Aumento de expressão: Expressão  $\geq 2,0$

As amostras com expressão relativa com valores entre 0,5 e 2,0 não foram consideradas com expressão alterada em relação ao tecido normal.

Na Figura 3 pode-se observar resultado representativo da análise da expressão dos miRNAs.



**Figura 3** - Resultado representativo da análise da expressão de miRNAs em amostras de cDNA provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

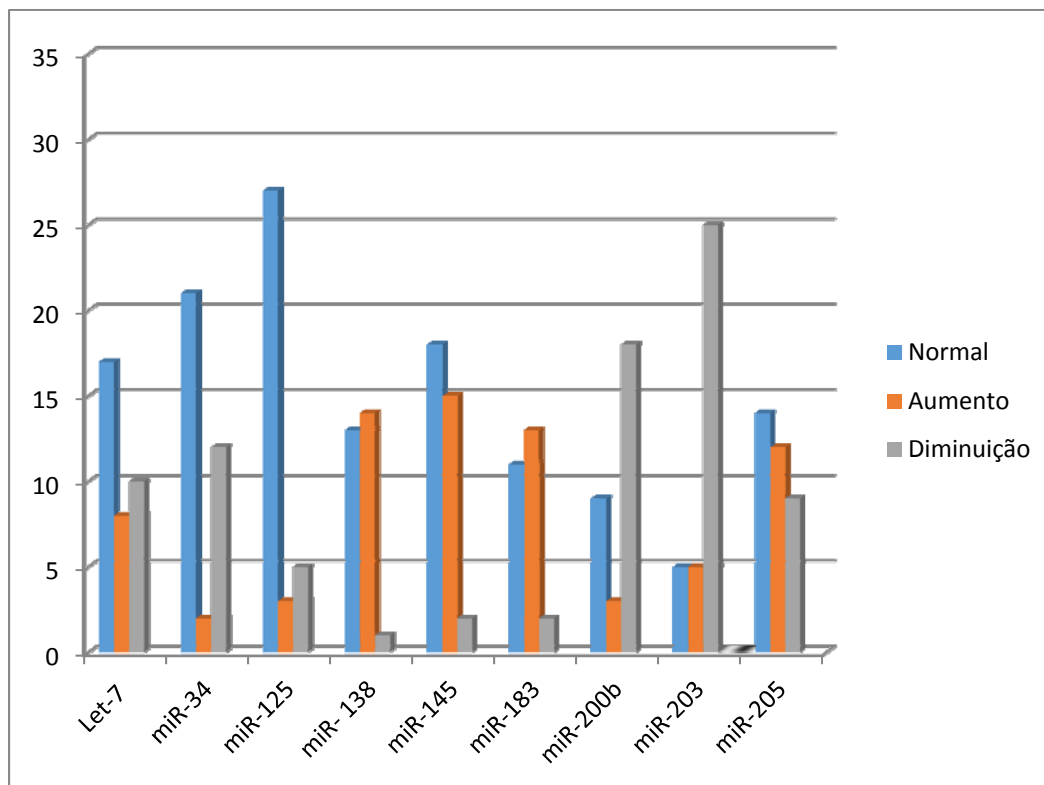
Foi observado que miRNA let-7a apresentou aumento de expressão em 8 amostras (22,8%) e diminuição em 10 das 35 amostras analisadas (28,6%). Com relação ao miRNA-34a, foi observado aumento de expressão em apenas 2 amostras (5,7%) e 12 amostras (34,3%) apresentaram diminuição de expressão. Quanto à expressão do miRNA-125b, 3 amostras (8,6%) apresentaram aumento de expressão e 5 amostras (14,3%) demonstraram diminuição de expressão. Para o miRNA-138 foi observado que 14 amostras (50,0%) apresentaram aumento da expressão e apenas uma diminuição de expressão (3,6%). Em relação ao miRNA-145, 15 amostras apresentaram aumento da expressão (42,9%) e somente 2



apresentaram diminuição de expressão (5,7%). Para o miRNA-183 foi observado aumento de expressão em 13 amostras (50,0%) e diminuição em 2 amostras (7,7%). A diminuição da expressão do miRNA-200b foi observada em 18 (60,0%) de 30 amostras e somente 3 (10,0%) apresentaram aumento na expressão. A expressão do miRNA-203 foi diminuída em 25 amostras (71,4%) e aumentada em 5 amostras (14,3%). Foi observada diminuição da expressão do miRNA-205 em 9 amostras (25,7%) e aumento de expressão em 12 amostras (34,3%). Esses resultados podem ser observados na Tabela 4 e Figura 4.

**Tabela 4** - Perfil da expressão relativa de miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em comparação com amostras sem evidência de neoplasia.

miRNAs	Número de pacientes	Diminuição da expressão (%)	Expressão Normal (%)	Aumento da expressão (%)
Let-7a	35	10 (28,6)	17 (48,6)	08 (22,8)
miR-34a	35	12 (34,3)	21 (60,0)	02 (5,7)
miR-125b	35	05 (14,3)	27 (77,1)	03 (8,6)
miR-138	28	01 (3,6)	13 (46,4)	14 (50,0)
miR-145	35	02 (5,7)	18 (51,4)	15 (42,9)
miR-183	26	02 (7,7)	11 (42,3)	13 (50,0)
miR-200b	30	18 (60,0)	09 (30,0)	03 (10,0)
miR-203	35	25 (71,4)	05 (14,3)	05 (14,3)
miR-205	35	09 (25,7)	14 (40,0)	12 (34,3)



**Figura 4** - Análise da expressão de miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. As barras representam o número de casos com aumento de expressão, com diminuição de expressão e com expressão equivalente à do tecido normal.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise de associação entre a expressão dos miRNAs e características clinicopatológicas do tumor foi observado que a diminuição da expressão do miRNA- let-7a está associada à presença de invasão perineural ( $p=0,042$ ) (Tabela 5). Aumento da expressão do miRNA-138 está associado a tumores em estágio patológico avançado ( $p=0,018$ ) (Tabela 6). Aumento da expressão do miRNA-145 está associado à presença de invasão vascular ( $p=0,012$ ) (Tabela 7) e aumento da expressão do miRNA-

205 está associado à presença de metástase em linfonodo ( $p=0,029$ ) (Tabela 8).

Para os demais miRNAs (miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203) não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa com as características clínico-patológicas (Tabelas 9-13).

**Tabela 5** - Associação da expressão do miRNA let-7a com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	$\leq 0.5$	0.5-2	$\geq 2$	total	p
Estádio clínico	T1/T2	4 (36)	4 (36)	3 (27)	11	0,836
	T3/T4	6 (32)	9 (47)	4 (21)	19	
Estádio patológico	I/II	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4	0,957
	III/IV	9 (32)	13 (46)	6 (21)	28	
Local do tumor	gengiva	0 (0)	3 (60)	2 (40)	5	0,063
	orofaringe	1 (9)	5 (45)	5 (45)	11	
	outros	3 (50)	2 (33)	1 (17)	6	
	assoalho/língua	6 (46)	7 (54)	0 (0)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	7 (37)	8 (42)	4 (21)	19	0,628
	pouco/moderadamente diferenciado	3 (21)	7 (50)	4 (29)	14	
	diferenciado	3 (21)	7 (50)	4 (29)	14	
Invasão Vascular	não	7 (28)	13 (52)	5 (20)	25	0,592
	sim	2 (25)	3 (38)	3 (38)	8	
Invasão Perineural	não	1 (7)	10 (71)	3 (21)	14	<b>0,042</b>
	sim	8 (42)	6 (32)	5 (26)	19	
Linfonodo Comprometido	não	2 (18)	6 (55)	3 (27)	11	0,624
	sim	6 (33)	7 (39)	5 (28)	18	

**Tabela 6** - Associação da expressão do miRNA-138 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	1 (12)	3 (38)	4 (50)	8	0,330
	T3/T4	0 (0)	7 (41)	10 (59)	17	
Estádio patológico	I/II	1 (33)	1 (33)	1 (33)	3	<b>0,018</b>
	III/IV	0 (0)	10 (43)	13 (57)	23	
Local do tumor	gingiva	0 (0)	1 (33)	2 (67)	3	0,334
	orofaringe	0 (0)	5 (45)	6 (55)	11	
	outros	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4	
	assoalho/língua	0 (0)	5 (50)	5 (50)	10	
Grau Histológico	bem diferenciado	1 (7)	8 (53)	6 (40)	15	0,483
	pouco/moderadamente diferenciado	0 (0)	5 (42)	7 (58)	12	
Invasão Vascular	não	1 (5)	7 (35)	12 (60)	20	0,152
	sim	0 (0)	6 (75)	2 (25)	8	
Invasão Perineural	não	0 (0)	3 (33)	6 (67)	9	0,427
	sim	1 (5)	10 (53)	8 (42)	19	
Linfonodo	não	0 (0)	4 (50)	4 (50)	8	0,786
Comprometido	sim	1 (6)	8 (44)	9 (50)	18	

**Tabela 7** - Associação da expressão do miRNA-145 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estadio clínico	T1/T2	1 (9)	5 (45)	5 (45)	11	0,886
	T3/T4	1 (5)	10 (53)	8 (42)	19	
Estádio patológico	I/II	0 (0)	2 (50)	2 (50)	4	0,822
	III/IV	2 (7)	15 (54)	11 (39)	28	
Local do tumor	gengiva	1 (20)	3 (60)	1 (20)	5	0,249
	orofaringe	0 (0)	6 (55)	5 (45)	11	
	outros	1 (17)	4 (67)	1 (17)	6	
	assoalho/língua	0 (0)	5 (38)	8 (62)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	1 (5)	8 (42)	10 (53)	19	0,384
	pouco/moderadamente diferenciado	1 (7)	9 (64)	4 (29)	14	
Invasão Vascular	não	2 (8)	16 (64)	7 (28)	25	<b>0,012</b>
	sim	0 (0)	1 (12)	7 (88)	8	
Invasão Perineural	não	1 (7)	8 (57)	5 (36)	14	0,797
	sim	1 (5)	9 (47)	9 (47)	19	
Linfonodo	não	0 (0)	6 (55)	5 (45)	11	0,726
Comprometido	sim	1 (6)	9 (50)	8 (44)	18	

**Tabela 8** - Associação da expressão do miRNA-205 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	4 (36)	5 (45)	2 (18)	11	0,407
	T3/T4	5 (26)	6 (32)	8 (42)	19	
Estádio patológico	I/II	3 (75)	1 (25)	0 (0)	4	0,070
	III/IV	6 (21)	11 (39)	11 (39)	28	
Local do tumor	gingiva	0 (0)	1 (20)	4 (80)	5	0,121
	orofaringe	2 (18)	4 (36)	5 (45)	11	
	outros	2 (33)	4 (67)	0 (0)	6	
	assoalho/língua	5 (38)	5 (38)	3 (23)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	6 (32)	9 (47)	4 (21)	19	0,194
	pouco/moderadamente diferenciado	2 (14)	5 (36)	7 (50)	14	
Invasão Vascular	não	5 (20)	12 (48)	8 (32)	25	0,198
	sim	3 (38)	1 (12)	4 (50)	8	
Invasão Perineural	não	1 (7)	6 (43)	7 (50)	14	0,119
	sim	7 (37)	7 (37)	5 (26)	19	
Linfonodo	não	1 (9)	7 (64)	3 (27)	11	<b>0,029</b>
Comprometido	sim	7 (39)	3 (17)	8 (44)	18	

**Tabela 9** - Associação da expressão do miRNA-34a com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	5 (45)	5 (45)	1 (9)	11	0,465
	T3/T4	5 (26)	13 (68)	1 (5)	19	
Estádio patológico	I/II	2 (50)	1 (25)	1 (25)	4	0,149
	III/IV	9 (32)	18 (64)	1 (4)	28	
Local do tumor	gengiva	0 (0)	5 (100)	0 (0)	5	0,078
	orofaringe	2 (18)	8 (73)	1 (9)	11	
	outros	5 (83)	1 (17)	0 (0)	6	
	assoalho/língua	5 (38)	7 (54)	1 (8)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	9 (47)	9 (47)	1 (5)	19	0,073
	pouco/moderadamente diferenciado	2 (14)	12 (86)	0 (0)	14	
	diferenciado	2 (14)	12 (86)	0 (0)	14	
Invasão Vascular	não	7 (28)	17 (68)	1 (4)	25	0,546
	sim	3 (38)	4 (50)	1 (12)	8	
Invasão Perineural	não	3 (21)	10 (71)	1 (7)	14	0,634
	sim	7 (37)	11 (58)	1 (5)	19	
Linfonodo	não	1 (9)	9 (82)	1 (9)	11	0,219
Comprometido	sim	7 (39)	10 (56)	1 (6)	18	

**Tabela 10** - Associação da expressão do miRNA-125b com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	2 (18)	7 (64)	2 (18)	11	0,494
	T3/T4	3 (16)	15 (79)	1 (5)	19	
Estádio patológico	I/II	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4	0,401
	III/IV	4 (14)	22 (79)	2 (7)	28	
Local do tumor	gengiva	1 (20)	4 (80)	0 (0)	5	0,127
	orofaringe	0 (0)	10 (91)	1 (9)	11	
	outros	3 (50)	3 (50)	0 (0)	6	
	assoalho/língua	1 (8)	10 (77)	2 (15)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	2 (11)	14 (74)	3 (16)	19	0,293
	pouco/moderadamente diferenciado	2 (14)	12 (86)	0 (0)	14	
Invasão Vascular	não	4 (16)	19 (76)	2 (8)	25	0,468
	sim	0 (0)	7 (88)	1 (12)	8	
Invasão Perineural	não	1 (7)	12 (86)	1 (7)	14	0,688
	sim	3 (16)	14 (74)	2 (11)	19	
Linfonodo Comprometido	não	0 (0)	9 (82)	2 (18)	11	0,235
	sim	3 (17)	14 (78)	1 (6)	18	



**Tabela 11** - Associação da expressão do miRNA-183 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	1 (12)	4 (50)	3 (38)	8	0,313
	T3/T4	0 (0)	5 (38)	8 (62)	13	
Estádio patológico	I/II	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4	0,065
	III/IV	0 (0)	8 (42)	11 (58)	19	
Local do tumor	gengiva	0 (0)	2 (40)	3 (60)	5	0,427
	orofaringe	0 (0)	3 (38)	5 (62)	8	
	outros	1 (33)	2 (67)	0 (0)	3	
	assoalho/língua	1 (10)	4 (40)	5 (50)	10	
Grau Histológico	bem diferenciado	2 (14)	5 (36)	7 (50)	14	0,419
	pouco/moderadamente diferenciado	0 (0)	5 (45)	6 (55)	11	
Invasão Vascular	não	2 (10)	10 (50)	8 (40)	20	0,056
	sim	0 (0)	0 (0)	5 (100)	5	
Invasão Perineural	não	1 (8)	5 (42)	6 (50)	12	0,982
	sim	1 (8)	5 (38)	7 (54)	13	
Linfonodo	não	0 (0)	4 (40)	6 (60)	10	0,626
Comprometido	sim	1 (8)	5 (42)	6 (50)	12	

**Tabela 12** - Associação da expressão do miRNA-200b com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	4 (44)	4 (44)	1 (11)	9	0,492
	T3/T4	11 (69)	4 (25)	1 (6)	16	
Estádio patológico	I/II	2 (67)	1 (33)	0 (0)	3	0,869
	III/IV	14 (58)	8 (33)	2 (8)	24	
Local do tumor	gengiva	1 (25)	3 (75)	0 (0)	4	0,465
	orofaringe	7 (70)	2 (20)	1 (10)	10	
	outros	2 (50)	1 (25)	1 (25)	4	
	assoalho/língua	8 (67)	3 (25)	1 (8)	12	
Grau Histológico	bem diferenciado	11 (69)	4 (25)	1 (6)	16	0,533
	pouco/moderadamente diferenciado	6 (50)	4 (33)	2 (17)	12	
Invasão Vascular	não	12 (55)	8 (36)	2 (9)	22	0,215
	sim	5 (83)	0 (0)	1 (17)	6	
Invasão Perineural	não	6 (46)	5 (38)	2 (15)	13	0,338
	sim	11 (73)	3 (20)	1 (7)	15	
Linfonodo	não	5 (50)	4 (40)	1 (10)	10	0,556
Comprometido	sim	10 (71)	3 (21)	1 (7)	14	

**Tabela 13** - Associação da expressão do miRNA-203 com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Característica	categoria	<=0.5	0.5-2	>=2	total	p
Estádio clínico	T1/T2	8 (73)	2 (18)	1 (9)	11	0,970
	T3/T4	13 (68)	4 (21)	2 (11)	19	
Estádio patológico	I/II	3 (75)	1 (25)	0 (0)	4	0,707
	III/IV	19 (68)	5 (18)	4 (14)	28	
Local do tumor	gengiva	2 (40)	1 (20)	2 (40)	5	0,369
	orofaringe	7 (64)	2 (18)	2 (18)	11	
	outros	6 (100)	0 (0)	0 (0)	6	
	assoalho/língua	9 (69)	3 (23)	1 (8)	13	
Grau Histológico	bem diferenciado	11 (58)	4 (21)	4 (21)	19	0,417
	pouco/moderadamente diferenciado	11 (79)	2 (14)	1 (7)	14	
	diferenciado	11 (79)	2 (14)	1 (7)	14	
Invasão Vascular	não	17 (68)	5 (20)	3 (12)	25	0,641
	sim	5 (62)	1 (12)	2 (25)	8	
Invasão Perineural	não	8 (57)	3 (21)	3 (21)	14	0,576
	sim	14 (74)	3 (16)	2 (11)	19	
Linfonodo	não	6 (55)	3 (27)	2 (18)	11	0,624
Comprometido	sim	13 (72)	3 (17)	2 (11)	18	

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão dos miRNAs let-7a, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-138, miRNA-145, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203, miRNA-205, descritos como reguladores de células-tronco, em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Para as análises de expressão dos miRNAs, o RNA total foi extraído de amostras emblocadas em parafina. Esse tipo de amostra tem sido amplamente utilizado em análises moleculares devido a sua disponibilidade em várias instituições. Mesmo com o risco de afetar a qualidade do RNA, devido à demora na coleta do material após ressecção cirúrgica, problemas na fixação, que pode ocasionar degradação do RNA total, entre outros fatores, é importante ressaltar que a análise retrospectiva, utilizando tecidos de arquivo pode ser de qualidade se todas as etapas de processamento durante a extração do RNA forem feitas corretamente e com reagentes de qualidade (DEBEN et al. 2013).

Para o miRNA let-7a, a maioria das amostras tumorais apresentou expressão equivalente à observada nas amostras normais. Com relação à associação com características clinicopatológicas, foi observado que a diminuição da expressão do miRNA let-7a estava associada à presença de invasão perineural. A invasão perineural é uma característica patológica importante, com implicações na sobrevida e taxas de recorrência loco-regional. Estudos sugerem que a incidência de invasão perineural em

tumores de cabeça e pescoço pode chegar a 80% (LIEBIG et al. 2009). YU et al. (2011) observaram que células com características fenotípicas de células-tronco em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (ALDH1<sup>+</sup>) apresentavam diminuição da expressão do miRNA let-7a, e a expressão dos fatores de transcrição associados à regulação de células-tronco - Nanog, Oct-4, KLF4 e Bmi1 - estava elevada. Foi demonstrado com ensaios *in vivo* que a formação de tumores e a capacidade metastática foram inibidos e a taxa de sobrevivência foi maior em camundongos transplantados com células reexpressando miRNA let-7a, sugerindo que a ativação do miRNA let-7a em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ALDH1<sup>+</sup> represente um papel importante na modulação da tumorigênese e possa ser considerada como um potencial candidato a terapia anti-tumoral.

Considerando-se o miRNA-34a, a maioria das amostras tumorais apresentou expressão equivalente à observada nas amostras normais. Contudo, cerca de 35% das amostras apresentaram diminuição da expressão. KUMAR et al. (2012) observaram diminuição de expressão do miRNA-34a em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e linhagens celulares, sendo esta diminuição associada à proliferação celular, migração celular e angiogênese. SCAPOLI et al. (2010) também demonstraram diminuição da expressão do miRNA-34a em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sugerindo que a modulação desse miRNA possa representar um potencial alvo terapêutico. LIU J et al. (2011) demonstraram que a molécula CD44 é alvo direto de miRNA-34a e a re-expressão desse miRNA em células CD44<sup>+</sup> levava à alteração nas

propriedades migratórias, invasivas e metastáticas em células prostáticas, devido a inibição de CD44. JI et al. (2009) analisaram os efeitos de recuperação funcional de miRNA-34a em câncer de pâncreas: células com fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, formavam oncosferas, apresentando aumento de BCL-2 e Notch e perda de expressão de miRNA-34a. Quando foi restabelecida a função do miRNA-34a, houve uma redução no crescimento de oncosferas, evidenciando que o miRNA-34a restaurado, inibe o potencial das células-tronco. Também foi observado que o miRNA-34a pode atuar restaurando a função supressora de tumores da proteína p53.

Não houve alteração da expressão do miRNA-125b nas amostras analisadas: cerca de 80% das amostras tumorais apresentou expressão similar à observada no tecido normal. O papel do miRNA-125b ainda é controverso na literatura, sendo capaz de regular tanto a apoptose quanto a proliferação. Como p53 é um regulador central tanto da apoptose e proliferação, o duplo papel de miRNA-125b levanta a questão de que genes nessa via possam ser regulados por esse miRNA: LE et al. (2011) identificaram 20 genes na via de p53 regulados pelo miRNA-125b, sugerindo que a modulação desse miRNA possa desempenhar papel importante na tumorigênese.

LIU et al. (2013) mostraram que o aumento de expressão do miRNA-125b aumenta a população de células com características de células-tronco em tumores de mama (CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>). O aumento de expressão de *SNAIL* aumenta a expressão de miRNA-125b, que inibe *BAK1* conferindo quimioressistência às células tumorais. WANG YD et al. (2013) propuseram

um modelo no qual a expressão de OCT4 ativa o miRNA-125b promovendo a progressão tumoral na carcinogênese do colo do útero através da inibição de *BAK1*. No carcinoma hepatocelular ZHAO et al. (2012) observaram que o miRNA-125b suprime a proliferação de células e promove a apoptose através da inibição da expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2.

O miRNA-138 apresentou predominantemente aumento de expressão nas amostras analisadas e esse aumento está associado à tumores em estadiamento avançado. Inversamente a este achado, estudos têm demonstrado diminuição da expressão desse miRNA em tumores de cabeça e pescoço (JIN Y et al. 2013), sugerindo que o miRNA-138 atue como um supressor tumoral regulando processos como a migração celular, EMT, progressão do ciclo celular, resposta a danos e reparo do DNA e senescência. Em gliomas, o miRNA-138 foi descrito como um oncomiR devido à sua associação com crescimento, sobrevivência e potencial de auto-renovação. A inibição desse miRNA impediu a formação de oncosferas *in vitro* e a tumorigênese *in vivo* (CHAN et al. 2012).

O miRNA-145 é considerado um supressor em diferentes tumores sendo associado à modulação do crescimento tumoral, invasão celular, metástase e regulação de células-tronco (SACHDEVA e MO 2010). Em nosso estudo, a maioria das amostras apresentou expressão equivalente à observada no tecido normal. Contudo, pode ser observada uma tendência ao aumento da expressão desse miRNA, sendo esse aumento associado à presença de invasão vascular. A expressão do miRNA-145 é induzida durante o processo de diferenciação, levando ao silenciamento da auto-

renovação de células-tronco e da pluripotência (SACHDEVA e MO 2010). Em gliomas, SPERANZA et al. (2012) demonstraram que o aumento de expressão do miRNA-145 correlacionou-se com a diminuição de expressão do marcador de células-tronco SOX2, juntamente com inibição da migração *in vitro* e *in vivo*. WU Y et al. (2011) demonstraram que, em câncer de endométrio, o aumento de expressão do miRNA-145 reduziu a expressão de OCT4 sugerindo que o miRNA-145 atue na diferenciação de células tumorais no carcinoma de endométrio.

O miRNA-183 apresentou predominantemente aumento de expressão nas amostras analisadas. Esse miRNA é considerado como um OncomiR, sendo associado à regulação do gene supressor de tumor *EGR1*. Foi observado que células de sarcoma e tumores de cólon, apresentavam um aumento na expressão dos supressores de tumor *PTEN E EGR1* e diminuição da capacidade de invasão, quando tratadas com o anti-miRNA-183 (SARVER et al. 2010).

ABRAHAM et al. (2011) observaram aumento de expressão do miRNA-183 no câncer medular da tireóide esporádico sendo esse aumento de expressão associado a metástase em linfonodos, recidiva e mortalidade. Já WANG et al. (2008), em células de câncer de pulmão, sugeriram que o miRNA-183 possa atuar como um inibidor de migração, invasão e consequentemente metástase, através da regulação da expressão da proteína EZRIN conhecida por atuar no controle do citoesqueleto de actina, adesão celular e motilidade.



O miRNA-200b apresentou predominantemente diminuição da expressão nas amostras analisadas. SUN et al. (2012) demonstraram que a diminuição da expressão de miRNA-200b em câncer de língua foi relacionada a resistência a quimioterapia, metástase e diminuição na sobrevida dos pacientes, enquanto que o aumento da expressão do miRNA-200b nas células do câncer de língua revertia as características mesenquimais e sensibilizava as células ao tratamento quimioterápico.

Estudos demonstraram que células tumorais resistentes à drogas apresentam características de EMT e de células-tronco (GOMES et al. 2011). A sinalização via Hedgehog é importante durante a EMT em células de câncer de pulmão e AHMAD et al. (2013) demonstraram que inibição de Hedgehog levava à sensibilização das células aos agentes quimioterápicos, sendo observado a diminuição da expressão de marcadores de células-tronco como *SOX2*, *NANOG* e *EpCAM* e aumento da expressão dos miRNAs- 200b e let-7. KURASHIGE et al. (2012) demonstraram que o aumento da expressão do miRNA-200b em câncer gástrico estava associado à inibição de EMT, sendo observado a diminuição de *ZEB2*, aumento de E-caderina e redução da proliferação celular, migração e invasão.

O miRNA-203 também apresentou predominantemente diminuição da expressão nas amostras analisadas. Estudos têm demonstrado a participação do miRNA-203 no desenvolvimento tumoral, através da regulação da proliferação celular, invasão e resistência a drogas. YIN et al. (2013) demonstraram que o miRNA-203 tem como alvo o oncogene *BMI1*,

associado à manutenção e regulação de células-tronco, levando à resistência a quimioterápicos em câncer de mama. TAUBE et al. (2013), também estudando câncer de mama, demonstraram a diminuição da expressão do miRNA-203 por hipermetilação da região promotora. A re-expressão do miRNA-203 promoveu a inibição da migração e invasão *in vitro* e iniciação e metástase *in vivo*. No câncer de próstata a diminuição da expressão do miRNA-203 foi associada à migração e metástase. Além disso, foi demonstrado que a re-expressão do miRNA-203 foi responsável pela indução da transição mesênquima-epitélio (MET) estado inverso à EMT (SAINI et al. 2011).

Considerando-se o miRNA-205, 40% das amostras apresentaram expressão equivalente à observada no tecido normal. Contudo, pode ser observada uma tendência ao aumento da expressão deste miRNA, sendo esse aumento associado à presença de metástase em linfonodo. QU et al. (2012) demonstraram aumento na expressão do miRNA-205 em linhagens celulares radioresistentes de tumores nasofaríngeos, levando à inibição do supressor de tumor *PTEN* e ativação da via PI3K/AKT. MATSUSHIMA et al. (2011) descreveram aumento de expressão do miRNA-205 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago, sendo este aumento associado aos processos de invasão e migração celular através da regulação de *ZEB2*. Diminuição da expressão do miRNA-205 também tem sido descrita: KALOGIROU et al. (2013) observaram diminuição de expressão em mais de 70% das amostras de câncer de próstata, sendo essa diminuição associada a metástase em linfonodo. CHILDS et al. (2009)

avaliaram a expressão do miRNA-205 em 104 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e notaram que a diminuição de expressão foi associada a recorrência e diminuição de sobrevida. KIMURA et al. (2010) analisaram o perfil de expressão de miRNAs em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, carcinoma epidermóide de esôfago em comparação com epitélio normal e tumores de outros órgãos: o miRNA-205 apresentou predominante aumento de expressão tanto em amostras tumorais quanto de epitélio escamoso normal, sugerindo que esse miRNA possa ser um marcador específico do epitélio escamoso.

Os resultados controversos de expressão dos miRNAs encontrados em nosso estudo quando comparados com dados de literatura podem ser devidos à diversos fatores. A presença de mutações/SNPs na via de biogênese dos miRNAs, poderia levar à uma diminuição dos miRNAs maduros, que foram avaliados nesse estudo (KWAK et al. 2010; SLABY et al 2012). Outro possível mecanismo é a hipermetilação nas ilhas CpGs na região promotora de miRNAs levando também à diminuição da expressão dos miRNAs (GORENCHTEIN et al. 2012). Como diversos miRNAs estão mapeados em regiões cromossômicas associadas ao câncer, amplificações, perdas de heterozigose, quebras cromossômicas podem também afetar a expressão dos miRNAs (DI LEVA et al. 2012; IORIO e CROCE 2012).

Nosso estudo demonstrou a expressão dos miRNAs let-7a, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-138, miRNA-145, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203, miRNA-205 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e a expressão dos miRNAs let-7a, miRNA-138, miRNA-145 e miRNA-205

apresentou associação com características clinicopatológicas. Esses miRNAs estão associados à regulação de células-tronco. Contudo, como os miRNAs podem regular a expressão de diversos mRNAs alvo, o papel desses miRNAs na regulação de células-tronco em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ainda precisa ser investigado através da avaliação da expressão dos mRNAs alvo nessas amostras e também por estudos *in vitro*, avaliando o papel do aumento e diminuição desses miRNAs em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

## 6 CONCLUSÕES

- 1 Os miRNAs let-7a, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-138, miRNA-145, miRNA-183, miRNA-200b, miRNA-203, miRNA-205 foram expressos nas amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço avaliadas:
  - a. Os miRNAs miRNA-138 e miRNA-183 apresentaram predominantemente aumento de expressão nos tumores quando comparada à expressão observada no tecido normal. Os miRNAs miRNA-145 e miRNA-205 apresentaram uma tendência ao aumento de expressão, mas não foi observado um padrão de expressão predominante nas amostras;
  - b. Os miRNAs miRNA-200b e miRNA-203 apresentaram predominantemente diminuição de expressão nos tumores quando comparada à expressão observada no tecido normal;
  - c. Os miRNAs let-7a, miRNA-34a e miRNA-125b não apresentaram alteração predominante no padrão de expressão quando comparada à expressão observada no tecido normal.
  
- 2 A expressão dos miRNAs let-7a, miRNA-138, miRNA-145 e miRNA-205 foi associada à características clínico-patológicas dos pacientes:
  - a. Diminuição da expressão do miRNA-let-7a está associada à presença de invasão perineural;

- b. Aumento da expressão do miRNA-138 está associado a tumores em estágio patológico avançado;
- c. Aumento da expressão do miRNA-145 está associado à presença de invasão vascular;
- d. Aumento da expressão do miRNA-205 está associado à presença de metástase em linfonodo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham D, Jackson N, Gundara JS, et al. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. **Clin Cancer Res** 2011; 17:4772-81.

Adrien J, Bertolus C, Gambotti L, et al. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncol** 2013 [Epub ahead of print]

Ahmad A, Maitah MY, Ginnebaugh KR, et al. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. **J Hematol Oncol** 2013; 6:77.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-88.

Ansary-Moghaddam A, Huxley RR, Lam TH, et al. The risk of upper aero digestive tract cancer associated with smoking, with and without concurrent alcohol consumption. **Mt Sinai J Med** 2009; 76:392-403.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** 2004; 23:281-97.

Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology. **Int J Cancer** 2013; 133:2013-23.

Bourguignon LY, Wong G, Earle C, et al. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. **J Biol Chem** 2012; 287:32800-24.

Büssing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cell and cancer. **Trends Mol Med** 2008; 14:400-9.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:15524-9.

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 XH, Nama S, Gopal F, et al. Targeting glioma stem cells by functional inhibition of a prosurvival oncomiR-138 in malignant gliomas. **Cell Rep** 2012; 2:591-602.

Childs G, Fazzari M, Kung G, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Pathol** 2009; 174:736-45.

Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, et al. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. **Nat Cell Biol** 2011; 13:1353-60.

Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, et al. Cancer stem cells – new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis** 2006; 12:443-54.



da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncol** 2011; 47:783-91.

de Aguiar A Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral Oncol** 2007; 43:593-601.

Deben C, Zwaenepoel K, Boeckx C, et al. Expression analysis on archival material revisited: isolation and quantification of RNA extracted from FFPE samples. **Diagn Mol Pathol** 2013; 22:59-64.

DeSano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. **AAPS J** 2009; 11:682-92.

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

Dröge P, Davey CA. Do cells let-7 determine stemness? **Cell Stem Cell** 2008; 2:8-9.

Dwivedi RC, Chisholm EJ, Khan AS, et al. An exploratory study of the influence of clinico-demographic variables on swallowing and swallowing-related quality of life in a cohort of oral and oropharyngeal cancer patients treated with primary surgery. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2012; 269:1233-9.

Eke I, Dickreuter E, Cordes N. Enhanced radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cells by  $\beta 1$  integrin inhibition. **Radiother Oncol** 2012; 104:235-42.

Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, et al. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. **Cell** 2009; 136:1122-35.

Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205. **Transl Oncol** 2008; 1:202-8.

Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol** 2012; 8:1407-25.

Gomes LR, Terra LF, Sogayar MC, Labriola L. Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis. **Curr Pharm Biotechnol** 2011; 12:1881-90.

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.

Hao J, Zhao S, Zhang Y, Zhao Z, Ye R, Wen J, Li J. Emerging Role of MicroRNAs in Cancer and Cancer Stem Cells. **J Cell Biochem** 2013 Oct 26. [Epub ahead of print]

Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, et al. MicroRNAs and genomic instability. **Semin Cancer Biol** 2007; 17:65-73.

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

Ji Q, Hao X, Zhang M, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. **PLoS One** 2009; 4:e6816.

Jin Y, Chen D, Cabay RJ, et al. Role of microRNA-138 as a potential tumor suppressor in head and neck squamous cell carcinoma. **Int Rev Cell Mol Biol** 2013; 303:357-85.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell** 2005; 120:635-47.

Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. **Head Neck** 2012; 34:42-9.

Ju SY, Chiou SH, Su Y. Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. **Stem Cell Res** 2013; 12:86-100.

Kalogirou C, Spahn M, Krebs M, et al. MiR-205 is progressively down-regulated in lymph node metastasis but fails as a prognostic biomarker in high-risk prostate cancer. **Int J Mol Sci** 2013; 14:21414-34.

Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. **Trends Biochem Sci** 2010; 35:368-76.

Khlifi R, Hamza-Chaffai A. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review. **Toxicol Appl Pharmacol** 2010; 248:71-88.

Kimura S, Naganuma S, Susuki D, et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. **Oncol Rep** 2010; 23:1625-33.

Kumar B, Yadav A, Lang J, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. **PLoS One** 2012; 7:e37601.

Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, et al. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. **Arch Pathol Lab Med** 2005; 129:354-9.

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

Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL, et al. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. **PLoS Genet** 2011; 7:e1002242.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 1993; 75:843-54.

Lee Y, Yang X, Huang Y, et al. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis. **PLoS Comput Biol** 2010; 6:e1000730.

Li G, Luna C, Qiu J, et al. Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183. **J Biol Chem** 2010; 285:5461-71.

Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. **Cancer** 2009; 115:3379-91.

Lim YY, Wright JA, Attema JL, et al. Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem-cell-like state. **J Cell Sci** 2013; 126:2256-66.

Lin HC, Wu CL, Chen YL, et al. High-level  $\beta$ 1-integrin expression in a subpopulation of highly tumorigenic oral cancer cells. **Clin Oral Investig** 2013 Aug 25. [Epub ahead of print]

Lin S, Sun JG, Wu JB, et al. Aberrant microRNAs expression in CD133<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup> human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. **Mol Cells** 2012; 33:277-83.

Liu J, Zheng M, Tang YL, et al. MicroRNAs, an active and versatile group in cancers. **Int J Oral Sci** 2011; 3:165-75.

Liu X, Wang C, Chen Z, et al. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. **Biochem J** 2011; 440:23-31.

Liu Z, Liu H, Desai S, et al. miR-125b functions as a key mediator for snail-induced stem cell propagation and chemo resistance. **J Biol Chem** 2013; 288:4334-45.

Lo WL, Yu CC, Chiou GY, et al. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. **J Pathol** 2011; 223:482-95.

Luce D, Stücker I, Study Group I. Investigation of occupational and environmental causes of respiratory cancers (ICARE): a multicenter, population-based case-control study in France. **BMC Public Health** 2011; 14:928.

Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. **J Transl Med** 2011; 9:30.

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

Mishra PJ, Merlino G. MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer. **J Clin Invest** 2009; 119:2119-23.

Mitra S, Das S, Das S, et al. HNOCDDB: a comprehensive data base of genes and miRNAs relevant to head and neck and oral cancer. **Oral Oncol** 2012; 48:117-9.

Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. **Cell Stem Cell** 2011; 8:633-8.

Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, et al. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. **J Oncol** 2011; 2011:762780.

Nam EJ, Lee M, Yim GW, et al. MicroRNA profiling of a CD133(+) spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. **BMC Med Genomics** 2012; 5:18.

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

Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. **Cancer Res** 2010; 70:2789-98.

O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, et al. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:14235-40.

Park BJ, Chiosea SI, Grandis JR. Molecular changes in the multistage pathogenesis of head and neck cancer. **Cancer Biomark** 2010; 9:325-39.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature** 2000; 408:86-9.

Petridou E, Zavras AI, Lefatzis D, et al. The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma. **Cancer** 2002; 94:2981-88.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:973-8.

Qu C, Liang Z, Huang J, et al. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. **Cell Cycle** 2012; 11:785-96.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. 2010. Available from: <URL:<http://www.lsw.uni-heidelberg.de/users/christlieb/teaching/UKStaSS10/R-refman.pdf>> [2013 set 12]

Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. **Am J Transl Res** 2010; 2:170-80.

Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory role of Mir-203 in prostate cancer progression and metastasis. **Clin Cancer Res** 2011; 17:5287-98.

Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. **Cancer Res** 2010; 70:9570-80.

Scapoli L, Palmieri A, LoMuzio L, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2010; 23:1229-34.

Sellappa S, Balakrishnan M, Raman S, et al. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. **J Oral Sci** 2009; 51:289-92.

Shi L, Zhang S, Feng K, et al. MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. **Int J Oncol** 2012; 40:119-29.

Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. MicroRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). **Cancers (Basel)** 2010; 2:653-69.

Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, et al. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. **J Cell Mol Med** 2012; 16:8-21.

Speranza MC, Frattini V, Pisati F, et al. NEDD9, a novel target of miR-145, increases the invasiveness of glioblastoma. **Oncotarget** 2012; 3:723-34.

Sotillo E, Thomas-Tikhonenko A. Shielding the messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies. **Pharmacol Ther** 2011; 131:18-32.

Sun L, Yao Y, Liu B, et al. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. **Oncogene** 2012; 31:432-45.



Sung SY, Liao CH, Wu HP, et al. Loss of let-7 microRNA upregulates IL-6 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggering a reactive stromal response to prostate cancer. **PLoS One** 2013; 8:e71637.

Taube JH, Malouf GG, Lu E, et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. **Sci Rep** 2013; 3:2687.

Tellez CS, Juri DE, Do K, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. **Cancer Res** 2011; 71:3087-97.

Tu HF, Lin SC, Chang KW. MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg** 2013; 21:104-11.

Underwood SM. Enhancing the delivery of cancer care to the disadvantaged: the challenge to providers. **Cancer Pract** 1995; 3:31-6.

Wang G, Mao W, Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. **FEBS Lett** 2008; 582:3663-8.

Wang HJ, Guo YQ, Tan G, et al. miR-125b regulates side population in breast cancer and confers a chemoresistant phenotype. **J Cell Biochem** 2013; 114:2248-57.

Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. **Laryngoscope** 2009; 119:1518-30.

Wang YD, Cai N, Wu XL, et al. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. **Cell Death Dis** 2013; 4:e760.

Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, et al. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. **GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg** 2012; 11:Doc09.

Wu BH, Xiong XP, Jia J, et al. MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. **Oral Oncol** 2011; 47:314-19.

Wu Y, Liu S, Xin H, et al. Up-regulation of microRNA-145 promotes differentiation by repressing OCT4 in human endometrial adenocarcinoma cells. **Cancer** 2011; 117:3989-98.

Xu J, Wang Y, Tan X, et al. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. **Autophagy** 2012; 8:873-82.

Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell** 2009; 137:647-58.

Ye D, Wang G, Liu Y, et al. MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. **Stem Cells** 2012; 30:1645-54.

Yin J, Zheng G, Jia X, et al. A Bmi1-miRNAs cross-talk modulates chemotherapy response to 5-fluorouracil in breast cancer cells. **PLoS One** 2013; 8:e73268.

Yu CC, Chen YW, Chiou GY, et al. MicroRNA let-7a represses chemo resistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. **Oral Oncol** 2011; 47:202-10.

Yu F, Yao H, Zhu P, et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. **Cell** 2007; 131:1109-23.

Zhang GJ, Zhou H, Xiao HX, Li Y, Zhou T. MiR-378 is an independent prognostic factor and inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. **BMC Cancer** 2014; 14:109.

Zhao A, Zeng Q, Xie X, et al. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. **J Genet Genomics** 2012; 39:29-35.

Zhao L, Chen X, Cao Y. New role of microRNA: carcinogenesis and clinical application in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 2011; 43:831-9.

## Anexo 1 - Ficha de coleta de dados dos pacientes

### Dados do paciente

Paciente (iniciais): \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

RGH \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Data do 1º diagnóstico \_\_\_\_\_

Tabagista: (0) não (1) sim (9) ign

Etilista: (0) não (1) sim (9) ign

### Dados do tumor

Nº AP peça \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tipo histológico: \_\_\_\_\_

Grau histológico: (1) bem diferenciado (2) moderadamente diferenciado (3) pouco diferenciado (4) indiferenciado

Estadio clínico: \_\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_

Tamanho da lesão: \_\_\_\_\_

Status margem: (0) livre (1) comprometida

Embolia vascular: (0) não (1) sim (9) ign

Invasão perineural: (0) não (1) sim (9) ign

Linfonodos comprometidos: (0) não (1) sim (9) ign

TNM: \_\_\_\_\_

### Tratamento:

Data da cirurgia: \_\_\_\_\_

Quimioterapia neoadjuvante: (0) não (1) sim

Radioterapia neoadjuvante: (0) não (1) sim

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim

**Segundo tumor primário:** (0) não (1) sim

Localização: \_\_\_\_\_

### Evolução:

**1) Recidivas locais:** (0) não (1) sim

data: \_\_\_\_\_ AP \_\_\_\_\_

**Cirurgia:** data \_\_\_\_\_

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim \_\_\_\_\_

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim \_\_\_\_\_

**1) Metástases:** (0) não (1) sim \_\_\_\_\_

data: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

**Cirurgia:** (0) não (1) sim

data \_\_\_\_\_

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim \_\_\_\_\_

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim \_\_\_\_\_

### Status atual

Data da última informação \_\_\_\_\_

(1) vivo com doença (2) vivo

## Anexo 2 - Aprovação Comitê de Ética



### Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de maio de 2012.

A  
**Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo.**

**Aluna: Bárbara de Lima Brito (Mestrado).**

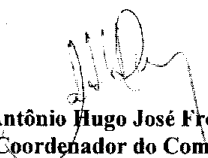
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1664/12**  
**“Avaliação da expressão de miRNAs reguladores de células-tronco em carcinoma epidermóide oral e associação com características clinicopatológicas”.**

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 08/05/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 08 de março de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedades das Informações Geradas;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,



**Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos**  
**2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

## Anexo 3 - Código Internacional de Doenças/CID-10

C00-D48 - Neoplasias - Tumores

### **(C00-C14) Neoplasia malignas, lábio, cavidade oral e faringe**

- **(C00)** Neoplasia maligna do lábio
- **(C01)** Neoplasia maligna da base da língua
- **(C02)** Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da língua
- **(C03)** Neoplasia maligna da gengiva
- **(C04)** Neoplasia maligna do assoalho da boca
- **(C05)** Neoplasia maligna do palato
- **(C06)** Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca
- **(C07)** Neoplasia maligna da glândula parótida
- **(C08)** Neoplasia maligna de outras glândulas salivares maiores e as não especificadas
- **(C09)** Neoplasia maligna de amígdala
- **(C10)** Neoplasia maligna de orofaringe
- **(C11)** Neoplasia maligna da nasofaringe
- **(C12)** Neoplasia maligna do seio piriforme
- **(C13)** Neoplasia maligna da hipofaringe
- **(C14)** Neoplasia maligna de outras localizações e de localizações mal definidas, do lábio, cavidade oral e faringe

## Anexo 4 - Sistema TNM

CLASSIFICAÇÃO TNM DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE	
CATEGORIA DA DOENÇA	DEFINIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS
<b>TUMOR PRIMÁRIO DE CAVIDADE ORAL</b>	
<b>Tx</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>T2</b>	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
<b>T4a</b>	
<b>Lábio:</b>	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)
<b>Cavidade oral:</b>	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos / profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face.
<b>T4b</b>	( <b>Lábio e cavidade oral</b> ): Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
<b>Nota:</b> A erosão superficial isolada do osso/alvéolo dentário por um tumor primário de gengiva não é suficiente para classificá-lo como T4.	
<b>TUMOR PRIMÁRIO DE OROFARINGE</b>	
<b>Tx</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>T2</b>	Tumor com mais de 2 cm até 4 cm em sua maior dimensão
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
<b>T4a:</b>	Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigóide medial, palato duro e mandíbula.
<b>T4b:</b>	Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: músculo pterigóide lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base do crânio ou adjacentes a artéria carótida
<b>METÁSTASE REGIONAL</b>	
<b>Nx</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>N2</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>N2a</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
<b>N2b</b>	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>N2c</b>	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>N3</b>	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>METÁSTASE À DISTÂNCIA</b>	
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Metástase à distância é evidente
<b>Legenda:</b> <b>T</b> - a extensão do tumor primário / <b>N</b> - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais / <b>M</b> - a ausência ou presença de metástase à distância* Modificado de Trotta et al.(2011)	