

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS
REGULADORES DA APOPTOSE EM TUMORES
DE GLÂNDULA SALIVAR**

**BIANCA DE CÁSSIA TRONCARELLI DE
CAMPOS PARRA FLORES**

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Flores, Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra
Avaliação da expressão de microRNAs reguladores da apoptose em tumores de glândula salivar / Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra Flores – São Paulo 2015.
74p.
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. APOPTOSE 2. MICRORNAS. 3. NEOPLASIAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES/diagnóstico. 4. EXPRESSÃO GÊNICA.

“Quando deixamos determinado lugar, deixamos para trás um pedaço de nós – permanecemos lá, apesar de partirmos. E há coisas em nós que só podemos recuperar se voltarmos para lá.

Viajamos até perto de nós, para dentro de nós mesmos, quando um ruído monótono das rodas nos transporta em direção a um lugar onde passamos uma parte de nossa vida, por mais breve que tenha sido.

Assim que colocamos, pela segunda vez, o pé numa estação estranha, escutando as vozes nos alto-falantes, sentindo os cheiros inconfundíveis, não apenas chegamos ao lugar distante, mas também na distância do próprio interior, num ângulo talvez bem remoto do nosso eu que, quando estamos em outro lugar, permanece oculto e completamente entregue à invisibilidade.” (Trem noturno para Lisboa – Pascal Mercier)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, fontes de inspiração, força e estímulo. Jamais poderei agradecer a compreensão de vocês; a qual torna possível a realização de todos os meus sonhos.

Aos pacientes envolvidos neste estudo, meu agradecimento por terem cedido as amostras utilizadas. Àqueles que passaram pelo tratamento do câncer; e também aqueles que encaram atualmente esta luta; no A.C.Camargo Cancer Center, assim como em outras instituições de saúde; meu desejo de melhora e cura. Em especial à minha tia Maria José. Dedico meu trabalho, minhas pesquisas e orações a todos. Desejo vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida...

Aos meus pais, José e Regina, e minha avó Antônia, por tornarem realidade meus sonhos e acalmarem minhas angústias. Serem meu porto seguro e minha certeza...gradidão eterna!

A dança, por ter sido meu ponto de partida e principalmente, meu ponto de chegada...

Agradeço aos meus amigos por trazerem cores e sorrisos aos meus dias; pela sintonia e dedicação após tantos anos de amizade. Obrigada, obrigada, obrigada!

Agradeço a minha orientadora, Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, por tornar possível meu desejo de iniciar minha trajetória pela pesquisa em oncologia. Obrigada pelo exemplo de dedicação, seriedade, inteligência e compromisso.

Agradeço a Capes pela bolsa de mestrado e à FAPESP pelo Auxílio à Pesquisa (11/02051-6).

A todos do CIPE – Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, em especial ao grupo da Patologia Investigativa.

Ao Biobanco e a pós graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pela dedicação e trabalho árduo.

Aos Departamentos de Anatomia Patológica e Cabeça e Pescoço.

A todos que se dedicam ao A.C.Camargo Cancer Center; meu agradecimento por tornarem possível este e tantos outros estudos que buscam cura, qualidade de vida e esperança para estes pacientes.

RESUMO

Flores BCTCP. **Avaliação da expressão de microRNAs reguladores da apoptose em tumores de glândula salivar**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso, tornando seu diagnóstico uma atividade desafiadora. Por isso, a identificação de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico é tão importante, especialmente para este grupo de neoplasias. Os miRNAs são pequenas moléculas e modulam múltiplas vias oncogênicas, incluindo as vias apoptóticas. Diversos trabalhos têm demonstrado alterações na expressão de microRNAs em diversos tumores. O processo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese de estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares. Por isso a necessidade de novos estudos na busca por novos marcadores moleculares. O objetivo desse trabalho foi a determinação da expressão de microRNAs relacionados à regulação da apoptose (miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-34a) e a determinação da expressão de genes relacionados ao processo de apoptose (BAD, BAX, BCL2, BID, APAF1, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, DIABLO e TP53) e alvos desses microRNAs em amostras de tumores de glândula salivar através da metodologia de RT-PCR em tempo real. Para tanto, foram selecionadas 25 amostras de adenoma pleomórfico 23 de carcinoma mucoepidermóide e 10 amostras de glândulas salivar não neoplásicas, provenientes do Biobanco de tumores do AC Camargo Cancer Center. Como resultado, obtivemos os miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR -21, miR-29a e miR-34a com aumento de expressão em 76,0%, 60,0%, 47,8%, 80,0%, 84,0% e 96,0% das amostras de adenoma pleomórfico, respectivamente. Por outro lado, na análise da expressão do miR-20a, pode-se observar a diminuição da sua expressão em 75,0% das amostras. Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide, os microRNAs

miR-15a, miR-17-5p e miR-29a apresentaram expressão similar à observada no tecido não-neoplásico em 47,8%, 52,1% e 73,9%, respectivamente. O miR-20a apresentou expressão diminuída em 56,5% das amostras e os microRNAs miR-21 e miR-34 que apresentaram aumento de expressão em 90,9% e 73,9% das amostras de carcinoma mucoepidermóide, respectivamente. O miR-16 não apresentou um padrão de expressão predominante. Na análise dos resultados da expressão gênica, encontramos, nas amostras de adenoma pleomórfico, os genes APAF-1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO e TP53 com a expressão aumentada, enquanto os genes CASP2, CASP3, CASP6 e CASP7 se apresentaram com equivalente à observada no tecido não neoplásico. O gene BID não apresentou um padrão predominante de expressão. Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide os genes APAF-1, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO e TP53 apresentaram sua expressão aumentada. Os genes CASP7 e BAD encontraram-se com a expressão similar às amostras não-neoplásicas utilizadas como controle. Nossos resultados demonstraram alteração na expressão dos microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29 e miR-34a em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares. Poucos estudos têm avaliado o papel dos microRNAs em tumores de glândula salivar e não existem estudos avaliando a expressão desses microRNAs em tumores de glândula salivar. Os resultados também demonstram alterações na expressão dos genes APAF1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO e TP53 nas amostras de adenoma pleomórfico e alteração dos genes APAF1, BAX, BCL2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO e TP53 nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. Alguns genes estudados podem ser regulados por mais de um microRNA avaliado em nosso estudo, bem como pelo fato de que diversos outros microRNAs não avaliados neste estudo, podem regular esses mesmos genes; isso poderia explicar a razão de existirem resultados contraditórios.

SUMMARY

Flores BCTCP. **[Evaluation of apoptosis-regulating microRNAs in salivary gland tumors]**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Salivary gland tumors comprise a heterogeneous group of lesions, with different histological features and different clinical behavior, imposing a significant challenge on the diagnosis of these tumors. Therefore, the identification of molecular markers for diagnosis and prognosis is so important, especially for this group of malignancies. miRNAs are small non-coding RNAs that modulate several biological processes, including apoptotic pathways. Several studies have demonstrated changes in microRNA expression in various tumors. The process of apoptosis plays an important role during the organogenesis of glandular structures, including the development of salivary glands. For that reason the need for further studies in the search for new molecular markers. The aim of this study was to determine the expression of microRNAs related to the regulation of apoptosis (miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-34a) and the expression of genes (BAD, BAX, BCL2, IDB, APAF1, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, DIABLO and TP53) related to the apoptotic process and that are target of these microRNAs in salivary gland tumor samples by real time RT-PCR methodology. Twenty-five pleomorphic adenoma samples 23 mucoepidermoid carcinoma samples and 10 non-neoplastic salivary gland samples were selected from the Biobank of the AC Camargo Cancer Center. Our results demonstrated that microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-21, and miR-29a miR-34a presented an increased expression in 76.0%, 60.0%, 47.8%, 80.0% 84.0% and 96.0% of the pleomorphic adenoma samples, respectively. Moreover, miR-20a expression was decreased in 75.0% of samples. microRNAs miR-15a, miR-17-5p and miR-29a presented expression similar to that observed in non-

neoplastic tissue. The miR-20a expression was decreased in 56.5% of samples and microRNAs miR-21 and miR-34 presented increased expression in 90.9% and 73.9% of the mucoepidermoid carcinoma samples, respectively, and miR-16 presented the same number of samples with increased expression and expression similar to that observed in non-neoplastic samples (43.5%). With regard to gene expression, we have observed APAF-1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO and TP53 genes with increased expression in pleomorphic adenoma samples, while CASP2, CASP3, CASP6 and CASP7 genes presented expression similar to that observed in non-neoplastic samples. The BID gene did not present a predominant pattern of expression. In mucoepidermoid carcinoma samples, APAF-1, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO and TP53 genes presented increased expression. The CASP7 and BAD genes presented expression similar to that observed in non-neoplastic samples. Our results demonstrated normal expression of microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29 and miR-34a in mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma of the salivary glands. Few studies have evaluated the role of microRNAs in salivary gland tumors and there are no studies evaluating the expression of these microRNAs in salivary gland tumors. The results also demonstrated changes in the expression of APAF1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO and TP53 genes in pleomorphic adenoma samples and alteration of APAF1, BAX, BCL2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO and TP53 genes in mucoepidermoid carcinoma samples. Some studied genes may be regulated by more than one microRNA evaluated in our study as well as the fact that several other microRNAs not evaluated in this study, can regulate these same genes; this could explain why there are contradictory results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da glândula salivar.....	3
Figura 2	Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico e do carcinoma mucoepidermóide.....	7
Figura 3	Processo de apoptose.....	10
Figura 4	As duas principais vias apoptóticas.....	15
Figura 5	Biossíntese do microRNA.....	17
Figura 6	Classificação dos microRNAs com relação a apoptose.....	19
Figura 7	Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão dos microRNAs.....	26
Figura 8	Esquema representativo da avaliação de alvos de microRNAs utilizando a ferramenta miRTarBase.....	28
Figura 9	Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão gênica.....	30
Figura 10	Visão global procedimentos.....	32
Figura 11	Análise da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em amostras de adenoma pleomórfico.....	36
Figura 12	Análise da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide.....	37

Figura 13	Esquema da ferramenta miRTarBase.....	39
Figura 14	Análise da expressão dos genes reguladores de apoptose em amostras de adenoma pleomórfico.....	41
Figura 15	Análise da expressão dos genes reguladores de apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide.....	44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação histopatológica dos tumores benignos epiteliais das glândulas salivares e incidência dos mais frequentes.....	4
Quadro 2	Classificação histopatológica dos tumores malignos epiteliais das glândulas salivares e incidência dos mais frequentes.....	4
Tabela 1	Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com adenoma pleomórfico.....	33
Tabela 2	Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide.....	34
Tabela 3	Expressão relativa de microRNAs reguladores da apoptose em amostras de adenoma pleomórfico em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas.....	35
Tabela 4	Expressão relativa de microRNAs reguladores da apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas.....	37
Tabela 5	Comparação da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico.....	38
Tabela 6	Genes alvo de microRNAs reguladores da apoptose avaliados em amostras de carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico.....	40
Tabela 7	Expressão relativa dos genes reguladores da apoptose em amostras de adenoma pleomórfico em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas.....	42

Tabela 8	Expressão relativa dos genes reguladores da apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas.....	43
Tabela 9	Comparação da expressão dos genes reguladores de apoptose em carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa
Ct*	CycleThreshold
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EMT*	Epithelial-mesenchymal transition
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mirna	microRNA
mRNA*	RNA mensageiro
pb	Pares de base
PCR*	Polymerase Chain Reaction
pri-miRNA	microRNA primário
RISC*	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR*	Reverse Transcription-quantitative PCR
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SNPs*	Single-Nucleotide Polymorphism

* Siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Desenvolvimento das Glândulas Salivares.....	1
1.2	Neoplasias de Glândulas Salivares	3
1.3	Apoptose	9
1.4	MicroRNAs	16
1.5	Justificativa	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Casuística.....	23
3.2	Análise da expressão de microRNAs	23
3.2.1	Extração do RNA total	23
3.2.2	Síntese do cDNA	24
3.2.3	Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	25
3.3	Análise da expressão de gênica	27
3.3.1	Determinação dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo	27
3.3.2	Síntese do cDNA	28
3.3.3	Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	29
3.4	Análise Estatística	31
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Dados demográficos, clínicos e patológicos.....	33
4.2	Análise da expressão de microRNAs	35
4.2.1	Análise estatística.....	38
4.3	Análise da expressão gênica.....	39
4.3.1	Determinação dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo	39

4.3.2	Análise Estatística	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

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

Anexo 3 Expressão de microRNAs e genes

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

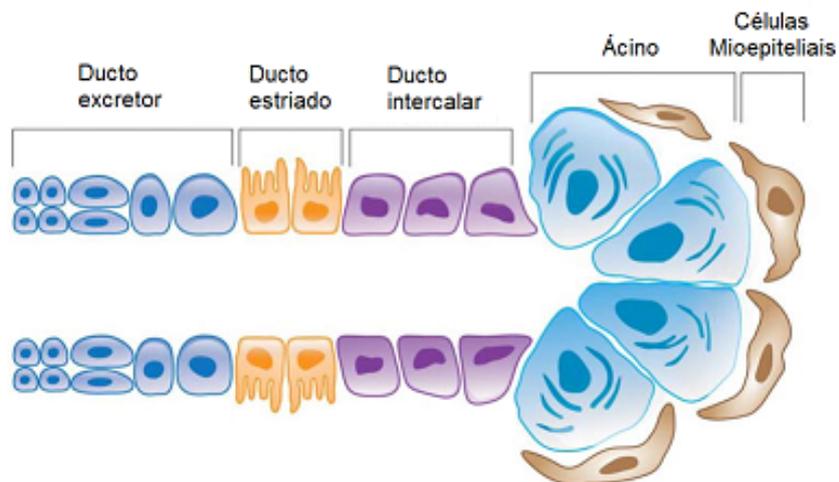
As glândulas salivares se originam como uma proliferação das células do epitélio oral, formando um espessamento focal que cresce para o interior do ectomesênquima subjacente. A continuidade do crescimento resulta na formação de um pequeno botão ligado à superfície por um vestígio de cordão de células epiteliais, com células mesenquimais condensadas em torno do botão. Fissuras desenvolvem-se no botão, formando dois ou mais novos botões; continuando este processo, chamado de ramificação morfogênica, produzindo novos botões e ramificações da glândula (NANCI 2013; HOLMBERG e HOFFMAN 2014).

As glândulas salivares são exócrinas e produzem saliva, fluido que possui funções digestivas, lubrificantes e protetoras. Além das glândulas pequenas dispersas pela cavidade oral, existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótida, submandibular (submaxilar) e sublingual.

Uma cápsula de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas circunda e reveste as glândulas salivares maiores. O parênquima destas glândulas consiste em terminações secretoras e em um sistema de ductos ramificados que se arranjam em lóbulos, separados entre si por septos de tecido conjuntivo que se originam da cápsula. As terminações secretoras possuem

dois tipos de células secretoras – serosas ou mucosas, além das células mioepiteliais não secretoras. Esta porção secretora precede um sistema de ductos cujos componentes modificam a saliva, à medida que a conduzem para a cavidade oral (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004; HOLMBERG e HOFFMAN 2014).

O ducto excretor principal, que desemboca dentro da cavidade oral, divide-se progressivamente em ductos secretores menores interlobares ou interlobulares que entram nos lobos e lóbulos da glândula. O componente predominante do ducto interlobular é o ducto estriado, que causa a maior modificação da saliva primária produzida pela porção terminal secretora. A ligação dos ductos estriados à porção secretora terminal é dada pelos ductos intercalares, que antes se ramificam uma ou duas vezes, terminando em uma única porção terminal. O lúmen da porção terminal é contínuo com o ducto intercalar (Figura 1) (NANCI 2013; HOLMBERG e HOFFMAN 2014).



Fonte: Modificado de ADAMS et al. (2013)

Figura 1 - Estrutura da glândula salivar. Diagrama ilustrativo representando as porções da glândula salivar.

1.2 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Esses tumores são classificados em benignos (adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais e tumor de Warthin) e malignos (adenocarcinoma de células basais, carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide-cístico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma ex-adenoma pleomórfico e carcinoma mioepitelial) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Classificação histopatológica dos tumores benignos epiteliais das glândulas salivares e incidência dos mais frequentes

Tipo histológico	Variações	Incidência
Adenoma Pleomórfico		50%
Mioepitelioma		1,5%
Adenoma de Células Basais		1 – 3%
Tumor de Warthin		5 – 10%
Oncocitoma		1%
Adenoma canalicular		1%
Adenoma sebáceo		0,1%
Linfoadenoma	Sebáceo e não sebáceo	
Papiloma Ductal	Invertido, intraductal, sialoadenoma papilífero	
Cistoadenoma		

Fonte: BARNES et al. (2005)

Quadro 2 - Classificação histopatológica dos tumores malignos epiteliais das glândulas salivares e incidência dos mais frequentes

Tipo histológico	Incidência
Carcinoma de Células Acinares	5%
Carcinoma Mucoepidermóide	15%
Carcinoma Adenoide Cístico	5%
Adenocarcinoma Polimorfo de baixo grau	
Carcinoma Epitelial-Mioepitelial	1%
Carcinoma de Células Claras, sem outra especificação	
Adenocarcinoma de Células Basais	
Carcinoma Sebáceo	
Linfoadenomacarcinoma Sebáceo	
Cistadenocarcinoma	
Cistadenocarcinoma Cribriforme de baixo grau	
Adenocarcinoma Mucinoso	
Carcinoma Oncocítico	< 1%
Carcinoma do Ducto Salivar	9%
Adenocarcinoma, sem outra especificação	10%
Carcinoma Mioepitelial	
Carcinoma Ex-Adenoma Pleomórfico	0,9 – 14%
Carcinossarcoma	
Adenoma Pleomórfico Metastático	
Carcinoma de Células Escamosas	1%
Carcinoma de Células Pequenas	< 1%
Carcinoma de Células Grandes	
Carcinoma Linfoepitelial	< 1%
Sialoblastoma	

Fonte: BARNES et al. (2005)

Essas neoplasias são relativamente incomuns e representam menos de 2% de todos os tumores humanos e 5% dos tumores de cabeça e pescoço. Cerca de 65% a 80% são originados nas parótidas 10% nas glândulas submandibulares e o restante nas glândulas salivares menores e sublinguais. Os tumores de glândula salivar geralmente ocorrem em adultos, com discreta predominância pelo sexo feminino, mas cerca de 5% ocorrem em crianças com menos de 16 anos. Os tumores benignos ocorrem mais frequentemente em torno da 5^a a 7^a décadas de vida. Os tumores malignos, em média, tendem a ocorrer posteriormente (BARNES et al. 2005; KUMAR e PERKINS 2010; CARLSON 2013; NAGAO 2013).

Os tumores da glândula parótida geralmente se manifestam como um inchaço indolor. A presença de paralisia do nervo facial, dor, a fixação da massa na pele ou estruturas subjacentes, e adenopatia cervical associada geralmente indicam a presença de extensão local ou regional de um tumor maligno (ADELSTEIN et al. 2012). Os tumores da glândula submandibular são relativamente incomuns e geralmente se apresentam como uma massa indolor, móvel no triângulo submandibular. Envolvimento da pele sobrejacente ou fixação à mandíbula, muitas vezes indica extensão local de um tumor maligno (ADELSTEIN et al. 2012). Já os tumores originados a partir das glândulas salivares menores são geralmente malignos e sua apresentação clínica depende do local de origem, mais comumente o palato, espaço parafaríngeo, e glândula lacrimal (ADELSTEIN et al. 2012).

O principal tratamento para as neoplasias de glândula salivar é a cirurgia. Radioterapia pós-operatória tem sido utilizada para melhorar o

controle local da doença e aumentar as taxas de sobrevida para pacientes com tumores de alto grau, com margens cirúrgicas positivas ou com infiltração perineural. O papel da quimioterapia no manejo desses tumores ainda é controverso, sendo que alguns quimioterápicos apresentam respostas em torno de 15-50% e de curta duração (MILANO et al. 2007; ADELSTEIN et al. 2012).

O adenoma pleomórfico é o tumor benigno de glândula salivar mais frequente. Representa cerca de 60% dos tumores das glândulas parótidas, sendo menos comum nas glândulas submandibulares e relativamente raro nas glândulas salivares menores. O adenoma pleomórfico se apresenta como uma mistura de células ductais (epiteliais) e mioepiteliais, demonstrando diferenciação epitelial e mesenquimal. Apresenta elementos epiteliais dispersos por toda a matriz, com graus variados de tecido condróide (cartilaginoso), hialino, mixóide e até mesmo ósseo. Por sua grande diversidade histopatológica, essa neoplasia foi chamada de tumor misto (JAIN et al. 2015). Imagens representativas da histologia do tumor podem ser observadas na Figura 2.

Conhece-se pouco sobre a origem dessa neoplasia, exceto que a exposição à radiação aumenta o risco de desenvolvimento (MENDENHALL et al. 2008). Taxas de recorrência de até 15% foram relatadas (ZHANG et al. 2009). Os fatores de risco para o adenoma pleomórfico ainda não estão bem definidos, embora haja uma preponderância feminina bem reconhecida e uma distribuição etária bimodal que cai na gravidez e na menopausa. Análise citogenética de tumores de glândula salivar tem consistentemente

revelado translocações cromossômicas nas regiões 8q12 12q13 e 3p21-155 correspondentes aos genes PLAG1, β -catenina e HMGIC, respectivamente (ZHANG et al. 2009).

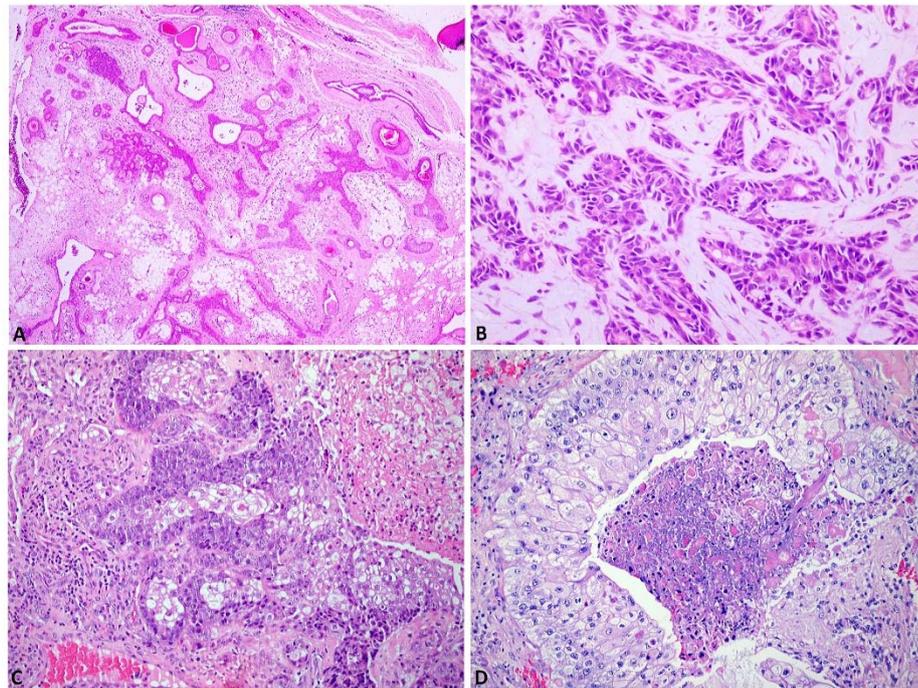


Figura 2 - Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico e do carcinoma mucoepidermóide. A, Adenoma pleomórfico: neoplasia mista contida sob pseudocápsula fibrosa; B, Adenoma pleomórfico: neoplasia composta de ductos neoplásicos e células mioepiteliais modificadas em um estroma mixóide; C, Carcinoma mucoepidermóide: neoplasia infiltrativa composta por células mucosas e intermediárias; D, Carcinoma mucoepidermóide: células mucosas circundando área de comedonecrose.

O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno de glândula salivar mais frequente. Representa 40% dos tumores malignos ocorridos nas glândulas salivares (MCHUGH et al. 2012), ocorrendo principalmente (70%) nas parótidas. É composto por células escamosas, células secretoras de

muco e células intermediárias. Imagens representativas da histologia do tumor podem ser observadas na Figura 2.

Em mais da metade dos casos esse tumor está associado a uma translocação cromossômica (q21; p13) balanceada (11;19), que permite a fusão de um gene composto de porções dos genes MECT1 e MAML2. Acredita-se que o gene MECT1 – MAML2 desempenhe um papel importante na gênese desse tumor, possivelmente por desequilibrar as vias de sinalização Notch e dependentes de AMP-cíclico (MARTINS et al. 2004).

A baixa incidência dos tumores de glândula salivar, aliada à grande quantidade de lesões diferentes presentes neste grupo faz do diagnóstico destas lesões uma atividade desafiadora. Por isso, a identificação de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico é tão importante, especialmente para este grupo de neoplasias (KUMAR e PERKINS 2010; CARLSON 2013; NAGAO 2013).

O processo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese de estruturas glandulares (CHUNG e ANDREW 2008; ANDREW e EWALD 2010), incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares (MELNICK e JASKOLL 2000; JASKOLL et al. 2001; PATEL et al. 2006; PRADHAN et al. 2010).

1.3 APOPTOSE

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, KERR et al. sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular.

Historicamente, a apoptose foi descrita como um fenômeno caracteristicamente morfológico e distinto da morte celular por necrose. Neste último caso, a célula aumenta de volume, a cromatina se agrega sem uma nítida mudança de distribuição, há uma certa desorganização do citoplasma, as mitocôndrias ficam "inchadas" e com a matriz floculenta, os ribossomos se dissolvem e a membrana celular perde a continuidade com vazamento de conteúdo citoplasmático e a consequente reação inflamatória local (BARCINSKI 2006).

Na apoptose, no entanto, as modificações na morfologia celular ocorrem de maneira temporalmente coordenada no núcleo, no citoplasma e na membrana citoplasmática. Ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta (BARCINSKI 2006). A seguir, a membrana

celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos (Figura 3). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório, diferentemente do processo necrótico (DEGTEREV et al. 2003).

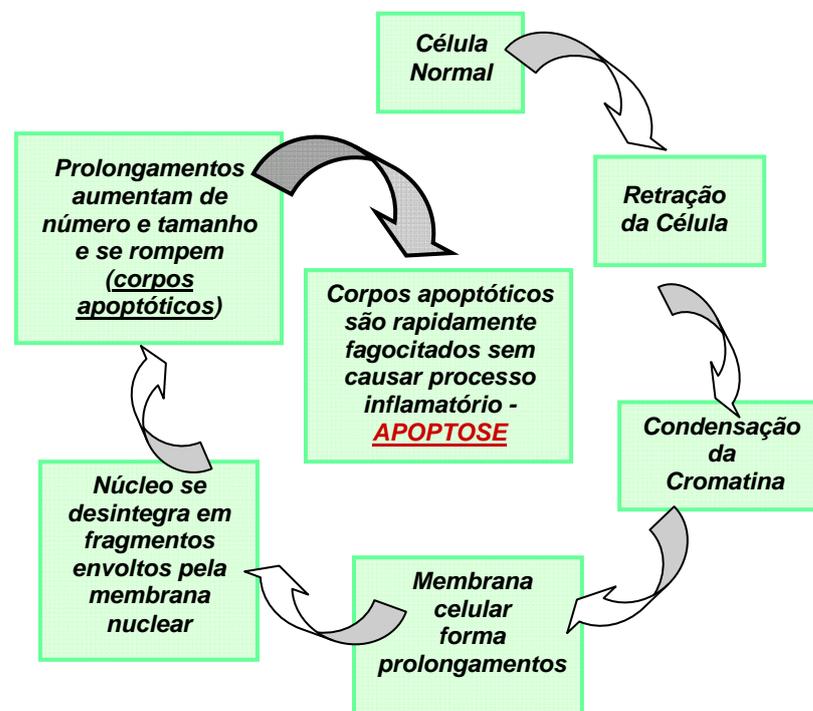


Figura 3 - Processo de apoptose. Principais etapas do processo de apoptose: iniciando pela retração celular e formação dos corpos apoptóticos, até o momento em que estes corpos apoptóticos são fagocitados, finalizando a apoptose celular, sem causar processo inflamatório.

A apoptose pode ser iniciada por diferentes estímulos como, por exemplo, privação de fatores de crescimento, sinalização proveniente de outras células ou alguma forma de dano/estresse celular (LYNAM-LENNON et al. 2009).

A maioria das mudanças morfológicas observadas por HERR et al. em 1972 foram associadas à ativação de cisteína proteases especificamente ativadas em células apoptóticas. Essas proteases são homólogas entre si e são parte de uma família de proteínas conhecidas como caspases (TAYLOR et al. 2008).

As caspases estão normalmente inativas dentro da célula saudável, mas em resposta a estímulo apoptótico são convertidas em enzimas ativas. A ativação das caspases é normalmente iniciada por processamento proteolítico entre as subunidades grandes e pequenas para formar um heterodímero. Esse evento de processamento rearranja o sítio ativo das caspases na sua conformação ativa (TAYLOR et al. 2008).

As caspases podem ser subdivididas entre iniciadoras, que são capazes de se auto-ativar e iniciar processamento proteolítico de outras caspases; e efetoras, que são ativadas por outras caspases. As caspases efetoras clivam a grande maioria de substratos durante a apoptose (TAYLOR et al. 2008).

Existem duas vias apoptóticas principais, denominadas Via Intrínseca e Via Extrínseca, explicadas e ilustradas (Figura 4) a seguir:

- **Via Extrínseca:** Uma subfamília da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNF-R) pode recrutar e ativar caspases em

resposta a sinais extracelulares específicos. Como a consequência do recrutamento de caspases geralmente é a morte celular, esses receptores são conhecidos como receptores de morte. Além disso, os receptores de morte são definidos por um domínio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos chamado domínio de morte (DD, do inglês *Death Domain*), que tem papel crucial na transmissão do sinal de morte da superfície da célula para vias de sinalização intracelulares (CONTASSOT et al. 2007).

Após exposição ao seu ligante, o receptor se multimeriza, recrutando a proteína adaptadora FADD através de interação homotípica de seus DDs (SCHULZE-OSTHOFF et al. 1998). FADD, por sua vez, liga a caspase-8 por interação homotípica entre seus domínios efetores de morte (DED). Uma vez ativa, a caspase-8 ativa cliva as caspases efetoras -3 e -7 ativando-as e fazendo com que as células entrem em apoptose como consequência da clivagem de várias proteínas vitais por estas caspases efetoras (FISCHER et al. 2003).

- **Via Intrínseca:** A liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol é fundamental para a formação do apoptossomo e subsequente ativação de caspases na via de apoptose intrínseca. O mecanismo pelo qual ocorre a liberação do citocromo c ainda é controverso, mas existem inúmeras evidências de que membros da família de proteínas Bcl-2 (Bid truncado – tBid) são mediadores chave para essa liberação no contexto do estímulo apoptótico. A

família de proteínas Bcl-2 é composta por inúmeros membros que, de acordo com sua estrutura e função, podem ser divididos em três subfamílias. Uma delas é a subfamília dos membros anti-apoptóticos, que apresentam quatro domínios de homologia a Bcl-2 (Bcl-2 homólogo – BH1-4) e tem como membros as proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 e Bcl-B. As duas outras subfamílias são compostas por membros pró-apoptóticos, que podem ter três domínios BH (BH1-3), como Bax, Bak e Bok, ou apenas o domínio BH-3, chamadas de BH3-*only*, como Bim, Bad, Bik, Bid, Noxa, Puma, Bmf e Hrk (TAYLOR et al. 2008).

As proteínas responsáveis pela permeabilização da membrana externa mitocondrial são Bax e Bak, e sua atividade seria controlada pelos membros anti-apoptóticos e BH3-*only* de maneiras distintas. Em células saudáveis, Bax existe como um monômero citosólico (HSU e YOULE 1998), enquanto Bak reside na membrana externa mitocondrial onde parece estar ligado a Mcl-1 (CUCONATI et al. 2003) e Bcl-xL (WILLIS et al. 2005). Na ausência de estímulo apoptótico, acredita-se que os membros anti-apoptóticos da família impeçam a permeabilização mitocondrial pelos membros pró-apoptóticos Bax e Bak através de uma interação direta entre essas proteínas. Após a indução de apoptose, membros pró-apoptóticos BH3-*only* seriam capazes de se ligarem a uma cavidade hidrofóbica formada pelos domínios BH1-3 nos membros anti-apoptóticos, liberando as proteínas Bax e Bak da inibição. Bax sofreria uma mudança conformacional, integrando a membrana externa mitocondrial através de seu C-terminal

(CARTRON et al. 2002) onde oligomerizaria assim como Bak. Acredita-se que a oligomerização de Bax e Bak cause a permeabilização da membrana externa mitocondrial ou ativação das proteínas responsáveis pela permeabilização mitocondrial permitindo o e fluxo de proteínas apoptóticas para o citosol (HUNTER et al. 2007).

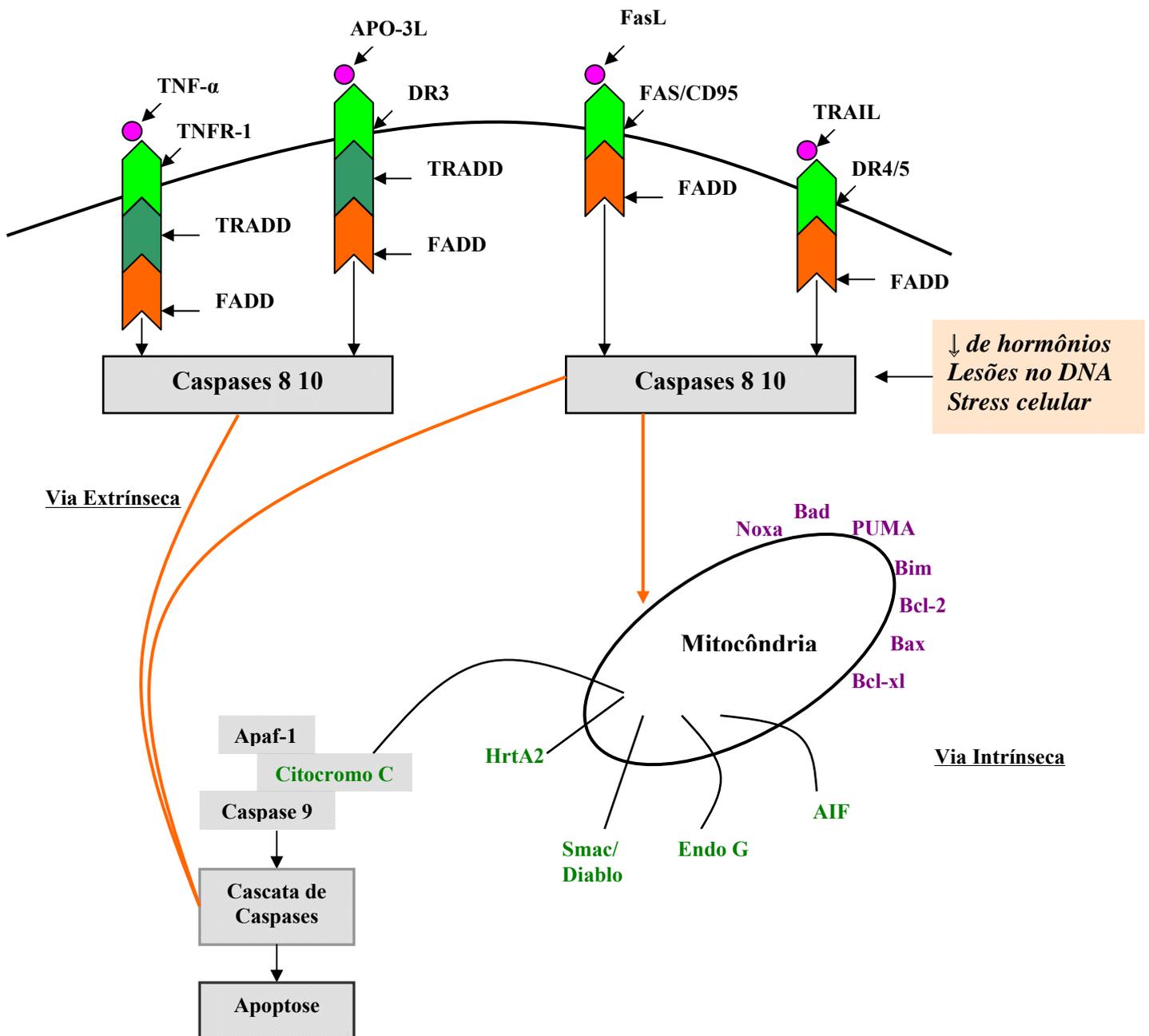


Figura 4 - As duas principais vias apoptóticas. A via extrínseca é induzida pela ativação de receptores como o FAS, o receptor de TNF- α , DR3 (death receptor 3), DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5) por seus ligantes, que ativam as caspases iniciadoras 8 e 10. Ativada, a caspase 8 estimula a apoptose via duas cascatas paralelas: ele pode diretamente clivar e ativar a caspase-3 (via extrínseca), ou alternativamente, pode clivar Bid, uma proteína pró-apoptótica da família do Bcl-2 (via intrínseca). Bid truncado (tBid) estimula a liberação várias moléculas pró-apoptóticas da mitocôndria, como Smac / Diablo, AIF, HtrA2 e EndoG, além do citocromo c. O citocromo c liga-se ao fator de ativação de protease de apoptose 1 (APAF-1) e forma um complexo de ativação (o apoptossoma) juntamente com a caspase 9. As proteínas da família Bcl-2 regulam a apoptose através do controle da permeabilidade mitocondrial.

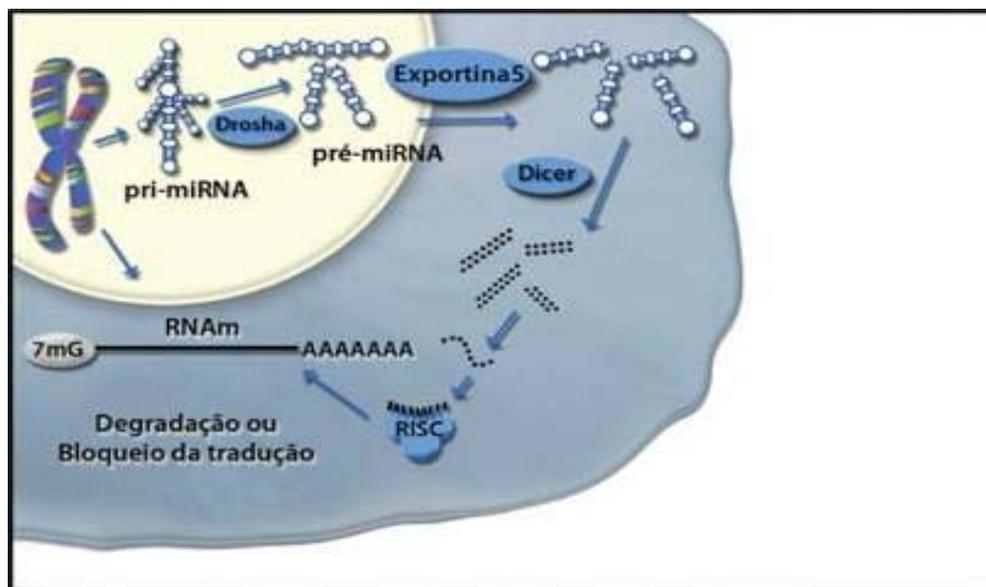
Alguns estudos avaliaram a participação da via apoptótica no desenvolvimento de tumores de glândula salivar, analisando a expressão de poucas moléculas por imunistoquímica e expressão gênica, especialmente o papel do Bcl-2 e da survivina. Contudo os resultados ainda são contraditórios (SOINI et al. 1998; AOKI et al. 2004; STENNER et al. 2010; GOMES et al. 2012; FERREIRA et al. 2014).

Recentes estudos têm demonstrado a regulação do processo de apoptose por microRNAs (LYNAM-LENNON et al. 2009; REYNOLDS et al. 2009).

1.4 MICRORNAS

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19–25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (LYNAM-LENNON et al. 2009). Em humanos já foram identificados 2588 microRNAs maduros (<http://www.mirbase.org/>, Release 21: June 2014). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' (e, eventualmente, na região 5') não traduzida de RNAs mensageiros (RNAm) alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Figura 5). Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos.

Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoese, entre outras funções (LYNAM-LENNON et al. 2009; SU et al. 2015).



Fonte: Modificado de LYNAM-LENNON et al. (2009).

Figura 5 - Biossíntese do microRNA. Primeiramente a RNA polimerase II (Pol II) facilita a transcrição do gene do miRNA no núcleo. O transcrito primário resultante (pri-miRNA) é então clivado pelo Drosha e pelo DGCR8, produzindo o precursor molecular (pré-miRNA). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma pelo Exportina-5 e pelo Ran-GTP. O pré-miRNA sofre seu processamento final, que envolve sua clivagem pelo Dicer e pelo TRBP abaixo da haste-laço. Isto produz uma molécula dupla, composta pela fita única de miRNA maduro e uma molécula de miRNA fragmentado*. O complexo miRNA/miRNA* é incorporado ao complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC). O fragmento de miRNA* é degradado, ao passo que a molécula de miRNA maduro orienta o RISC com o mRNA alvo.

A interação entre um miRNA e seu mRNA alvo é restrita à extremidade 5' do miRNA. Uma sequência complementar entre nucleotídeos é vital para o reconhecimento (LEWIS et al. 2003). Se o miRNA tem suficiente complementaridade em sua sequência (quase idêntico) com o mRNA alvo; e baseando-se em sua estabilidade bioquímica para a escolha da fita funcional, então a regulação é efetuada por um processo chamado interferência de RNA, em que o complexo RISC cliva o mRNA alvo (HUTVAGNER e ZAMORE 2002). Se houver complementaridade insuficiente, o qual é geralmente o caso em mamíferos (LEWIS et al. 2003), a regulação é alcançada pela repressão da tradução (OLSEN e AMBROS 1999; PILLAI et al. 2005; PETERSEN et al. 2006; WANG et al. 2006).

Os miRNAs estão envolvidos em processos homeostáticos importantes, tais como a proliferação e a morte celular (EVAN e VOUSDEN 2001; CHENG et al. 2005). A expressão aberrante de miRNAs tem importante papel no desenvolvimento do câncer (LYNAM-LENNON et al. 2009). 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; SU et al. 2015). Alguns microRNAs podem ter função oncogênica em uma célula ou tecido específico, mas supressor de tumor em outro, dependendo do contexto do tecido e genes alvos (GASCHE e GOEL 2012).

Um exemplo de função oncogênica dos microRNAs é o aumento da expressão dos microRNAs da família 29 que induz o processo de transição epitélio-mesênquima e a metástase tumoral. De maneira recíproca, os microRNAs podem ser caracterizados como supressores de tumor se sua ação normal é oposta a oncogênese (let-7, miR-15a/16-1, miR-34a, miR-143/145) (SPIZZO et al. 2009).

A expressão aberrante de microRNAs relacionados ao processo de apoptose pode levar ao estímulo ou inibição desse processo. Um exemplo é o miR-15a, que é capaz de se ligar ao gene que codifica a proteína Bcl-2, que é anti-apoptótica, sendo considerado um microRNA pró-apoptótico (LIMA et al. 2011). Outro exemplo é, o miR-29 cuja diminuição de expressão pode levar à indução da apoptose pela via do p53 e do MCL1 (SPIZZO et al. 2009; SU et al. 2015) (Figura 6).

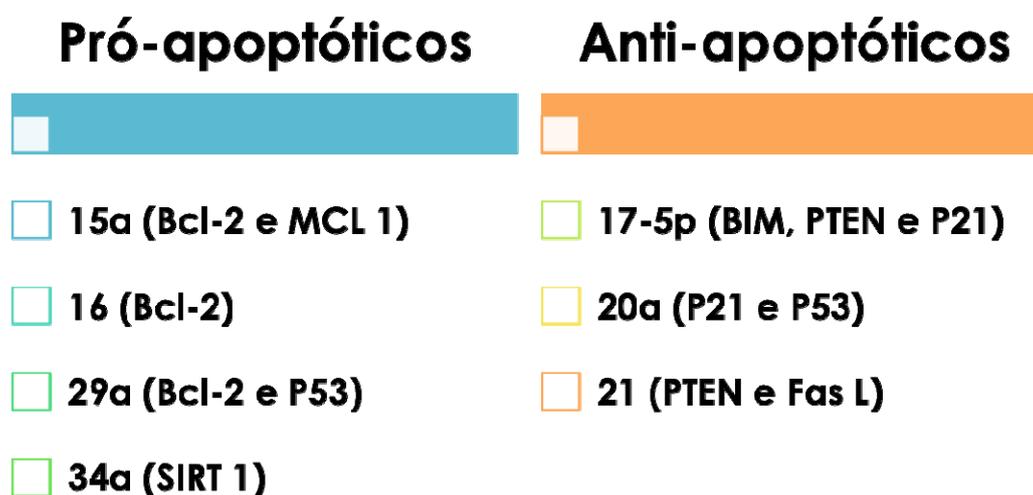


Figura 6 - Classificação dos microRNAs com relação a apoptose. Um microRNA que possui complementaridade com um gene pró-apoptótico, por exemplo, é denominado como um miR anti-apoptótico.

Poucos estudos têm avaliado o papel dos miRNAs no desenvolvimento/progressão dos tumores de glândula salivar. ZHANG et al. (2009), comparando amostras de adenoma pleomórfico e glândula salivar normal, identificaram um conjunto de 22 miRNAs diferencialmente expressos com um aparente aumento de expressão nos tumores, sendo os microRNAs -376a, -301 e -21 já descritos como apresentando aumento de expressão em diversos tumores sólidos.

MITANI et al. (2013) identificaram diferentes padrões de expressão de miRNAs comparando glândula salivar normal e carcinoma adenoide cístico (ACC), sugerindo que o aumento de expressão do cluster miR-17-92 possa desempenhar um papel importante na biologia do ACC e ser potencialmente alvo de novos estudos terapêuticos. Um outro estudo, utilizando linhagem celular de carcinoma adenoide cístico (ACC-2) demonstrou que o miRNA-155 parece ter um papel importante para o crescimento e invasão do ACC, regulando a via EGFR/NFκB (LIU et al. 2013).

Análise global de expressão de microRNAs identificou 4 microRNAs diferencialmente expressos entre linhagens de carcinoma adenóide cístico metastática e não-metastática (miR-4487 e miR-4430 estavam com expressão aumentada e miR-5191 e miR-3131 estavam com a expressão diminuída na linhagem metastática) (CHEN et al. 2014).

MATSE et al. (2013) utilizando amostras de saliva de pacientes com tumores benignos e malignos da glândula parótida também identificaram miRNAs diferencialmente expressos: miR-374, miR-222, miR-15b, let-7g e miR-132.

ANDREASEN et al. (2015) analisaram a via da IL-6/STAT3 e demonstraram por imunohistoquímica que IL-6, JAK1, JAK2 e STAT3 estavam com expressão aumentada em adenoma pleomórfico. Experimentos de hibridização in situ demonstraram que o miR-181b estava com expressão aumentada no adenoma pleomórfico e a expressão do miR-21 foi indetectável tanto em adenoma pleomórfico quanto em amostras de glândulas normais.

1.5 JUSTIFICATIVA

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso, tornando a identificação de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico importante. O processo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese de estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares. Os miRNAs são pequenas moléculas e modulam múltiplas vias oncogênicas, inclusive a apoptose. Diversos trabalhos têm demonstrado alterações na expressão de miRNAs em diferentes tumores. Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel dos miRNAs no desenvolvimento/progressão dos tumores de glândula salivar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de microRNAs relacionados à regulação da apoptose em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a expressão dos microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29a e miR-34a utilizando a técnica de qRT-PCR;
- 2 Comparar a expressão dos microRNAs entre o adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide;
- 3 Associar a expressão dos miRNAs com características clínicas e patológicas dos tumores;
- 4 Avaliar a expressão de genes APAF-1, BAD, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, DIABLO e TP53, regulados por esses microRNAs, utilizando a técnica de qRT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas 48 amostras congeladas de tumores de glândula salivar provenientes de cirurgias realizadas no período do ano 2000 a 2012; sendo 25 casos de adenoma pleomórfico e 23 casos carcinoma mucoepidermóide e 10 amostras de glândulas salivares não neoplásicas, derivadas do Biobanco de tumores do A.C. Camargo Cancer Center. Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada paciente foram coletados nos prontuários arquivados no SAME do A.C. Camargo Cancer Center.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Instituição (CEP) sob o n°. 1578/11E, no dia 22 de outubro de 2013 (Anexo 1).

3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS

3.2.1 Extração do RNA total

As amostras de tecido foram macrodissecadas para retirada de material contaminante e o tecido congelado foi homogeneizado pelo equipamento Precelly®s (Carlsbad, California, USA) sendo o RNA total extraído utilizando-se o miRNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA).

O RNA total foi incubado em solução 20 mM de Tris HCl pH 8.4 2 mM MgCl₂, 50 mM de KCl e 1U de DNase I (Invitrogen)/1ug de RNA a temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi posteriormente inativada pela adição de 2,5 mM de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram precipitadas por 16 horas a - 20°C em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com etanol 75% e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi então seco e ressuspenso em água livre de DNase/RNase.

3.2.2 Síntese do cDNA

Dez nanogramas de RNA total foram submetidas a uma reação enzimática modulada pela ação da enzima transcriptase reversa, permitindo a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o *kit* TaqMan microRNA RT (Life Technologies). A reação continha solução tampão (1,5 µL), deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (0,15µL), transcriptase reversa (*Multiscribe reverse transcriptase*) (1µL), enzima inibidora de RNase (*RNase Inhibitor*) (0,19 µL) e água ultrapura (4,16 µL). Sendo que para cada 15µL de reação, seguiu-se a seguinte proporção:

- ✓ 7 μ L de RT master mix : 5 μ L RNA total (10 ng por reação) : 3 μ L de RT oligonucleotídeo específico (concentrado 5X)

A reação foi incubada a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos em um termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems) e o produto da síntese armazenado a -20°C.

3.2.3 Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O volume final de reação foi de 20 μ L, sendo que cada tubo continha 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix II, 7,67 μ L de água ultrapura 1 μ L de TaqMan Small RNA Assay (específico para cada microRNA) e 1,33 μ L de produto de síntese de cDNA. Os experimentos foram realizados em duplicata. Foram analisados os miRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR20a, miR21, miR-29a e miR-34a, descritos como relacionados à via da apoptose (Anexo 2).

A amplificação foi feita 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 amplificação foi feita no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. O nível de expressão de cada microRNA foi quantificado relativamente à expressão de um controle (referência). Para a determinação do controle foi utilizada a ferramenta RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Esse software, através da análise do perfil de amplificação dos controles, calcula aqueles com

expressão mais estável no conjunto de amostras analisadas. Para essa análise foram utilizadas 11 amostras de adenoma pleomórfico, 12 amostras de carcinoma mucoepidermóide e 1 *pool* composto por 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas. Foram testados microRNAs e *small nuclear* RNAs, sendo selecionado como referência o *small nuclear* RNA RNU48, conforme demonstrado na Figura 7.



Fonte: Modificado de <http://www.leonxie.com/referencegene.php> (Acessado em 2015).

Figura 7 - Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão dos microRNAs. Resultado da análise de seleção de microRNAs e *small nuclear* RNAs mais estáveis para a normalização dos experimentos de RT-PCR em tempo real utilizando-se amostras de glândulas salivares humanas normais e tumorais (adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide).

O nível de expressão de cada microRNA também foi quantificado relativamente à expressão de uma amostra calibradora (*pool* de 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas). O resultado final (Rq_{microRNA}) foi

expresso como um aumento ou diminuição da expressão do microRNA em n-vezes quando comparado à referência e ao calibrador, da seguinte forma:

$Rq_{\text{microRNA}} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}})}$, onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do microRNA estudado do valor médio de Ct do *small nuclear RNA* usado como referência.

Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos miRNAs nas amostras tumorais em comparação com as amostras não neoplásicas foi utilizado o seguinte valor:

Diminuição de expressão: Expressão (Rq) $\leq 0,5$

Aumento de expressão: Expressão (Rq) $\geq 2,0$

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

3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GÊNICA

3.3.1 Determinação dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo

Foi realizada uma análise *in silico* para a determinação dos mRNAs alvo preditos e validados experimentalmente para os microRNAs avaliados. Foi utilizada a ferramenta miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>). Na Figura 8 pode-se observar o resultado dessa análise para o miR-15a, sendo demonstrado que o gene

BCL2 apresenta uma forte evidência de ser regulado por esse microRNA, o que já é demonstrado por 12 trabalhos publicados.

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Strong evidence			Less strong evidence				Sum	# of papers
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	psILAC	Other		
MIRT000280	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	BMI1	✓	✓					✓	3	1
MIRT000282	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	WNT3A	✓		✓				✓	3	2
MIRT000283	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	MYB	✓	✓	✓	✓			✓	5	3
MIRT000284	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	CDC25A	✓						✓	2	1
MIRT000285	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	CCND2	✓				✓		✓	3	3
MIRT000804	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	RAB9B							✓	1	1
MIRT000806	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	ACTR1A							✓	1	1
MIRT000808	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	TPI1							✓	1	1
MIRT000810	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	PDCD4			✓				✓	2	1
MIRT000812	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	RAB21			✓				✓	2	1
MIRT000815	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	BCL2	✓	✓	✓	✓			✓	5	12
MIRT000817	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	WT1			✓				✓	2	1
MIRT000819	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	ASXL2				✓			✓	2	1
MIRT000823	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	TMEM251				✓			✓	2	1
MIRT000825	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-15a-5p	CARD8				✓			✓	2	1

Fonte: Modificado miRTarBase (2015).

Figura 8 - Esquema representativo da avaliação de alvos de microRNAs utilizando a ferramenta miRTarBase. Os genes regulados pelos microRNAs são selecionados com base em avaliação experimental, sendo atribuída uma somatória de pontos de acordo com a validação já existente. Também é apresentado o número de trabalhos já publicados com essa validação experimental.

3.3.2 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, a partir de 1000ng de RNA total, em uma reação com volume final de 20 µL, sendo que cada tubo continha 2 µL de 10 x RT Buffer; 0,8 µL de 25 x dNTP mix; 2 µL de 10 x Random Primers; 1

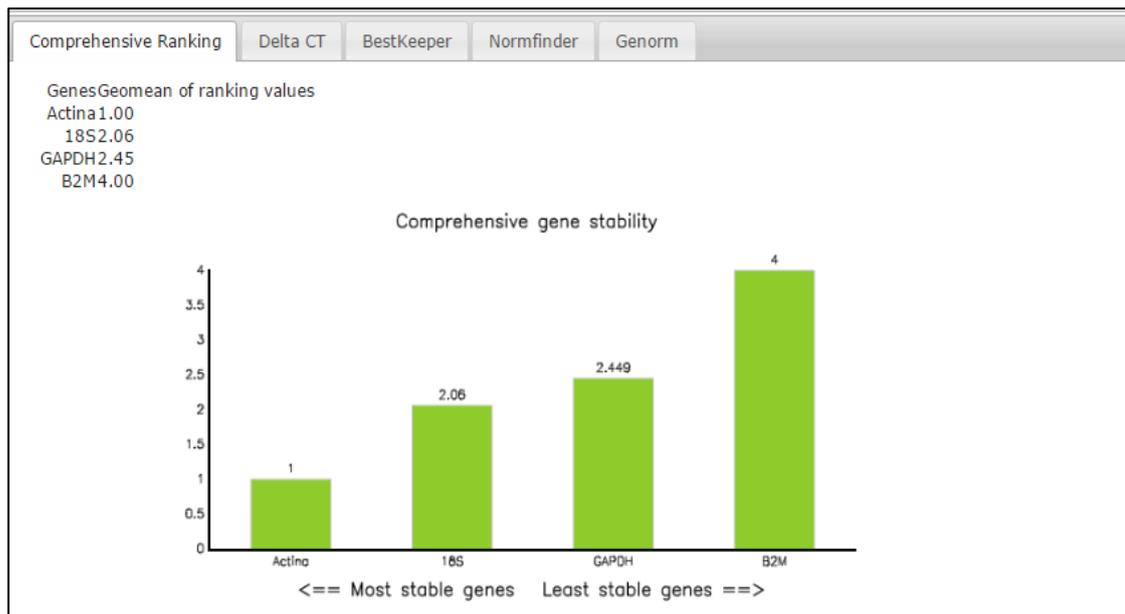
μL de Enzima Multiscribe; 1 μL de RNase out; 13,2 μL de RNA. A reação foi incubada em termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems) a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos, a 85°C por 5 minutos e armazenado a -20°C.

3.3.3 Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O volume final de reação foi de 20 μL , sendo que cada tubo continha 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix II, 4,0 μL de água ultrapura, 5,0 μL (10ng) do cDNA e 1 μL de TaqMan Gene Expression Assay (específico para cada gene) (Anexo 2). Os experimentos foram realizados em duplicata.

A amplificação foi feita 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 amplificação foi feita no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Assim como na análise dos microRNAs, o nível de expressão de cada gene foi quantificado relativamente à expressão de um controle (referência), selecionado utilizando-se a ferramenta RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Para essa análise foram utilizadas 14 amostras de adenoma pleomórfico, 9 amostras de carcinoma mucoepidermóide e 1 *pool* composto por 10 amostras de glândula não neoplásicas. Foram testados os genes da β -actina 18S, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -2-microglobulina (B2M); sendo selecionado o gene β -actina como referência, conforme demonstrado na Figura 9.



Fonte: Modificado de <http://www.leonxie.com/referencegene.php> (2015).

Figura 9 - Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão gênica. Resultado da análise de seleção do gene mais estável para a normalização dos experimentos de RT-PCR em tempo real utilizando amostras de glândulas salivares humanas normais e tumorais (adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide).

Assim como na análise nos microRNAs, o nível de expressão de cada gene também foi quantificado relativamente à expressão de um *pool* composto por 10 amostras de glândula salivar não-neoplásica (amostra calibradora). O resultado final (Rq_{gene}) foi então expresso como um aumento ou diminuição da expressão do gene em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:

- $Rq_{\text{gene}} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}})}$, onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do gene estudado do valor médio de Ct do gene usado como referência.

Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos genes nas amostras tumorais em comparação com as amostras não neoplásicas foi utilizado o seguinte valor:

Diminuição de expressão: Expressão (Rq) $\leq 0,5$

Aumento de expressão: Expressão (Rq) $\geq 2,0$

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

Uma visão geral dos procedimentos realizados neste estudo pode ser observada na Figura 10.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os resultados de expressão dos microRNAs e genes obtidos por RT-PCR em tempo real entre os diferentes tumores foi realizada por meio do 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 2.13 (R Development Core Team 2010).

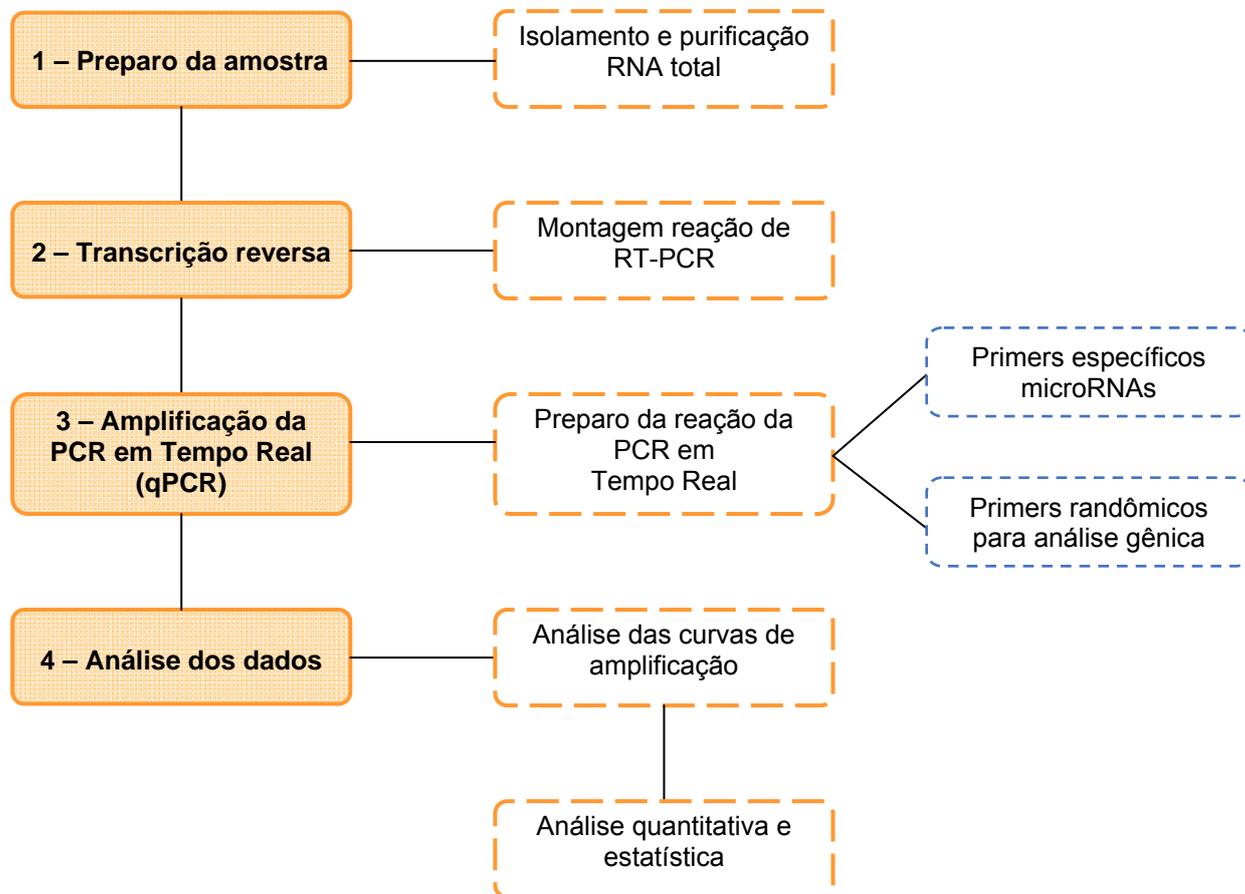


Figura 10 - Visão global procedimentos. Esquema demonstrando visão global dos procedimentos realizados no projeto.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

Analisando as características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico, observamos que a maior parte dos pacientes era do sexo feminino, com mais de 40 anos. Todos os tumores se originaram na parótida e somente um paciente apresentou recorrência (Tabela 1).

Tabela 1 - Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com adenoma pleomórfico

Característica	Número de casos (%)
Gênero	
Feminino	17 (68,0)
Masculino	8 (32,0)
Raça	
Branca	22 (88,0)
Não branca	2 (8,0)
Informação não disponível	1 (4,0)
Idade	
< = 40 anos	9 (36,0)
> 40 anos	16 (64,0)
Local	
Parótida	25 (100,0)
Recorrência	
Sim	1 (4,0)
Não	24 (96,0)

A maioria dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide era do sexo feminino, com mais de 40 anos, sendo que a maior parte dos tumores ocorreram na parótida (52,2%). Em 13,1% dos casos houve desenvolvimento de metástases (ósseas, cerebral, muscular, renal, ocular e hepática); e a infiltração perineural foi observada em 30,4% dos tumores (Tabela 2).

Tabela 2 - Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide

Característica	Número de casos (%)
Gênero	
Feminino	12 (52,2)
Masculino	11 (47,8)
Raça	
Branca	16 (69,6)
Outras	2 (8,7)
Informação não disponível	5 (21,7)
Idade	
< = 40 anos	6 (26,1)
> 40 anos	17 (73,9)
Local	
Parótida	12 (52,2)
Submandibular	1 (4,3)
Glândulas Salivares Menores	12 (43,5)
Linfonodos comprometidos	
Sim	10 (43,5)
Não	3 (13,0)
Informação não disponível	10 (43,5)
Metástase	
Sim	9 (39,1)
Não	13 (56,5)
Informação não disponível	1 (4,4)
Infiltração Perineural	
Sim	7 (30,4)
Não	16 (69,6)
Recorrência	
Sim	7 (30,4)
Não	15 (65,2)
Informação não disponível	1 (4,4)

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS

Foi avaliada a expressão dos microRNAs miR-15a (48 amostras), miR-16 (48 amostras), miR-17-5p (46 amostras), miR-20a (47 amostras), miR-21 (47 amostras), miR-29a (48 amostras) e miR-34a (48 amostras) nas amostras de carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico.

Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não neoplásico. Desta forma, observamos que os microRNAs miR-15a, -16, -17-5p, -21, -29a e -34a apresentaram aumento de expressão em 76,0%, 60,0%, 47,8%, 80,0%, 84,0% e 96,0% das amostras de adenoma pleomórfico, respectivamente. Por outro lado, na análise da expressão do miR-20a, pode-se observar a diminuição da sua expressão em 75,0% das amostras (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3 - Expressão relativa de microRNAs reguladores da apoptose em amostras de adenoma pleomórfico em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas

Adenoma Pleomórfico	miR-15a	miR-16	miR-17-5p	miR-20a	miR-21	miR-29a	miR-34a
Expressão aumentada	19 (76,0%)	15 (60,0%)	11 (47,8%)	0 (0,0%)	20 (80,0%)	21 (84,0%)	24 (96,0%)
Expressão diminuída	0 (0,0%)	1 (4,0%)	3 (13,1%)	18 (75,0%)	1 (4,0%)	0 (0,0%)	1 (4,0%)
Expressão normal	6 (24,0%)	9 (36,0%)	9 (39,1%)	6 (25,0%)	4 (16,0%)	4 (16,0%)	0 (0,0%)
Total de Amostras	25 (100,0%)	25 (100,0%)	23 (100,0%)	24 (100,0%)	25 (100,0%)	25 (100,0%)	25 (100,0%)

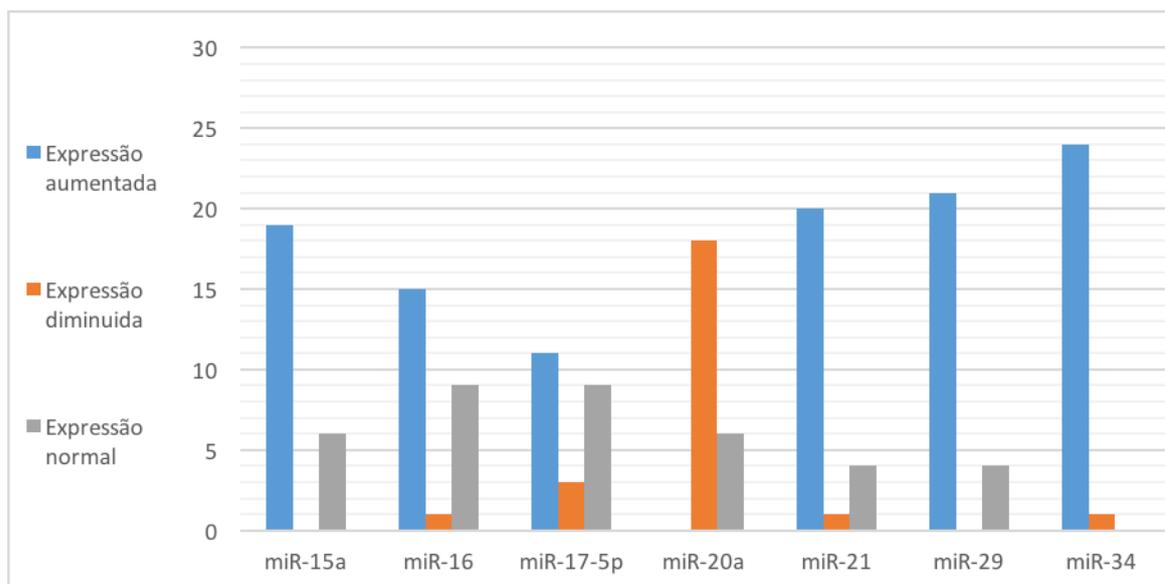


Figura 11 - Análise da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em amostras de adenoma pleomórfico. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do RNU48 (*small nucleolar RNA* utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide, os microRNAs miR-15a, -17-5p e -29a apresentaram expressão similar à observada no tecido não-neoplásico. O miR-20a apresentou expressão diminuída em 52,0% das amostras e os microRNAs miR-21 e -34 que apresentaram aumento de expressão em 90,9% e 73,9% das amostras de carcinoma mucoepidermóide, respectivamente. O miR-16 se apresentou com o mesmo número de casos com expressão normal e expressão aumentada (Tabela 4 e Figura 12).

Tabela 4 - Expressão relativa de microRNAs reguladores da apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas

Adenoma Pleomórfico	miR-15a	miR-16	miR-17-5p	miR-20a	miR-21	miR-29a	miR-34a
Expressão aumentada	9 (39,1%)	10 (43,5%)	9 (39,1%)	0 (0,0%)	20 (90,9%)	0 (0,0%)	17 (73,9%)
Expressão diminuída	3 (13,1%)	3 (13,0%)	2 (8,7%)	13 (56,5%)	0 (0,0%)	6 (26,1%)	0 (0,0%)
Expressão normal	11 (47,8%)	10 (43,5%)	12 (52,2%)	10 (43,5%)	2 (9,1%)	17 (73,9%)	6 (26,1%)
Total de Amostras	23 (100,0%)	23 (100,0%)	23 (100,0%)	23 (100,0%)	22 (100,0%)	23 (100,0%)	23 (100,0%)

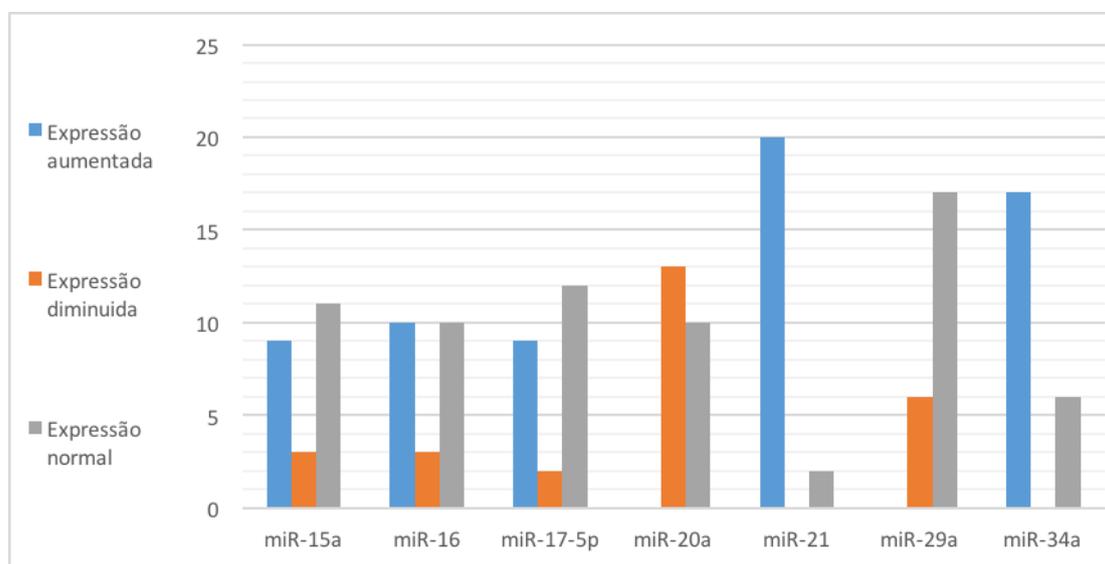


Figura 12 - Análise da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do RNU48 (*small nucleolar RNA* utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

4.2.1 Análise Estatística

Na análise de comparação da expressão dos miRNAs entre os casos de adenoma pleomórfico e de carcinoma mucoepidermóide foi observado que os microRNAs miR-15a, miR-29a e miR-34a foram mais expressos nas amostras de adenoma pleomórfico ($p=0,0186$, $p<0,001$ e $p=0,0172$, respectivamente). Esses resultados estão descritos na Tabela 5.

Devido ao número pequeno de amostras não foi possível fazer a análise de associação entre a expressão dos microRNAs e características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide.

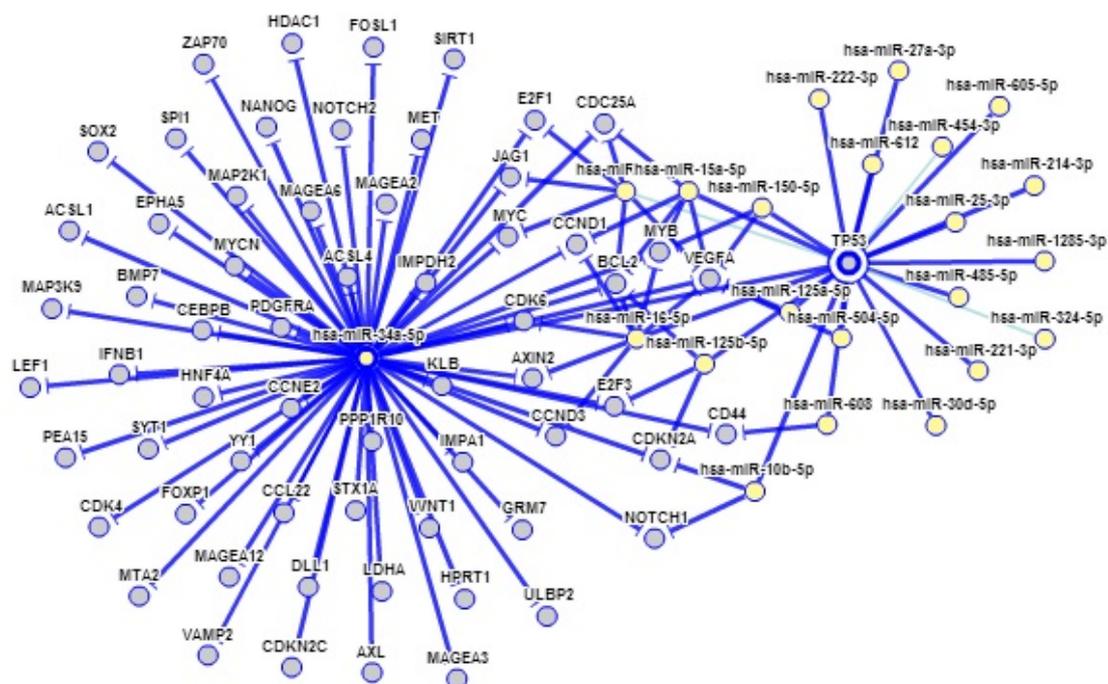
Tabela 5 - Comparação da expressão dos microRNAs reguladores de apoptose em carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico

		Carcinoma Mucoepidermóide	Adenoma Pleomórfico	Total	p-valor
miR-15a	≤ 0.5	3 (13)	0 (0)	3	0,0186
	0.5 - 2	11 (48)	6 (24)	17	
	> 2	9 (39)	19 (76)	28	
miR-16	≤ 0.5	3 (13)	1 (4)	4	0,3729
	0.5 - 2	10 (43)	9 (36)	19	
	> 2	10 (43)	15 (60)	25	
miR-17-5p	≤ 0.5	2 (9)	3 (13)	5	0,6608
	0.5 - 2	12 (52)	9 (39)	21	
	> 2	9 (39)	11 (48)	20	
miR-20a	≤ 0.5	13 (59)	19 (79)	32	0,2471
	0.5 - 2	9 (41)	5 (21)	14	
miR-21	≤ 0.5	0 (0)	1 (4)	1	0,4768
	0.5 - 2	2 (9)	4 (16)	6	
	> 2	20 (91)	20 (80)	40	
miR-29a	≤ 0.5	6 (26)	0 (0)	6	$<0,001$
	0.5 - 2	17 (74)	4 (16)	21	
	> 2	0 (0)	21 (84)	21	
miR-34	≤ 0.5	0 (0)	1 (4)	1	0,0172
	0.5 - 2	6 (26)	0 (0)	6	
	> 2	17 (74)	24 (96)	41	

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.3.1 Determinação dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo

Foi realizada uma análise *in silico* para a determinação dos mRNAs alvo preditos e validados experimentalmente para os microRNAs avaliados, utilizando-se a ferramenta miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>), como podemos observar na Figura 13.



Fonte: Modificado de miRTarBase (2015).

Figura 13 - Esquema da ferramenta miRTarBase. Demonstra os genes regulados pelo miR-34a e, por outro lado, os microRNAs que modulam o gene TP53, sendo que o TP53 é um dos alvos do miR-34a.

Na Tabela 6 podemos observar os genes que modulam a (as) via (s) apoptóticas (conforme descrição na Figura 4) e que foram selecionados para a avaliação da expressão gênica.

Tabela 6 - Genes alvo de microRNAs reguladores da apoptose avaliados em amostras de carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>)

Genes	microRNAs reguladores
BAD	34a
BAX	16a
BCL-2	15a/16a/17-5p/20a/21/29/34a
BID	21
APAF1	21
CASP2	17-5p/20a
CASP3	29
CASP6	17-5p/20a
CASP7	29a
CASP8	17-5p/20a/29a
DIABLO	16a/29a/34a
TP53	15a/16a/21/34a

Foi avaliada a expressão dos genes BAD, BAX, BCL2, BID, APAF1, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, DIABLO e TP53 em 12 amostras de carcinoma mucoepidermóide e 10 amostras de adenoma pleomórfico.

Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não neoplásico. Desta forma, observamos que os genes APAF1, BAD, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP8, DIABLO e TP53 com a expressão aumentada em 80,0%, 80,0%, 80,0% 100,0%, 50,0%, 40,0%,

80,0%, 80,0% e 100,0%, respectivamente, enquanto os genes CASP3, CASP6 e CASP7 se apresentaram com a expressão normal nas amostras de adenoma pleomórfico (75,0%, 85,7% e 77,8%, respectivamente) (Figura 14 e Tabela 7).

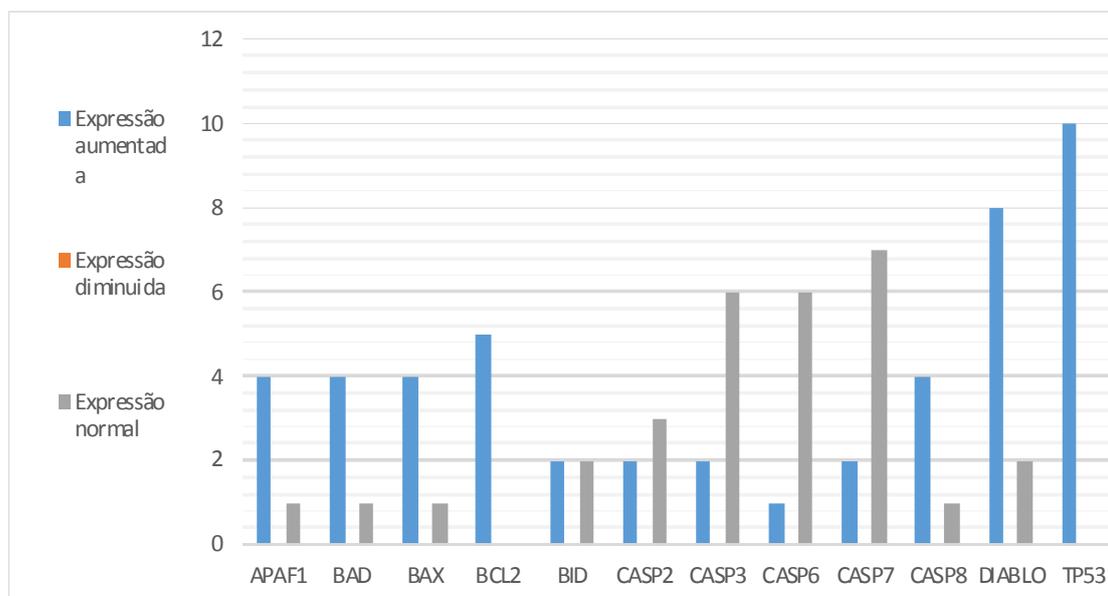


Figura 14 - Análise da expressão dos genes reguladores de apoptose em amostras de adenoma pleomórfico. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do gene β -actina (utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

Tabela 7 - Expressão relativa dos genes reguladores da apoptose em amostras de adenoma pleomórfico em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas

Adenoma Pleomórfico	APAF1	BAD	BAX	BCL2	BID	CASP2	CASP3	CASP6	CASP7	CASP8	DIABLO	TP53
Expressão aumentada	4 (80,0%)	4 (80,0%)	4 (80,0%)	5 (100,0%)	2 (50,0%)	2 (40,0%)	2 (25,0%)	1 (14,3%)	2 (22,2%)	4 (80,0%)	8 (80,0%)	10 (100,0%)
Expressão diminuída	0 (0,0%)	0 (0,0%)										
Expressão normal	1 (20,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	2 (50,0%)	3 (60,0%)	6 (75,0%)	6 (85,7%)	7 (77,8%)	1 (20,0%)	2 (20,0%)	0 (0,0%)
Total de Amostras	5 (100,0%)	5 (100,0%)	5 (100,0%)	5 (100,0%)	4 (100,0%)	5 (100,0%)	8 (100,0%)	7 (100,0%)	9 (100,0%)	5 (100,0%)	10 (100,0%)	10 (100,0%)

Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide os genes APAF-1, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO e TP53 apresentaram sua expressão aumentada em 66,7%, 83,3%, 58,3%, 91,7%, 58,3%, 54,5%, 50,0%, 87,5%, 50,0% e 83,3%, respectivamente. Os genes BAD e CASP7 encontraram-se com a expressão similar às amostras normais utilizadas como controle em 50,0% e 41,7% das amostras (Tabela 8 e Figura 15).

Tabela 8 - Expressão relativa dos genes reguladores da apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide em comparação com amostras de glândula salivar não neoplásicas

Carcinoma mucoepidermóide	APAF1	BAD	BAX	BCL2	BID	CASP2	CASP3	CASP6	CASP7	CASP8	DIABLO	TP53
Expressão aumentada	8 (66,7%)	5 (41,7%)	10 (83,3%)	7 (58,3%)	11 (91,7%)	7 (58,3%)	6 (54,5%)	6 (50,0%)	3 (25,0%)	7 (87,5%)	6 (50,0%)	10 (83,4%)
Expressão diminuída	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	1 (8,3%)	4 (33,3%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)
Expressão normal	4 (33,3%)	6 (50,0%)	2 (16,7%)	4 (33,4%)	1 (8,3%)	5 (41,7%)	4 (36,4%)	5 (41,7%)	5 (41,7%)	1 (12,5%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)
Total de Amostras	12 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	11 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	8 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)

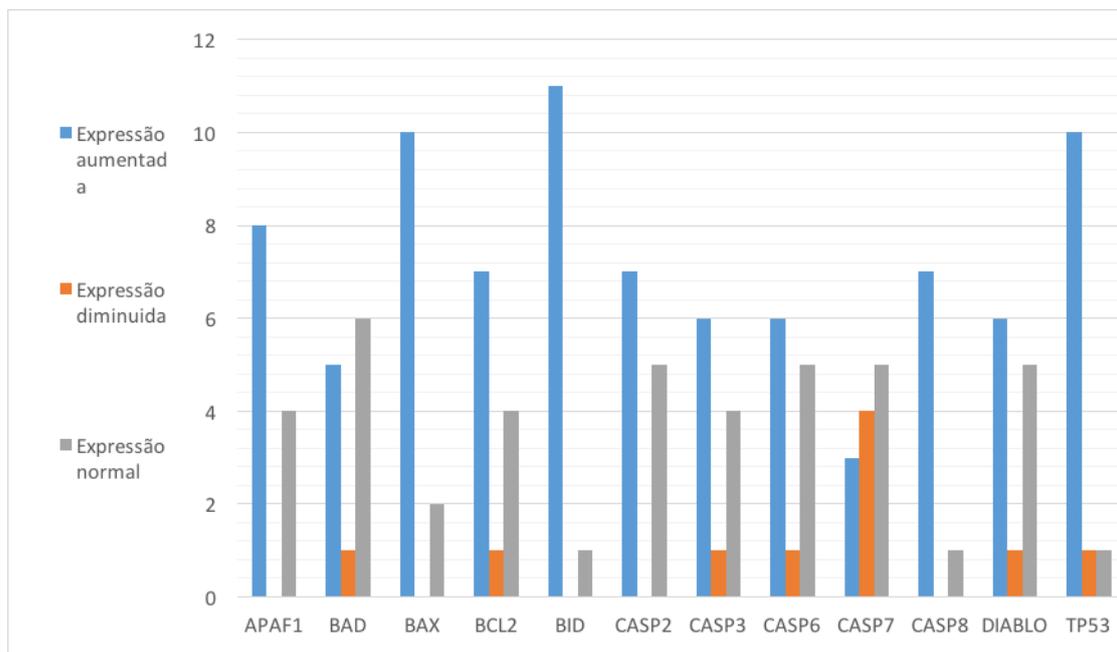


Figura 15 - Análise da expressão dos genes reguladores de apoptose em amostras de carcinoma mucoepidermóide. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do gene β -actina (utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

4.3.2 Análise Estatística

Na análise de comparação da expressão dos genes entre os casos de adenoma pleomórfico e de carcinoma mucoepidermóide não foi observada diferença estatisticamente significativa. Esses resultados estão descritos na Tabela 9.

Devido ao número pequeno de amostras não foi possível fazer a análise de associação entre a expressão dos genes e características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide.

Tabela 9 - Comparação da expressão dos genes reguladores de apoptose em carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico

		Carcinoma mucoepidermóide	Adenoma pleomórfico	Total	p-valor
APAF1	(0,5,2]	4 (33)	1 (20)	5	>0,99
	(2,89.9]	8 (67)	4 (80)	12	
BAD	(0,5,2]	6 (50)	1 (20)	7	0,3383
	(2,16.9]	5 (42)	4 (80)	9	
	[0,0.5]	1 (8)	0 (0)	1	
BAX	(0,5,2]	2 (17)	1 (20)	3	>0,99
	(2,71.9]	10 (83)	4 (80)	14	
BCL2	(0,5,2]	4 (33)	0 (0)	4	0,2286
	(2,66.8]	7 (58)	5 (100)	12	
	[0,0.5]	1 (8)	0 (0)	1	
BID	(0,5,2]	1 (8)	2 (50)	3	0,2673
	(2,98.4]	11 (92)	2 (50)	13	
CASP2	(0,5,2]	5 (42)	3 (60)	8	0,8754
	(2,54.2]	7 (58)	2 (40)	9	
CASP3	(0,5,2]	4 (36)	6 (75)	10	0,223
	(2,34.5]	6 (55)	2 (25)	8	
	[0,0.5]	1 (9)	0 (0)	1	
CASP6	(0,5,2]	5 (42)	4 (57)	9	0,6523
	(2,15.5]	6 (50)	2 (29)	8	
	[0,0.5]	1 (8)	1 (14)	2	
CASP7	(0,5,2]	5 (42)	5 (56)	10	0,7996
	(2,14.5]	3 (25)	2 (22)	5	
	[0,0.5]	4 (33)	2 (22)	6	
CASP8	(0,5,2]	1 (12)	0 (0)	1	>0,99
	(2,116]	7 (88)	5 (100)	12	
DIABLO	(0,5,2]	5 (42)	2 (20)	7	0,2998
	(2,22.5]	6 (50)	8 (80)	14	
	[0,0.5]	1 (8)	0 (0)	1	
TP53	(0,5,2]	1 (8)	0 (0)	1	0,3998
	(2,43.9]	10 (83)	10 (100)	20	
	[0,0.5]	1 (8)	0 (0)	1	

Comparando-se os resultados de expressão dos microRNAs e expressão gênica observamos que em nenhuma das análises o resultado foi estatisticamente significativo (Anexo 3).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a expressão dos microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29 e miR-34a, descritos como reguladores do processo de apoptose, em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares.

Os tumores de glândula salivar são raros, correspondendo a 3-6% dos tumores de cabeça e pescoço e apresentam uma grande diversidade histológica e clínica (KUMAR e PERKINS 2010; CARLSON 2013; NAGAO 2013). Apesar do adenoma pleomórfico e do carcinoma mucoepidermóide apresentarem origem histológica diferente (o adenoma pleomórfico se origina do ducto intercalar enquanto que o carcinoma mucoepidermóide se origina da porção principal do ducto) eles foram selecionados como modelo neste estudo por representarem os tipos histológicos benigno e maligno mais frequentes, respectivamente (BELL e HANNA 2012).

O adenoma pleomórfico representa cerca de 60% dos tumores das glândulas parótidas. São tumores benignos que se apresentam com uma mistura de células ductais (epiteliais) e mioepiteliais, demonstrando diferenciação epitelial e mesenquimal. A maioria dos pacientes avaliados neste estudo era do sexo feminino, com mais de 40 anos e todos os tumores se desenvolveram na parótida. Dados da literatura também indicam essa predominância por mulheres e idade de ocorrência (MENDENHALL et al. 2008).

O carcinoma mucoepidermóide é uma neoplasia composta de células escamosas, células secretoras de muco e células intermediárias. Representam 40% dos tumores malignos ocorridos nas glândulas salivares (MCHUGH et al. 2012), mas ocorrem principalmente (70%) nas parótidas. A maioria dos pacientes avaliados neste estudo era do sexo feminino, com mais de 40 anos. A maior parte dos tumores se desenvolveram na parótida e glândulas salivares menores. Alguns estudos têm demonstrado incidência do carcinoma mucoepidermóide similar entre a parótida e glândulas salivares menores (OLIVEIRA et al. 2009; LIMA et al. 2011) enquanto outros apontam uma predominância da glândula parótida (MCHUGH et al. 2012).

A apoptose parece desempenhar um papel importante na formação luminal de estruturas glandulares (MELNICK e JASKOLL 2000; JASKOLL et al. 2001; PATEL et al. 2006; PRADHAN et al. 2010) e poucos estudos têm avaliado o papel da apoptose no desenvolvimento de tumores de glândula salivar (SOINI et al. 1998; AOKI et al. 2004; STENNER et al. 2010; GOMES et al. 2012; FERREIRA et al. 2014; ACASIGUA et al. 2015). Os microRNAs têm sido apontados como reguladores do processo de apoptose em diversos tipos tumorais (SUBRAMANIAN e STEER 2010; LIMA et al. 2011, COURTHOD et al. 2014).

O miR-15a apresentou expressão aumentada em relação ao tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico. Já nas amostras de carcinoma mucoepidermóide a expressão foi predominantemente similar à do tecido não neoplásico. A diferença na expressão desse microRNA entre os dois tumores foi estatisticamente significativa. Baseando-se em dados

obtidos na literatura, encontramos casos onde o mesmo apresenta expressão diminuída em tumores de cabeça e pescoço (COUTINHO-CAMILLO et al. 2015). O miR-15 tem sido descrito como um microRNA supressor de tumor por sua ação como regulador da proteína anti-apoptótica BCL-2 (CALIN et al. 2002; CIMMINO et al. 2005). Contudo, DE GROEN et al. (2015) demonstraram expressão aumentada do miR-15 em carcinoma colorretal, associada com ganho de número de cópias do cromossomo 13q e sugerindo um papel oncogênico para esse microRNA nesses tumores.

O miR-16 apresentou expressão aumentada em relação ao tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico. No carcinoma mucoepidermóide, não foi observado um padrão de expressão predominante: a mesma proporção de pacientes apresentou expressão aumentada e similar à do tecido não neoplásico. COURTHOD et al. (2014) e COUTINHO-CAMILLO et al. (2015) encontraram um resultado similar ao que encontramos nas amostras de carcinoma mucoepidermóide em carcinoma oral de células escamosas e tumores de cabeça e pescoço, respectivamente.

O miR-17-5p apresentou expressão aumentada em relação ao tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico e expressão similar à do tecido não neoplásico nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. MITANI et al. (2013), em um estudo realizado com mostras de carcinoma adenoide cístico, também observou expressão aumentada do miR-17-5p.

O miR-20 apresentou diminuição de expressão na maioria das amostras em ambos os grupos (adenomas e carcinomas) sendo que, em

nenhuma das amostras este microRNA apresentou aumento de expressão. Ao contrário, outros estudos demonstraram aumento da expressão desse microRNA em amostras de carcinoma de nasofaringe, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e carcinoma anaplásico de tireóide (HUI et al. 2010; ZENG et al. 2012; XIONG et al. 2014). Recentemente, diversos estudos demonstraram que a expressão do cluster miR-17-92 (o qual agrega os seguintes microRNAs: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92a-1) pode ser regulada por vários fatores de transcrição, como o c-myc, E2F, AML1, ciclina D1, ciclina E1 e p53 (ZHANG et al. 2014; HOU et al. 2015; SOKOLOVA et al. 2015).

EL TAYEBI et al. (2013) demonstraram que, em amostras de carcinoma hepatocelular, c-Myc pode induzir a expressão de E2F, o qual induz a expressão do miR-17-5p, que, por sua vez, inibe a expressão de E2F, formando assim um *feedback* negativo, que reduzirá a expressão do próprio miR-17-5p. Já HE et al. (2012) demonstraram que a proteína HIF-1 α pode reduzir a expressão dos microRNAs miR-17 e miR-20a, através da redução da expressão de c-myc em células leucêmicas.

O miR-21 apresentou aumento de expressão na maioria das amostras em ambos os grupos (adenomas e carcinomas). Achado este que corrobora com os demais encontrados na literatura com relação a estudos na área de cabeça e pescoço (REIS et al. 2010; PENNELLI et al. 2014; HOU et al. 2015).

REIS et al. (2010) demonstraram associação da expressão do microRNA miR-21 com a expressão do gene PDCD4 em amostras de

carcinoma oral de células escamosas. A proteína PDCD4 está frequentemente com a expressão diminuída em células tumorais e tem a função de supressora tumoral, estando envolvida na apoptose, transformação celular, invasão, e progressão do tumor. Em nosso estudo observamos expressão aumentada do miR-21. Neste mesmo trabalho, REIS et al., a partir do silenciamento do gene PDCD4 foi avaliado em culturas de células. Contudo a expressão do gene PDCD4 não foi avaliada.

PENNELLI et al. (2014) também observaram expressão aumentada do miR-21 associada à baixa expressão do gene e proteína PDCD4 em amostras de carcinoma medular de tireóide.

HOU et al. (2015) descreveram a possibilidade de o miR-21 ser utilizado como um marcador não invasivo de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Em seu estudo, a análise do miR-21 circulante foi realizada em pacientes com HNSCC antes e após a retirada cirúrgica do tumor: antes da cirurgia observou-se expressão aumentada do miR-21, enquanto após a mesma, foi observada a expressão significativamente diminuída.

O miR-29a apresentou expressão aumentada em relação ao tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico. Já nas amostras de carcinoma mucoepidermóide a expressão foi predominantemente similar à do tecido não neoplásico. A diferença na expressão desse microRNA entre as amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide foi estatisticamente significativa. QIU et al. (2015) observaram expressão aumentada dos microRNAs miR-29a e miR-29b em linhagens celulares de

carcinoma de nasofaringe, associando esse aumento à migração e invasão das células tumorais.

WU et al. (2013) demonstraram, em um ensaio realizado em cultura celular de carcinoma mamário humano, que o aumento da expressão do miR-29 resulta na parada do ciclo celular em G0/G1 prevenindo as células de entrarem na fase S. Contudo, outros estudos têm descrito o miR-29 como um supressor tumoral, inibindo a migração e invasão celular. Estudos têm demonstrado que, em tumores de cabeça e pescoço, este microRNA apresenta expressão diminuída (SPIZZO et al. 2009; KINOSHITA et al. 2013).

O miR-34a apresentou aumento de expressão na maioria das amostras em ambos os grupos (adenomas e carcinomas). Contudo, análise estatística demonstrou que o miR-34a é mais expresso nas amostras de adenoma pleomórfico. Em 2013, MA et al. avaliando a ação do miR-34a em amostras de carcinoma papilífero de tireóide, observaram o aumento da expressão do miR-34a agindo sobre a proteína GAS1 (do inglês, *Growth Arrest Specific 1*), responsável pela parada no ciclo celular, promovendo proliferação celular e inibindo a apoptose através da via PI3K/Akt/BAD. Outros estudos demonstram diminuição da expressão do miR-34 em tumores, como LI et al. (2015) que observaram expressão diminuída do miR-34 em carcinoma oral, e essa diminuição estava associada a um pior prognóstico dos pacientes.

Como forma de validar os resultados obtidos com a análise da expressão dos microRNAs e tornar mais completa a análise do perfil destes

microRNAs em tumores de glândula salivar, foi realizada uma análise da expressão de genes que foram identificados como alvos de um ou mais microRNAs analisados neste trabalho. A seleção dos genes foi realizada utilizando análise *in silico* com a ferramenta miRTarBase.

Os genes APAF1, BAD, BAX, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8 e TP53 têm função pró-apoptótica; enquanto os genes BCL2 e DIABLO têm função anti-apoptótica (CHIPUK et al. 2012; CORREIA et al. 2015).

O gene APAF1 apresentou expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. No estudo de TANASE et al. (2014) este gene apresentou sua expressão diminuída em amostras de adenoma de hipófise. O APAF1 faz parte do complexo do apoptossomo, um efetor de morte celular, que juntamente com o citocromo c e a caspase 9, ativam a apoptose p53-dependente. Esse gene pode ser regulado pelo miR-21, o que poderia impedir a célula de entrar em processo de apoptose. CHOI et al. (2015) analisando carcinoma colorretal demonstraram a presença de mutações no gene APAF1 e presença de heterogeneidade intratumoral mutacional, o que poderia favorecer a tumorigênese afetando a apoptose nas células tumorais.

O gene BAD apresentou expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico e expressão similar à do tecido não neoplásico nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. A proteína BAD faz parte da família BCL2, mediadora da via mitocondrial da apoptose. Esse gene pode ser regulado pelo miR-34a avaliado em nosso estudo. Sendo assim, a

atividade pró-apoptótica do gene BAD poderia ser inibida pela ligação do miR-34a. No estudo de STICKLES et al. (2015), foram avaliados tumores de ovário, mama e colorretal; sendo que nos três tipos tumorais o resultado foi a expressão aumentada deste gene.

O gene BAX apresentou expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. BAX ativa a liberação do citocromo c pelo espaço intermembranar mitocondrial, induzindo a oligomerização da Apaf-1, formando-se, então, o complexo apoptossomo. GOMES et al. (2012) também observaram expressão aumentada do gene BAX em amostras de neoplasias de glândula salivar. CHOI et al. (2015) demonstraram a presença de mutação no gene BAX em amostras de carcinoma colorretal. FERREIRA et al. (2014) observaram diminuição da expressão da proteína BAX em amostras de adenoma pleomórfico. Contudo, não avaliaram a expressão gênica. O gene BAX pode ser regulado pelo microRNA miR-16.

O gene BID não apresentou um padrão predominante de expressão sendo observado a mesma proporção de amostras com aumento de expressão e com expressão similar à do tecido não neoplásico em amostras de adenoma pleomórfico. Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide a expressão desse gene foi aumentada. A proteína BID-truncada inicia a permeabilização da membrana mitocondrial externa, levando à liberação do citocromo c e a ativação do apoptossomo, iniciador da cascata de caspases. O processamento proteolítico de BID para ativar BID truncado é um passo crucial para iniciar a via apoptótica intrínseca, desencadeando a

permeabilização da membrana mitocondrial externa e posterior liberação do citocromo c e Smac/Diablo (BRASACCHIO et al. 2014), além de ser um importante fator de ligação entre as duas vias apoptóticas. Esse gene pode ser regulado pelo miR-21 avaliado em nosso estudo, sugerindo que o aumento de expressão de miR-21 poderia inibir a tradução da proteína BID levando à inibição do processo apoptótico. Já HONG et al. (2014) observaram expressão diminuída da proteína BID em amostras de carcinoma mamário utilizando a técnica de Western Blot.

Os genes CASP2, CASP3 e CASP6 apresentaram expressão similar à observada no tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico e expressão aumentada nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. CASP2 e CASP6 podem ser regulados pelos microRNAs miR-17-5p e miR-20 enquanto que CASP3 pode ser regulado pelo miR-29a. A proteína CASP2 é uma caspase iniciadora enquanto CASP3 e CASP6 atuam como efetoras na cascata de ativação da apoptose (FULDA 2015). O gene CASP2 já foi avaliado no estudo de COUTINHO-CAMILLO et al. (2015) e, assim como nas amostras de carcinoma mucoepidermoide deste estudo, se apresentou com a expressão aumentada em amostras de carcinoma oral de células escamosas. GOMES et. al. (2012) analisaram a expressão do gene CASP3 e observaram que não havia diferença na expressão quando comparado tumores benignos e malignos e que expressão aumentada foi observada em 44% das amostras de neoplasias de glândulas salivares.

O gene CASP7 apresentou expressão similar à observada no tecido não neoplásico nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma

mucoepidermóide. Este gene codifica a proteína CASP7 e pode ser regulado pelo miR-29a avaliado em nosso estudo. Em amostras de carcinoma oral de células escamosas, COUTINHO-CAMILLO et al. (2015) observaram o gene CASP7 com expressão aumentada. VILELLA-ARIAS et al. (2013) demonstraram diminuição da expressão de CASP7 em carcinoma de células renais e associação com a agressividade do tumor.

O gene CASP8 apresentou expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. Este gene codifica a proteína CASP8, uma caspase iniciadora e pode ser regulado pelos microRNAs miR-17-5p, miR-20a e miR-29a avaliados em nosso estudo. Em amostras de carcinoma oral de células escamosas, COUTINHO-CAMILLO et al. (2015) também observaram o gene CASP8 com expressão aumentada. LIAO et al. (2015) demonstraram que expressão aumentada da proteína CASP8 está associada com aumento da incidência de metástase cerebral após a cirurgia em pacientes com carcinoma de pulmão não-pequenas células. LING et al. (2015) demonstraram que baixa expressão da proteína CASP8 e alta expressão da proteína BCL2 está associada a resistência ao tratamento com TRAIL (do inglês, *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*).

O gene TP53 apresentou expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. O gene TP53 tem ação pró-apoptótica, atuando como supressor tumoral, regulando o ciclo celular e o mecanismo da apoptose. Esse gene pode ser regulado pelos microRNAs miR-15a, miR-16, miR-21 e miR-34a avaliados em nosso estudo.

Contudo, o miR-29 já foi descrito também como modulador do gene TP53 através das proteínas p85 α e CDC42. Os microRNAs da família 29 suprimem diretamente p85 α (a subunidade reguladora da PI3-kinase) e CDC42 (da família das GTPases), ambos os quais regulam negativamente p53 (PARK et al. 2009). O gene TP53 é o mais frequentemente mutado em tumores de cabeça e pescoço (AGRAWAL et al. 2011) e essa alteração em TP53 pode promover efeitos na expressão de microRNAs que são induzidos por esse gene (MITRA et al. 2014). Em nosso estudo, porém, não avaliamos a mutação desse gene nos tumores de glândula salivar.

O gene BCL2 apresentou aumento de expressão nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. Esse gene pode ser regulado pelos microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29 e miR-34a avaliados em nosso estudo. A proteína BCL-2 é anti-apoptótica e frequentemente relacionada a doença linfáticas e leucemia (PAN et al. 2015). Porém, devido a sua atividade anti-apoptótica, tem sido amplamente estudada em outros tipos tumorais. GOMES et al. (2012) demonstraram o perfil anti-apoptótico das neoplasias de glândula salivar através da análise dos genes Bax, Bcl-2 e CASP3, que apresentaram expressão similar à observada em nosso estudo. FERREIRA et al. (2014) observaram aumento da expressão da proteína Bcl-2 e diminuição da expressão da proteína pró-apoptótica Bax em amostras de adenoma pleomórfico de glândulas salivares menores, utilizando a técnica de imunohistoquímica.

O gene DIABLO apresentou aumento de expressão nas amostras de

adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide. Esse gene pode ser regulado pelos microRNAs miR-16, miR-29 e miR-34a avaliados em nosso estudo. COUTINHO-CAMILLO et al. (2015) encontraram o gene em questão com a expressão aumentada, também, em amostras de carcinoma oral de células escamosas. Este gene codifica a proteína DIABLO que é encontrada na mitocôndria e age como antagonista de proteínas inibidoras da apoptose. SHINTANI et. al. em 2014 observaram expressão aumentada da proteína DIABLO em carcinoma colorretal, sendo este um importante achado na busca por novas terapias no tratamento do câncer.

Nossos resultados demonstraram alteração na expressão de microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29 e miR-34a em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares. Poucos estudos têm avaliado o papel dos microRNAs em tumores de glândula salivar (ZHANG et al. 2009; MITANI et al. 2013; MATSE et al. 2013; CHEN et al. 2014; ANDREASEN et al. 2015; LIU et al. 2015) e cabe ressaltar que não existem estudos avaliando a expressão desses microRNAs em tumores de glândula salivar.

Os resultados também demonstram alterações na expressão dos genes APAF1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO e TP53 nas amostras de adenoma pleomórfico e alteração dos genes APAF1, BAX, BCL2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO e TP53 nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. Alguns resultados contraditórios poderiam ser explicados pelo fato de que alguns dos genes estudados podem ser regulados por mais de um microRNA do nosso estudo. Da mesma forma,

que diversos outros microRNAs não avaliados neste estudo, podem regular esses mesmos genes. JAMALI et al. (2015) realizando uma revisão sistemática da literatura e meta-análise, avaliaram a associação da expressão de microRNAs com o prognóstico de pacientes com tumores de cabeça e pescoço: a análise de 21 estudos, contando com 1685 pacientes demonstrou diversos microRNAs com expressão aumentada ou diminuída associados a um pior prognóstico. Contudo, somente o miR-21 apresenta um potencial como marcador prognóstico nesse tipo de tumor.

Outros estudos ainda são necessários para demonstrar a participação dos microRNAs reguladores de apoptose no processo de tumorigênese da glândula salivar: a análise da expressão protéica dos alvos dos microRNAs para verificar se houve inibição da tradução das proteínas. A técnica de hibridização *in situ* poderia ser utilizada para verificar a localização desses microRNAs dentro do componente tumoral de cada neoplasia, e também a realização de estudos *in vitro*, avaliando o papel do aumento e diminuição desses microRNAs em linhagens celulares de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide.

6 CONCLUSÕES

- 1 Os microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-34a foram expressos nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar avaliadas:
 - Os microRNAs miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-21, miR-29a, miR-34a apresentaram, na maioria das amostras de adenoma pleomórfico, aumento de expressão quando comparada à expressão observada no tecido não neoplásico. As amostras de carcinoma mucoepidermóide apresentaram aumento de expressão dos microRNAs miR-21 e miR-34a e diminuição da expressão do miR-29a;
 - O miRNA-20a apresentou predominantemente diminuição de expressão nos dois tipos tumorais quando comparada à expressão observada no tecido não neoplásico.
- 2 Comparando-se as amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide foi observado que os microRNAs miR-15a, miR-29a e miR-34a apresentaram expressão aumentada nas amostras de adenoma pleomórfico
- 3 Devido ao pequeno número de amostras não foi possível fazer a análise estatística comparando-se a expressão dos microRNAs e

expressão gênica e características demográficas, clínicas e patológicas do tumor

4 Os genes APAF1, BAD, BAX, BCL-2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, DIABLO e TP53 foram expressos nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar avaliadas:

- Os genes APAF1, BAD, BAX, BCL-2, CASP8, DIABLO e TP53 apresentaram, na maioria das amostras de adenoma pleomórfico, aumento de expressão quando comparada à expressão observada no tecido não neoplásico. Nas amostras de carcinoma mucoepidermóide os genes APAF1, BAX, BCL2, BID, CASP2, CASP3, CASP6, CASP8, DIABLO e TP53 apresentaram aumento de expressão quando comparada à expressão observada no tecido não neoplásico

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acasigua GA, Warner KA, Nör F, et al. BH3-mimetic small molecule inhibits the growth and recurrence of adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2015 Jun 26. [Epub ahead of print].

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncol** 2013; 49:845-53.

Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY. Biology and management of salivary gland cancers. **Semin Radiat Oncol** 2012; 22:245-53.

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. **Science** 2011; 333:1154-7.

Andreasen S, Therkildsen MH, Grauslund M, Friis-Hansen L, Wessel I, Homøe P. Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **APMIS** 2015; 123:706-15.

Andrew DJ, Ewald AJ. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. **Dev Biol** 2010; 341:34-55.

Aoki T, Tsukinoki K, Karakida K, Ota Y, Otsuru M, Kaneko A. Expression of cyclooxygenase-2, Bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with special reference to tumor proliferation and apoptosis. **Oral Oncol** 2004; 40:954-9.

Barcinski MA. Morte celular. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.57-63.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and genetics of head and neck tumours: salivary glands**. 3rd ed. Lyon: IARC; 2005. (WHO Classification of Tumours, v.9, IARC WHO Classification of Tumours, n° 9).

Bell D, Hanna EY. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. **Curr Oncol Rep** 2012; 14:166-74.

Brasacchio D, Noori T, House C, et al. A functional genomics screen identifies PCAF and ADA3 as regulators of human granzyme B-mediated apoptosis and Bid cleavage. **Cell Death Differ** 2014; 21:748-60.

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

Carlson J, Licitra L, Locati L, Raben D, Persson F, Stenman G. Salivary gland cancer: an update on present and emerging therapies. **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2013:257-63.

Cartron PF, Moreau C, Oliver L, Mayat E, Meflah K, Vallette FM. Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. **FEBS Lett** 2002; 512:95-100.

Chen XN, Wang KF, Xu ZQ, et al. MiR-133b regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis by targeting Bcl-w and Akt1. **Cancer Cell Int** 2014; 19; 14:70.

Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:1290-7.

Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. **Cell** 2012; 148:988-1000.

Choi MR, Gwak M, Yoo NJ, Lee SH. Regional bias of intratumoral genetic heterogeneity of apoptosis-related genes BAX, APAF1, and FLASH in colon cancers with high microsatellite instability. **Dig Dis Sci** 2015; 60:1674-9.

Chung S, Andrew DJ. The formation of epithelial tubes. **J Cell Sci** 2008; 121:3501-4.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. *miR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005, 102:13944-9.

Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis. **Dermatol Clin** 2007; 25:487-501.

Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, et al. Emerging understanding of Bcl-2 biology: implications for neoplastic progression and treatment. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1853:1658-71.

Courthod G, Franco P, Palermo L, Pisconti S, Numico G. The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. **Molecules** 2014; 19:5704-16.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nonogaki S, et al. Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. **Virchows Arch** 2013; 463:31-9.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Lima LA, Kowalski LP, Soares FA. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Genet** 2015; 208:382-9.

Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. **Genes Dev** 2003; 17:2922-32.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. **Oncogene** 2003; 22:8543-67.

El Tayebi HM, Omar K, Hegy S, et al. Repression of miR-17-5p with elevated expression of E2F-1 and c-MYC in non-metastatic hepatocellular carcinoma and enhancement of cell growth upon reversing this expression pattern. **Biochem Biophys Res Commun** 2013; 434:421-7.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature** 2001; 411:342-8.

Ferreira JC, Morais MO, Elias MR, Batista AC, Leles CR, Mendonça EF. Pleomorphic adenoma of oral minor salivary glands: an investigation of its neoplastic potential based on apoptosis, mucosecretory activity and cellular proliferation. **Arch Oral Biol** 2014; 59:578-85.

Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death Differ** 2003; 10:76-100.

Fulda S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: challenges and opportunities. **Semin Cell Dev Biol** 2015; 39:20-5.

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

Gomes CC, Bernardes VF, Diniz MG, De Marco L, Gomez RS. Anti-apoptotic gene transcription signature of salivary gland neoplasms. **BMC Cancer** 2012; 12:61.

de Groen FL, Timmer LM, Menezes RX, et al. Oncogenic Role of miR-15a-3p in 13q amplicon-driven colorectal adenoma-to-carcinoma progression. **PLoS One** 2015; 10:e0132495.

He M, Wang QY, Yin QQ, et al. HIF-1 α downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: a role in myeloid leukemic cell differentiation. **Cell Death Differ** 2013; 20:408-18.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci** 2014; 24:1-13.

Hong JY, Chung HJ, Bae SY, Trung TN, Bae K, Lee SK. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (Rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **J Cancer Prev** 2014; 19:273-8.

Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, et. al. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Biol Ther** 2015; 16:1042-6.

Hsu YT, Youle R. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. **J Biol Chem** 1998; 273:10777-83.

Hunter AM, Lacasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis** 2007; 12:1543-68.

Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1129-39.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science** 2002; 5589:2056-60.

Jain S, Hasan S, Vyas N, Shah N, Dalal S. Pleomorphic adenoma of the parotid gland: report of a case with review of literature. **Ethiop J Health Sci** 2015; 25:189-94.

Jamali Z, Asl Aminabadi N, Attaran R, Pournagiazar F, Ghertasi Oskouei S, Ahmadpour F. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Oral Oncol** 2015; 51:321-31.

Jaskoll T, Chen H, Min Zhou Y, Wu D, Melnick M. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development. **BMC Dev Biol** 2001; 1:5.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Órgãos associados ao trato digestivo; p.312-5.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin

signalling in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 2013; 109:2636-45.

Kumar V, Perkins JA. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. Cabeça e pescoço; p.764-70.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell** 2003; 115:787-98.

Li T, Li L, Li D, Wang S, Sun J. MiR-34a inhibits oral cancer progression partially by repression of interleukin-6-receptor. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:1364-73.

Liao Y, Yang F, Li X, et al. The impact of Caspase-8 on non-small cell lung cancer brain metastasis in II/III stage patient. **Neoplasma** 2015 Apr 13. [Epub ahead of print].

Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. **Eur J Cancer** 2011; 47:163-74.

Ling H, Zhou L, Jia X, Gapter LA, Agarwal R, Ng KY. Polyporenic acid C induces caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer A549 cells. **Mol Carcinog** 2009; 48:498-507.

Liu H, Du L, Wang R, et al. High frequency of loss of PTEN expression in human solid salivary adenoid cystic carcinoma and its implication for targeted therapy. **Oncotarget** 2015; 6:11477-91.

Liu L, Hu Y, Fu J, Yang X, Zhang Z. MicroRNA155 in the growth and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2013; 42:140-7.

Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. **Biol Rev Camb Philos Soc** 2009; 84:55-71.

Ma Y, Qin H, Cui Y. MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma via PI3K/Akt/Bad pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2013; 441:958-63.

Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. **J Mol Diagn** 2004; 6:205-10.

Matse JH, Yoshizawa J, Wang X, et al. Discovery and prevalidation of salivary extracellular microRNA biomarkers panel for the noninvasive detection of benign and malignant parotid gland tumors. **Clin Cancer Res** 2013; 19:3032-8.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer** 2012; 118:3928-36.

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000; 11:199-215.

Melnick M, Chen H, Min Zhou Y, Jaskoll T. The functional genomic response of developing embryonic submandibular glands to NF-kappa B inhibition. **BMC Dev Biol** 2001; 1:15.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary gland pleomorphic adenoma. **Am J Clin Oncol** 2008; 31:95-9.

Milano A, Longo F, Basile M, Iaffaioli RV, Caponigro F. Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. **Oral Oncol** 2007; 43:729-34.

miRTarBase. **The experimentally validated microRNA-target interactions database**. Available from: <URL:<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>> [2015 jun 03].

Mitani Y, Roberts DB, Fatani H, et al. MicroRNA profiling of salivary adenoid cystic carcinoma: association of miR-17-92 upregulation with poor outcome. **PLoS One** 2013; 8:e66778.

Mitra S, Mukherjee N, Das S, Das P, Panda CK, Chakrabarti J. Anomalous altered expressions of downstream gene-targets in TP53-miRNA pathways in head and neck cancer. **Sci Rep** 2014; 4:6280.

Nagao T. Dedifferentiation and high-grade transformation in salivary gland carcinomas. **Head Neck Pathol** 2013; 7 Suppl 1:S37-47.

Nanci A. **Ten cate: histologia oral**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. Tecidos bucais; p.5-7.

Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. **Head Neck Pathol** 2009; 3:271-5.

Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. **Dev Biol** 1999; 216:671-80.

Pan W, Yang J, Wei J, et al. Functional BCL-2 regulatory genetic variants contribute to susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma. **Sci Rep**

2015; 5:11833.

Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. **Nat Struct Mol Biol** 2009; 16:23-9.

Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. **Differentiation** 2006; 74:349-64.

Pennelli G, Galuppini F, Barollo S, et al. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma. **Hum Pathol** 2015; 46:50-7.

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. **Mol Cell** 2006; 21:533-42.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science** 2005; 309:1573-6.

Pradhan S, Liu C, Zhang C, Jia X, Farach-Carson MC, Witt RL. Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2010; 142:191-5.

Qiu F, Sun R, Deng N, et al. miR-29a/b enhances cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma progression by regulating SPARC and COL3A1 gene expression. **PLoS One** 2015; 10:e0120969.

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>> [2015 mai 12]

Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. **Mol Cancer** 2010; 9:238.

Reynolds MF, Peterson-Roth EC, Bernalov IA, et al. Rapid DNA double-strand breaks resulting from processing of Cr-DNA crosslinks by both MutS dimers. **Cancer Res** 2009; 69:1071-9.

Shintani M, Sangawa A, Yamao N, Kamoshida S. Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: association with clinicopathological parameters and survivin expression. **Oncol Lett** 2014; 8:2581-6.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem** 1998; 254:439-59.

Soini Y, Törmänen U, Pääkkö P. Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not to bax expression in salivary gland tumours. **Histopathology** 1998; 32:28-34.

Sokolova V, Fiorino A, Zoni E, et al. The Effects of miR-20a on p21: two mechanisms blocking growth arrest in TGF- β responsive colon carcinoma. **J Cell Physiol** 2015; 230:3105-14.

Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, Calin GA. SnapShot: microRNAs in cancer. **Cell** 2009; 137:586-586.e1.

Stenner M, Weinell A, Ponert T, et al. Cytoplasmic expression of survivin is an independent predictor of poor prognosis in patients with salivary gland cancer. **Histopathology** 2010; 57:699-706.

Stickles XB, Marchion DC, Bicaku E, et al. BAD-mediated apoptotic pathway is associated with human cancer development. **Int J Mol Med** 2015; 35:1081-7.

Su W, Aloisi MS, Garden GA. MicroRNAs mediating CNS inflammation: small regulators with powerful potential. **Brain Behav Immun** 2015 Jul 3. [Epub ahead of print]

Subramanian S, Steer CJ. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. **J Cell Physiol** 2010; 223:289-98.

Tanase C, Albulescu R, Codrici E, et al. Decreased expression of APAF-1 and increased expression of cathepsin B in invasive pituitary adenoma. **Onco Targets Ther** 2014; 8:81-90.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:231-41.

Vilella-Arias SA, Rocha RM, da Costa WH, et al. Loss of caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype. **Urology** 2013; 82:974.e1-7.

Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. **Mol Cell** 2006; 22:553-60.

Willis SN, Chen L, Dewson G, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. **Genes Dev** 2005; 19:1294-305.

Wu Z, Huang X, Huang X, Zou Q, Guo Y. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. **J Exp Clin Cancer Res** 2013; 32:98.

Xiong Y, Zhang L, Kebebew E. MiR-20a is upregulated in anaplastic thyroid cancer and targets LIMK1. **PLoS One** 2014; 9:e96103.

Zeng W, van den Berg A, Huitema S, Gouw AS, Molema G, de Jong KP. Correlation of microRNA-16, microRNA-21 and microRNA-101 expression with cyclooxygenase-2 expression and angiogenic factors in cirrhotic and noncirrhotic human hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2014; 9:e95826.

Zhang DG, Zheng JN, Pei DS. P53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy. **Mol Cancer** 2014; 13:115.

Zhang X, Cairns M, Rose B, et al. Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. **Int J Cancer** 2009; 124:2855-63.

Zheng M, Xing L, Guo H, et al. Study of the Effects of 50Hz Homogeneous Magnetic Field on Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 of SNU Cells In Vitro. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc** 2005; 5:4870-3.

Anexo 1 - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 28 de outubro de 2013.

A

Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo.

Aluna: Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra Flores (Mestrado).

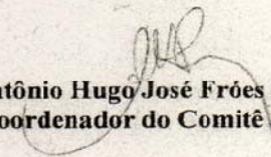
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1578/11E

“Avaliação da expressão de microRNAs reguladores da apoptose em tumores de glândula salivar”.

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 22/10/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Avaliação de marcadores de apoptose durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas”, registrado neste CEP sob nº 1578/11. O projeto afiliado em referência será a dissertação de Mestrado da aluna *Bianca de Cássia Troncarelli de Campos Parra Flores*.
- Projeto de Mestrado, datado de 08 de Outubro de 2013.

Atenciosamente,


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

Anexo 2 - microRNAs e genes avaliados nos experimentos de RT-qPCR: nome oficial, localização cromossômica e código do fornecedor

miRNA/Gene	Código fornecedor	Nome oficial	Localização
miR-15a	TM000389	MIR15A	Cromossomo 13
miR-16	TM000391	MIR16-1	Cromossomo 13
miR-17-5p	TM000393	MIR17	Cromossomo 13
miR-20a	TM000580	MIR20A	Cromossomo 13
miR-21	TM000397	MIR21	Cromossomo 17
miR-29a	TM002112	MIR29A	Cromossomo 7
miR-34a	TM000426	MIR34A	Cromossomo 1
RNU48	TM001006	SNORD48	Cromossomo 6
BAD	Hs00188930_m1	BAD	Cromossomo 11
BAX	Hs00180269_m1	BAX	Cromossomo 19
BCL-2	Hs00153350_m1	BCL2	Cromossomo 18
BID	Hs00609630_m1	BID	Cromossomo 22
APAF1	Hs00559441_m1	APAF1	Cromossomo 12
CASP-2	Hs00154242_m1	CASP2	Cromossomo 7
CASP-3	Hs00234387_m1	CASP3	Cromossomo 4
CASP-6	Hs00154250_m1	CASP6	Cromossomo 4
CASP-7	Hs00169152_m1	CASP7	Cromossomo 10
CASP-8	Hs00154256_m1	CASP8	Cromossomo 2
DIABLO	Hs00219876_m1	DIABLO	Cromossomo 12
TP53	Hs00153349_m1	TP53	Cromossomo 17
Beta Actina	4326315E-0909017	ACTB	Cromossomo 7

Anexo 3 – Dados completos de expressão de microRNAs e genes nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide

ADENOMA PLEOMORFICO																			
AMOSTRA	microRNAs							Genes											
	miR 15a	miR 16	miR 17-5p	miR 20a	miR 21	miR 29a	miR 34	APAF 1	BAD	BAX	BCL 2	BID	CASP 2	CASP 3	CASP 6	CASP 7	CASP 8	DIABLO	TP 53
1	1	1	1	3	1	1	2							2	2	2	2	2	2
2	2	2	1	3	2	2	2							1	1	1		1	2
3	2	2	1	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
4	2	2	2	3	2	2	2							2		2	2	2	2
5	1	1	3	3	3	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2
6	1	1	1	3	2	2	2												
7	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1		2	2
8	2	2	2	1	2	2	2											2	2
9	2	2		3	2	2	2												
10	1	3	1	3	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1		2	2
11	2	1	3		2	2	2									1		2	2
12	2	2		3	2	2	2	2	2	2	2		1	1	1	1		2	2
13	2	1	1	3	2	2	2												
14	2	1	2	1	2	2	2												
15	2	1	1	3	1	2	2												
16	1	1	2	1	2	2	2												
17	2	2	1	3	2	2	2												
18	2	2	1	3	2	2	2												
19	1	1	2	3	2	1	2												
20	2	2	2	3	1	2	2												
21	2	2	2	3	2	2	2												
22	2	2	2	3	2	2	2												
23	2	2	2	1	2	2	2												
24	2	2	2	1	2	2	2												
25	2	2	2	1	2	2	2												
TOTAL	25	25	23	24	25	25	25	5	5	5	5	4	5	8	7	9	5	10	10
↑	76% (19)	60% (15)	47,82% (11)	0,00%	80% (20)	84% (21)	96% (24)	85,72% (4)	85,72% (4)	85,72% (4)	100% (5)	66,67% (2)	57,15% (2)	40% (2)	33,33% (1)	27,27% (2)	85,72% (4)	83,34% (8)	100% (10)
↓	0,00%	4% (1)	13,04% (3)	75% (18)	4% (1)	0,00%	4% (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NORMAL	24% (6)	36% (9)	39,13% (9)	25% (6)	16% (4)	16% (4)	0,00%	14,28% (1)	14,28% (1)	14,28% (1)	0	33,33% (2)	42,85% (3)	60% (6)	66,67% (6)	72,73% (7)	14,28% (1)	16,66% (2)	0

- 1 – Expressão similar às amostras não-neoplásicas
- 2 – Expressão aumentada
- 3 – Expressão diminuída

Cont/ Anexo 3

CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE																			
AMOSTRA	microRNAs							Genes											
	miR 15a	miR 16	miR 17-5p	miR 20a	miR 21	miR 29a	miR 34	APAF 1	BAD	BAX	BCL 2	BID	CASP 2	CASP 3	CASP 6	CASP 7	CASP 8	DIABLO	TP 53
26	3	3	1	3	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
27	3	1	1	3	1	1	2												
28	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
29	1	2	1	3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
30	2	2	2	3	2	1	2	2	1	2	1	2	2		2	2	2	2	2
31	1	2	1	3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
32	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	3	2	1	2
33	3	1	1	3	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	3	2	1	1
34	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1		1	2
35	1	2	2	1	2	1	2												
36	1	1	3	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2
37	1	1	1	3	2	3	1												
38	1	1	1	3	2	1	2												
39	2	1	1	3		1	2												
40	1	2	1	1	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1		1	2
41	2	1	2	3	2	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2
42	2	1	1	3	2	3	2	1	3	1	3	2	1	3	3	3		3	3
43	2	2	2	1	2	1	1												
44	1	1	2	1	2	1	1												
45	1	2	1	1	2	1	2												
46	2	2	2	1	2	1	2												
47	2	3	3	3	2	1	2												
48	1	3	1	1	2	1	1												
TOTAL	23	23	23	23	22	23	23	12	12	12	12	12	12	11	12	12	8	12	12
↑	39,13% (9)	43,48% (10)	39,13% (9)	0	90,9% (20)	0	73,91% (17)	60% (8)	30% (5)	80% (10)	50% (7)	90% (11)	50% (7)	44,44% (6)	40% (6)	20% (3)	83,34% (7)	40% (6)	80% (10)
↓	13,04% (3)	13,04% (3)	8,69% (2)	56,52% (13)	0	26,08% (6)	0	0	10% (1)	0	10% (1)	0	0	11,12% (1)	10% (1)	40% (4)	0	10% (1)	10% (1)
NORMAL	47,82% (11)	43,48% (10)	52,17% (12)	43,47% (10)	9,09% (2)	73,91% (17)	26,08% (6)	40% (4)	60% (6)	20% (2)	40% (4)	10% (1)	50% (5)	44,44% (4)	50% (5)	40% (5)	16,66% (1)	50% (5)	10% (1)

1 – Expressão similar às amostras não-neoplásicas

2 – Expressão aumentada

3 – Expressão diminuída