



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOMEDICINA

REBECCA LAIS DA SILVA CRUZ

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* E *hsa-miR-221* NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
ORAL

BELÉM-PA  
2017

REBECCA LAIS DA SILVA CRUZ

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* E *hsa-miR-221* NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Camile de Barros Lopes

BELÉM-PA  
2017

REBECCA LAIS DA SILVA CRUZ

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MICRORNAS *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* E *hsa-miR-221* NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, aprovado com o conceito

---

**Belém (PA), 06 de fevereiro de 2016.**

Banca Examinadora:

---

Dr.<sup>a</sup>. Camile de Barros Lopes, UFPA

---

Dr. Pablo Diego do Carmo Pinto, UFPA

---

Msc. Leandro Lopes Magalhães, UFPA

---

Msc. Adenilson Leão Pereira, UFPA

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo o que tenho e sou. Sem Ele, eu provavelmente não teria chegado até aqui.

À minha querida e amada mãe, Socorro Cruz, por ser o meu maior exemplo de determinação, e por todas as vezes em que teve de abdicar de suas vontades em detrimento das minhas. Minha vida não teria sentido algum se eu não tivesse o seu apoio. Tenho um amor incondicional por esse ser humano.

Ao meu irmão, Renan, por ser meu ponto de equilíbrio. Sempre fomos tão diferentes... ele quieto, eu agitada. Ele de exatas, eu de biológicas. Ele introvertido, eu nem tanto... Pouca gente sabe, mas Renan foi quem despertou em mim a vontade de ingressar na vida acadêmica. Lá pelas tantas de 2010, eu fiquei tão orgulhosa quando ele passou no vestibular para Arquitetura e Urbanismo, que pensei: “quero passar por isso também!”. Eu sabia que ele tiraria de letra. Renan é a pessoa mais centrada que conheço. Por ser muito calado, poucas pessoas têm a oportunidade de embarcar em uma conversa com ele. Ah, se todo mundo tivesse uma chance... Ele é uma enciclopédia ambulante. Uma das pessoas mais legais que conheço. O mundo seria melhor se tivessem mais “Renans” por aí. Eu tenho a sorte grande de ter um como irmão, então, obrigada novamente, Deus.

Ao meu irmão, Rodrigo, que apesar de não estar mais presente fisicamente, sempre estará dentro do meu coração. O perdi no mesmo mês em que passei no vestibular para o curso de Biomedicina (janeiro de 2013). Acredito que as pessoas não entram em nossas vidas em vão. Elas sempre nos deixam algo. Rodrigo nos ensinou a encarar a vida com mais alegria, apesar das adversidades. Eu jamais conseguiria explicar ou mensurar o tamanho da saudade que sinto dele. Só espero que nos reencontremos um dia, e enfim, eu possa dá-lo aquele abraço que faltou. Eu sou imensamente grata por ter compartilhado 18 anos com ele... 18 anos de muitas alegrias, companheirismo e amor. Obrigada por mais essa, Deus.

Ao meu namorado, Luciano Lisboa, por ser o “sol” que me faltava. Lhe agradeço por todo apoio dentro e fora da vida acadêmica, por ser tão carinhoso, mesmo com minhas crises de humor. Ele me fez entender o que é o amor. Eu não acreditava que isso era possível. Que clichê! Eu jamais poderia deixar de agradecê-lo por todas as vezes em que me esperou, das 9h às 18h, no estacionamento do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)! Sua paciência me surpreende. É engraçado que, na vida, às vezes, a sintonia não bate. Às vezes, a personalidade não bate. Às vezes, quem não bate é o próprio sentimento. Mas às vezes, só às vezes, tudo bate. E foi assim conosco.

À minha amiga (quase irmã), Isabelle Carolina, por ser minha cúmplice em exatamente tudo. Isabelle foi um dos melhores presentes que Deus me deu: uma amiga companheira, engraçada, de bem com a vida e com os melhores conselhos na ponta da língua. Ela será uma excelente Pedagoga daqui há pouco tempo, e eu sempre estarei na primeira fila para aplaudir as suas vitórias. A nossa amizade vem de sempre e será para sempre.

À minha amada tia, Vera Cilena, por todo bom humor com que lida com a vida, por ser tão empoderada e extremamente autêntica. Tia Vera é um exemplo para mim. O seu apoio foi muito importante para eu lidar com as adversidades da vida, ao longo desses quatro anos (ou melhor, dos meus vinte e dois). Eu só espero poder desfrutar da sua maravilhosa companhia por muitos e muitos anos... Eu simplesmente a amo de montão.

À minha amada tia, Cleonice Carvalho, por ser o porto seguro de toda a família Silva e por sempre estar apta a ajudar a todos. Que exemplo de mulher! Independente, inteligente, amorosa, dona de si e linda! Eu realmente quero ser igual a ela quando crescer.

Aos amigos conquistados na Graduação e que levarei para a vida toda: Camilly, Jessica, Higo e Paula. Passamos por vários momentos difíceis, como 4 provas e 3 seminários por semana, greves, estágios, relatórios, problemas pessoais... ufa! Só a gente sabe o quão difícil foi lidar com tudo isso. Apesar dos pesares, estamos prestes a realizar um sonho que temos em comum: nos tornarmos Biomédicos. Essa profissão ainda enfrenta grandes dificuldades no que diz respeito ao reconhecimento profissional, direitos trabalhistas, entre outras... Mas, acredito que todo nosso esforço valerá a pena. Entramos com uma mentalidade na faculdade e com toda certeza, sairemos com outra. Eu só desejo um futuro coberto de sucesso a todos eles, e que tudo o que almejam, torne-se realidade.

Aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Médica: Adenilson, Cintia, Lucas e Roberta por fazerem o ambiente de trabalho um lugar mais divertido e aconchegante. Em especial, gostaria de agradecer a Aline, Amanda e Leandro por todo apoio que me foi empregado assim que entrei no laboratório, e à minha gêmea de sobrenome, Laís (que também foi um dos melhores presentes de Deus em minha vida), por estar comigo desde o princípio da graduação e da entrada no laboratório, por sempre me estender a mão e não pedir nada em troca. As nossas vidas se cruzaram por acaso, mas eu espero que nunca mais se descruzem.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ândrea Ribeiro dos Santos e à Dr<sup>a</sup>. Camile Lopes, por todo conhecimento compartilhado, experiências vividas, e principalmente, a paciência e dedicação a mim empregadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Às instituições financiadoras, das quais sem o apoio, o desenvolvimento do presente estudo não seria possível.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações celulares associadas a malignidade. Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2011.....	1
Figura 2 – Estimativas de casos novos de câncer no Brasil. Fonte: BRASIL – INCA, 2016....	3
Figura 3 – Estimativas de casos novos de câncer na região Nordeste. Fonte: BRASIL – INCA, 2016.....	3
Figura 4 – Estimativas de casos novos de câncer na região Norte. Fonte: BRASIL – INCA, 2016.....	4
Figura 5 – Leucoplasia heterogênea.....	6
Figura 6 – Eritroplasia. Fonte: <a href="http://oralcancerldv.org/en/erythroplakia/">http://oralcancerldv.org/en/erythroplakia/</a> .....	6
Figura 7 – Queilite actínica. Fonte: <a href="http://doutissima.com.br">http://doutissima.com.br</a> .....	7
Figura 8 – CCEO no vestíbulo com margens exofíticas elevadas e na mucosa bucal como uma úlcera assintomática. Fonte: MARKOPOULOS, 2012.....	8
Figura 9 – Biogênese dos microRNAs. Fonte: HAMMOND, 2015.....	14
Figura 10 – Curvas de amplificação de amostras de CCEO.....	20
Figura 11 – Box Plots de comparação entre os níveis de expressão dos microRNAs <i>hsa-miR-17</i> , <i>hsa-miR-21</i> , <i>hsa-miR-31</i> e <i>hsa-miR-221</i> em amostras com e sem CCEO.....	23
Figura 12 – Curvas ROC dos microRNAs selecionados para a distinção entre tecidos com e sem CCEO.....	25

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Classificação TNM. Fonte: BERNANDO e NUNES, 2010 (Modificado).....	9
Quadro 2 – Estadiamento da lesão obtido após a classificação TNM. Fonte: BERNARDO e NUNES, 2010 (Modificado).....	10
Tabela 1 – Genes alvos dos microRNAs <i>hsa-miR-17</i> , <i>hsa-miR-21</i> , <i>hsa-miR-31</i> e <i>hsa-miR-221</i> .....	23
Tabela 2 – Envolvimento dos genes alvos em processos biológicos fundamentais. ....	24

## RESUMO

O câncer consiste em uma doença de ordem multifatorial, que envolve fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. As células cancerosas reproduzem-se fora dos limites normais da divisão celular, e não passam pelo processo normal de diferenciação. Globalmente, a incidência de câncer tem-se mostrado alarmante. Dentre os diferentes tipos da doença, o câncer da cavidade oral destaca-se devido a morbidade e mortalidade crescentes, além do impacto causado a vida dos pacientes, uma vez que as lesões possuem sequelas, muitas vezes irreversíveis. Devido a agressividade, heterogeneidade das lesões e principalmente, aos difíceis diagnóstico e tratamento, faz-se necessária a investigação de potenciais biomarcadores preditivos que possam auxiliar no prognóstico, a fim de estabelecer um diagnóstico e tratamento precoces. Os microRNAs têm se destacado em vários estudos como bons candidatos a biomarcadores de doenças, principalmente porque apresentam a expressão desregulada em várias patologias, inclusive no câncer. Neste contexto, o objetivo norteador do presente estudo foi investigar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em amostras de tecidos com e sem carcinoma de células escamosas oral. Para tanto, utilizou-se 36 amostras (sendo 18 tecidos provenientes de pacientes diagnosticados com a doença, e 18 tecidos gengivais pertencentes a indivíduos sem a doença). A validação da expressão dos microRNAs foi realizada a partir da molécula de RNA total, a qual foi extraída e teve a sua concentração determinada. A amostra de RNA foi diluída em água DEPC para a concentração final de 5 nanogramas (ng) por microlitro ( $\mu$ l) e armazenada a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . A PCR em tempo real foi realizada a partir do DNA complementar (cDNA), e o RNA sintético RNU6B foi utilizado como endógeno. Todos os miRNAs apresentaram-se hiperexpressos no carcinoma de células escamosas oral, em comparação com os tecidos livres de câncer. A predição *in silico* de genes alvos revelou os genes *CDKN1A* e *PKD2* como alvos do *hsa-miR-17*, *MMP16* e *FZD3* como alvos do *hsa-miR-21*; *PTEN* e *TPM1* como alvos do *hsa-miR-31*; *CDKN1B* e *CDKN1C* sendo alvos do *hsa-miR-221*. A curva ROC mostrou que os quatro miRNAs em estudo são capazes de diferenciar tecidos com carcinoma de células escamosas oral daqueles sem o câncer, uma vez que *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* apresentaram uma área sob a curva ROC correspondente a 0,849, 0,877, 0,779 e 0,821, respectivamente. Todos estes achados sugerem que *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* são bons candidatos a potenciais biomarcadores ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral.

Palavras-chave: microRNAs, perfil de expressão, carcinoma de células escamosas oral.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 O CÂNCER .....	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER .....	2
1.3 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL .....	4
1.4 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL.....	5
1.5 ESTADIAMENTO CLÍNICO .....	9
1.6 TRATAMENTO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL .....	10
1.7 RNAs NÃO CODIFICANTES (MICRORNAs).....	12
1.8 MICRORNAs E O CÂNCER .....	14
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	18
3.2 TIPO DE ESTUDO.....	18
3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
3.3 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO .....	18
<b>3.3.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL E QUANTIFICAÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (qRT-PCR) .....</b>	<b>19</b>
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.5 PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE GENES ALVOS REGULADOS PELOS MIRNAS EM ESTUDO .....	21
3.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA ROC.....	21
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	21
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÂNCER

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças desencadeadas por alterações genéticas e epigenéticas, além de influências ambientais, que têm em comum o crescimento desordenado de células, o qual ocasiona a formação de um tumor (BRASIL, 2012). A massa tumoral é composta por células cancerosas, células aparentemente normais, células-tronco tumorais e células estromais (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As células cancerosas reproduzem-se fora dos limites normais da divisão celular, além disso, não sofrem diferenciação. Assim, estas células podem invadir outros tecidos, por meio da infiltração das células anormais em vasos sanguíneos e linfáticos, por meio dos quais são transportadas a outras localidades do corpo. Esse processo é denominado de metástase (SHIGA et al., 2015). De modo geral, existem pelo menos dez alterações essenciais na fisiologia das células, que podem associá-las a malignidade, conforme mostra a Figura 1.



Figura 1: Alterações celulares associadas à malignidade.  
Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2011.

A carcinogênese – processo de formação do câncer – pode ocorrer a partir de qualquer uma das trilhões de células que compõem o corpo humano, sendo resultado de múltiplas etapas, as quais podem envolver diversos tipos de genes, alterados por meio de

mutações (incluindo perdas e quebras cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica) e mecanismos epigenéticos (DANTAS et al., 2009; NCI, 2015).

Em função do grande impacto que provoca na sociedade, considera-se o câncer como um problema de saúde pública mundial, devido à sua amplitude epidemiológica, econômica e social (BATISTA et al., 2015). A incidência cada vez mais alarmante das neoplasias tem ocasionado mudanças no perfil epidemiológico da população, seja pelo aumento da exposição aos fatores cancerígenos, pelo aprimoramento das técnicas de diagnóstico, pelo perfil de envelhecimento da população, ou pela elevação de óbitos ocasionados por diferentes tipos de câncer (BRASIL - INCA, 2012).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é um dos principais responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade na população mundial, apresentando variações nestes números conforme a idade, sexo, hábitos como alcoolismo e etilismo, entre outros fatores (SHENOI et al., 2012). Em 2012, cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer foram registrados em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2035 estes números aumentarão para 24 milhões de novos casos e 14,6 milhões de mortes ocasionadas por diferentes tipos de câncer (NCI, 2015).

Globalmente, a incidência do câncer da cavidade oral mantém-se elevada, com uma taxa de sobrevivência que geralmente não ultrapassa 5 anos após o diagnóstico da doença (BAGAN e SCULLY, 2008). Tais fatores podem ser atribuídos a exposição a fatores potencialmente carcinogênicos, tais como o etilismo e o tabagismo, e ao diagnóstico tardio da doença, uma vez que os pacientes geralmente costumam procurar aconselhamento profissional quando o tumor já apresenta-se em estágios avançados, o que diminui as chances de cura e aumenta a probabilidade de óbito (WARNAKULASURIYA et al., 2009).

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estimam para o biênio 2016-2017 que ocorram 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres, conforme mostra a Figura 2.

Estimativa do número de casos novos, em <b>homens</b> , Brasil, 2016		Estimativa do número de casos novos, em <b>mulheres</b> , Brasil, 2016	
Localização Primária	Casos Novos	Localização Primária	Casos Novos
Próstata	61.200	Mama feminina	57.960
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	Cólon e Reto	17.620
Cólon e Reto	16.660	Colo do útero	16.340
Estômago	12.920	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890
<b>Cavidade Oral</b>	<b>11.140</b>	Estômago	7.600
Esôfago	7.950	Corpo do útero	6.950
Bexiga	7.200	Ovário	6.150
Laringe	6.360	Glândula Tireoide	5.870
Leucemias	5.540	Linfoma não Hodgkin	5.030
Sistema Nervoso Central	5.440	Sistema Nervoso Central	4.830
Linfoma não Hodgkin	5.210	Leucemias	4.530
Pele Melanoma	3.000	<b>Cavidade Oral</b>	<b>4.350</b>

Figura 2: Estimativas de casos novos de câncer no Brasil.  
Fonte: BRASIL - INCA, 2016.

Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, na região Nordeste, o câncer da cavidade oral será o 5º mais incidente em homens e o 9º em mulheres (figura 3).

• Região Nordeste			
Homens		Mulheres	
Localização Primária	Casos Novos	Localização Primária	Casos Novos
Próstata	14.290	Mama feminina	11.190
Estômago	2.940	Colo do útero	5.630
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.690	Cólon e Reto	2.530
Cólon e Reto	1.940	Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.100
<b>Cavidade Oral</b>	<b>1.880</b>	Estômago	1.940
Laringe	1.430	Glândula Tireoide	1.810
Esôfago	1.340	Ovário	1.420
Sistema Nervoso Central	1.260	Corpo do útero	1.320
Leucemias	1.210	<b>Cavidade Oral</b>	<b>1.190</b>
Linfoma não Hodgkin	1.010	Leucemias	1.070

Figura 3: Estimativas de casos novos de câncer na região Nordeste.  
Fonte: BRASIL - INCA, 2016.

Na região Norte, no mesmo período, estima-se que o câncer da cavidade oral será o 7º mais incidente em homens e o 12º em mulheres, como mostra a Figura 4. Com

aproximadamente 300 mil novos casos sendo reportados a cada ano, o câncer da cavidade oral é considerado um problema de saúde mundial (RANA, 2012). Diante desta constatação, é de extrema importância que a prevenção da doença seja cada vez mais estimulada, haja vista que por meio desta, pode-se alcançar o controle do câncer oral, bem como de outros tipos de câncer (PASSARELLI et al., 2011; DOMINGOS et al., 2014).

Estimativas de casos novos por região, segundo sexo, 2016

• Região Norte

Homens		Mulheres	
Localização Primária	Casos Novos	Localização Primária	Casos Novos
Próstata	2.470	Colo do útero	1.970
Estômago	970	Mama feminina	1.810
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	Cólon e Reto	480
Cólon e Reto	440	Estômago	480
Bexiga	370	Traqueia, Brônquio e Pulmão	410
Leucemias	310	Glândula Tireoide	270
<b>Cavidade Oral</b>	<b>290</b>	Leucemias	250
Laringe	250	Ovário	250
Linfoma não Hodgkin	230	Corpo do útero	230
Sistema Nervoso Central	230	Sistema Nervoso Central	190
Esôfago	200	Linfoma não Hodgkin	170
Linfoma de Hodgkin	110	<b>Cavidade Oral</b>	<b>160</b>

Figura 4: Estimativas de casos novos de câncer na região Norte.  
Fonte: BRASIL - INCA, 2016.

### 1.3 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

O câncer de cabeça e pescoço abrange um grupo bastante heterogêneo de doenças que acometem o trato aerodigestivo superior (POGORZELSKI, 2014). Estas doenças caracterizam-se por acometer principalmente indivíduos do sexo masculino, com idade superior a 50 anos. Os cânceres de cabeça e pescoço são traumáticos, pois causam grande impacto na qualidade de vida do paciente, uma vez que as lesões provocam sequelas irreversíveis na fala, respiração e deglutição, o que muitas vezes ocasiona o isolamento social do doente (SILVEIRA et al., 2012; HARDING et al., 2014; YANG et al., 2014).

Aproximadamente 90% dos cânceres de cabeça e pescoço correspondem ao carcinoma das células escamosas ou carcinoma espinocelular (CECCP), o qual envolve áreas como a cavidade oral (caracterizando-se por lesões nos lábios, mucosa jugal, língua, palato duro, assoalho bucal, região retromolar e rebordo alveolar), faringe (incluindo lesões na naso,

oro e hipofaringe), laringe e seios paranasais (ARGIRIS et al., 2008; FERLAY, 2008; NASMAN et al., 2009).

Cerca de 50% dos CECCP correspondem ao carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCEO), cujo desenvolvimento geralmente se inicia a partir de uma hiperplasia, progride para displasia e, finalmente, torna-se a neoplasia maligna. Durante a progressão destas fases podem ocorrer várias alterações genéticas e epigenéticas, tais como: aberrações cromossômicas, mutações e deleções, perda de heterozigotidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica, as quais podem alterar o perfil de expressão gênica (SPEIGHT et al., 2007; COLOMBO, RAHAL, 2008; SCULLY et al., 2008).

O CCEO possui uma taxa de recorrência significativa. A metástase à distância consiste em outro problema que dificulta o prognóstico do paciente, pois está relacionada a casos mais avançados (IRANI et al., 2016). Muitos tipos de malignidades primárias podem produzir metástases orais, sendo que os mais comuns localizam-se nos pulmões, na mama, nos rins e nos ossos (OKURA et al., 2009; KUMAR, MANJUNATHA, 2013).

Quanto aos fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do CCEO, os principais são: o consumo excessivo de tabaco e/ou álcool, visto que seus componentes agem diretamente na molécula de DNA, induzindo mutações e ocasionando danos em genes essenciais a regulação do ciclo celular (PEREZ et al., 2007; NEVILLE et al., 2009). Apesar de a maioria dos casos serem notificados em indivíduos com idades acima de 50 anos, alguns cânceres na cavidade oral acometem pessoas com idades entre 18 e 45 anos, que não possuem hábitos etilista e tabagista, evidenciando que outros fatores predisponentes como infecções virais e os próprios fatores genéticos podem interferir na carcinogênese oral.

A incidência crescente de CCEO relacionado à infecção pelo vírus HPV, tem sido relatada em vários estudos (OLIVEIRA, et al., 2008; ZHAO et al., 2009; MUÑOZ, et al., 2011). O vírus HPV é capaz de inserir-se no genoma de seu hospedeiro, a fim de replicar-se, o que implica na perturbação do ciclo celular no hospedeiro, uma vez que a proliferação celular é estimulada (MOODY and LAIMINS, 2010).

#### 1.4 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

A maioria das neoplasias orais é derivada de lesões orais potencialmente malignas (LOPM), as quais são alterações teciduais que podem assumir o caráter de tumor maligno (LIU et al., 2012). Por possuírem um tecido morfológicamente alterado, as LOPM's aumentam a probabilidade de um câncer oral ocorrer (MAIA et al., 2016).

Em 2005, a OMS modificou a terminologia das lesões e condições orais pré-malígnas e as denominou lesões orais com potencial de malignização (VAN DER WAAL, 2009), sendo a leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica as mais comuns. A leucoplasia (Figura 5) é uma lesão na mucosa oral, geralmente de cor branca, a qual pode apresentar-se lisa, rugosa ou verrucosa. Classifica-se em homogênea ou heterogênea, sendo que a última possui um maior potencial de tornar-se maligna (HOLMSTRUP et al., 2006).



Figura 5: Leucoplasia Heterogênea.  
Fonte: CALATAYUD et al., 2009.

A eritroplasia (Figura 6) consiste em uma lesão macular ou em placa, cuja coloração é avermelhada (HOSNY et al., 2009), acomete ambos os gêneros, mas mostra maior incidência em homens. Possui uma maior prevalência em indivíduos de cor clara (REICHART et al., 2005). Esta lesão pode associar-se a uma leucoplasia, sendo então denominada de eritroleucoplasia.



Figura 6: Eritroplasia.  
Fonte: <http://oralcancerldv.org/en/erythroplakia/>

A queilite actínica (Figura 7) é uma condição de natureza inflamatória que manifesta-se pelo ressecamento, erosões e perda do limite do lábio inferior com a pele, sendo os indivíduos com pele clara os mais afetados (ROSSOE et al., 2011). Geralmente, estas lesões são assintomáticas e podem ser brancas, vermelhas, brancas com áreas vermelhas e também ulceradas (SILVEIRA et al., 2009).



Figura 7: Queilite actínica.  
Fonte: <http://doutissima.com.br>

A cavidade oral é revestida por um tecido epitelial pavimentoso estratificado, que pode estar queratinizado ou não, dependendo da região. As neoplasias orais geralmente iniciam-se a partir de alterações neste tecido (FERRARO et al., 2011). O CCEO pode apresentar-se de diversas formas clínicas, como por exemplo, uma úlcera com margens exofíticas elevadas ou como uma lesão nodular (figura 8). Geralmente, o câncer oral é indolor e o quadro clínico envolve uma história de uma ferida que não cicatriza e que forma crostas, juntamente com sangramento (ANDRADE et al., 2014).



Figura 8: CCEO no vestibulo, com margens exofíticas elevadas (à esquerda); e apresentando-se como uma úlcera assintomática (à direita).  
Fonte: MARKOPOULOS, 2012.

## 1.5 ESTADIAMENTO CLÍNICO

A partir do estadiamento clínico é possível analisar e comparar os diferentes grupos de pacientes, além de descrever clinicamente e classificar histopatologicamente as neoplasias. Estes dados são importantes, pois possibilitam o planejamento terapêutico mais adequado a cada paciente (SAMPAIO et al., 2011).

A classificação para o câncer oral é dada por meio do sistema TNM (Quadro 1), o qual auxilia na descrição da extensão de um tumor e permite as análises do tumor primário (T), da presença de linfonodos acometidos (N), e de metástase (M) (GREENE; SOBIN, 2008). Após a classificação tumoral por meio do sistema TNM, é possível determinar o estadiamento da lesão (MOURA et al., 2016), como mostra o Quadro 2.

Quadro 1 - Classificação TNM.

TNM	Descrição
<b>T</b>	<b>Tamanho do tumor primário</b>
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor 0-2 cm de diâmetro
T2	Tumor 2-4 cm de diâmetro
T3	Tumor > 4 cm de diâmetro
T4a	Tumor invadindo estruturas adjacentes (p.e. osso, seio maxilar, pele e musculatura da língua)
T4b	Tumor invadindo espaço mastigatório, placa pterigoide, base de crânio ou revestimento da artéria carótida interna
<b>N</b>	<b>Presença de linfonodos regionais</b>
Nx	Linfonofos não podem ser avaliados
N0	Não há disseminação para linfonodos regionais
N1	Um linfonodo < 3 cm, ipsilateral
N2a	Um linfonodo > 3 cm e < 6 cm, ipsilateral
N2b	Múltiplos linfonodos < 6 cm, ipsilaterais
N2c	Múltiplos linfonodos < 6 cm, ipsilaterais ou contralaterais
N3	Ao menos um linfonodo > 6 cm
<b>M</b>	<b>Presença de metástase distante</b>
Mx	A presença de disseminação não pode ser avaliada
M0	Não há metástase distante
M1	Metástase em órgão distante

Fonte: Modificado de BERNARDO e NUNES, 2010.

Quadro 2: Estadiamento da lesão obtido após a classificação TNM.

Estágio	Classificação TNM			
Estágio 0	Tis, N0, M0			
Estágio I	T1, N0, M0			
Estágio II	T2, N0, M0			
Estágio III	T3, N0, M0	T1, N1, M0	T2, N1, M0	T3, N1, M0
Estágio IVa	T4, N0, M0	T4, N1, M0		Qualquer T, N2, M0
Estágio IVb	Qualquer T, N3, M0			
Estágio IVc	Qualquer T, Qualquer N, M1			

Fonte: Modificado de BERNARDO e NUNES, 2010.

## 1.6 TRATAMENTO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

O tratamento é direcionado ao paciente de acordo com a classificação TNM, na qual verifica-se o estadiamento da lesão (SAMPAIO et al., 2011). Devido à complexidade do problema, é importante o serviço multidisciplinar de toda uma equipe, desde o diagnóstico da doença, durante o tratamento e após este, a fim de minimizar os danos causados e oferecer a manutenção da qualidade de vida ao paciente (SHAH, GIL, 2009; LORCH et al., 2009).

A equipe de profissionais associados ao tratamento oncoterápico deve ser composta por médicos (incluindo cirurgiões de cabeça e pescoço, cirurgiões plásticos, oncologistas, radioterapeutas), cirurgiões-dentistas, enfermeiros, psicólogos, nutricionistas, fonoaudiólogos, assistentes sociais, dentre outros, os quais, dentro de suas áreas de competência, podem cooperar no atendimento ao paciente, visando a melhoria de vida deste (MAIA, 2010).

A terapia oncológica para o CCEO basicamente engloba a aplicação de cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia. A seleção da modalidade terapêutica específica (ou combinada) para cada paciente depende do estágio em que se encontra a doença (RAPIDIS et al., 2009; MAZERON et al., 2009). A cirurgia é o tratamento de escolha para cânceres orais em estágios iniciais, já em casos mais avançados, geralmente substitui-se a cirurgia por uma terapia combinada (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), a fim de se reduzirem possíveis danos a estruturas adjacentes, como, por exemplo, as glândulas salivares (SHAH, GIL, 2009; BRAAKHUIS et al., 2010).

O tratamento do CCEO ocasiona diversos efeitos adversos ao paciente, uma vez que a irradiação utilizada e as drogas da quimioterapia antineoplásica não agem somente nas células malignas. As estruturas normais, principalmente as com alto potencial de renovação, como a medula óssea e a mucosa do tubo digestivo, também são atingidas. As principais complicações advindas do tratamento neoplásico são: mucosite, xerostomia, osteorradição e a hipossalivação (PAIVA et al., 2010).

A mucosite bucal geralmente é um dos primeiros sinais clínicos a surgirem, e apresenta-se clinicamente como placas brancas, elevadas e descamativas que podem causar dor, queimação e desconforto significativos, os quais podem atenuar-se durante a alimentação e a higienização bucal (SERA et al., 2013). A xerostomia consiste na sensação de secura na boca, geralmente ocasionada pelo uso de medicamentos anti-sialogogos (os quais podem ser utilizados com o objetivo de diminuir a salivagem, a fim de se evitarem a diluição dos anestésicos) (BROCHADO, 2014).

A osteorradição é uma complicação severa de aparecimento tardio, provocada pela irradiação na região da cabeça e pescoço, e caracteriza-se por necrose e exposição do tecido ósseo. Geralmente, a área mais afetada é a mandíbula (MARQUES, 2015).

A hipossalivação é uma complicação na qual verifica-se uma produção reduzida de saliva, devido a uma baixa função da glândula salivar, sendo, portanto, diferente da xerostomia (WIENER et al., 2011). Os indivíduos com hipossalivação possuem uma inadequada ação tampão (justamente pela diminuição de salivagem), bem como uma menor remineralização e eliminação de açúcar e ácido, o que pode resultar em um aumento na taxa de cárie dentária (DAWES, 2008).

É de extrema importância a prevenção e o controle dos efeitos adversos orais induzidos pela radiação e pelas drogas antineoplásicas, pois estes podem interromper temporária ou definitivamente o tratamento e, dessa forma, comprometer o controle do tumor e impactar na sobrevida do paciente (JEMAL et al., 2010; MAJCHRZAK, 2014).

Devido à agressividade, à heterogeneidade das lesões e principalmente aos difíceis diagnóstico e tratamento, faz-se necessária a investigação de biomarcadores preditivos que possam auxiliar no prognóstico e estabelecer um diagnóstico e tratamento precoces para o câncer da cavidade oral. Os microRNAs têm se destacado como bons candidatos a biomarcadores de doenças, principalmente porque apresentam a expressão desregulada em várias patologias, inclusive no câncer. (SASSEN, 2008; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010).

## 1.7 RNAs NÃO CODIFICANTES (MICRORNAs)

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não codificantes, de 18-22 nucleotídeos de comprimento, que regulam a expressão de genes a nível pós-transcricional ao se parear com a extremidade 3' não traduzida de RNAs mensageiros. Eles participam de vários processos biológicos fundamentais, tais como o crescimento celular (CHENG, et al., 2005), desenvolvimento (KARP, AMBROS, 2005), diferenciação (CHEN et al., 2004) e apoptose (XU et al., 2004). Estima-se que os miRNAs controlem a expressão de aproximadamente 30% dos genes que codificam proteínas (LEWIS et al., 2005).

A biogênese dos miRNAs é um processo de múltiplas etapas que objetivam a conversão do transcrito primário em miRNA maduro (Figura 9). A biogênese convencional dos miRNAs tem início com a sua transcrição no núcleo da célula (a qual é mediada pela enzima RNA polimerase II), nas quais os transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNAs), os quais possuem em torno de 1000 nucleotídeos, formam estruturas secundárias: as regiões “*stem*”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “*loop*”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares (GREGORY et al., 2005).

Os pri-miRNAs são processados pela ação da enzima endonucleotídica *DROSHA* e seu cofator *DGCR8*. O resultado deste processamento é o miRNA precursor (pre-miRNA), um transcrito em forma de grampo com aproximadamente 70-80 nucleotídeos, o qual é exportado para o citoplasma através da exportina 5 e processado pela enzima *DICER*, a qual remove a alça na estrutura *stem loop*, resultando em um duplex miRNA/miRNA\* (BALLARINO et al., 2009). Uma vertente deste duplex é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) - cuja composição contém a proteína argonauta (Ago2) - e as duas fitas são separadas (SUN, 2008). Uma das fitas continua associada ao RISC e a fita complementar deve ser degradada. Entretanto, para alguns miRNAs, ambas as fitas podem ser associadas ao RISC (HAMMOND et al., 2015).

Ago2 liga diretamente o miRNA maduro e procura mRNAs alvo que tenham complementaridade com o miRNA. Em particular, a região “*seed*” (que corresponde aos nucleótidos 2-7 do miRNA) (LAI et al., 2005) e a extremidade 3' do miRNA são importantes para a associação com o mRNA alvo. Se houver complementaridade na região central do miRNA (nucleótidos 9-11) com o mRNA alvo, este último pode ser clivado através da atividade de Ago2 (LIU et al., 2004; HAMMOND et al., 2015).

No entanto, a maioria dos alvos de miRNA em seres humanos, não possui esta correspondência de sequência central, logo não são diretamente clivados por Ago2. Em vez

disso, Ago2 é recrutada para um complexo contendo GW182 (TNRC6A/B/C) dentro de corpos P citoplasmáticos, onde ocorre a repressão da tradução. O complexo CCR4-NOT-deadenilase é recrutado para RISC e isto facilita a remoção da cauda poli (A) e eventual degradação do mRNA alvo (FABIAN, SONENBERG, 2012; BRAUN et al., 2013; PTAFF et al., 2013).

As localizações nucleotídicas específicas de clivagem por *DROSHA* e *DICER* são normalmente bem definidas nas extremidades terminais. No entanto, alguns miRNAs apresentam locais de clivagem heterogêneos, levando a múltiplas isoformas (“IsomiRs”) do miRNA maduro. Esta heterogeneidade pode levar a uma repressão diferencial do mRNA alvo, de acordo com o tipo celular. Esta repressão diferencial já foi relatada em algumas doenças como o diabetes e a fibrilação atrial (BARAN-GALE et al., 2013; OHANIAN et al., 2013).

Enquanto a maioria dos miRNAs identificados são produzidos pela via convencional, existem vários exemplos de biogênese alternativa, sendo a classe mirtron a mais comum (RUBY *et al.*, 2007; BEREZIKOV et al., 2007; OKAMURA et al., 2007; BABIARZ et al., 2008). Em vez de serem clivados por *DROSHA*, nestes miRNAs as extremidades precursoras são formadas pelos eventos de clivagem de *splicing*. O precursor resultante é processado por *DICER* e carregado em RISC (HAMMOND et al., 2015).

A biogênese independente de *DICER* é uma via que já foi descrita e o melhor exemplo estudado é o *hsa-miR-451* (CHELOUFI et al., 2010; CIFUENTES *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010). Após a sua transcrição e clivagem por *DROSHA*, o pre-miRNA liga-se diretamente a Ago2, em vez de *DICER*, e Ago2 cliva o duplex miRNA/miRNA\*, sendo que a sequência remanescente forma o *hsa-miR-451* maduro. Estas vias de biogênese alternativas parecem ser eventos raros, mas que podem ocorrer (HAMMOND et al., 2015).

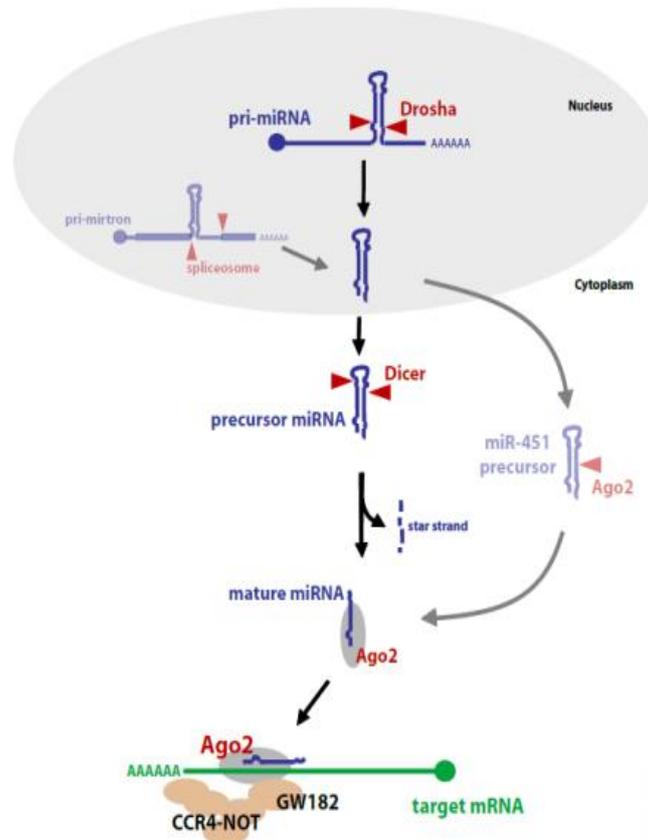


Figura 9: Biogênese dos microRNAs.

Fonte: HAMMOND, 2015

## 1.8 MICRORNAS E O CÂNCER

A expressão dos miRNAs está desregulada em vários tipos de câncer. Este desbalanço no perfil de expressão dos miRNAs implica na expressão de genes alvos e possui um papel importante na oncogênese, uma vez que desencadeia o aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose, e o aumento do potencial metastático de células afetadas, favorecendo assim, a progressão e a invasão tumoral (DI LEVA et al., 2010; WANG et al., 2011; VAROL et al., 2011).

Dependendo do contexto e do tipo celular em que é expresso, um mesmo miRNA pode desempenhar um papel oncogênico ou de supressor tumoral (FABBRI et al., 2007). Vale ressaltar que, além disso, um único miRNA é capaz de regular diversos genes alvos e, assim, controlar simultaneamente atividades opostas, como por exemplo a proliferação celular e a apoptose (VOLINIA et al., 2006).

Os miRNAs oncogênicos (oncomiRs) encontram-se com a expressão elevada em tumores malignos, estimulam a proliferação celular, e inibem a ação de genes supressores tumorais (ARDEKANI, NAEINI, 2010). Os TS-miRs que atuam no controle da apoptose e são reprimidos em tumores, o que ocasiona um desequilíbrio e permite o desenvolvimento tumoral (ZHANG et al., 2007). Vários miRNAs têm sido relatados como sendo iniciadores de invasão tecidual e metástase, sendo então denominados de metastamiRs (LÓPEZ, 2012).

O envolvimento de miRNAs em diversas vias de processos celulares, tais como a alteração dos níveis de metilação do promotor (KOZAKI et al., 2008; LANGEVIN et al., 2010; GASCHE and GOEL, 2012) migração/invasão (JIANG et al., 2010; FUKUMOTO et al., 2015) e prognóstico (CHANG et al., 2008; AVISSAR et al., 2010) têm sido relatado em diversos estudos.

Há evidências de que os diferentes perfis de expressão dos miRNAs podem ser utilizados para classificar os estágios e a progressão do câncer, além disso, podem auxiliar no prognóstico e nas respostas ao tratamento. Por exemplo, a expressão reduzida do *hsa-miR-let-7b* foi correlacionada com a diminuição da sobrevida de pacientes com câncer de pulmão (TAKAMIZAWA et al., 2004), enquanto que níveis elevados do *hsa-miR-21* implicaram na redução da sobrevida e na resposta terapêutica de pacientes com adenocarcinoma de cólon (LEUNG et al., 2008).

Vários estudos correlacionam a expressão de miRNAs em diferentes tipos de cânceres e em linhagens derivadas de carcinomas de laringe, faringe e cavidade oral (AVISSAR et al., 2010; SHIIBA et al., 2010). A expressão de miRNAs em diversos tipos de amostras, tais como linfonodos, tecidos tumorais, saliva e plasma também vem sendo relatada (CARVALHO et al., 2015; MANIKANDAN et al., 2016; ZAHRAN et al., 2015; MACLELLAN et al., 2012),

Os miRNAs escolhidos para o presente estudo (*hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221*) encontram-se relacionados a vários tipos de câncer. Por exemplo, o *cluster miR-17-92* abriga as famílias dos miRs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-18*, *hsa-miR-19* e *hsa-miR-92* e têm sido relatado como um grupo de oncomiRs, relacionado principalmente ao câncer de pulmão e à linfomas (HAYASHITA et al., 2005; LU et al., 2007).

O *hsa-miR-21* é um dos miRNAs mais comumente relacionados a eventos celulares fundamentais ao câncer, tais como o crescimento tumoral (SI et al., 2007), proliferação (ROLDÓ et al., 2006), e apoptose (BUSCAGLIA e LI, 2011), sendo o seu perfil hiperexpresso relatado em vários tipos de câncer, como o de mama (LORIO et al., 2005),

estômago (CHAN et al., 2008), leucemia (FULCI et al., 2007), linfoma (LAWRIE et al., 2007) e mieloma múltiplo (PICHIORRI et al., 2008).

O *hsa-miR-31* é um importante supressor tumoral no câncer de mama (VALASTYAN et al., 2009; O' DAY, LAL, 2010), entretanto, a sua expressão apresenta-se elevada em outros tipos de câncer, tais como o de pulmão (EDMONDS et al., 2016) e o carcinoma de células escamosas cutâneo (WANG et al., 2014).

A hiperexpressão do *hsa-miR-221* tem sido mostrada como sendo promotora de proliferação celular no câncer, muito provavelmente devido à sua capacidade de modular a expressão da proteína oncogênica c-kit (FELLI et al., 2005) e do inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKN1B), um importante regulador da progressão celular (GALARDI et al., 2007; GILLIES, LORIMER, 2007; LE SAGE et al., 2007; VISIONE et al., 2007).

Como observado, os perfis de expressão dos miRNAs variam entre os diferentes tipos celulares. Desse modo, a realização de uma análise comparativa de microRNAs entre tecidos com e sem CCEO pode revelar biomarcadores do mecanismo carcinogênico importantes para o entendimento desta patologia, os quais futuramente podem auxiliar na identificação dos fatores de risco da doença, visando a detecção mais precoce desta, bem como auxiliar em seu tratamento (RAMDAS et al., 2009).

O nosso grupo de pesquisas vêm realizando estudos a cerca dos miRNAs, com ênfase em sua expressão diferencial no câncer gástrico (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010; MOREIRA et al., 2014; DARNET et al., 2015). Valeu-se da expertise do grupo neste assunto para investigar o perfil de expressão destes miRNAs no câncer oral e assim contribuir com conhecimentos novos e relevantes acerca desta doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em amostras de tecidos com e sem carcinoma de células escamosas oral.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar o perfil de expressão dos microRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em amostras de pacientes com e sem carcinoma de células escamosas oral.
- b) Avaliar os miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* como potenciais biomarcadores ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral.
- c) Realizar a predição *in silico* de genes alvos dos microRNAs em estudo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ÁREA DE ESTUDO**

A área de estudo é a Genética.

#### **3.2 TIPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS**

O presente estudo corresponde a uma investigação experimental em laboratório. As amostras foram obtidas seguindo-se os parâmetros de biossegurança. Realizou-se a colheita das amostras na Universidade Federal do Ceará (UFCE), através de biópsias incisionais de tumores da mucosa bucal, provenientes de pacientes diagnosticados com CCEO. Os tecidos livres de câncer foram obtidos da gengiva do terceiro molar de indivíduos voluntários.

##### **3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

###### **AMOSTRAS**

O número amostral corresponde a 36 tecidos, dos quais 18 são de pacientes com CCEO (sendo 8 amostras de borda lateral de língua, 5 amostras de rebordo alveolar, 4 amostras de assoalho bucal e 1 amostra de lábio inferior) e 18 correspondem a tecidos gengivais extraídos do terceiro molar inferior de indivíduos sem câncer.

#### **3.3 DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS**

##### **3.3.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL E QUANTIFICAÇÃO**

A quantificação da expressão dos miRNAs foi realizada a partir da molécula de RNA. Para tanto, primeiramente o RNA total das amostras foi extraído por intermédio do Kit *High Pure RNA Isolation kit* (Roche Applied Science), utilizando-se os procedimentos recomendados pelo fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado para que sua concentração fosse determinada. Este processo de quantificação ocorreu no equipamento *Qubit®2.0* (Life Technologies, Foster City, CA, US). Em seguida, o RNA total foi diluído em água DEPC para a concentração final de 5 ng/μL e armazenado a -20 °C.

### 3.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Uma vez que o aparelho que realiza a PCR em Tempo Real faz a amplificação do material genético a partir da molécula de DNA de fita dupla, fez-se necessária a realização da reação de transcrição reversa (RT). Esta técnica consiste na reação de síntese de uma molécula de DNA de fita dupla (denominado de DNA complementar ou cDNA), a partir de primers específicos para os miRNAs de interesse, por meio da enzima Transcriptase Reversa.

O cDNA corresponde a forma mais conveniente de se manipular a sequência de codificação do miRNA, uma vez que o RNA é uma molécula facilmente degradada por RNases. Neste estudo, a RT ocorreu por meio da utilização da TaqMan® Micro-RNA RT (*Applied Biosystems*), com primers específicos para cada miRNA a ser estudado. O produto da transcriptase reversa (cDNA) foi sintetizado em um termociclador e estocado a -20°C até o momento da execução da PCR em Tempo Real.

A PCR em tempo real quantitativa foi realizada no equipamento Rotorgene® (*Applied Biosystems*) para análise dos miRNAs com sondas TaqMan® e reagentes Universal Master Mix II (*Applied Biosystems*). O RNA nucleolar RNU6b foi utilizado como controle endógeno – a fim de favorecer uma quantificação relativa. Em todas as reações houve um NTC (*No Template Control*), o qual consiste em uma reação sem amostra para avaliar uma possível contaminação.

Durante a reação de amplificação, um software específico constrói em tempo real um gráfico que relaciona os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência que é emitida durante a amplificação da molécula de DNA nas amostras, ciclo a ciclo (NASCIMENTO *et al*, 2010). Deve-se traçar a partir do referido gráfico, uma linha paralela ao eixo correspondente ao número de ciclos (abscissas), na altura em que se inicia a fase exponencial da amplificação gênica (no início da elevação exponencial na emissão da fluorescência). Tal parâmetro representa o limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos para amplificação, o qual é denominado de *threshold* (Figura 9).

O ponto exato em que o *threshold* cruza com a linha de amplificação da amostra, permite a determinação do número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica alvo presente no DNA de cada amostra (NASCIMENTO *et al*, 2010). Denomina-se este valor de Ct (“*Cycle Threshold*”), o qual permite a quantificação relativa do cDNA em cada uma das amostras, após ser corrigido pelos Cts dos controles endógenos e das amostras controle. O Ct é igual ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene alvo em uma dada amostra, o que evidencia que quanto menor for o número inicial do Ct obtido na

amostra, em comparação com outro gene, maior será a amplificação do gene alvo e, consequentemente, o mesmo apresentará maior expressão.

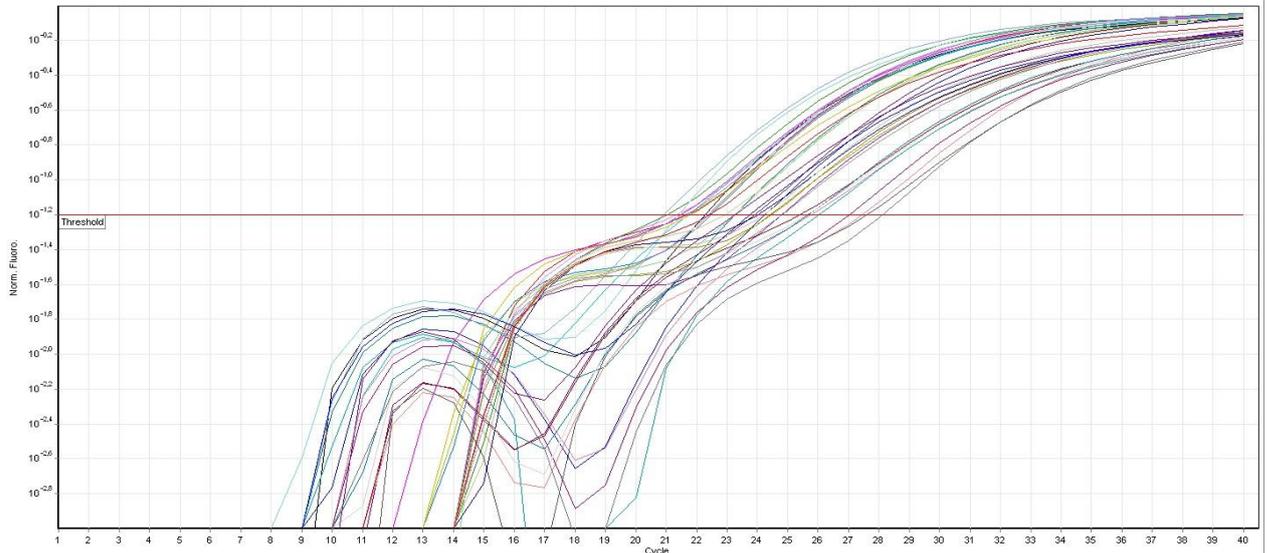


Figura 10: Curvas de amplificação de amostras de CCEO. Cada curva corresponde a uma amostra. O *Threshold* determinado corresponde a linha vermelha traçada paralelamente as curvas das amostras.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, empregou-se o método comparativo de Ct ( $\Delta$ CT). O CT é definido como uma fração de números de ciclos em que a fluorescência passa do limite fixo estabelecido. Esta metodologia consiste no cálculo inicial das médias e do desvio padrão dos valores dos CTs obtidos nas triplicatas de cada amostra (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A normalização das amostras foi realizada a partir da subtração do CT médio do seu correspondente com o CT médio do controle do endógeno ( $\Delta$ CT = CT amostra – CT endógeno).

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas no programa SPSS Versão 22.0. Considerando-se os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos. Para avaliar se as amostras apresentariam uma distribuição normal, optou-se pela aplicação do teste de *Kolmogorov Smirnov* (KS). Caso as amostras estivessem dentro da normalidade, o teste paramétrico aplicado seria o teste *T* de *Student* para duas amostras independentes, a fim de avaliar a hipótese de igualdade das médias entre os dois grupos. Em seguida, os gráficos de boxplot seriam montados por meio da ferramenta online *BoxPlotR*.

### 3.5 PREDIÇÃO *IN SILICO* DE GENES ALVOS REGULADOS PELOS MIRNAS EM ESTUDO

A predição *in silico* para a busca de genes alvos dos miRNAs envolvidos na carcinogênese oral (CCEO), preditos e validados experimentalmente na literatura, foi realizada com o auxílio de duas diferentes ferramentas online: miRTarBase <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php>> e TargetScan <[http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)>. O critério de escolha se deu a partir de genes em comum validados nas duas ferramentas.

### 3.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA ROC

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em diferenciar tecidos com e sem CCEO, optou-se pela construção da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), a qual avalia a taxa de verdadeiro positivos *versus* a taxa de falso positivos. A área sob a curva (AUC) é utilizada para determinar a capacidade do teste de discriminar entre as populações doentes e saudáveis (METZ, 1978), assim, trata-se de uma maneira eficaz de resumir a acurácia de um determinado teste ou resumir a acurácia de um candidato a biomarcador em separar os doentes dos indivíduos sem a doença.

### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, sob número 077/09. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4. RESULTADOS

Foram analisadas 36 amostras de tecidos, sendo 18 provenientes de pacientes com CCEO e 18 pertencentes a indivíduos sem câncer oral. Para a análise de todos os miRNAs, primeiramente testou-se a normalidade das amostras. Através do teste de *Kolmogorov Smirnov* verificou-se que todas as amostras não apresentavam normalidade, uma vez que os valores de  $p$  para os miRNAs apresentaram valores inferiores a 0,05. (*hsa-miR-17*:  $P=0,000$ ; *hsa-miR-21*:  $P=0,001$ ; *hsa-miR-31*:  $P=0,025$ ; e *hsa-miR-221*:  $P=0,006$ ).

Devido a anormalidade das amostras, aplicou-se então um teste não paramétrico – teste de *Wilcoxon Mann-Whitney*. A Figura 10 mostra os Box Plots de comparação dos níveis de expressão dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* entre os tecidos com e sem CCEO. Para o *hsa-miR-17*, os dados mostraram diferenças significativas entre os grupos, sendo as medianas obtidas para o grupo com CCEO de 5,59 e para o grupo sem câncer de 1,75 (Teste de *Wilcoxon Mann-Whitney*,  $P=0,000$ ) o que evidencia a hiperexpressão do *hsa-miR-17* nas amostras com CCEO.

A comparação dos níveis de expressão do *hsa-miR-21* em amostras com e sem CCEO mostra que houve diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos, com mediana de 5,73 para o grupo com CCEO e 1,42 para o grupo sem câncer (Teste  $T$  de *Student*,  $P=0,003$ ). O *hsa-miR-21* apresentou-se hiperexpresso nas amostras de CCEO.

O *hsa-miR-31* apresentou diferenças estatísticas significativas de expressão entre os dois grupos, sendo a mediana referente ao grupo com CCEO de 1,14 e -1,79 para o grupo sem câncer (Teste  $T$  de *Student*,  $P=0,005$ ). Os dados mostram que o *hsa-miR-31* apresentou um perfil hiperexpresso nas amostras com CCEO.

Os níveis de expressão do *hsa-miR-221* entre os grupos com e sem CCEO também apresentou diferenças estatísticas significativas, sendo a média de expressão do grupo com mediana igual a 2,84 para o grupo com CCEO e -0,26 para o grupo sem câncer (Teste  $T$  de *Student*,  $P=0,014$ ). O *hsa-miR-221* obteve um perfil hiperexpresso nas amostras com CCEO.

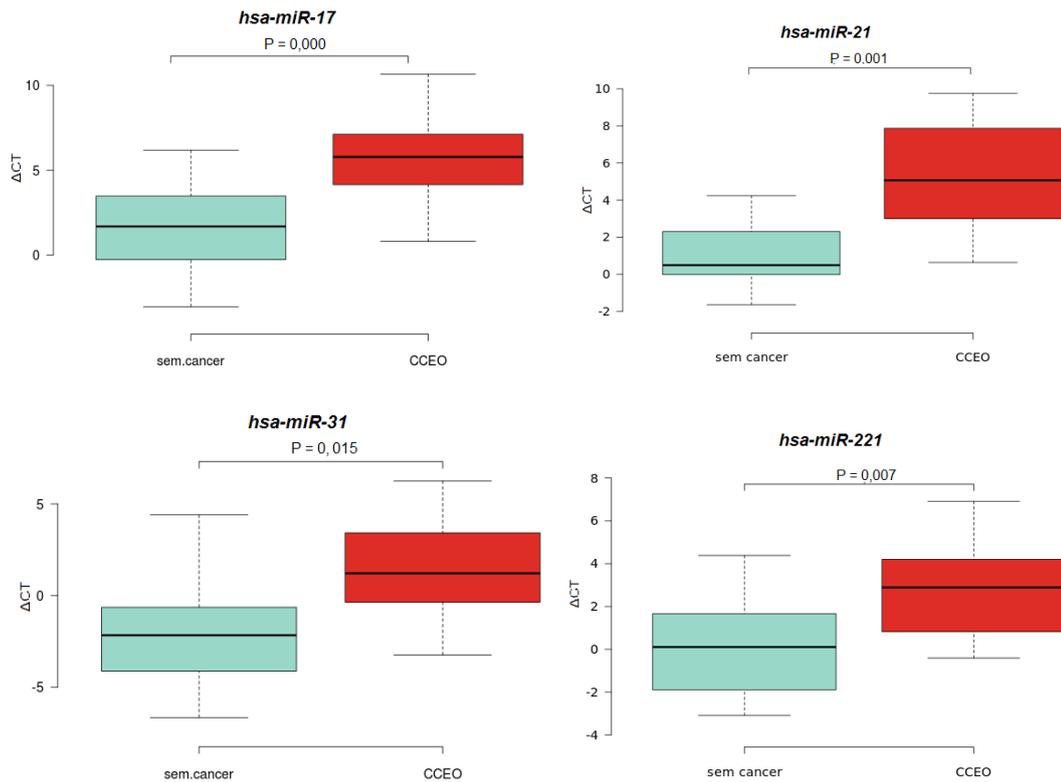


Figura 11: Box Plots de comparação entre os níveis de expressão dos microRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em amostras com e sem CCEO.

A predição *in silico*, com o auxílio das ferramentas online mirTarBase e TargetScan, revelou como genes alvos dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* os descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Genes alvos dos microRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221*.

<i>hsa-miR-17</i>	<i>hsa-miR-21</i>	<i>hsa-miR-31</i>	<i>hsa-miR-221</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>PTEN</i>	<i>FZD3</i>	<i>CDKN1B</i>
<i>PKD2</i>	<i>TPM1</i>	<i>MMP16</i>	<i>CDKN1C</i>

A Tabela 2 mostra o envolvimento dos genes alvos dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em processos biológicos fundamentais.

Tabela 2: Envolvimento dos genes alvos em processos biológicos fundamentais.

Gene	Expressão	Proliferação Celular	Metástase	Invasão Tumoral	Progressão Tumoral	Referências
<i>CDKN1A</i>	↓	•				IVANOVSKA et al., 2008; WU et al., 2010.
<i>PKD2</i>	↓	•				SUN et al., 2012
<i>PTEN</i>	↓		•	•		CERVIGNE, et al., 2009; CHANG et al., 2008
<i>TPM1</i>	↓		•	•		CERVIGNE, et al., 2009; ZHU, et al., 2007
<i>FZD3</i>	↓				•	VALASTYAN et al., 2009
<i>MMP16</i>	↓				•	VALASTYAN et al., 2009.
<i>CDKN1B</i>	↓	•				FORNARI et al., 2008
<i>CDKN1C</i>	↓	•				FORNARI et al., 2008

A curva ROC foi utilizada a fim de traçar a acurácia dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em discriminar os tecidos com e sem CCEO, por meio da separação entre a taxa positiva real (sensibilidade) e a taxa de falso positivos

(especificidade). As curvas ROC destes miRNAs estão ilustradas na Figura 12. A área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% e o valor de P dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221*, correspondeu a: AUC=0,849 (IC95%: 0,72-0,97, P=0,000); AUC=0,877 (IC95%: 0,77-0,99, P=0,000); AUC=0,779 (IC95%: 0,62-0,94, P=0,006); AUC=0,821 (IC95%: 0,69-0,96, P=0,001) respectivamente.

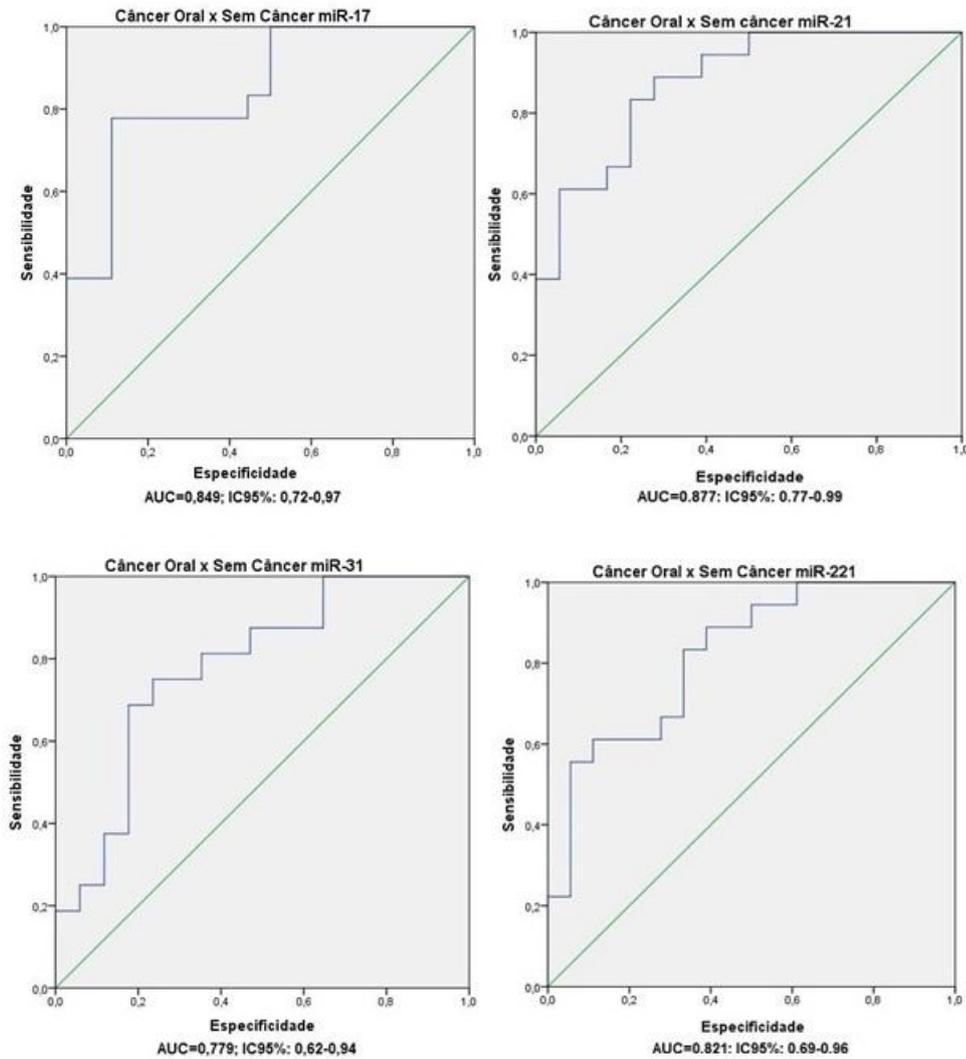


Figura 12: Curvas ROC dos miRNAs selecionados para a distinção entre os tecidos com e sem CCEO.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os perfis de expressão de quatro miRNAs: *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* em amostras com e sem CCEO. Buscou-se também, os genes alvos de cada um miRNA, bem como o seu envolvimento em processos biológicos fundamentais. Por fim, construiu-se a curva ROC dos miRNAs a fim de avaliar a sua capacidade ou não de distinção entre tecidos com e sem CCEO.

Este é o primeiro estudo na literatura que correlaciona a expressão específica do *hsa-miR-17* em amostras de tecidos de CCEO. Nossos resultados demonstram um perfil hiperexpresso do *hsa-miR-17* em amostras com CCEO, em relação as amostras sem câncer. Este miRNA faz parte do *cluster miR-17-92*, que como já mencionado, agrupa as famílias de miRNAs que têm sido relacionadas a vários tipos de câncer, sendo os seus membros comumente descritos como oncomiRs, por promover a proliferação celular e a angiogênese, além de inibir a apoptose (HAYASHITA et al., 2005; HAMMOND et al., 2008; GRILLARI et al., 2010).

No presente estudo, o *hsa-miR-21* apresentou-se hiperexpresso em amostras de tecidos com CCEO, quando comparados a amostras de tecidos sem câncer. Este miRNA trata-se de um dos mais associados ao desenvolvimento do câncer. Sua hiperexpressão foi descrita em diversos estudos com cânceres de cabeça e pescoço (CHANG et al., 2008; HUANG et al., 2010; KIMURA et al., 2010; REIS et al., 2010). Além disso, este miRNA também apresentou perfil hiperexpresso em outros tipos de câncer, incluindo o de pulmão, neuroblastoma, meduloblastoma e estômago (HAYASHITA et al., 2005; VOLINIA et al., 2006; MATSUBARA et al., 2007; PETROCCA et al., 2008; UZIEL et al., 2009).

O *hsa-miR-21* regula a proliferação celular, apoptose, atua na progressão neoplásica, e vem sendo descrito como hiperexpresso em vários tipos de câncer (HERMANSEN et al., 2013). Os nossos resultados estão de acordo com inúmeros estudos, nos quais a hiperexpressão do *hsa-miR-21* apresenta-se em amostras tumorais.

Em nossos resultados, o *hsa-miR-31* apresentou-se hiperexpresso em amostras de CCEO. No estudo de Chattopadhyay e colaboradores (2016), também observou-se a hiperexpressão do *hsa-miR-31* em amostras de tecido de câncer oral, leucoplasia e líquen plano. Resultados similares foram relatados em estudos com linhagens celulares de CCEO e de outros cânceres de cabeça e pescoço (KOZAKI et al., 2008; WONG et al., 2008; SHIIBA et al., 2010). A hiperexpressão do *hsa-miR-31* também foi descrita em amostras de saliva,

mostrando que este miRNA possui potencial para atuar como biomarcador na detecção do estágio inicial do CCEO (AL-MALKEY et al., 2015).

Existem poucos estudos na literatura que relacionem a expressão do *hsa-miR-221* ao câncer oral. No estudo de TRAN e colaboradores (2007), o *hsa-miR-221* apresentou-se hiperexpresso em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço. Os nossos resultados estão de acordo com o estudo de Avissar e colaboradores (2010), no qual relatou-se a hiperexpressão do *hsa-miR-221* em amostras de tecidos de câncer de cabeça e pescoço, incluindo amostras de língua, laringe e úvula.

A predição *in silico* dos genes alvos dos miRNAs em estudo revelou os genes *CDKN1A* e *PKD2* como alvos do *hsa-miR-17*; *PTEN* e *TPM1* como alvos do *hsa-miR-21*; *FZD3* e *MMP16* como alvos do *hsa-miR-31* e *CDKN1B* e *CDNK1C* sendo alvos do *hsa-miR-221*. O gene *CDKN1A* faz parte da família Cip/Kip de inibidores de ciclina cinase, e atua inibindo a progressão do ciclo celular, na fase G1 (WU et al., 2010; FUKAZAWA et al., 2016). Quando regulado negativamente pelo *hsa-miR-17*, provoca um descontrole celular que corrobora para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, como por exemplo, o linfoma de células B (INOMATA et al., 2008; IVANOVSKA et al., 2008; PETROCCA et al., 2008). O gene *PKD2* é codificado por uma proteína de membrana que atua como um canal de cátion permeável ao cálcio. Esta proteína interage com a policistina 1, a qual regula a proliferação, adesão, migração, diferenciação e maturação celular (GÓMEZ et al., 2009). O gene *PKD2* é reprimido pós-transcricionalmente pelo *hsa-miR-17*. A hiperexpressão deste miRNA pode promover a proliferação celular, mediante a inativação de *PKD2* (SUN et al., 2010).

O gene *PTEN* foi descrito como alvo do *hsa-miR-21* em vários estudos (CHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2008; CHILDS et al., 2009; LU et al., 2009). O estudo de CERVIGNE e colaboradores (2009) mostrou que a expressão aumentada do *hsa-miR-21* pode inibir a apoptose através da inativação do gene *PTEN*. Por sua vez, esta inativação estimula a ativação da via *AKT*, a qual exerce atividade contra a apoptose e estimula a progressão tumoral (ALTOMARE e TESTA, 2005). O gene *TPM1* faz parte da família de tropomiosinas envolvidas com o sistema de contratilidade dos músculos estriados e lisos. Este gene também é reprimido pelo *hsa-miR-21*. ZHU e colaboradores (2008), mostraram que a ligação do *hsa-miR-21* aos genes *PTEN* e *TPM1*, promove os efeitos oncogênicos deste miRNA, como a invasão tumoral e metástase.

O gene *FZD3* é um locus de suscetibilidade a esquizofrenia (HASHIMOTO et al., 2005). O gene *MMP16* faz parte da família de metaloproteinases de matriz, a qual agrupa proteínas envolvidas na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos

normais (como reprodução e remodelação tecidual) e anormais (como a metástase) (TAKINO et al., 2003; SANJMYATAV et al., 2011). Sabe-se que a expressão diminuída dos genes *FZD3* e *MMP16* pela ação do *hsa-miR-31*, em linhagens celulares de câncer de mama, apresentou relação com a progressão da doença (VALASTYAN et al., 2009).

O gene *CDKN1B* codifica uma proteína que atua como inibidor de quinase dependente de ciclina. A degradação desta proteína é necessária para a transição da quiescência celular para o estado proliferativo (PENGA et al., 2015). Demonstrou-se que a inativação monoalélica de *CDKN1B* aumenta significativamente o desenvolvimento do câncer (BORRIELLO et al., 2010). O gene *CDKN1C* codifica uma proteína que inibe a ligação de vários complexos G1 ciclina/CDK. Entre as suas vias relacionadas está a transcrição de VDR na regulação de genes envolvidos na osteoporose. VDR trata-se de um regulador negativo da proliferação celular (BRIOUDE et al., 2015). A inativação dos genes *CDKN1B* e *CDKN1C* através da hiperexpressão do *hsa-miR-221* foi relatada no carcinoma hepatocelular. A repressão de *CDKN1B* possui um significado prognóstico relevante, uma vez que esta condição está associada a um estágio de tumor avançado e uma sobrevida reduzida (FORNARI et al., 2008).

Fica evidente que os genes alvos abordados participam em processos biológicos importantes característicos de neoplasias malignas, como a proliferação celular e a invasão tumoral. Todos possuem algo em comum: são supressores tumorais, e suas regulações negativas favorecem eventos oncogênicos importantes.

O método da área sob a curva ROC tem sido amplamente utilizado para a identificação de biomarcadores (GRUND et al., 2010; STARMANS et al., 2011). Em geral, uma AUC de 0,5 sugere que não há discriminação entre doentes e indivíduos sem a doença; a AUC de 0,7 a 0,8 é considerada aceitável, a AUC de 0,8 a 0,9 é considerada boa e de mais de 0,9 é considerada excelente (MANDREKAR, 2010). No presente estudo observou-se que os miRNAs apresentaram AUC entre 0,8 e 0,9, com exceção do *hsa-miR-31*, o qual apresentou AUC=0,779.

Demonstrou-se neste estudo que os miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* apresentaram-se hiperexpressos em amostras de tecidos com CCEO, quando comparadas a amostras sem câncer. Por apresentarem a expressão elevada em tumores malignos e inibir a ação de genes supressores tumorais identificados *in silico*, tais miRNAs atuaram como oncomiRs. Há uma complexa rede de sinalização entre estes genes, que causa um desbalanço essencial para a progressão do câncer.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, os miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221* apresentaram-se hiperexpressos em amostras de tecidos com CCEO, quando comparadas aos tecidos livres de câncer. O presente estudo foi o primeiro a relatar a hiperexpressão do *hsa-miR-17* em amostras de tecidos com CCEO.

Os genes alvos previstos dos miRNAs em estudo (*CDKN1A*, *PKD2*, *FZD3*, *MMP16*, *PTEN*, *TPM1*, *CDKN1B* E *CDKN1C*) correspondem a supressores tumorais, pois quando regulados negativamente pelos miRNAs em estudo, desencadeiam vários processos biológicos importantes para a carcinogênese.

Por meio da construção da curva ROC observou-se que os miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21* e *hsa-miR-221* apresentaram uma boa acurácia para a diferenciação entre tecidos com e sem CCEO (AUC=0,849; AUC=0,877 e AUC=0,821). Mesmo que a sua acurácia não tenha se mostrado boa, o *hsa-miR-31* apresentou uma AUC dentro dos limites aceitáveis (AUC=0,779).

Os dados referentes a análise de expressão dos miRNAs *hsa-miR-17*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-31* e *hsa-miR-221*, bem como os da curva ROC sugerem que os quatro miRNAs possuem potencial para atuarem como biomarcadores a fatores de risco ao desenvolvimento do CCEO.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTOMARE, D.; TESTA, J. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, **24**: 7455–7464, 2005.

ANDRADE, S.; MUNIZ, L.; SOARES, J. et al. Câncer de boca: avaliação do conhecimento e conduta dos dentistas na atenção primária à saúde. **Rev. bras. odontol.**, **71**, (1): 42-7, 2014.

ARDEKANI, A.; NAEINI, M. The role of micornas in human diseases. **Avicenna J Med Biotechnol**, **2** (4): 161–179, 2010.

ARGIRIS, A.; KARAMOUZIS, M.; RABEN, D. et al. Head and neck cancer. **Lancet**, **371** (9625): 1695-1709, 2008.

AVISSAR, M.; CHRISTENSEN, B.; KELSEY, K.; MARSIT, C. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, **15** (8): 2850-5, 2010.

BABIARZ, J. E. et al. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes & development**, **22** (20): 2773-2785, 2008.

BAGAN, J; SCULLY, C. Recent advances in Oral Oncology 2007: Epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. **Oral Oncology**, **44**, (2), 103-8, 2008.

BALLARINO, M.; PAGANO, F.; GIRARDI, E. et al. Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs. **Molecular and cellular biology**, **29**, (20): 5632-5638, 2009.

BARAN-GALE, J.; FANNIN, E.; KURTZ, C. Sethupathy, Beta Cell 5'-Shifted Isomirs Are Candidate Regulatory Hubs In Type 2 Diabetes. **Plos One**, **8**: e73240, 2013.

BARTEL, D. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, **166**, (2): 281-297, 2004.

BATISTA, D. R. R.; MATTOS, M.; SILVA, S. F. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Rev Enferm** **5** (3): 499-510, 2015.

BEREZIKOV, E.; CHUNG, W. J.; WILLIS, J. et al. Mammalian mirtron genes. **Molecular Cell**, **28** (2): 328-336, 2007.

BERGER, J, et al. MBD2 is required for correct spatial gene expression in the gut. **Molecular and Cellular Biology**, **27**, (11): 4049–4057, 2007.

BORRIELLO, A.; BENCIVENGA, D.; RAGIONE, F. The unpredictable consequences of CDKN1B/p27Kip1 mutations in cancer. **Cell Cycle**, **14** (18): 2865–2866, 2015.

BRAAKHUIS, B; BLOEMENA, E; LEEMANS, C; R. BRAKENHOFF, H. Molecular Analysis of Surgical Margins in Head and Neck Cancer: More than a Marginal Issue. **Oral Oncology**, **46** (7): 485-491, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA) – Estimativas de câncer para 2016 e 2017. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em: 01 Nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Coordenação de Educação ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2<sup>a</sup> ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

BRAUN, J. E.; HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. The role of gw182 proteins in mirna-mediated gene silencing, **Adv Exp Med Biol**, **768**: 147 -163, 2013.

BRIOUDE, F.; NETCHINE, I.; PRAZ, F. et al. Mutations of the Imprinted CDKN1C Gene as a Cause of the Overgrowth Beckwith–Wiedemann Syndrome: Clinical Spectrum and Functional Characterization. **Hum Mutat**, **36** (9):894-902, 2015.

BROCHADO, J. I. V. **Xerostomia e produção de saliva artificial na doença oncológica**. Dissertação de Mestrado. Porto. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde, 2014. 79p.

BUSCAGLIA, L. E.; LI, Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. **Chin J Cancer**, **30**(6): 371–380, 2011.

CARVALHO, A. C.; NETO, C. S.; MAIA, D. C. et al. Accuracy Of Micromnas As Markers For The Detection Of Neck Lymph Node Metastases In Patients With Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. **Bmc Medicine**, **13**: 108, 2015.

CERVIGNE, N.; REIS, P.; MACHADO, J. et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. **Human Molecular Genetics**, **18** (24): 4818-29, 2009.

CHAN, S. H.; WU, C. W.; LI, A. F. et al. miR-21 microrna expression in human gastric carcinomas and its clinical association. **Anticancer Res**, (2a): 907-11, 2008.

CHANG, S.; JIANG, W.; SMITH, I.; POETA, L.; BEGUM, S.; GLAZER, Chad, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, **123** (12): 2791-7, 2008.

CHATTOPADHYAY, E.; SINGH, R.; RAY, A. et al. Expression deregulation of mir31 and CXCL12 in two types of oral precancers and cancer: importance in progression of precancer and cancer. **Scientific Reports**, **6**, 2016.

CHELOUFI, S.; DOS SANTOS, C. O.; CHONG, M. M., et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature**, **465** (7298): 584-589, 2010.

CHEN, C.; LING, L.; LODISH, H. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, **303** (5654): 83-86, 2004.

CHENG, A.; BYROM, M.; SHELLON, J. et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Research**, **33** (4): 1290-1297, 2005.

CHILDS, G.; FAZZARI, M.; KUNG, G. et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. **The American Journal of Pathology**, **174** (3): 736-45, 2009.

CIFUENTES, D.; XUE, H.; TAYLOR, D. W. et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. **Science**, **328**, (5986): 1694-1698, 2010.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Genetics Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **55** (2): 165-174, 2009.

DANTAS, E. L.; SÁ, F. H.; CARVALHO, S. M. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **55**(3): 263-269, 2009.

DARNET, S.; MOREIRA, F.; HAMOY, I. et al. High-Troughput Sequencing of miRNAs Reveals a Tissue Signature in Gastric Cancer and Suggests Novel Potencial Biomarkers. **Bioinformatics and Biology insights**, **9**, 2015.

DAWES, C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft tissues. **JADA**, **139** (5 suppl):18S-24S.

DI LEVA, G.; CROCE, C. Roles of small RNAs in tumor formation. **Trends in Molecular Medicine**, **16**, (6): 257-267, 2010.

DOMINGOS, P.; PASSALACQUA, M.; OLIVEIRA, A. Câncer bucal: um problema de saúde pública. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, **26** (1): 46-52, 2014.

EDMONDS, M. D.; BOYD, K. L.; MOYO, T. et al. Microrna-31 Initiates Lung Tumorigenesis And Promotes Mutant Kras-Driven Lung Cancer. **J Clin Invest**, **126** (1): 349-64, 2016.

FABBRI, M.; GARZON, R.; CIMMINO, A. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **104**, (40): 15805–15810, 2007.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N. The mechanics of mirna -mediated gene silencing: a look under the hood of mirisc, **Nat Struct Mol Biol**, **19**: 586-593, 2012.

FERLAY, J.; AUTIER, P.; BONIOL, M. et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in europe in 2006. **Ann Oncol**, **18** (3): 581-592, 2007.

FERRARO, C. T.; CANEDO, N. H.; OLIVEIRA, S. P. et al. Infecção oral pelo hpv e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, **47** (4), 2011.

FU, X.; WANG, Q.; CHEN, J. et al. Clinical Significance Of Mir-221 And Its Inverse Correlation With P27kip<sup>1</sup> In Hepatocellular Carcinoma, et al. **Mol Biol Rep**, **38** (5): 3029-35, 2011.

FUKAZAWA, T.; GUO, M.; ISHIDA, N. et al. SOX2 suppresses CDKN1A to sustain growth of lung squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, **6**, 2016.

FUKUMOTO, I.; HANAZAWA, T.; KINOSHITA, T. et al. Microrna Expression Signature Of Oral Squamous Cell Carcinoma: Functional Role Of Microrna-26a/B In The Modulation Of Novel Cancer Pathways. **Br J Cancer**. **112** (5): 891-900, 2015.

FULCI, V.; CHIARETTI, S.; GOLDONI, M. et al. Quantitative Technologies Establish A Novel Microrna Profile Of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Blood**, **109** (11): 4944-51, 2007.

GAROFALO, M.; QUINTAVALLE, C.; DI LEVA G, Microrna signatures of trail resistance in human non-small cell lung cancer. **Oncogene**, **27** (27): 3845-55, 2008.

GRILLARI, j.; HACKL, M.; GRILLARI-VOGLAUER, R. miR-17–92 cluster: ups and downs in cancer and aging. **Biogerontology**. **11** (4): 501–506, 2010.

GASCHE, J.; GOEL, A. Epigenetic Mechanisms In Oral Carcinogenesis. **Future Oncol**. **8** (11): 1407–1425, 2012.

GÓMEZ, P. F.; MORO, E. C.; GARCÍA-COSMES, P. et al. Genetic analysis (PKD2) of autosomal dominant polycystic kidney disease. **Nefrologia**, **29** (6):562-8, 2009.

GRUND, Birgit; SABIN, Caroline. Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. **Curr Opin HIV AIDS**, **5** (6): 473-9, 2010.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, **87**: 3-14, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, **4** (5), 2011.

HARDING, S.; SANIPOUR, F.; MOSS, T. Existence of benefit finding and posttraumatic growth in people treated for head and neck cancer: a systematic review. **PeerJ**, **11**, (2), e256, 2014.

HASHIMOTO, R.; SUZUKI, T.; IWATA, N. et al. Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. **J Neural Transm (Vienna)**, **112** (2): 303-7, 2005.

HAYASHITA, Y.; OSADA, H.; TATEMATSU, Y. et al. A Polycistronic MicroRNA Cluster, Mir-17-92, Is Overexpressed In Human Lung Cancers And Enhances Cell Proliferation. **Cancer Res**, **65**: 9628–9632, 2005.

HE, L.; THOMSON, J. M.; HEMANN, M. T. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. **Nature**, **435** (7043): 828-33, 2005.

HERMANSEN, S.; DAHLROT, R.; NIELSEN, B. et al. MiR-21 expression in the tumor cell compartment holds unfavorable prognostic value in gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. **111** (1): 71–81, 2013.

HOSNI, E. S.; SALUM, F.G.; CHERUBINI, K. et al. Oral erythroplakia and speckled leukoplakia: retrospective analysis of 13 cases. **Braz J Otorhinolaryngol**, **75**, (2): 295-9, 2009.

HOSSAIN, A.; T. KUO, M.; SAUNDERS, G. Mir-17-5p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of AIB1 mRNA. **Mol Cell Biol**, **26**, (21): 8191–8201, 2006.

HUANG, H.; ZHENG, W.; ZHAO, R. et al. FBXO31 is down-regulated and may function as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, **24** (3): 715-20, 2010.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, **65** (16): 7065-7070, 2005.

IRANI, S. Distant metastasis from oral cancer: a review and molecular biologic aspects. **J int soc prev community dent**, **6** (4): 265–271, 2016.

IVANOVSKA, I; BALL, A; DIAZ, R. et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. **Mol Cell Biol**, **28**: 2167–2174, 2008.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E. et al. Cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, **59** (4): 225-49. 2009.

KARP, X.; AMBROS, V. Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. **Science**, **310** (5752): 1288-9, 2005.

KIMURA, S.; NAGANUMA S.; SUSUKI, D. et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. **Oncology Reports**, **23** (6): 1625-33, 2010.

KUMAR, G. S.; MANJUNATHA, B. S. Metastatic tumors to the jaws and oral cavity. **J oral maxillofac pathol**, **17** (1): 71–75, 2013.

LAI, E. C.; TAM, B.; RUBIN, G.M. Pervasive Regulation of Drosophila notch target genes by gy-box -, brd-box -, and k -box -class micrnas. **Genes Dev**, **19**: 1067 -1080, 2005.

LAWRIE, C. H.; SONEJI, S.; MARAFIOTI, T. et al. Microrna Expression Distinguishes Between Germinal Center B Cell-Like And Activated B Cell-Like Subtypes Of Diffuse Large B Cell Lymphoma. **Int J Cancer**, **121** (5): 1156-61, 2007.

LE SAGE, C.; NAGEL, R.; EGAN, D.A. et al. Regulation Of The P27 (Kip1) Tumor Suppressor By Mir-221 And Mir-222 Promotes Cancer Cell Proliferation. **Embo J**, **26** (15): 3699-708, 2007.

LEUNG, W.; WU, M.; KAKUGAWA, Y. et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. The **Lancet Oncology**, **9** (3): 279-87, 2008.

LEWIS, B.; BURGE, C.; BARTEL, D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, **120** (1): 15-20, 2005.

LIU, M. A.; CARMELL, M.A.; RIVAS, F. V. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, **305**: 1437-1441, 2004.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 22DDCT Method. **Methods**, **25** (4): 402-408, 2001.

LORCH, J. H.; POSNER, M.R.; WIRTH, L. J, et al. Seeking Alternative Biological Therapies: The Future of Targeted Molecular Treatment. **Oral Oncology**, **45**, (4), 447-453, 2009.

LU, Y.; THOMSON, J. M.; WONG, H.Y. et al. Transgenic Over-Expression Of The Microrna Mir-17-92 Cluster Promotes Proliferation And Inhibits Differentiation Of Lung Epithelial Progenitor Cells. **Dev Biol**, **310**: 442–453, 2007.

LU, Z.; LIU, M., STRIBINSKIS; V. et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. **Oncogene**, **27** (31): 4373-9, 2009.

MACLELLAN, S.; LAWSON, J.; BAIK, J. et al. Differential expression of mirnas in the serum of patients with high-risk oral lesions. **Cancer med**, **1** (2): 268–274, 2012.

MAIA, H. C.; PINTO, N. A.; PEREIRA, J. et al. Lesões orais potencialmente malignas: correlações clínico-patológicas. **Einstein**, **14** (1): 35-40, 2016.

MAJCHRZAK, E.; SZYBIAK, B.; WEGNER, A. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiol Oncol**, **48** (1): 1-10, 2014.

MANDREKAR, J. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **J Thorac Oncol**, **5**: 1315–1316, 2010.

MANIKANDAN, M.; DEVA MAGENDHRA RAO, A. K; GANESAN, A. Oral Squamous Cell Carcinoma: Microrna Expression Profiling And Integrative Analyses For Elucidation Of Tumourigenesis Mechanism. **Mol cancer**, **15**, 2016.

MARKOPOULOS, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. **Open Dent J**, **6**: 126–130, 2012.

MAZERON, R; TAO, Y.; LUSINCHI, A. et al. Current Concepts of Management in Radiotherapy for Head and Neck Squamous-Cell Cancer. **Oral Oncology**, **45** (4): 402-408, 2009.

MOODY, C.; LAIMINS, L. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. **10** (8): 550-60, 2010.

MOREIRA, F.; ASSUMPCÃO, M.; HAMOY, I. et al. MiRNA Expression Profile for the Human Gastric Antrum Region Using Ultra-Deep Sequencing. **PLoS ONE**, **5** e13205, 2010.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZALEZ, A. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, **6**: 1–10, 2011.

MARQUES, N. **Osteorradionecrose dos Maxilares**. Dissertação de Mestrado. Porto. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde, 2015. 80p.

METZ, C. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med**, **8** (4):283-98, 1978.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.; PINHAL, M. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, **67**: 7-19, 2010.

NASMAN, A.; ATTNER, P.; HAMMARSTEDT, L. et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? **International Journal of Cancer**, **2** (125): 362–366, 2009.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>>. Acesso em: 17 Nov. 2016.

NEVILLE, B.; DAMM, D.; ALLEN, C. et al. J. Patologia Oral & Maxilofacial. 3ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, 2009.

NIELSEN, C.; SHOMRON, N.; SANDBERG, R. et al. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. **RNA**, **13** (11): 1894-910, 2007.

O'DAY, E.; LAL, A. Micornas And Their Target Gene Networks In Breast Cancer. **Breast Cancer Res**, **12** (2): 201, 2010.

O'DONNELL, K.; WENTZEL, E.; ZELLER, K. et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature**, **435**: 839-843, 2005.

OHANIAN, M.; HUMPHREYS, D. T.; ANDERSON, E. et al. A Heterozygous Variant In The Hum An Cardiac Mir-133 Gene, Mir133a2, Alters Mirna Duplex Processing And Strand Abundance. **Bmc Genet**, **14**, 2013.

OKAMURA, K.; HAGEN, J.W.; DUAN, H. et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. **Cell**, **130** (1): 89-100, 2007.

OKURA, M.; AIKAWA, T; SAWAI, N. et al. Decision analysis and treatment threshold in a management for the N0 neck of the oral cavity carcinoma. **Oral Oncology**, **45** (10) 908–911, 2009.

OLIVEIRA, L.; RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L. et al. HPV infection in Brazilian oral squamous cell carcinoma patients and its correlation with clinicopathological outcomes. **Molecular Medicine Reports**, **1**, (1): 123–129, 2008.

PAIVA, M.; BIASE, R.; MORAES, J. et al. Complicações Oraís Decorrentes da Terapia Antineoplásica. **Arquivos em odontologia**, **48** (01): 48-55, 2010.

PASSARELLI, D. H.; GOBBO, S. R.; CAMPOS, M. et al. A interdisciplinaridade no diagnóstico de carcinoma epidermóide. **Rev odontol Univ Cid São Paulo (Online)**, **23**, (3): 273-7, 2011.

PENGA, Y.; WUA, W.; CHENB, L. et al. Upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors CDKN1B and CDKN1C in hepatocellular carcinoma-derived cells via goniiothalamine-mediated protein stabilization and epigenetic modifications. **Toxicology Reports**, **2**: 322–332, 2015.

PEREZ, R.; FREITAS, S.; DEDIVITIS, R. et al. Estudo epidemiológico do carcinoma espinocelular da boca e orofaríngeo. **International Archives of Otorhinolaryngology**, **11** (3): 271-277, 2007.

PETROCCA, F.; VISIONE, R.; ONELLI, M. et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGF $\beta$ -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. **Cancer Cell**, **13**: 272–286, 2008.

PFAFF, J.; MEISTER, G. Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing, **Biochem Soc Trans**, **41**: 855-860, 2013.

PICHIORRI, F.; SUH, S.; LADETTO, M. et al. MicroRNAs Regulate Critical Genes Associated With Multiple Myeloma Pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **105** (35): 12885-90, 2008.

POGORZELSKI, M.; GAULER, T.; BREITENBUECHER, T. C. et al. Impact of human papilloma virus infection on the response of head and neck cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy. **Cell Death & Disease**, **5** (2), 2014.

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N. et al. Human RISC Couples microRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. **Cell**, **123**: 631-640, 2005.

RAMDAS, L.; GIRI, U.; ASHORN C. et al. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. **Head Neck**, (5): 642-54, 2009.

RANA, M.; ZAPF, A.; KUEHLE, M. et al. Clinical evaluation of an autofluorescence diagnostic device for oral cancer detection: a prospective randomized diagnostic study. **Eur J Cancer Prev**, **21**, (5): 460-6, 2012.

RAPIDIS, A.; GULLANE, P.; LANGDON, J. et al. Major Advances in the Knowledge and Understanding of the Epidemiology, Aetiopathogenesis, Diagnosis, Management and Prognosis of Oral Cancer. **Oral Oncology**, **45**, (4): 299-300, 2009.

REICHART, P.; PHILIPSEN, H. Oral erythroplakia--a review. **Oral oncol**, **41** (6): 551-61, 2005.

REIS, P.; TOMENSON, M.; CERVIGNE, N. et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. **Mol Cancer** **9**, 2010.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.; KHAYAT, A.; SILVA, A. et al. Ultra-Deep Sequencing Reveals the microRNA Expression Pattern of the Human Stomach. **PLoS ONE**, **5** (10) e13205, 2010.

ROLDO, C.; MISSIAGLIA, E.; HAGAN, J. P. et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. **Journal of Clinical Oncology**, **24** (29): 4677-4684, 2006.

ROSSOE, E.; TEBCHERANI, A.; SITTART, J. et al. Actinic cheilitis: aesthetic and functional comparative evaluation of vermilionectomy using the classic and W-plasty techniques. **An Bras Dermatol**, **86** (1): 65-73, 2011.

RUBY, J.; JAN, C. H.; BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**, **448**, (7149): 83-86, 2007.

SAKAKURA, C.; HAGIWARA, A.; YASUOKA, R. et al. Amplification and overexpression of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in primary gastric cancers. **Int. J. Cancer**, **89**: 217-223, 2000.

SALAMA, J.; SEIWERT, T.; VOKES, E. Chemo-radiotherapy for locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol**, **25** (26): 4118 – 4126, 2007.

SAMPAIO, R. M.; LIMA, M.; ABREU, M, et al. Correlação do estadiamento clínico com a expressão da e-caderina em carcinoma escamocelular intrabucal. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.** **11** (3), 85-92, 2011.

SANJMYATAV, J.; STEINER, T.; WUNDERLICH, H. et al. A specific gene expression signature characterizes metastatic potential in clear cell renal cell carcinoma. **J Urol**, **186** (1): 289-94, 2011.

SASSEN, S; MISKA, E; CALDAS, C. MicroRNA – implications for cancer. **Virchows Arch**, **452**, (1): 1-10, 2008.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral Squamous Cell Carcinoma Overview. **Oral Oncology**, **45** (4), 301- 308, 2009.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Recent advances in oral oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. **Oral Oncology**, **44**, (3): 211-215, 2008.

SERA, E.; OLIVEIRA, R. V.; MARIOTTO, A. H. Avaliação dos cuidados odontológicos pré e trans tratamento radioterápico. **Braz j periodontol**, **23**: 30-38, 2013.

SHAH, J; GIL, Z. Current Concepts in Management of Oral Cancer-Surgery. **Oral Oncology**, **45**, (4) 394-401, 2009.

SHENOI, R.; DEVRUKHKAR, V.; SHARMA, B. K. et al. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: A retrospective study. **Indian Journal of Cancer**, **49**, (1): 21-26, 2012.

SHIGA, K.; HARA, M.; NAGASAKI, T. et al. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. **Cancers**, **7** (4): 2443-2458, 2015.

SHIIBA, M.; UZAWA, K.; TANZAWA, H. MicroRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). **Cancers**, **2** (2): 653–669, 2010.

SI, M. L.; ZHU, S.; WU, H. et al. Mir-21-Mediated Tumor Growth. **Oncogene**, **26** (19): 2799-803, 2007.

SILVEIRA, A.; GONÇALVES, J.; SEQUEIRA, T. et al. Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **15**, (1): 38-48, 2012.

SILVEIRA, E. J.; LOPES, M. F.; SILVA, L. M. et al. Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, **45** (3), 2009.

SONG, B.; WANG, C., LIU, J. et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, **29** (1), 2010.

SPEIGHT, P. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. **Head and Neck Pathology**, **1** (1): 61–66. 2007.

STARMANS, M.; FUNG, G.; STECK, H. et al. A simple but highly effective approach to evaluate the prognostic performance of gene expression signatures. **PLoS One**, **6** (12), 2011.

SUN, B.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **59** (5): 725-37, 2008.

SUN, H.; LI, Q. W.; LV, X. Y. et al. MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. **Molecular Biology Reports**, **37** (6): 2951-2958, 2010.

TAKAMIZAWA, J.; KONISHI, H.; YANAGISAWA, K. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Research**, **64** (11): 3753-6, 2004.

THOMAS, M.; LIEBERMAN, J.; LAL, A. Desperately seeking microRNA targets. **Nature Structural & Molecular Biology**, **17** (10): 1169-74, 2010.

TRAN, N.; MCLEAN, T.; ZHANG, X. et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, v. **358** (1): 12-17, 2007.

VALASTYAN, S.; REINHARDT, F.; BENAICH, N. et al. A Pleiotropically Acting microRNA, miR-31, Inhibits Breast Cancer Metastasis. **Cell**, **137** (6): 1032–1046, 2009.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral oncol**, **45**, (4-5): 317-23, 2009.

VAROL, N.; KONAC, E.; GUROCAK, O. et al. The realm of miRNAs in cancers. **Molecular Biology Reports**, **38**: 1079-89, 2011.

VOLINIA, S.; CALIN, G.; LIU, C. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103** (7): 2257-61, 2006.

WANG, A.; LANDÉN, N. X.; MEISGEN, F. et al. MicroRNA-31 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates cell motility and colony formation ability of tumor cells. **Plos One**, **9** (7), e103206, 2014.

WANG, K.; CHEN, X.; ZHAN, Y. et al. miR-335 inhibits the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells through direct suppression of BCL-W. **Tumour Biology**, **36** (9): 6875-82, 2015.

WANG, Z. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. **Methods in Molecular Biology**, **676**: 211-223, 2011.

WARNAKULASURIYA, S. Global Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancer, **Oral Oncology**, **45** (4): 309-316, 2009.

WERBROUCK, J.; RUYCK, K.; DUPREZ, F. et al. Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes. **International Journal of Radiation Oncology** **73** (4): 1187-1195, 2009.

WU, S.; HUANG, S.; DING, J. et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. **Oncogene**, **29**, (15): 2302–2308, 2010.

XU, P.; GUO, M.; BRUCE, H. MicroRNAs and the regulation of cell death. **Trends in Genetics**. v. **20** (12): 617-624, 2004.

YANG, J. S.; LAI, E. C. Dicer -independent, ago2 -mediated microRNA biogenesis in vertebrates, **Cell Cycle**, **9**: 4455-4460, 2010.

YANG, W.; ZHAO, S.; LIU, F. et al. Health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer: Reconstruction with free fibula flap. **Medicina Oral Patologia Oral Y Cirurgia Bucal**, **19**. (4) e414-418, 2014.

ZAHARAN, F.; GHALWASH, D.; SHAKER, O. Salivary MicroRNAs In Oral Cancer. **Oral Dis**, **21** (6): 739-47, 2015.

ZHANG, W.; DAHLBERG, J.; TAM, W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. **The American Journal of Pathology**; v. **171** (3): 728-738, 2007.

ZHANG, Z.; XIE, D.; LI, X. et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. **Human Pathology**, **38** (4): 598-606, 2007.

ZHAO, D.; XU, Q.; CHEN, X. et al. Human Papillomavirus as an Independent Predictor in Oral Squamous Cell Cancer. **International Journal Oral Science**, **1** (3): 119–125, 2009.

ZHU, S.; WU, H.; WU, F. et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. **Cell Research**, **18** (3): 350-9, 2008.