FLÁVIA MAZIERO ANDREGHETTO

**Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua
contribuição como marcador de metástases em carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço**

São Paulo

2015

FLÁVIA MAZIERO ANDREGHETTO

**Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua
contribuição como marcador de metástases em carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo, para obter o título de Doutor,
pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia
bucal

Orientador: Profa. Dra Patricia
Severino.

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Andreghetto, Flávia Maziero.

Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua contribuição como marcador de metástases em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço / Flávia Maziero Andreghetto ; orientador Patricia Severino. -- São Paulo, 2015.

134 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Metástase linfática. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Biomarcadores. I. Severino, Patricia. II. Título.

Andreghetto FM. Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua contribuição como marcador de metástases em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor/Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a).

Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).

Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).

Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).

Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).

Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

À minha mãe por ter
acreditado que um dia
tudo daria certo.
Obrigada pelo amor e
por nunca ter me
deixado desistir, mesmo
nos tempos mais
difíceis. E por ter
acreditado que eu
pudesse viver o seu
sonho.

Ao meu pai que
acompanhou toda a
jornada do
desenvolvimento dessa
tese, mas que não pode
vê-la concluída. Você
sempre estará comigo.
Obrigada pelo apoio e
amor!

Ao meu irmão pelas
boas palavras nas horas
certas e pelo amor.

Ao meu marido Ivo pelo
amor, dedicação, apoio
e compreensão nos
momentos em que
estive ausente.

AGRADECIMENTOS

A realização dessa tese marca o início e o fim de uma etapa muito importante da minha vida.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a sua concretização.

À minha orientadora Dra. Patricia Severino, agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo e por acreditar que eu pudesse desenvolver este projeto. Agradeço ainda a atenção, dedicação, paciência e incentivo, que foram com certeza, fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao GENCAPO, agradeço pela disponibilidade das amostras que utilizei nesse estudo e pela oportunidade de fazer parte das discussões.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, agradeço pela disponibilidade da estrutura física para a realização deste trabalho.

À Aline Oliveira, Jéssica Boscariol, Mariana Barbosa e Mônica, que com tanto carinho coletaram as amostras de plasma e as compartilhou para que esse projeto pudesse acontecer, agradeço a atenção e colaboração.

Ao meu grupo de pesquisa Jean Parpinelli, Camila Fernandes e Bruna Lorencini, pessoas especiais pelo companheirismo e convívio dentro e fora do laboratório.

À querida Adriana Sondermann que com tanta dedicação me ensinou sobre patologia de carcinomas de cabeça e pescoço, e me mostrou que poderia ser encantador estudá-los.

À todos os colegas e amigos do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, em especial Fernanda Paladino (Fusca) e Pedro Papotto (Papotinho),

agradeço pelas conversas acolhedoras, discussões e, sobretudo, por me fazerem rir nos momentos mais difíceis. Vocês sempre morarão no meu coração!

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal, Néia, Zilda e Vinícius agradeço por sempre estarem a disposição quando preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pelo suporte financeiro concedido para que eu pudesse me dedicar de forma integral no doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço o auxílio financeiro através do projeto de pesquisa 10/51168-0.

À minha família, agradeço pelos ensinamentos, carinho e suporte. Amo vocês!

À todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

RESUMO

Andreghetto FM. Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua contribuição como marcador de metástases em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

MicroRNAs são pequenos RNAs que desempenham papel importante como reguladores da expressão gênica em processos de iniciação e progressão do câncer. Achados recentes demonstram que microRNAs estão presentes em biofluidos, podendo ser encontrados na corrente sanguínea. Especula-se que alterações nos níveis de expressão dos microRNAs em tecidos tumorais podem ser identificadas em plasma. Apesar de desafios relacionados a variáveis analíticas e pré-analíticas desta abordagem, há um grande interesse clínico em identificar microRNAs circulantes como biomarcadores em câncer dada a simplicidade e baixo risco de um exame como este. O carcinoma de cabeça e pescoço está entre as principais neoplasias no mundo. Ele está associado ao uso crônico de tabaco e álcool e a taxa de sobrevivência média fica em torno de 50% em 5 anos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer parâmetros adequados para processamento e detecção de microRNAs circulantes, assim como identificar microRNAs circulantes que pudessem caracterizar indivíduos portadores de carcinoma de cavidade oral e de orofaringe e, em particular, distinguir aqueles que apresentavam metástase linfonodal ao diagnóstico daqueles livres de comprometimento linfonodal. A expressão de 179 microRNAs foi analisada por PCR em tempo real no plasma de 45 indivíduos portadores de carcinoma epidermoide (28 com metástase linfonodal ao diagnóstico e 17 sem metástases linfonodais) e 15 indivíduos saudáveis. As amostras foram pareadas quanto a sexo, idade e quanto ao uso de tabaco. Identificamos microRNAs preferencialmente expressos em amostras de plasma de portadores do tumor, dentre os quais microRNAs já descritos como relevantes em carcinoma epidermoide oral, como miR-210, e miRNAs ainda pouco estudados, como miR-543. Diferenças importantes foram observadas quando tumores de cavidade oral foram analisados separadamente dos

tumores de orofaringe, de acordo com diferenças moleculares existentes entre estes sub-sítios tumorais. MicroRNAs possivelmente envolvidos com o processo metastático foram identificados quando amostras de plasma de pacientes que apresentavam metástases em linfonodos foram comparadas com amostras de pacientes sem comprometimento linfonodal. Dentre estes miRNAs destacam-se miR-192 e miR-574, mais expressos em plasma de indivíduos portadores de tumores metastáticos de orofaringe e esses dados estão de acordo com a literatura onde foram identificados com perfil semelhante em amostras de plasma associadas a outros tipos de tumor. Concluímos que os miRNAs circulantes presentes em plasma podem refletir características moleculares do tumor, e que a desregulação da sua expressão em contextos específicos, como subsítios tumorais e condições clínicas distintas, como a presença ou ausência de metástase, poderiam auxiliar no diagnóstico e na avaliação do prognóstico de portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: MiRNAs circulantes, Biomarcador de prognóstico, Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, Metástase linfonodal

ABSTRACT

Andreghetto FM. Identification and contribution of circulating microRNAs as metastasis biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules with roles in gene regulation and implications in cancer initiation and progression. Cell-free microRNAs detected in body fluids are of clinical interest due to their possible application as biomarkers. The stability of microRNAs in plasma has been demonstrated and it seems that alterations in cancer tissue may be detected in plasma from patients. Despite the fact that their reliable quantification depends on several technical parameters there is great clinical interest in this approach due to its simplicity and low risk to the patient. Oral squamous cell carcinoma is one of the most common cancer types worldwide. Tobacco and alcohol consumption are the most important risk factors and survival rates are about 50% in 5 years. The aim of this study was to establish reliable parameters for the detection of microRNAs in plasma and to identify plasma microRNAs associated with squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx as well as with the presence of cervical lymph node metastases. With this purpose we evaluated the expression of 179 microRNAs in plasma from 45 patients (28 presenting cervical lymph node metastases at diagnosis and 17 with no lymph node metastasis) and 15 healthy controls. Samples were matched according to age, sex, drinking and smoking habits. We identified microRNAs mostly expressed in tumor samples, some of which already described in oral squamous cell carcinoma, such as miR-210, and microRNAs poorly studied, such as miR-573. Comparisons between oral and oropharynx carcinomas yielded several differences, in accordance with molecular differences known between these cancer types. MicroRNAs possibly involved in the metastatic process were identified between plasma samples from individuals presenting lymph node metastasis at diagnosis and plasma from patients who were metastasis-free. Among these molecules, miR-192 and miR-574 were identified as more expressed in plasma from individuals with metastatic oropharynx squamous cell

carcinoma. We conclude that plasma microRNAs may indicate molecular characteristics of the tumor and that its differential detection in association with specific clinical conditions or sub-sites may be considered as a potential tool to help in the diagnosis and prognosis assessment of head and neck squamous cell carcinoma.

Keywords: MicroRNA, Lymph node metastasis, Metastasis, Oral squamous cell carcinoma, Oropharynx squamous cells carcinoma, Cancer biomarker

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Do inglês 3' <i>untranslated region</i> / região 3' não-traduzida
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Do inglês <i>protein kinase B</i> / proteína kinase B
CA	Do inglês, <i>carbohydrate antigen</i> / antígeno carboidrato
cDNA	DNA complementar
CEA	Do inglês, <i>carcinoembryonic antigen</i> / antígeno carcinoembrionário
CCDN1	Do inglês, <i>cyclin D1</i> / ciclina D1
CDK	Do inglês, <i>cyclin-dependent kinase</i> / quinases dependentes de ciclina
CDKN2A	Do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> / inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
Ct	Do inglês <i>cycle threshold</i> / limiar de ciclo
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> / Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Do inglês, <i>epidermal growth factor</i> / fator de crescimento epidérmico
EGFR	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> / receptor do fator de crescimento epidérmico
Fold-change	Razão entre a expressão gênica de duas condições distintas

HGF	Do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i> / fator de crescimento de hepatócito
HPV	Do inglês, <i>human pappilomavirus</i> / papilomavírus humano
JAK	Do inglês, <i>Janus kinase</i> / quinase Janus
MAPK	Do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i> / proteína quinase ativada por mitógenos
MDM2	Do inglês, <i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MMP	Do inglês, <i>metalloproteinase matrix</i> / metaloproteinase de matriz
mRNA	Do inglês, <i>messenger RNA</i> / RNA mensageiro
miR	microRNA
miRNA	microRNA
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> / real de polimerase em cadeia
PI3K	Do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i> / fosfoinosítídeo 3-quinase
pH	Cologarítmo de concentração hidrogênica de uma solução (potencial hidrogênico)
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
PTEN	Do inglês <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> / homólogos de fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
siRNA	Do inglês, <i>short-interference RNAs</i> / pequeno RNA de interferência

SCC	Do inglês, <i>squamous cell carcinoma antigen</i> / antígeno do carcinoma de células escamosas
STAT3	Do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> / transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TNF- α	Do inglês, <i>transforming growth factor-α</i> / fator de crescimento transformante alfa
TNM	Do inglês <i>Tumour, Node, Metastasis</i> / Tumor, Linfonodo, Metástase - Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos
TP53	Do inglês, <i>tumor protein 53</i> / proteína p53
TRPM3	Do inglês, <i>transient receptor potential melastatin 3</i> / potencial receptor transiente de melastatina 3
VEGR	Do inglês, <i>vascular epithelial growth factor</i> / fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
=	igual
>	maior
$\geq$	maior ou igual
<	menor
$\leq$	menor ou igual
μL	microlitro
mM	milimolar
ng	nanograma
p	p-valor
%	por cento
TM	trademark
U	unidade

"The two most important days in your life are the day you were born and the day you find out why".

Mark Twain

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Critérios de inclusão e dados dos casos	36
4.2 Separação das frações do sangue	39
4.3 Avaliação da hemólise por espectrofotometria.....	40
4.4 Seleção de miRNAs frequentemente expressos em plasma e soro e genes para normalização de expressão	41
4.5 Extração de RNA	42
4.5.1 Extração de RNA das amostras de plasma e soro de indivíduos sadios	42
4.5.2 Extração de RNA das amostras de plasma de casos e controles	42
4.6 Síntese de cDNA para miRNAs	43
4.6.1 Síntese de cDNA para amostras de indivíduos sadios.....	43
4.6.2 Síntese de cDNA para amostras de casos e controles	44
4.7 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs	44
4.7.1 PCR em tempo real para avaliar a expressão de miRNAs em amostras de plasma e soro de indivíduos sadios	44
4.7.2 PCR em tempo real para avaliar a expressão de miRNAs em amostras de plasma de casos e controles	45
4.8 Análise dos resultados	48
4.8.1 Análise dos resultados da PCR em tempo real para as placas de <i>PCR</i> <i>Array</i>	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Identificação de miRNAs em plasma e soro e a interferência da hemólise na expressão de miRNAs	50
5.2 Seleção de pacientes e controles e avaliação da presença de hemólise nas amostras disponíveis.....	56
5.3 miRNAs detectados em plasma de pacientes e controles	59
5.4 Identificação de miRNAs diferencialmente expressos	63

5.4.1 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide da cavidade oral e orofaringe e plasma de indivíduos controle	63
5.4.2 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide de base de língua e plasma de indivíduos controle	68
5.4.3 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade oral (assoalho de boca e borda de língua) e plasma de indivíduos controle	74
5.4.4 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma associadas a tumores com perfil metastático e não metastático.....	78
5.4.5 Expressão diferencial entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide de cavidade oral com perfil metastático e não metastático	81
5.5 Níveis de expressão de miRNAs em amostras de plasma obtidas após ressecção cirúrgica.....	83
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

A regulação da expressão gênica é um processo biológico essencial para todos os organismos, porém essa regulação é composta de diversos eventos complexos. Na década de 90, acreditava-se que os fatores de transcrição eram os principais moduladores da expressão gênica. Com o passar dos anos e o avanço nas pesquisas, foram sendo descobertos outros fatores essenciais para a regulação da expressão gênica, como mudanças estruturais na cromatina que permitem ou não o acesso da maquinaria transcricional, *splicing* do RNA, modificações do RNA mensageiro (mRNA) e modificações protéicas pós-traducionais. Mais recentemente, discute-se a importância de pequenos RNAs não codificantes, os microRNAs (miRNAs), como reguladores pós-transcricionais.

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que desempenham importante papel como moléculas reguladoras de expressão gênica (Lagos-Quintana et al., 2001). Essa regulação se dá através da complementaridade das sequências fita-simples dos miRNAs a uma sequência na porção 3'UTR de mRNAs. Esta ligação leva à degradação da molécula de mRNA de forma semelhante ao que realizam os siRNAs (do inglês, *short-interference RNAs*), ou à repressão da tradução, levando a alterações na regulação da expressão gênica (Kim, 2004; Yekta et al., 2004; Babu et al., 2011).

Os miRNAs desempenham papéis importantes em grande parte dos processos biológicos, incluindo determinação do destino da célula, proliferação e morte celular. Além de participarem destes processos vitais, os miRNAs estão envolvidos em atividades complexas como resposta imune (O'Connell et al., 2010), secreção de insulina (Poy et al., 2004), síntese de neurotransmissores (Greco; Rameshwar, 2007), ritmo circadiano (Cheng et al., 2007) e replicação viral (Jopling et al., 2005). Recentes análises mostraram a expressão desregulada de miRNAs em câncer (Di Leva; Croce, 2010). Os miRNAs podem modular vias oncogênicas ou supressoras de tumor, ao passo que os próprios miRNAs podem ser regulados por oncogenes ou supressores tumorais (Lee et al., 2009; Di Leva; Croce, 2010).

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo, sendo que mais de 90% desses carcinomas são epidermóides (Vermorken et al.,

2008; Jemal et al., 2009). Esse tumor tem início na superfície epitelial da mucosa que reveste as vias aero-digestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e a laringe). Estudos epidemiológicos mostram uma forte relação entre o carcinoma de cabeça e pescoço e fatores carcinógenos, especialmente tabaco e álcool (Farshadpour et al., 2011). Apesar de diversos avanços para tratamento do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, a taxa de sobrevivência global em 5 anos está entre as mais baixas dentre os principais tipos de cânceres, não apresentando melhora nas últimas décadas (Pignon et al., 2000; Carvalho et al., 2005; Jemal et al., 2011). Atualmente, ainda não existem técnicas eficazes para diagnóstico precoce e marcadores de prognóstico eficazes.

A análise de miRNAs circulantes pode ser considerada como uma nova promessa para identificação de marcadores moleculares capazes de prever prognóstico e diagnóstico precoce de neoplasias. Sendo assim, acreditamos que miRNAs circulantes em plasma de indivíduos com CECP podem ser utilizados como marcadores de prognóstico, em particular, como marcador da presença de metástases. Por isso, neste estudo, padronizamos as técnicas de obtenção e detecção de miRNAs circulantes em plasma e buscamos encontrar marcadores passíveis de serem utilizados para caracterizar amostras de indivíduos portadores de CECP que apresentavam metástase ao diagnóstico, de forma a diferenciá-los de indivíduos que não apresentavam metástase ao diagnóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo heterogêneo de tumores malignos que ocorre no trato aerodigestivo superior, a maioria (93%) dos quais do subtipo histológico de células escamosas ou epidermoide (CECP), que originam-se no lábio, cavidades nasal e oral, faringe e laringe (Chen; Myers, 2001). O CECP é a sexta neoplasia mais comum no mundo e a previsão para 2015 é de que o número de novos casos esteja próximo a 650.000, com 353.000 mortes (GLOBOCAN, 2012). Na América do Sul, esta doença ocupa a quinta posição entre homens e a sexta entre mulheres (GLOBOCAN, 2012). Para 2015, estima-se que ocorram cerca de 25.175 novos casos de CECP no Brasil, dentre eles 19.343 homens e 5.832 mulheres (GLOBOCAN, 2012). Globalmente, o CECP acomete mais homens do que mulheres, sendo 50 anos a idade média para o aparecimento destes tumores (American Cancer Society, 2012). Já os pacientes jovens correspondem à cerca de 1-6% das estatísticas (Lee et al., 2009; Patel et al., 2011).

Segundo Broumand et al. (2006), os principais sítios primários de CECP são o assoalho da boca, a porção ventrolateral da língua e o palato mole. A recorrência local destes tumores ocorre em aproximadamente 10 a 50% dos pacientes, e estão diretamente relacionados ao sítio primário e estadio da doença (Lester; Wight, 2009). O aparecimento de metástase em linfonodos cervicais ocorrem em cerca de 33% dos casos (Hosal et al., 2000; Kuriakose; Trivedi, 2009). O comportamento agressivo dos tumores primários de CECP, está relacionado à alta disseminação e a propensão a metástases em linfonodos cervicais (Arosarena et al., 2006; Lim et al., 2006).

Um dos principais fatores de risco de CECP é o uso de tabaco, sendo o aumento na taxa de risco determinada pelo tempo e a quantidade de tabaco consumido (Schlecht et al., 1999; Zhang et al., 2000). O risco aumentado é atribuído à presença de agentes carcinógenos genotóxicos na fumaça do tabaco, incluindo nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos (Choi; Myers, 2008). Outro fator de risco para CECP é o consumo de álcool. A reação entre acetaldeídos provenientes do etanol e deoxinucleosídeos formam adutos no DNA, que interferem na síntese e nas vias de reparo do DNA (Brooks; Theruvathu, 2005), e, além disso, quando utilizado junto com o tabaco, a natureza dos seus solventes químicos aumentam e

prolongam a exposição da mucosa oral à carcinógenos presentes no tabaco (Pai; Westra, 2009).

Recentemente, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), especialmente o tipo HPV-16 que foi associada ao desenvolvimento de CECP, principalmente na região orofaríngea (Sugiyama et al., 2003; Chung; Gillison, 2009; Leemans et al., 2011; Pereira et al., 2011). A vasta maioria de CECP HPV-positivo localiza-se nos sulcos dos tecidos linfóides do anel tonsilar, que compreendem as tonsilas linguais, palatinas e faríngea, pois parece que as características anatômicas favorecem a permanência do vírus (Pai; Westra et al., 2009). Os tumores HPV-positivos apresentam características clínicas, anátomo-patológicas e moleculares diferentes quando comparados aos HPV-negativos (Chung; Gillison, 2009; Marur et al., 2010; Leemans et al., 2011).

O sistema de classificação e estadiamento TNM, utilizado para o estadiamento de neoplasias em geral, classifica os pacientes em estadios segundo o tamanho do tumor primário (T), presença de metástase em linfonodos regionais (N) ou à distância (M). Esta classificação segue a padronização da AJCC (do inglês, *American Joint Committee on Cancer*), e é frequentemente utilizado para caracterizar tumores de CECP (Quadro 2.1).

T - Tumor	
Tx	Tumor primário sem informação
T0	Sem evidência do tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor menor do que 2 cm de diâmetro
T2	Tumor entre 2-4 cm de diâmetro
T3	Tumor maior do que 4 cm de diâmetro
T4	Tumor que invade estruturas adjacentes. Utiliza-se mais comumente T4a e T4b, dependendo da estrutura envolvida e da natureza da lesão
N - Linfonodo	
Nx	Sem informação do linfonodo
N0	Sem linfonodo palpável
N1	Linfonodo ipsilateral palpável (<3 cm de diâmetro)
N2	Linfonodos contralaterais ou bilaterais
N3	Linfonodo palpável (>6 cm de diâmetro)
M - Metástase	
Mx	Sem informações de metástases a distância
M0	Sem metástase a distância
M1	Evidências clínicas e radiológicas de metástase

Quadro 2.1 - Sistema para classificação de tumores de cabeça e pescoço, segundo TNM AJCC 8ª edição.

As lesões iniciais de CECP são dificilmente diagnosticadas, e sabe-se que apenas cerca de um terço dos pacientes são diagnosticados em estágios iniciais, enquanto os outros dois terços são diagnosticados em estágios avançados da doença, muitas vezes já apresentando metástase em linfonodos cervicais (Horner et al., 2009). Apesar de estudos como os de Gonzalez-Moles (2002) e Genden et al. (2003), que relacionaram estadios mais avançados e comprometimento linfonodal à diminuição de 50% na sobrevida dos pacientes com CECP, este sistema de estadiamento não permite caracterizar a heterogeneidade destes tumores ou predizer com precisão o prognóstico de um paciente. Os pacientes apresentando um mesmo tumor com relação ao subsítio e estadio, podem evoluir de maneiras diferentes quanto à progressão, resposta à terapia, taxa de recorrência e sobrevida (Leemans et al., 2011; Choi; Chen, 2005). Entretanto, atualmente, esta ainda é a classificação mais utilizada para a escolha do tratamento dos pacientes.

Apesar da qualidade de vida dos pacientes de CECP ter melhorado com os avanços cirúrgicos e com técnicas radioterapêuticas, a taxa de sobrevida de 50% em 5 anos, não sofreu grandes alterações nas últimas três décadas (Pignon et al.,

2000; Carvalho et al., 2005; Jemal et al., 2009). Isso se deve à frequentes recorrências loco-regionais, metástases à distância e aparecimento de segundo tumor primário nestes pacientes (Jemal et al., 2011).

2.1 Alterações moleculares e fatores prognósticos em CECp

A presença de metástases linfonodais em pacientes com CECp é hoje o principal indicador de pior prognóstico, sendo que a detecção precoce dos tumores com propensão a invadir e espalhar através do sistema linfático local seria um importante passo para a escolha e do melhor tratamento para o paciente (Dunne et al., 2006).

A carcinogênese em CECp resulta de processos multifatoriais caracterizados pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (Schaaij-Visser et al., 2009; Ha et al., 2009). Dentre essas alterações, destacam-se amplificações gênicas, ganho ou perda da heterozigose e inativação gênica por metilação, os quais podem alterar o perfil de expressão gênica (Choi; Myers, 2008). Os resultados fenotípicos dessas alterações estão relacionados a diferentes características do câncer, como sua velocidade de crescimento, angiogênese e invasão, características estas associadas com o seu potencial metastático. Sendo assim, muitas moléculas, como as descritas a seguir, têm sido estudadas como marcadores de prognóstico, incluindo metástases, mas ainda não existem marcadores considerados como eficazes para avaliar o prognóstico destes tumores.

Entre 50 e 80% dos casos de CECp são caracterizados por mutações em TP53 (Agrawal et al., 2011; Poeta et al., 2007). No restante dos casos, a inativação funcional do TP53 pode ocorrer via outros mecanismos, incluindo super-expressão ou amplificação gênica do MDM2, que codifica a proteína responsável pela degradação proteossomal do TP53 e deleção do CDKN2A, que elimina p14/ARF, um regulador negativo de MDM2 (Vogelstein et al., 2000). O reestabelecimento ou modulação do p53 como alvo de terapia é uma área de bastante interesse, porém com sucesso limitado até o momento (Nemunaitis et al., 2009). Sabe-se que a inativação de TP53 é também associada com perfil agressivo dos tumores, independente do impacto à respostas de terapias genotóxicas. Portanto, TP53

truncado ou mutações inibidoras de TP53 são frequentemente associadas a pior prognóstico após cirurgia primária com ou sem radioterapia pós cirúrgica, quando comparado a mutações não inibidoras ou nenhuma mutação (Poeta et al., 2007). O grupo de Cabanillas et al. (2007) relacionou a super-expressão do p53 com metástases linfonodais de pacientes com CECP, e sugeriu que o p53 é um forte preditor de metástases loco-regionais e indicador de pior prognóstico, assim como relatado anteriormente pelo grupo de Shin et al. (2000).

Outro gene frequentemente mutado em CECP é o *CCDN1* (do inglês, *cyclin D1*). Trata-se de um proto-oncogene que modula etapas importantes da progressão do ciclo celular (Motokura; Arnold, 1993). Em estágio avançados de G1, este gene interage com outras quinases dependentes de ciclina (CDKs), promovendo a transição da célula em fase G1 para a fase S, e levando à multiplicação celular. Desregulação da expressão do *CCDN1* pode ocorrer durante a tumorigênese em CECP (Izzo et al., 1998). A super-expressão ou amplificação do gene *CCDN1* foi observada nestes tumores, mas os relatos variam quanto à sua importância, com observações entre 17 e 79% de pacientes com CECP apresentando esta alteração (Quon et al., 2001; Thomas et al., 2005). A super-expressão protéica de ciclina D1 foi correlacionada com extensão tumoral, metástase em linfonodos regionais, estágio clínico avançado e pior sobrevida em CECP (Gleich; Salamone, 2002; Braakhuis et al., 2004; Fakhry et al., 2008). Outros estudos também evidenciaram que alterações na expressão ciclina D1 constituem um marcador de prognóstico de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global reduzidas (Fujii et al., 2001; Volavsek et al., 2003).

O EGFR (do inglês, *epidermal growth factor receptor*) é um membro da família ErbB/HER2 de receptores transmembrana do tipo tirosina quinase, que desempenham importante papel na proliferação celular, diferenciação, sobrevida e migração. A super-expressão da proteína EGFR é detectada em cerca de 90% dos casos de CECP, sendo que em 10-30% dos casos ocorre a amplificação gênica e 1-7% mutações pontuais (Loeffler-Ragg et al., 2006; Temam et al., 2007; Morris et al., 2011). Os principais ligantes responsáveis pela ativação deste receptor são o EGF, TNF- α (do inglês, *transforming growth factor- α*) e anfirregulina. A ligação entre o receptor e o ligante resultam em mudanças conformacionais do EGFR, como homodimerização e heterodimerização com outros membros da família ErbB, levando à auto-fosforilação e ativação do receptor e sinalização *downstream* de vias

importantes como MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), PI3K/AKT (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*), JAK (do inglês, *Janus kinase*)/STAT3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) (Hynes; Lane, 2005). O complexo de ligação EGF-EGFR pode também ser translocado para o núcleo e desempenhar a função de um fator de transcrição, tendo como alvo, por exemplo, o gene *CCDN1* que codifica a proteína ciclina D1 e está envolvido na progressão do ciclo celular (Lin et al., 2001). A super-expressão de EGFR foi associada à recidiva em metástases linfonodais e aumento da resistência do tumor à quimioterapia e radioterapia em pacientes com CECP (Ford; Grandis, 2003). Além disso, acredita-se que o aumento da expressão de EGFR em tumores apresentando metástases linfonodais seja um importante marcador de prognóstico, principalmente por estar relacionado a diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de doença (Lothaire et al., 2006).

A transição epitélio-mesênquima é um processo no qual as células perdem as características epiteliais e adquirem o fenótipo mesenquimal, levando a maior capacidade de migração e invasão e maior resistência a apoptose (Kalluri; Weinberg, 2009). Existem diversos fatores de transcrição envolvidos nesta transição, sendo que o aumento da expressão do gene Twist e Snail (inibidor de E-caderina) está relacionado à metástase linfonodal (Ou et al., 2008; Yang; Weinberg, 2008). Outro fator de transcrição importante que controla a transição epitélio-mesênquima, é o oncogene c-Met - um receptor tirosina quinase ativado pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que na presença do ligante é ativado, desencadeando a sinalização das vias de RAS, PI3K, STAT3 e NOTCH, resultando em motilidade, crescimento e sobrevivência celular. Tanto o MET quanto o HGF estão super-expressos em 80% dos tumores de CECP (Knowles et al., 2009; Seiwert et al., 2009). A super-expressão de MET e do HGF têm papel importante no processo de transformação maligna da célula, além de estar relacionada ao aumento da motilidade celular, angiogênese e invasão nos pacientes com CECP (Suh et al., 2014).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que estão envolvidas na degradação e remodelação dos componentes da matriz extracelular, como o colágeno, elastina e a fibronetina. Vários estudos têm evidenciado que as MMPs atuam no rompimento da membrana basal celular e degradação do estroma intersticial, facilitando a invasão de células tumorais e desenvolvimento de metástases (Rosenthal; Matrisian, 2006).

Um estudo *in vivo* demonstrou que tumores de CECP expressam altos níveis de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13 e MMP-14, sendo que a MMP-1, MMP-2 e MMP-9 são associadas à progressão da doença (Thomas et al., 2005). A associação da expressão da MMP-2 e MMP-9 com o estágio tumoral avançado, invasão tumoral e metástases em linfonodos já foi observada em CECP (Miyajima et al., 1995; Thomas et al., 2005; Patel et al., 2005). Por conta destas observações, acredita-se que desregulação dessas moléculas em CECP possa ser considerada um marcador para predição de metástases (Thomas et al., 2005; Patel et al., 2005).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é a molécula mais associada com a indução da angiogênese (Senger et al., 1983). A expressão de VEGF é induzida por hipóxia e mediada pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1 α) (Kyzas et al., 2005). Os processos angiogênicos desempenham importante papel em CECP, principalmente em metástases loco-regionais (Joo et al., 2009; Lv et al., 2011). A expressão de VEGF em CECP é associada com doença mais avançada, aumento da resistência a agentes citotóxicos e pior prognóstico (Riedel et al., 2004; Bocci et al., 2004; Tse et al., 2007).

A via de sinalização de *NOTCH1* está envolvida em diversas funções biológicas, incluindo regulação da capacidade de auto-renovação e sobrevivência. Estudos identificaram mutações no gene *NOTCH1* em cerca de 14 a 15% de casos de CECP, e em outros membros da família NOTCH de 3 a 5% (Agrawal et al., 2011; Stransky et al., 2011). A sinalização de Notch promove a diferenciação terminal em queratinócitos, através da ativação de queratinas suprabasais e por efeitos indiretos nas vias Wnt, Hedgehog e resposta ao interferon (Duan et al., 2006), que são importantes para o CECP. A super-expressão de Notch foi observada em amostras de pacientes de CECP com metástases linfonodais e relacionada a pior prognóstico (Joo et al., 2009).

O fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) encontra-se super-expresso em alguns tumores, incluindo o CECP (Kalyankrishna; Granndis, 2006). É produzido em macrófagos e queratinócitos, e induz o desenvolvimento epitelial. A super-expressão do TGF- α em tumores é associada com pior resposta a radioterapia e pior sobrevida (Quon et al., 2001; Leemans et al., 2011). A significância prognóstica de TGF- α não é tão estudada quanto EGFR, mas algumas evidências sugerem que a super-expressão deste fator de crescimento pode

predizer um risco aumentado de recorrência tumoral e sobrevida global reduzida em pacientes com CECp (Quon et al., 2001; Leemans et al., 2011).

Os dados apresentados ilustram parte do conhecimento acerca de mecanismos moleculares associados à progressão tumoral em CECp. Apesar de amplo, o conhecimento sobre estes processos ainda não é suficiente para a avaliação do seu prognóstico, incluindo seu potencial metastático.

2.2 miRNAs e seu papel em câncer e metástase

Nos últimos anos, uma classe de pequenos RNAs não codificantes, denominados microRNAs (miRNAs) começaram a ser estudados como possíveis marcadores moleculares em câncer (Gao et al., 2010; Chung et al., 2010; Nana-Sinkam; Croce, 2010; Feber et al., 2011). Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que desempenham importante papel como moléculas reguladoras de expressão gênica (Lagos-Quintana et al., 2001). Essa regulação se dá através da complementaridade das sequências fita-simples dos miRNAs a uma sequência na porção 3'UTR de mRNAs. Esta ligação leva à degradação da molécula de mRNA de forma semelhante ao que realizam os siRNAs (do inglês, *short-interference RNAs*), ou à repressão da tradução, levando a alterações na regulação da expressão gênica (Kim, 2004; Yekta et al., 2004; Babu et al., 2011). A interação entre miRNAs e seus alvos constitui um sistema complexo onde um único miRNA pode interagir e regular diversos alvos e, por outro lado, diversos miRNAs podem controlar um mesmo alvo (Griffiths-Jones et al., 2005). Os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos essenciais como regulação do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular (Shiiba et al., 2010).

MiRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor. Alguns estudos abordaram a desregulação de miRNAs no contexto de câncer, sugerindo que estas moléculas poderiam ser utilizadas no diagnóstico e como marcadores de prognóstico (Guo et al., 2014; Yang et al., 2014; Barbano et al., 2014; Melbø-Jørgensen et al., 2014; Yu et al., 2015). No trabalho de Guo et al. (2014), por exemplo, os autores associaram a baixa expressão do miR-133b em amostras de tecido tumoral de câncer gástrico comparado a margem livre de tumor à invasão e

maior agressividade tumoral. O re-establishimento da expressão do miR-133b por estudo de super-expressão diminuiu a proliferação, migração e invasão celular. Esses achados sugerem que o miR-133b atua como um supressor tumoral e acreditam que esse miRNA possa se tornar uma promessa para o diagnóstico ou alvo terapêutico para o câncer gástrico. Já no trabalho de Yang et al. (2014), o aumento da expressão do miR-21 e diminuição da expressão do seu gene alvo, *IGFBP3*, em amostras de glioblastoma comparado a margem livre de tumor, está relacionado à pior sobrevida, sugerindo um papel oncogênico nesse tipo de tumor. A investigação deste miRNA como marcador prognóstico é bastante intensa, pois existem trabalhos mostrando que apesar da sua expressão ser constitutiva em diferentes tumores, amostras de tumores mais agressivos expressam mais o miR-21 (Barbano et al., 2014; Melbø-Jørgensen et al., 2014; Yu et al., 2015).

O papel regulatório dos miRNAs em metástase é bastante estudado e miRNAs diretamente relacionados a este processo foram denominados metastamiRs (Hurst et al., 2009). MetastamiRs promovem ou inibem várias etapas na migração e metástase de células tumorais, possuindo efeitos pró-metastáticos ou anti-metastáticos (White et al., 2011). Apesar de pouco numerosos, alguns trabalhos já abordaram a identificação de miRNAs associados com metástases em CECP e alguns deles serão citados a seguir.

No estudo de Liu et al. (2009) seis linhagens celulares de CECP distintas quanto ao potencial metastático foram comparadas quanto aos níveis de expressão de miRNAs. A baixa expressão do miR-138 foi observada em todas as linhagens celulares altamente invasivas, assim como previamente observado em tumores de tireóide (Mitomo et al., 2008). Ensaios de ganho de função do miR-138 levaram as células de CECP à parada do ciclo celular e apoptose, e os ensaios de perda de função do miR-138 com as mesmas células, aumentaram invasão celular e inibição da apoptose, mostrando a importância deste miRNA na metástase e progressão do CECP.

A baixa expressão do miR-222 em células derivadas de CECP metastático foi relacionada à progressão da doença (Liu et al., 2009). O miR-222 tem como alvo o gene p27, que é um inibidor do ciclo celular e em tumores encontra-se com a expressão desregulada (Miller et al., 2008; Hu et al., 2009). Ensaios funcionais que super-expressavam o miR-222 nas células derivadas de CECP metastático (UM1) não modificaram a expressão dos genes envolvidos em apoptose e ciclo celular,

como o gene p27, mas diminuíram a invasão celular. Junto a isso, o grupo confirmou que o gene da metaloproteinase de matrix 1 (MMP1) é um alvo do miR-222, e que sua expressão é diminuída quando o miR-222 está super-expresso, o que contribui para a metástase das células tumorais (Yang et al., 2001; Nelson et al., 2003; Nelson; Melendez, 2004).

O estudo de Su et al. (2010) mostrou que tumores de CECPs metastáticos estão associados com baixos níveis de *TAp63*, um membro da família *p53*, que age como gene supressor tumoral. CECPs metastáticos também exibiram níveis reduzidos de Dicer, uma endoribonuclease envolvida no processamento de miRNAs. O *TAp63* se liga e transativa o promotor da Dicer, sugerindo um papel em metástase através da alteração do processamento do miRNA. Ao lado disso, o miR-130b (He et al., 2007) estava pouco expresso em células de CECP que são *knockout* para *TAp63*. Baseado nestes dados, os autores do trabalho concluíram que a *TAp63* participa da inibição do processo de metástase, que também envolve a regulação transcricional coordenada de Dicer e miR-130b (Su et al., 2010).

Detectou-se baixa expressão do miR-204 em tumores de CECP, possivelmente relacionada ao desbalanço genômico do locus 9q21.1-22.3, correspondente ao gene TRPM3 (do inglês, *transient receptor potential melastatin 3*), gene associado com predisposição genética a tumores de cabeça e pescoço (Lee et al., 2010; Abou-Elhamd et al., 2008). Alvos preditos para o miR-204 que estão super-expressos em CECP tem funções relacionadas a adesão celular, regulação do ciclo celular e proliferação celular e a super-expressão do miR-204 inibe a interação célula-matriz, motilidade e invasão *in vitro* (Lee et al., 2010; Yang et al., 2010; Bao et al., 2013). O padrão de expressão de 19 genes alvo do miR-204 em diferentes subtipos tumorais de CECP mostrou um possível papel desse miRNA no prognóstico de CECP (Chung et al., 2004).

O grupo de Childs et al. (2009) observou que a baixa expressão do miR-205 e let-7d em 104 amostras de tecido de CECP comparado às margens livres de tumor, estavam relacionados à recorrência loco-regional e pior sobrevida (Long et al., 2009).

Apesar da disponibilidade de informação sobre a biologia e mecanismo de ação dos miRNAs em processos metastáticos de pacientes com CECP, na prática ainda não existem protocolos estabelecidos para o uso dessas moléculas como marcadores de prognóstico. Discute-se sobre técnicas de detecção eficazes e

precisas destas moléculas, que sejam capazes de prever o desenvolvimento da doença.

2.2.1 miRNAs circulantes em plasma e soro como marcadores em câncer

Marcadores moleculares que possam ser obtidos de forma pouco invasiva para o paciente e que permitam o acompanhamento da progressão ou o diagnóstico do câncer são foco de intensas pesquisas. O soro, plasma, urina e saliva são biofluidos frequentemente analisados quanto a presença de marcadores com estes fins (Kosugi et al., 2004; Mroczko et al., 2008; Lee et al., 2009; Lipschitz et al., 2013). Kosugi et al. (2004) avaliaram os níveis de três antígenos presentes no soro de pacientes com câncer de esôfago - o antígeno carcinoembriônico (CEA), o antígeno carboidrato (CA) 19-9 e o antígeno de células do carcinoma epidermoide (SCC) – e discutiram o uso do SCC como preditor para câncer esofágico avançado associado a pior sobrevida após esofagectomia. O grupo de Mroczko et al. (2008) avaliou os níveis de antígenos de MMP9 presentes no soro de pacientes com câncer de esôfago, e sugeriu seu uso como eficaz marcador tumoral diagnóstico. Lee et al. (2009) sugeriram o uso de uma imunoglobulina de cadeia pesada (CA215), presente no soro, como marcador do monitoramento da resposta dos cânceres de ovário e cérvix. Outro biofluido bastante avaliado pela fácil obtenção é a saliva, como foi sugerido pelo grupo de Lipschitz et al. (2013) para uso na detecção de alfa-amilase em pacientes que se curaram do câncer, porém que adquiriram outros distúrbios associados a doença prévia.

Nos últimos anos, foi demonstrado que os miRNAs não são apenas detectados em tecidos, mas também circulantes no soro, plasma, saliva e urina (Song et al., 2011; Wei et al., 2011; Wiklund et al., 2011; Yamada et al., 2011). Alguns estudos demonstraram que a expressão dos miRNAs em biofluidos é estável por não sofrer degradação após manuseio, diferenças de pH e temperatura, além de sua expressão ser consistente entre indivíduos (Calin; Croce, 2006; Chen et al., 2008; Filipowicz et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Muitas especulações surgiram sobre como poderiam pequenos RNAs estarem livres na circulação e não sofrerem degradação por ribonucleases endógenas. No momento, acredita-se que miRNAs

derivados de tumores são resistentes à atividade de ribonucleases por estarem empacotados em microvesículas secretoras como exossomos, micropartículas e corpos apoptóticos (Zernecke et al., 2009; Pegtel et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Komatsu et al., 2011), porém ainda pouco se sabe sobre como e porque aconteceriam estas mudanças nos níveis de miRNAs circulantes. Acredita-se que a lise celular ou um aumento no número de exossomos rompidos, em células doentes, contribua para níveis elevados de certos miRNAs circulantes (Falcone et al., 2015).

Os primeiros indícios sobre uma relação entre miRNAs circulantes e câncer foram obtidos em 2008 quando o grupo de Lawrie et al. (2008) encontrou um aumento significativo nos níveis de expressão do miR-155, miR-21 e miR-210 no soro de 60 pacientes com linfoma difuso de células B grandes quando comparados aos controles. Pouco depois, um estudo de perfil de expressão de miRNAs em pacientes com carcinoma epidermoide de língua identificou alterações comparando tanto o tecido tumoral com o tecido livre de tumor pareado quanto o plasma destes pacientes (Wong TS et al., 2008), sendo o miR-184 aquele com maior expressão no tecido tumoral e no plasma dos pacientes. Ambos trabalhos tentavam identificar um possível biomarcador no sangue, através do perfil de expressão de miRNAs.

Após os primeiros relatos da presença de miRNAs na circulação, muitos grupos começaram a investigar o seu potencial como biomarcador em câncer. Alguns exemplos incluem estudos sobre o câncer de próstata (Mitchell et al., 2008), colorretal (Ng et al., 2009), ovário (Resnick et al., 2009), mama (Heneghan et al., 2010), gástrico (Tsujiura et al., 2010), pulmão (Zheng et al., 2011), pâncreas (Morimura et al., 2011) e esôfago (Zhang et al., 2012).

No contexto de CECP, ainda pouco se conhece sobre os miRNAs circulantes, assim como sobre uma possível expressão diferencial de miRNAs relacionados à agressividade destes tumores. Os miRNAs estudados em plasma de pacientes com CECP até o momento estão relacionados na quadro 2.2. A maior parte dos miRNAs foram identificados com alta expressão em plasma de CECP quando comparado ao plasma de indivíduos saudáveis.

miRNAs	Subsítios avaliados e número de casos	TNM		Perfil de expressão de miRNAs	Autor
miR-134	Mucosa bucal = 34 Língua = 26 Orofaringe e outros sítios = 36	T1 – T3 = 36 T4 = 60	N0 = 51 N>0 = 45	*Maior expressão no plasma de pacientes N>0 quando comparado aos N0. *Redução da expressão do miRNA após 1 mês da ressecção do tumor.	Liu CJ et al., 2013
miR-331-3p miR-603 miR-1303 miR-660-5p miR-212-3p	Laringe = 20	T1 – T3 = 8 T4 = 12	N0 = 13 N>0 = 7	*Maior expressão dos miRNAs no plasma dos pacientes quando comparado aos controles.	Ayaz et al., 2013
miR-146a	Cavidade oral = 60	T1 – T3 = 24 T4 = 36	N0 = 35 N>0 = 25	*Maior expressão dos miRNAs no plasma dos pacientes quando comparado aos controles. *Redução da expressão do miRNA após ressecção do tumor.	Hung et al., 2013
miR-338 miR-29a miR-223 miR-16 let-7b	Carcinoma oral <i>in situ</i> = 14 Cavidade oral = 16	-	-	miRNAs pouco expressos (miR-338, miR-29a e miR-223); miRNAs super-expressos (miR-16 e let-7b) *Maior/menor expressão dos miRNAs no plasma dos pacientes quando comparado aos controles.	MacLellan et al., 2012
miR-21 miR-26b	Língua = 14 Boca = 9 Tonsilas = 5 Hipofaringe = 8 Laringe = 3 Gengiva = 5 Palato mole = 2 Assoalho de boca = 2 Lábio = 2	T1 – T3 = 10 T4 = 40	N0 = 32 N>0 = 18	*Maior expressão dos miRNAs no plasma dos pacientes quando comparado aos controles. *Sem análise entre pacientes N+ e N0 para amostras de plasma. *Redução da expressão dos miRNAs no plasma após 1 ano da ressecção cirúrgica.	Hsu et al., 2012
miR-196a	Mucosa bucal = 34 Língua = 25 Outros sítios = 36	T1 – T3 = 36 T4 = 59	N0 = 50 N>0 = 45	*Maior expressão no plasma de pacientes N>0 quando comparado aos N0. *Pacientes com recidiva apresentaram maior expressão do miR-196a. *Associação da expressão do miRNA em amostras N>0 com pior prognóstico.	Liu et al., 2012
miR-27b	Cavidade oral = 20	T1-T3 = 13 T4 = 7	-	*Menor expressão do miRNA no plasma dos pacientes quando comparado aos controles.	Lo et al., 2012
miR-181	Mucosa bucal = 11 Gengiva = 10 Língua = 9 Outros sítios = 9	T1 – T3 = 13 T4 = 26	N0 = 20 N>0 = 19	*Maior expressão do miRNA no plasma dos pacientes quando comparado aos controles. *Sem análise entre pacientes N+ e N0 para amostras de plasma.	Yang et al., 2011

Continua

Conclusão

miRNAs	Subsítios avaliados e número de casos	TNM		Perfil de expressão de miRNAs	Autor
miR-31	Mucosa bucal = 17 Gengiva = 10 Língua = 11 Outros sítios = 5	T1 – T3 = 19 T4 = 24	N0 = 27 N>0 = 16	*Maior expressão do miRNA no plasma de pacientes T1 -2, N0 quando comparado aos controles. *Sem alteração na expressão do miRNA em pacientes T3 – T4, N>0. *Redução da expressão do miRNA após 1 mês da ressecção do tumor.	Liu et al., 2010
miR-24	Mucosa bucal = 11 Gengiva = 12 Língua = 10 Outros sítios = 10	T1 – T3 = 14 T4 = 29	N0 = 25 N>0 = 18	*Maior expressão do miRNA no plasma dos pacientes quando comparado aos controles. *Sem análise entre pacientes N+ e N0 para amostras de plasma.	Lin et al., 2010
miR-184	Língua = 25	T1 – T3 = 24 T4 = 1	N0 = 20 N>0 = 5	*Maior expressão do miRNA no plasma dos pacientes quando comparado aos controles. *Não houve correlação entre a expressão do miRNA com comprometimento linfonodal. *Redução da expressão do miRNA após ressecção do tumor.	Wong TS et al., 2008

Quadro 2.2 - miRNAs estudados em plasma de portadores de CECP. T- tamanho do tumor; N0: pacientes sem presença de metástase linfonodal; N>0: pacientes com presença de metástase linfonodal

Existem diversos desafios quanto aos métodos para a detecção de miRNAs circulantes em plasma e soro, incluindo procedimentos de coleta e manuseio de amostras, extração do RNA e PCR em tempo real utilizando *primers* específicos.

Quanto à extração de RNA, o principal desafio está na baixa concentração de miRNA encontrada no plasma e soro. Isso significa que a qualidade e concentração de miRNA detectados por medidas convencionais, como eletroforese e avaliação por absorvância, não são eficazes para esse tipo de amostra. O procedimento de extração torna-se mais eficaz com a adição de carreadores de RNA às amostras (Andreasen et al., 2010).

Alguns artigos discutem variáveis pré-analíticas que influenciam o perfil de miRNAs em plasma e soro (Kirschner et al., 2011; Pritchard et al., 2012; Blondal et al., 2013). Estes estudos mostram que a contaminação do plasma por células do sangue e a hemólise (lise de células vermelhas) podem levar grandes variações nos

níveis de expressão de miRNAs detectados no plasma. Por exemplo, Kirschner et al. (2011) e Blondal et al. (2013) demonstraram que a expressão do miR-451 e do miR-16 na presença hemólise é aumentada quando comparado ao plasma sem hemólise (Blondal et al., 2013). Evitar contaminação celular e hemólise em amostras de soro e plasma constitui, portanto, um desafio importante.

A presença de inibidores de transcriptase reversa e de enzimas do tipo polimerase utilizadas nas reações da PCR quantitativa também constituem obstáculos importantes a serem considerados. A utilização de RNAs sintéticos (*spike-ins*) durante a transcrição reversa para o monitoramento da interferência de inibidores durante a PCR quantitativa é uma solução apresentada para garantir uma melhor interpretação dos resultados (Blondal et al., 2013).

Por fim, a normalização dos dados da PCR em tempo real pode ser um desafio pois os genes utilizados frequentemente como referência em ensaios para detecção de miRNAs, como os pequenos RNAs nucleolares, estão presentes em concentrações extremamente baixas no soro e no plasma.

Neste estudo, padronizamos as técnicas de obtenção e detecção de miRNAs circulantes em plasma e buscamos encontrar marcadores passíveis de serem utilizados para caracterizar amostras de indivíduos portadores de CECP que apresentavam metástase ao diagnóstico, de forma a diferenciá-los de indivíduos que não apresentavam metástase ao diagnóstico.

3 PROPOSIÇÃO

Propusemos que miRNAs circulantes em plasma de indivíduos com CECP poderiam ser utilizados como marcadores de prognóstico, em particular como marcador da presença de metástases.

Especificamente, pretendeu-se atingir os seguintes objetivos:

- Avaliar métodos de extração e detecção por PCR em tempo real de miRNAs presentes em plasma e soro de indivíduos saudáveis, visando a comparação entre estes biofluidos quanto à adequação para detecção de miRNAs circulantes no sangue periférico;
- Avaliar a expressão de miRNAs circulantes que serão utilizados para a detecção da hemólise e normalização dos ensaios do tipo PCR em tempo real;
- Comparar a expressão de miRNAs entre amostras de plasma de pacientes com CECP, em diferentes estádios, com e sem comprometimento linfonodal no momento da cirurgia, utilizando placas de PCR *array*;
- Avaliar a expressão de miRNAs diferencialmente expressos entre grupos de amostras de seguimento de plasma de pacientes com CECP após três meses da ressecção cirúrgica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Critérios de inclusão e dados dos casos

O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Processo nº 25000.084206/2011-76, Parecer CONEP nº 128/2012 registrado sob nº 16491/CONEP (Anexo A), e o Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein é colaborador (conforme citado no parecer CONEP) para a realização dos experimentos para fins deste projeto. O termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) foi assinado por todos indivíduos identificados como casos e controles. As amostras de plasma foram coletadas no Hospital Heliópolis e Hospital das Clínicas de São Paulo, centros participantes do projeto e membros do Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço (GENCAPO), um consórcio colaborativo criado em 2002 com o objetivo de desenvolver análises clínicas, genéticas e epidemiológicas do CECP.

Os casos incluídos neste projeto apresentaram diagnóstico confirmado após exame anátomo-patológico das peças cirúrgicas para carcinomas do tipo epidermoide de cabeça e pescoço. Selecionamos apenas amostras que apresentavam lesões bucais da cavidade oral - (borda de língua e assoalho de boca) e da orofaringe (base de língua) como sítios primários da lesão. As amostras foram subdivididas em dois grupos distintos, o primeiro formado por pacientes que apresentavam comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico (N+) e o segundo por pacientes que não apresentavam comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico (N0), independentemente do tamanho dos tumores. Os critérios clínicos de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, tabagistas, etilistas e com idade acima de 50 anos. Os testes para detecção de HPV nas amostras não foram realizados, no entanto, optamos por selecionar amostras de pacientes com idade superior a 50 anos pela menor incidência de tumores acometidos por HPV. Para as amostras controle selecionamos indivíduos que não apresentavam lesões orais, idade acima de 50 anos, tabagistas e etilistas. As amostras coletadas foram armazenadas em freezer -80°C nos respectivos centros de coleta e mantidas nestas condições até a extração de RNA.

Os dados clínicos e patológicos dos indivíduos e tumores, respectivamente, incluídos neste estudo estão relacionados no quadro 4.1.

Para a avaliação da expressão de miRNAs após ressecção cirúrgica dos pacientes com CECP, utilizamos amostras de seguimento clínico (3 meses), conforme a disponibilidade nos biobancos.

Pacientes	Tabagismo	Etilismo	Gênero	Idade	Descrição da topografia	pT	pN	pM	Tipo de amostras	Status clínico da amostra analisada	Experimentos realizados
BR-001/0039	Sim	Sim	F	52	Base da língua	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0057	No passado	No passado	M	50	Base da língua	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0074	Sim	Sim	M	60	Base da língua	4b	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0109	Sim	Sim	M	55	Base da língua	3	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0109 F1	Sim	Sim	M	55	Base da língua	3	0	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais – Validação
BR-001/0124	Sim	Sim	M	52	Base da língua	4a	3	1	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0223	Sim	Sim	F	55	Base da língua	2	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0250	Sim	Sim	M	52	Base da língua	4a	2a	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0256	Sim	Sim	M	62	Base da língua	3	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0263	No passado	Sim	M	52	Base da língua	4a	3	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0285	Sim	Sim	M	51	Base da língua	3	3	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0288	Sim	No passado	M	54	Base da língua	3	3	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0292	No passado	No passado	M	66	Base da língua	4a	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0301	No passado	No passado	M	51	Base da língua	4	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0304	Sim	No passado	M	60	Base da língua	3	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0321	Sim	No passado	M	54	Base da língua	2	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0328	No passado	No passado	M	65	Base da língua	2	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0046	Sim	Sim	M	54	Borda da língua	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0105	Sim	No passado	F	80	Borda da língua	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0134	Sim	Sim	M	57	Borda da língua	3	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0146	Sim	Sim	M	58	Borda da língua	2	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0151	No passado	Sim	M	65	Borda da língua	2	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0151 F1	No passado	Sim	M	65	Borda da língua	2	2c	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais – Validação
BR-002/0020	Sim	Sim	M	58	Borda da língua	2	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0020 F1	Sim	Sim	M	58	Borda da língua	2	0	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais - Validação
BR-002/0025	Sim	Sim	M	58	Borda da língua	2	1	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0068	Sim	No passado	M	67	Borda da língua	1	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0072	Sim	No passado	M	53	Borda da língua	3	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0072 F1	Sim	No passado	M	53	Borda da língua	3	0	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais – Validação
BR-001/0025	Sim	Sim	M	61	Assoalho da boca	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0049	No passado	Sim	M	70	Assoalho da boca	4a	1	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array

Continua

Conclusão

Pacientes	Tabagismo	Etilismo	Gêner o	Idade	Descrição da topografia	T	N	M	Tipo de amostras	Status clínico da amostra analisada	Experimentos realizados
BR-001/0061	No passado	No passado	M	50	Assoalho da boca	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0111	Sim	Sim	M	55	Assoalho da boca	1	3	1	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0115	Sim	No passado	M	56	Assoalho da boca	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0119	Sim	Sim	M	50	Assoalho da boca	4b	3	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0220	No passado	No passado	F	50	Assoalho da boca	1	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0220 F1	No passado	No passado	F	50	Assoalho da boca	1	0	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais - Validação
BR-001/0236	Sim	Sim	M	53	Assoalho da boca	4a	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0248	No passado	No passado	M	55	Assoalho da boca	2	2a	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0308	Sim	Sim	M	50	Assoalho da boca	4a	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0323	Sim	No passado	M	50	Assoalho da boca	4a	2c	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/0335	Sim	Sim	F	50	Assoalho da boca	2	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0021	No passado	Sim	M	63	Assoalho da boca	3	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0021 F1	No passado	Sim	M	63	Assoalho da boca	3	0	0	Plasma	seguimento de 3 meses	Ensaios individuais - Validação
BR-002/0031	Sim	No passado	M	62	Assoalho da boca	1	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0035	Sim	No passado	M	57	Assoalho da boca	1	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0041	Sim	No passado	M	64	Assoalho da boca	4a	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0048 F1	Sim	Sim	M	52	Assoalho da boca	2	2b	0	Plasma	seguimento de 3 meses	PCR Array
BR-002/0058	Sim	Sim	M	58	Assoalho da boca	4	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0062	Sim	Sim	M	55	Assoalho da boca	1	0	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/0095	Sim	Sim	M	52	Assoalho da boca	3	2b	0	Plasma	ao diagnóstico	PCR Array

BR-001/3004	Sim	No passado	M	69	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3034	Sim	No passado	F	53	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3040	Sim	No passado	M	61	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3044	No passado	No passado	M	55	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3046	No passado	No passado	F	71	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3066	No passado	No passado	M	65	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3076	No passado	No passado	M	63	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3082	Sim	Sim	F	55	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3138	Sim	No passado	M	68	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-001/3163	Sim	Sim	M	63	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/3004	Sim	No passado	M	64	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/3014	Sim	No passado	M	55	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/3017	Sim	Sim	M	51	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/3021	Sim	Sim	F	62	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array
BR-002/3032	Sim	Sim	M	67	Controle				Plasma	ao diagnóstico	PCR Array

Quadro 4.1 - Dados clínicos dos pacientes e controles e dados anátomo-patológicos dos tumores. T - tamanho do tumor; N - comprometimento linfonodal patológico; M - metástases à distância

Antes de iniciarmos os ensaios com amostras de plasma de casos com CECP e controles, realizamos ensaios de padronização das técnicas de detecção de miRNAs em plasma e soro. Nesta etapa do projeto, utilizamos amostras de plasma de indivíduos sadios (n=7) (Quadro 4.2).

Amostras	Gênero	Idade
1	feminino	28
2	feminino	31
3	feminino	28
4	masculino	31
5	masculino	23
6	feminino	27
7	masculino	32

Quadro 4.2 - Informações gerais sobre indivíduos sadios que doaram amostras para ensaios de padronização das técnicas de detecção de miRNAs em plasma e soro

4.2 Separação das frações do sangue total

Para os experimentos iniciais de avaliação das técnicas de detecção de miRNAs, separamos o sangue total periférico em plasma e soro. A separação do soro e do plasma foi feita imediatamente após a coleta de sangue periférico. O sangue separado em plasma foi coletado em um tubo contendo solução anti-coagulante (EDTA) e submetido a centrifugações seriadas, para prevenir contaminação por ácidos nucleicos (Komatsu et al., 2011). Para o plasma, realizamos centrifugações seriadas de 1500 rpm por 30 min, 3000 rpm por 5 min e 4500 rpm por 5 min. Já o sangue separado em soro, foi coletado em um tubo seco de 15 mL sem a adição de anti-coagulantes, centrifugado três vezes à 3000 rpm por 20 min. A coagulação decorrente da separação das células vermelhas em soro, pode ser um fator importante na interferência na hemólise e contaminação por ácidos nucleicos.

Para estudar interferência de células vermelhas originadas do sangue total na expressão de miRNAs presentes no plasma e soro, coletamos as células vermelhas do sangue (hemácias) após a separação do plasma no tubo de EDTA, vortexamos por 10 segundos, e adicionamos novamente as células vermelhas no plasma.

O soro, plasma e as células vermelhas do sangue foram armazenadas à -80°C.

Para a obtenção do plasma de casos e controles, os centros de coleta seguiram estritamente o protocolo de separação de sangue total que baseia-se na coleta do sangue em tubo contendo solução anti-coagulante (EDTA) e, em seguida, centrifugação do sangue por 10 min a 3600 rpm. Todas as amostras de plasma foram armazenadas em criotubos à -80°C.

4.3 Avaliação da hemólise por espectrofotometria

Os níveis de hemoglobina livre nas amostras de plasma e soro foram avaliados por análises de espectrofotometria, através do espectrofotômetro *NanoVue Spectrophotometer* (GE Healthcare). Os picos de absorbância em 414 nm são indicativos de hemoglobina livre (Wong et al., 2006).

A avaliação dos níveis de expressão de miRNAs em diferentes concentrações de hemólise foi feito com o auxílio de uma curva de hemólise que simulasse possíveis rompimentos de células vermelhas no plasma. O rompimento das células vermelhas foi realizado por agitação mecânica (vortex) do tubo por 15 segundos. Para a curva de hemólise, utilizamos diferentes concentrações de células vermelhas no plasma (0.08%, 0.016%, 0,033% e 0.066% de volume de hemácias/volume de plasma), conforme figura 4.1 (Kirschner et al., 2011).

Figura 4.1 - Esquema da curva padrão de hemólise contruída com diferentes concentrações de hemácias em plasma: 0.008%, 0.016%, 0.033% e 0.066% de hemácias lisadas contidas no plasma

As porcentagens representadas nos gráficos são calculadas em função da razão entre o volume de hemácias e o volume total de plasma (v/v). Assumimos valores acima de 0.2 de absorbância como marcador de hemólise, pois segundo o trabalho de Kirschner et al. (2011), mesmo não sendo perceptível a hemólise por mudança na coloração do plasma/soro, valores de absorbância acima de 0.2 levam a mudanças na expressão de miRNAs.

Para todas as avaliações por espectrofotometria, utilizamos uma amostra de plasma hemolisada e uma amostra de plasma não hemolisada para calibração do equipamento.

4.4 Seleção de miRNAs frequentemente expressos em plasma e soro e genes para normalização de expressão

A busca por miRNAs frequentemente expressos em plasma e soro de indivíduos saudáveis e de pacientes com CECP, assim como a seleção de genes normalizadores da expressão da PCR em tempo real, foi feita com base em artigos científicos disponíveis no *PubMed* pertencente ao site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *LILACS*, *SCIELO* e *Medline*.

4.5 Extração de RNA

4.5.1 Extração de RNA das amostras de plasma e soro de indivíduos saudáveis

Utilizamos o kit *mirVana™ miRNA isolation* (Invitrogen) (cat. num: AM1560) para a extração de RNA. Fizemos a opção deste protocolo por estar bem padronizado em estudos anteriores do nosso grupo e na literatura (Wong et al., 2006; Shen et al., 2012). Este kit foi desenvolvido para extrações de RNA de amostras provenientes de cultura de células e tecidos. Para este projeto, adaptamos o protocolo do kit para extrações em amostras de plasma, assim como descrito por Shen et al. (2012). A extração de RNA foi feita com 350 µL de amostra e inicialmente foram adicionados dois volumes de *lysis/binding solution*. O tubo foi agitado vigorosamente por 10 s no vórtex para obter um lisado homogêneo. Em seguida, 70 µL de *miRNA Homogenate Additive* e posteriormente vortexado por 15 s e a mistura deixada no gelo por 10 min. Foi adicionado 700 µL de Ácido-Fenol:Clorofórmio e agitado vigorosamente no vórtex por 60 s, o lisado foi então centrifugado a 10000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foi adicionado 1.25 x volume da amostras de etanol 100%. Em seguida, 700 µL da mistura foram pipetados na coluna e centrifugados 15 s à 10000 xg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura de lisado e etanol fosse filtrada. Foi adicionado à coluna 700 µL de *miRNA Wash Solution 1* e os tubos foram centrifugados por 10 s à 10000 xg. O líquido foi descartado e 500 µL de *miRNA Wash Solution 2/3* foram aplicados à coluna e centrifugados 10 s à 10000 xg. O RNA foi eluído com 50 µL de água livre de nuclease e o RNA extraído foi armazenado à -80°C.

4.5.2 Extração de RNA das amostras de plasma de casos e controles

Utilizamos o kit *miRCURY™ RNA isolation - Biofluids* (Exiqon, Dinamarca)

(cat. num: 203301) para a extração de RNA das amostras de plasma dos casos e controles. Este kit é específico para detecção de miRNAs em plasma e soro. O primeiro passo foi centrifugar o plasma à 3000 xg por 5 min à 4°C, para eliminar possíveis debris celulares. Foi utilizado 200 µL de plasma como material inicial da extração de RNA. Em seguida, foi adicionado 1 µg de RNA carreador MS2 (Roche®) e um mix de *spike-ins* (UniSp2, UniSp4, UniSp5) em 60 µL de solução de lise à amostra de plasma. O tubo foi agitado vigorosamente no vórtex por 5 s e mantido em repouso à temperatura ambiente por 3 min. Para a precipitação de proteínas, foi adicionado 20 µL de *Protein Precipitation Solution BF*. O tubo foi agitado vigorosamente no vórtex por 5 s, mantido em repouso à temperatura ambiente por 1 min e centrifugado à 11000 xg por 3 min. A fase aquosa foi coletada e disposta em um novo tubo. Foi adicionado 200 µL de isopropanol ao sobrenadante e agitado vigorosamente no vórtex por 5 s. Em seguida, 300 µL da mistura foram pipetados na coluna de um tubo coletor, mantidos 2 min à temperatura ambiente e centrifugados 30 s à 11000 xg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura de lisado e isopropanol fosse filtrada. Foi adicionado à coluna 100 µL de *Wash Solution 1 BF* e o tubo foi centrifugado por 30 s à 11000 xg. O líquido foi descartado e 700 µL de *Wash Solution 2 BF* foram aplicados à coluna e centrifugados 30 s à 11000 xg. O líquido foi descartado e novamente adicionado 250 µL de *Wash Solution 2 BF* à coluna. O tubo foi centrifugado 2 min à 11000 xg até que a membrana estivesse completamente seca. O RNA total foi eluído pela adição de 50 µL de água livre de nuclease à membrana da coluna e centrifugado à 11000 xg por 1 min. Os RNAs extraídos foram armazenados à -80°C.

4.6 Síntese de cDNA para miRNAs

4.6.1 Síntese de cDNA para amostras de indivíduos sadios

Para estas análises iniciais, sintetizamos cDNA a partir de 4 µL de RNA total

pelo kit *TaqMan miRNA Reverse Transcription* (Life Technologies™) (cat. num: 4366596). Foi utilizado para cada reação de cDNA, 20x RT primer, 100 mM dNTP, *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50U/μL), 10x RT Buffer, *RNAse inhibitor* (20U/μL), amostra adequada e água livre de nuclease para completar o volume de 15 μL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e 4°C.

4.6.2 Síntese de cDNA para amostras de casos e controles

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *miRCURY LNA™ Universal RT cDNA Synthesis* (Exiqon, Dinamarca) (cat. number: 203301). Para cada reação de cDNA foi utilizado 4 μL de *5x Reaction Buffer*, 2 μL de *Enzyme Mix*, 1 μL de RNA sintético - *Spik-in* (UniSp6 e cel-miR39-3p), 9 μL de água livre de nuclease e 4 μL de amostra, totalizando 20 μL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 42°C por 60 min, 95°C por 5 min e 4°C até resfriar a amostra.

Para os ensaios de validação dos miRNAs selecionados por PCR Array, utilizamos o protocolo de ensaios individuais do kit *miRCURY LNA™ Universal RT cDNA Synthesis* (Exiqon, Dinamarca). Para cada reação de miRNA foi utilizado 2 μL de *5x Reaction Buffer*, 1 μL de *Enzyme Mix*, 0.5 μL de RNA sintético - *Spik-in* (UniSp6), 4.5 μL de água livre de nuclease e 2 μL de amostra, totalizando 10 μL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 42°C por 60 min, 95°C por 5 min e 4°C até resfriar a amostra.

4.7 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs

4.7.1 PCR em tempo real para avaliar a expressão de miRNAs em amostras de plasma e soro de indivíduos saudáveis

Para a detecção de miRNAs específicos em amostras de plasma e soro de indivíduos saudáveis, a PCR em tempo real foi realizada por *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Life Technologies) (cat. num: 4440040) e *primers* específicos, seguindo estritamente as recomendações do fabricante. De forma resumida, cada reação continha *TaqMan 2X Master Mix*, *TaqMan 20X RT primer*, cDNA (sem diluição) e água livre de nuclease. As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em duplicata, levadas ao termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies™), e submetidas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min, e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, com volume final de 20 µL.

4.7.2 PCR em tempo real para avaliar a expressão de miRNAs em amostras de plasma de casos e controles

Para identificar os miRNAs presentes no plasma, utilizamos painéis (PCR em placa ou *PCR arrays*) fabricados pela empresa Exiqon (Woburn, MA), *serum/plasma Focus microRNA PCR Panel 96 well (V3.MI)* (cat. num: 203838). Cada painel de miRNAs é composto de duas placas de PCR de 96 *well* (placa I + placa II), totalizando 179 diferentes conjuntos de *primers* LNA™ para amplificação por PCR em tempo real de miRNAs humanos. Os miRNAs presentes nas placas são frequentemente expressos em amostras de soro e plasma de indivíduos saudáveis e de indivíduos com diferentes doenças. Na figuras 4.2 e 4.3 estão ilustrados os desenhos das placas utilizadas neste projeto. Os cinco dos 179 conjuntos de *primers* de miRNA LNA™: miR-93, miR-103, miR-191, miR-423-5p e miR-425 são miRNAs que apresentam expressão alta e constante em soro e plasma (Blondal et al., 2013), e assim, podem ser utilizados como genes de referência para normalização da PCR em tempo real. MiR-23a e miR-451 são utilizados para detectar o grau de hemólise presente nas amostras. Existem ainda cinco conjuntos de *primers* para controle de qualidade: detecção dos *spike-ins* (UniSp2, UniSp4 e UniSp5) para controlar o rendimento da extração de miRNA; UniSp6 para monitorar sinais de inibição durante a reação de síntese de cDNA; e UniSp3 como calibrador

da PCR em tempo real entre-placas, presente em triplicata nas placas I e II. Cada placa ainda possui um poço que não receberá amostras (chamado “branco”) para detecção da contaminação dos reagentes por ácidos nucleicos.

Serum/plasma Focus microRNA PCR Panel I, 96-well plate layout												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-miR-652-3p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-200a-3p	UniSp2	hsa-miR-484	UniSp3 IPC	hsa-miR-106a-5p
B	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-342-3p	UniSp4	hsa-miR-324-5p	UniSp3 IPC	hsa-let-7e-5p
C	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-451a	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-485-3p	hsa-let-7b-3p	UniSp5	hsa-miR-25-3p	UniSp3 IPC	hsa-miR-33a-5p
D	hsa-miR-16-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-152	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-146a-5p	cel-miR-39-3p	hsa-miR-424-5p	UniSp6 CP	hsa-miR-107
E	hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-186-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-320b	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-99a-5p
F	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-215	hsa-miR-320a	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-103a-3p
G	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-142-3p	hsa-let-7d-3p	hsa-miR-605	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-192-5p
H	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-204-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-24-3p	Blank (H2O)

Figura 4.2 - Disposição dos miRNAs na placa I. Vermelho: miRNAs para detecção da hemólise; Verde: miRNAs para normalização; Amarelo: detecção de *spike-ins*; Azul: controle entre-placas; Azul claro: branco

Serum/plasma Focus microRNA PCR Panel II, 96-well plate layout												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-154-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-27a-3p
B	hsa-miR-1	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-133b	hsa-let-7d-5p	hsa-miR-133a	hsa-miR-20b-5p	UniSp3 IPC	hsa-miR-328	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-532-5p
C	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-660-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-551b-3p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-let-7c	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-29b-3p
D	hsa-miR-136-5p	hsa-let-7i-3p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-326	UniSp3 IPC	hsa-miR-421	hsa-miR-223-5p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-205-5p
E	hsa-miR-339-5p	Blank (H2O)	hsa-miR-500a-5p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-346	hsa-miR-193b-3p	UniSp3 IPC	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-208a	hsa-miR-16-2-3p
F	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-2110	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-93-3p
G	hsa-miR-144-5p	hsa-miR-210	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-766-3p	hsa-miR-584-5p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-190a	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-151a-3p
H	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-182-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-95	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-543	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-495-3p

Figura 4.3 - Disposição dos miRNAs na placa II. Verde: miRNAs para normalização; Azul: controle entre-placas; Azul claro: branco

Para a PCR em placas (PCR arrays) utilizamos o kit *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR* (Exiqon, Dinamarca) (cat. number: 203420). Os

ensaios foram realizados à partir de um mix contendo 5 µL de cDNA diluído 50 vezes em água livre de nuclease e 5 µL de *PCR ExiLENT SYBR® Green Master Mix*, totalizando 10 µL. A PCR foi realizada no termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies™), com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min, e 45 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 1 min, seguido da análise da curva de dissociação.

Para os ensaios de validação dos miRNAs selecionados por PCR arrays, utilizou-se 4 ul de cDNA diluído 40 vezes em água livre de nuclease, 1 ul de PCR primer e 5 ul de *PCR ExiLENT SYBR® Green Master Mix*, totalizando 10 µL.

A sequência e número de acesso dos primers *miRCURY™ LNA UniRT PCR* (Exiqon, Dinamarca) utilizados em ensaios individuais estão citados na Quadro 4.3. A PCR foi realizada no termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies™), com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min, e 45 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 1 min, seguido da análise da curva de dissociação.

miRNA	Número de Acesso no miRbase	Sequência
Hsa-miR-20b	MR0000000047	CAAAGUGCUCUAUAGUGCAGGUAG
Hsa-miR-93a-5p	MR0001763661	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
Hsa-miR-99a	MR0001762914	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
Hsa-miR-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUCUACAGUGCAGGUAG
Hsa-miR-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
Hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
Hsa-miR-204-5p	MI0000284	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
Hsa-miR-210	MI0000286	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
Hsa-miR-296	MI0000747	AGGGCCCCCCCCUCAAUCCUGU

Quadro 4.3 - miRNAs utilizados para validação dos achados pelas placas de *PCR Array*

4.8 Análise dos resultados

4.8.1 Análise dos resultados da PCR em tempo real para as placas de *PCR Array*

As análises estatísticas foram realizadas com a versão 6.0 do *software* GenEx, um *software* desenvolvido através da parceria entre a empresa Exiqon e MultiD. Este *software* foi especificamente adaptado para análises dos valores gerados pela PCR em tempo real dos produtos *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*. Inicialmente, realizamos o pré-processamento dos dados, que consistiu da calibração entre placas pelos controles IPCs (do inglês, *interplate controls*), seguido pela identificação dos valores de Ct (do inglês, *cycle threshold*) e substituição de valores de Ct acima de 37 ou indeterminados durante a PCR em tempo real pelo valor de Ct 38 para permitir a análise estatística entre grupos de amostras que expressavam ($Ct \leq 37$) e não expressavam ($Ct > 37$ ou indeterminado) miRNAs, de acordo com o manual do kit. A partir disso, o *software* oferece duas opções de normalização, pela média global dos genes ou através de genes de referência (miR-93-5p, miR-103-5p, miR-191-5p, miR-423-5p e miR-425-5p) sugeridos pelo kit. Optamos por normalizar os dados com os genes de referência candidatos, o miR-93a-5p e o miR-191-5p, confirmado pelos algoritmos geNorm e NormFinder. Tanto o geNorm quanto o NormFinder geram uma tabela de valores que indicam a variabilidade de cada gene entre amostras (valor M – geNorm, SD no NormFinder), sendo que o melhor gene para normalização possui a expressão mais estável e constante. Após a normalização, os valores foram reduzidos a logaritmo na base 2 e os dados processados e comparados como *fold-change*, segundo o modelo matemático de Ptáfl (2001) e conhecido como “método $\Delta\Delta Ct$ ”.

O cálculo baseia-se na comparação dos valores de Ct, expresso em unidades arbitrárias, entre dois grupos de amostras no momento em que a PCR atinge a fase exponencial de amplificação. Estes valores são calculados com base na normalização do gene de interesse subtraído do gene normalizador. Em seguida, é obtida a diferença de uma amostra de interesse pela amostra controle. Por fim, os

valores são elevados à segunda potência, obtendo-se os valores de *fold-change*, conforme a fórmula:

$$\text{fold-change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ΔCt = Ct do gene de interesse – Ct do gene normalizador

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

ΔCt_1 = amostra de interesse

ΔCt_2 = amostra controle

Para ensaios iniciais, os resultados estão apresentados como valores de Ct.

Os resultados das amostras de casos e controles foram comparadas da seguinte maneira: tumor e controle, C02C04 e controle, C01 e controle, N+ e N0. A significância estatística foi determinada comparando-se os valores de delta Ct das amostras, através do software Graph Prism (versão 6.0). Utilizamos o paramétrico t de *Student* bicaudal para amostras que apresentavam distribuição gaussiana e o teste não-paramétrico Mann-Whitney para amostras com distribuição não-gaussiana. Os valores de *p* menores do que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de miRNAs em plasma e soro e a interferência da hemólise na expressão de miRNAs

Visando avaliar a técnica de extração de miRNAs a partir de amostras de plasma e soro, bem como a detecção adequada de miRNAs por PCR em tempo real, inicialmente selecionamos miRNAs previamente identificados em soro e plasma de indivíduos sadios com base em relatos na literatura (item 4.4). Para estes ensaios, que foram chamados de iniciais, utilizamos amostras de plasma e soro de 7 indivíduos sadios (Tabela 4.2).

A quantificação de miRNAs circulantes é um desafio pelos níveis protéicos elevados e pela baixa concentração de RNA em plasma e soro. Na literatura, sugere-se a utilização de moléculas carreadoras e *spike-ins* para aumentar o rendimento da extração e para o monitoramento da qualidade da extração em biofluidos, respectivamente, uma vez que a quantidade obtida é geralmente igual ou inferior ao limite de quantificação exata por meio de análise de espectrofotometria. Assim, utilizando o carreador e *spike-ins*, partimos de 4 ul de RNA total extraídos para os ensaios individuais do tipo TaqMan®, um volume sugerido no kit selecionado e independente de uma quantificação absoluta.

A normalização da expressão de miRNAs por PCR em tempo real em amostras de tecidos e linhagens celulares, é comumente realizada a partir dos níveis de expressão de pequenos RNAs nucleolares. No caso dos biofluidos, a expressão destes pequenos RNAs é muito baixa, o que dificulta a sua detecção e utilização para normalização de miRNAs circulantes. Os nossos achados mostraram baixa expressão do RNU44, RNU48 e RNU6B em amostras de soro e plasma (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Avaliação da expressão de RNAs nucleolares em amostras de plasma e soro de indivíduos saudáveis. Todos apresentaram amplificação tardia, com Cts superiores a 35 ciclos. Experimento feito em duplicata

Tendo em vista esta dificuldade, a expressão de miRNAs cuja expressão foi reportada como sendo constante em estudos realizados em larga escala, poderia ser utilizada como alternativa para a normalização. Selecionamos o miR-16, com base na literatura (Resnick et al., 2009; Huang et al., 2010), para o propósito de normalização da PCR tempo real, porém, ao avaliarmos a expressão deste miRNA em nossas amostras observamos grande variabilidade (Figuras 5.2 e 5.3). Este miRNA foi portanto descartado como possível normalizador para os experimentos seguintes.

De forma similar, o miR-122, previamente descrito na literatura como eficaz para normalização (McDonald et al., 2011), apresentou pouca estabilidade nas nossas amostras (Figuras 5.2 e 5.3).

Tendo em vista estes resultados, preferimos apresentar os valores de expressão dos miRNAs inicialmente selecionados para validação da técnica em valores absolutos de Ct.

O trabalho de Blondal et al. (2013) avaliou 1500 amostras de soro e plasma de indivíduos saudáveis, através da PCR em tempo real para miRNAs específicos. Este trabalho identificou 119 miRNAs comumente expressos, dentre os quais selecionamos miR-15b e miR-25, comumente expressos em plasma, e 4 miRNAs que, além de já reportados em soro e plasma, foram selecionados com base em seu possível papel em CECP: o miR-21, miR-24-1, miR-192 e o miR-221, por estarem

super-expressos em amostras de tecido CECp (Avisar et al., 2009; Shiiba et al., 2010; Lin et al., 2010; Hsu et al., 2012).

Comparamos os valores de Ct para os 6 miRNAs selecionados em plasma e soro de indivíduos saudáveis. Pudemos observar expressão abundante destes miRNAs para todos os indivíduos, tanto nas amostras de soro quanto para plasma (Figuras 5.2 e 5.3). Em média, a expressão em plasma era mais elevada do que em soro para todos os miRNAs (Figuras 5.2 e 5.3). A partir destes resultados e da disponibilidade de plasma, e não de soro, nos centros de coleta que colaboram para este trabalho, optamos por trabalhar apenas com plasma para os experimentos subsequentes.

Figura 5.2 - Avaliação da expressão de miRNAs em sete amostras pareadas de plasma e soro (A) Valores expressos em média de Ct para miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24-1, miR-25, miR-122, miR-192, miR-221 e miR-451 para as amostras de plasma (B) Valores expressos em média de Ct para miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24-1, miR-25, miR-122, miR-192, miR-221 e miR-451 para as amostras de soro. Números de 1 a 7 indicam os pacientes avaliados. Cada ponto indica a média da duplicata técnica do experimento

Figura 5.3 - Avaliação da expressão de miRNAs em sete amostras pareadas de plasma e soro. O gráfico representa a média dos valores de Ct para todos os indivíduos avaliados para cada miRNAs. As diferenças de expressão entre o plasma e o soro foram calculadas com base no teste T de *student*. * $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$; ns=não significativo. Barras de erro = desvio padrão. Experimento feito em duplicata

A influência da contaminação do plasma por células sanguíneas no perfil de expressão de miRNAs já foi demonstrada anteriormente (McDonald et al., 2011; Kirschner et al., 2011; Blondal et al., 2013). Altos níveis de hemólise podem ser identificados facilmente pela mudança na coloração do plasma, porém alterações nos níveis de expressão de miRNAs podem ser causadas sem que sejam observadas mudanças visíveis da coloração do plasma (Kirschner et al., 2011).

Existem relatos de que o miR-451 está envolvido nos estágios tardios da eritropoiese, sendo considerado eritrócito específico (Bruchova et al., 2007; Merkerova et al., 2008), e que o aumento da expressão deste miRNA pode variar na presença de hemólise (Kirschner et al., 2011). Por isso, selecionamos o miR-451 para detecção da hemólise no plasma, avaliando sua expressão na presença e ausência de hemólise

Para tanto, realizamos uma curva padrão de hemólise à partir de diluições seriadas de células vermelhas em plasma não hemolisado e, em seguida, avaliamos a expressão do miR-451 nestas amostras. A absorbância foi aferida em cada uma das amostras no comprimento de onda de 414 nm. Valores de absorbância acima de 0.2 indicam a presença hemólise, pois segundo o trabalho de Kirschner et al. (2011), mesmo não sendo perceptível a hemólise por mudança na coloração do

plasma/soro, valores de absorvância acima de 0.2 levam a mudanças na expressão de miRNAs.

A mudança na coloração do plasma foi visível à partir da diluição de 0.016% (v/v) de hemácias em plasma, sendo que o pico de absorvância em 414 nm mostrou-se aumentado em duas vezes à partir de 0.008% (v/v) (Figura 5.4). Isso indica que a espectrofotometria é capaz de detectar a hemólise de forma eficiente, mesmo quando se trata de pequenas contaminações celulares que não são detectadas a olho nu.

Em paralelo, também observamos aumento da expressão do miR-451 à medida que a concentração de eritrócitos no plasma aumentava (Figura 5.4). Essa mudança de expressão é marcada pelo aumento em 5 Cts entre a amostra de plasma livre de hemólise comparado ao plasma contendo 0.008% de células vermelhas. O aumento brusco da expressão do miR-451 ocorreu quando ainda a hemólise não era detectada a olho nu, o que demonstra que a sensibilidade dessa técnica para a detecção de hemólise.

Figura 5.4 - Correlação entre a concentração de hemácias e absorvância no plasma de indivíduo sadio. (A) Aumento da absorvância no comprimento de onda de 414nm associada à presença de hemácias no plasma (B) Aumento do nível de expressão do miR-451 conforme aumento da concentração de hemácias no plasma. A expressão do miR-451 apresentada em valores médios de Ct

Buscamos compreender então, qual seria o impacto da hemólise na expressão dos miRNAs que selecionamos por estarem freqüentemente expressos em plasma (miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24, miR-25, miR-122, miR-192 e miR-221). Utilizamos amostras de plasma livre de hemólise de três indivíduos e diluições apresentando 0.066% de hemácias, diluição escolhida a partir dos resultados apresentados na Figura 5.5.

Observamos que a expressão do miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24-1, miR-25, e miR-192 variaram na presença de hemólise, apresentando aumento estatisticamente significativo (Figura 5.5). Por outro lado, o miR-221 e o miR-122 não apresentaram diferença significativa de expressão entre as amostras.

Figura 5.5 - Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma livres de hemólise e plasma contendo hemácias (0.066%) dos indivíduos 3, 4 e 5 (Tabela 5). Os dados representados são a média de expressão das duplicatas técnicas de todos os indivíduos para cada miRNA. Barras de erro = desvio padrão. As diferenças de expressão entre as amostras de plasma sem hemólise e plasma hemolisado foram calculadas com base no teste Mann-Whitney pareado. * $p \leq 0.05$; ns=não significativo. Experimento feito em duplicata

Com base nestes resultados concluímos que amostras de plasma onde a hemólise fosse detectada não poderiam ser incluídas no estudo.

5.2 Seleção de pacientes e controles e avaliação da presença de hemólise nas amostras disponíveis

Um total de 489 casos de CECP foram registrados, no período de julho de 2011 à agosto de 2014, pelos dois centros que colaboraram para esta fase do projeto. Destes, 143 foram incluídos pelo Hospital Heliópolis e 346 pelo Hospital das Clínicas de São Paulo.

Tendo em vista que para este projeto incluiríamos apenas casos com o sítio primário em assoalho de boca, base de língua e borda de língua, estratificamos os pacientes quanto aos diferentes subsítios de CECP. Identificamos que dos 143 casos de CECP do Hospital Heliópolis, 7 eram de base de língua, 14 de borda de língua, 14 de assoalho de boca e 108 de outros subsítios (Figura 5.6). E no Hospital das Clínicas de São Paulo, dos 346 casos, 51 eram de base de língua, 20 de borda de língua, 27 de assoalho de boca e 248 de outros subsítios (Figura 5.6). Sendo assim, 133 casos correspondiam aos subsítios de interesse.

Figura 5.6 - Seleção de pacientes com base nos subsítios de interesse obtidos em dois centros colaboradores nesta fase do projeto. (A) Hospital Heliópolis (B) Hospital das Clínicas

Além dos subsítios, conforme citado no item 4.1, os pacientes considerados como casos deveriam ser etilistas e tabagistas no presente e/ou passado, com idade acima de 50 anos, independente do gênero. Assim, dos 133 casos de CECP triados anteriormente, apenas 89 atendiam aos critérios de inclusão. Três outros critérios de exclusão - a hemólise detectável, dados clínicos incompletos e amostra de plasma

não disponível - determinaram nosso número final de pacientes: 57. Dentre os 31 casos descartados, 18 foram por apresentar hemólise visível, 7 por dados clínicos incompletos e 6 por haver apenas sangue total armazenado.

Selecionamos em um primeiro momento, 45 das 57 amostras de plasma de casos para a análise da expressão dos miRNAs circulantes em placas do tipo PCR Array. Destas amostras, 20 eram tumores de assoalho de boca (13 N+ e 7 N0), 10 tumores de borda de língua (5 N+ e 5 N0) e 15 tumores de base de língua (10 N+ e 5 N0). Os dados clínicos e anátomo-patológicos das amostras estão descritos na Quadro 4.1.

Amostras de plasma de pacientes que foram acompanhados por três meses após a ressecção cirúrgica, totalizaram 7 amostras. Essas amostras foram usadas após a identificação dos miRNAs mais importantes para avaliação das mudanças nos níveis de expressão após procedimento cirúrgico (Quadro 4.1).

A seleção das amostras dos indivíduos controle seguiu o mesmo fluxo estabelecido para seleção das amostras tumorais, quanto aos critérios de inclusão por hábitos de vida e idade, assim como hemólise detectada por mudança na coloração. Iniciamos a triagem dos pacientes a partir da idade, e à partir de 215 indivíduos do Hospital das Clínicas de São Paulo e 46 do Hospital Heliópolis, 149 com idade igual ou superior a 50 anos entre os dois centros foram selecionados. Em seguida, selecionamos pelos hábitos tabagismos e etilismo (presente e/ou passado), e dos 149 indivíduos previamente selecionados, 83 foram incluídos. Por fim, foi avaliada hemólise e a disponibilidade das amostra de plasma, excluindo mais 68 indivíduos. Sendo assim, apenas 15 amostras foram utilizadas para as análises (Quadro 4.1)

Antes de iniciar as análises de expressão de miRNAs, buscamos avaliar a presença de hemólise, por espectrofotometria, nas 67 amostras de plasma de casos (45 amostras usadas para: PCR Array; 12 amostras extras e 7 amostras de acompanhamento) e nas 15 amostras de plasma de indivíduos controle, totalizando 82 amostras. Verificamos que os valores de absorbância para as amostras de pacientes e controles variaram sempre próximo à 0.15 no comprimento de onda de 414 nm, indicando ausência de hemólise quando comparados ao controle positivo (Figura 5.7).

continua

Conclusão

Figura 5.7 - Análise de absorbância por espectrofotometria como indicador de hemólise no plasma de 57 casos de CECP e 15 controles. Valores de absorbância acima de 0.2 em 414nm indicam hemólise. (A) 15 amostras de tumor de base de língua (B) 10 amostras de tumor de borda de língua (C) 20 amostras de tumor de assoalho de boca (D) 15 amostras de controle (E) 10 amostras de acompanhamento. Controle positivo = amostra de plasma com hemácias (0.008%)

5.3 miRNAs detectados em plasma de pacientes e controles

Para a investigação do perfil de expressão de miRNAs em plasma, utilizamos placas de PCR Array especialmente desenvolvidas para detecção de miRNAs em amostras de plasma e/ou soro. Estas placas incluem *primers* para a detecção de 179 miRNAs, dentre os quais 5 miRNAs são frequentemente utilizados como normalizadores e 174 miRNAs são amplamente expressos em humanos. Para um total de 60 placas de PCR Array utilizamos amostras dos três subsítios tumorais

selecionados: assoalho de boca, borda de língua e base de língua, totalizando 45 amostras tumorais e 15 controles (Quadro 4.1).

A qualidade da extração de RNA interfere na síntese de cDNA e, consequentemente, nos resultados das reações de PCR em tempo real. A fim de monitorar a eficiência da extração de RNA e síntese de cDNA, incluímos RNAs sintéticos (*spike-ins*) em cada um das amostras, de acordo com o protocolo do fabricante. Os *spike-ins* UniSp2, UniSp4 e UniSp5 foram adicionados em diferentes concentrações para avaliar o rendimento das extrações de RNA, enquanto que os *spike-ins* UniSp6/cel-miR-39-3p e UniSp3 IPC foram utilizados para monitorar sinais de inibição durante a síntese de cDNA e PCR em tempo real, respectivamente. Todas as amostras apresentaram expressão estável e constante dos *spike-ins*, sugerindo extração eficiente de RNA, síntese de cDNA e amplificação da PCR em tempo real. A figura 5.8 ilustra os resultados obtidos.

Figura 5.8 - Uso de *spike-ins* para monitoramento da qualidade da extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real. Os três RNAs sintéticos (UniSp2, UniSp4, UniSp5) são utilizados em diferentes concentrações para controlar rendimento da extração de RNA. O spike-in UniSp6 + cel-miR-39-3p é utilizado para monitorar a síntese de cDNA e o UniSp3 IPC é usado para monitorar a eficiência da PCR em tempo real. O gráfico representa a média dos valores de Ct para 60 amostras (45 casos e 15 controles) utilizados nas placas de PCR Array. Barras de erro = desvio padrão. A utilização dos cinco spike-ins para o monitoramento da qualidade é eficaz para as amostras avaliadas, sendo que a expressão observada com as amostras deste estudo foram similares ao descrito pelo protocolo do kit Exiqon

Cinco miRNAs - miR-93, miR-103, miR-191, miR-423-5p e miR-425 – devem possuir expressão relativamente constante em amostras de plasma e devem ser detectados caso as quantidades de RNA iniciais sejam suficientes e os procedimentos de síntese e amplificação ocorram de forma satisfatória. Estes miRNAs podem ainda ser utilizados como normalizadores para a expressão das outras moléculas detectadas pela placa. Nossos resultados indicaram expressão estável destes 5 miRNAs, garantindo portanto, que as quantidades iniciais de RNA eram adequadas e que a amplificação foi eficiente (Figura 5.9).

Figura 5.9 - miRNAs indicados pela Exiqon como possíveis normalizadores da expressão da PCR em tempo real. A expressão dos miRNAs permaneceu estável e constante entre as amostras. O gráfico representa a média dos valores de Ct para 60 amostras (45 casos e 15 controles) utilizados nas placas de PCR Array. Barras de erro = desvio padrão. Os miRNAs selecionados podem ser utilizados como normalizadores da expressão de miRNAs, por apresentarem expressão estável e constante entre as amostras. O miR-93-5p e o miR-191-5p foram os miRNAs mais expressos e com maior estabilidade entre as amostras

Analisamos a expressão dos miRNAs de expressão constante (miR-93a, miR-191, miR-423, miR-103 e miR-425) pelo *software Genex*, e confirmamos a estabilidade da expressão destes miRNAs por dois algoritmos disponíveis no *software*: NormFinder e geNORM. Estes algoritmos indicaram que tanto o miR-93-5p quanto o miR-191-5p apresentavam a expressão mais consistente entre as amostras. Apesar de pequena diferença, para as amostras de base de língua,

ambos algoritmos indicaram o miR-191-5p como o mais estável, e para as amostras de borda de língua e assoalho de boca, o miR-93a.

Através dos miRNAs detectados pelas placas de PCR Array também é possível a análise da hemólise através de variações na expressão de miR-23a e miR-451 e cálculo sugerido pelo protocolo do fabricante. Para esta avaliação, é calculada a diferença de expressão entre o miR-23a e o miR-451, e valores acima de 7 para esta diferença indicam hemólise. Na figura 5.10 estão representados os valores de delta Ct obtidos dos pacientes e controles. Observamos que para todas amostras os valores estavam abaixo de 7, indicando ausência de hemólise e confirmando os resultados obtidos por espectrofotometria.

Figura 5.10 - Indicador de hemólise baseado na expressão do miR-23a e miR-451. Valores de delta Ct maiores do que 7 indicariam presença de hemólise no plasma

Consideramos como genes expressos aqueles que apresentavam valores de $Ct \leq 37$. Com este limite, um total de 164 miRNAs estavam expressos em amostras tumorais e controles, sendo que destes, 79 estavam expressos em 100% das amostras destes grupos. Quando avaliamos os grupos separadamente, observamos que 11 miRNAs estão expressos em todas as amostras tumorais dos subsítios de base de língua, assoalho de boca e borda de língua, mas não estão expressos nas amostras controle e 28 miRNAs estão expressos em todas as amostras controle, mas não estão expressos nas amostras tumorais.

Tendo em vista que as amostras tumorais de carcinoma epidermoide da cavidade oral, tanto de borda de língua quanto de assoalho de boca, apresentam expressão dos miRNAs bastante similar entre elas, optamos por avaliá-las como um único grupo de amostras. Pudemos observar que 85 miRNAs estão expressos nas

amostras tumorais dos subsítios de assoalho de boca e borda de língua, sendo que apenas 5 miRNAs estavam expressos em 100% das amostras avaliadas.

Por fim, identificamos a presença de 104 miRNAs expressos tanto nas amostras tumorais de base de língua quanto nas amostras controle. Quando avaliamos separadamente os grupos, conseguimos selecionar 17 miRNAs que estão expressos em todas as amostras de plasma do subsítio de base de língua e que não estão expressas nas amostras controle.

No quadro 5.1 estão relacionados os miRNAs observados especificamente em cada grupo de amostras.

miRNAs expressos em todas as amostras tumorais	miR-23b, miR-132-3p, miR-210, miR-92a, miR-29c, miR-21, miR-148b, miR-192-5p, miR-885, miR-199-5p
miRNAs expressos em todas as amostras controle	miR-145-5p, let-7a-5p, miR-128, miR-25-3p, miR-30e-5p, let-7i-5p, miR-122-5p, miR-365a-3p, miR-144-3p, miR-192-5p, miR-199a-3p, miR-532-5p, miR-28-5p, miR-425-3p, miR-132-3p, miR-18a-5p, miR-223-5p, miR-146b-5p, miR-629-5p, miR-200c-3p, miR-423-3p, miR-199a-5p, miR-28-3p, miR-324-3p, miR-30e-3p, miR-185, miR-143, miR-424-3p, miR-331, miR-141, miR-148a, miR-133b, miR-335-5p, miR-425-5p, miR-22-3p, miR-107, miR-30d, miR-590
miRNAs expressos em todas as amostras de carcinoma epidermoide de borda de língua e assoalho de boca	miR-652-3p, miR-885, miR-28-5p, miR-34a, miR-328
miRNAs expressos em todas as amostras de carcinoma epidermoide de base de língua	miR-324-5p, let-7e-5p, miR-485-3p, miR-151a-5p, miR-223-3p, miR-142-3p, let-7d-3p, miR-125b-5p, miR-502-3p, miR-27a-3p, miR-660-5p, miR-574-3p, miR-205-5p, miR-346, miR-16-2-3p, miR-130b-3p, miR-363-3p

Quadro 5.1 - miRNAs expressos em todas as amostras dos grupos avaliados.

5.4 Identificação de miRNAs diferencialmente expressos

5.4.1 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide da cavidade oral e orofaringe e plasma de indivíduos controle

A fim de identificarmos miRNAs que desempenham papel importante no desenvolvimento de CECP, selecionamos miRNAs diferencialmente expressos entre amostras tumorais e controles. Para tal análise, agrupamos as amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade oral e carcinoma epidermoide de orofaringe - assoalho de boca, borda de língua, base de língua - em um único grupo denominado tumoral.

Para a identificação destes miRNAs, selecionamos *fold-change* acima de 1.5, isso quer dizer, miRNAs que apresentaram expressão pelo menos 50% maior/menor entre os grupos de amostras tumorais e controles. Avaliamos também a significância estatística das diferenças entre os grupos, sendo que *p* valores ≤ 0.05 foram consideradas estatisticamente significativos. Na tabela 5.1 estão representados os miRNAs selecionados pelos dois critérios citados acima.

Tabela 5.1 - miRNAs selecionados pela diferença de expressão entre as amostras tumorais e as amostras de controles (fold-change ≥ 1.5)

miRNA	Fold-change (tumor x controle)	<i>p</i> valor
hsa-miR-223-3p	-14,32	6,70E-01
hsa-miR-15a-5p	-10,84	3,00E-02
hsa-miR-122-5p	-9,54	1,30E-01
hsa-miR-185-5p	-7,88	7,00E-04
hsa-miR-18a-5p	-5,88	1,00E-01
hsa-miR-424-5p	-5,21	2,00E-04
hsa-miR-25-3p	-4,23	2,00E-01
hsa-miR-195-5p	-4,04	2,00E-02
hsa-miR-95	-3,81	2,00E-02
hsa-miR-338-3p	-3,70	8,00E-02
hsa-miR-125b-5p	-3,59	1,30E-01
hsa-miR-222-3p	-3,47	2,00E-02
hsa-miR-423-3p	-2,82	3,60E-01
hsa-miR-150-5p	-2,82	6,10E-01
hsa-miR-133b	-2,81	1,00E-02
hsa-miR-144-3p	-2,76	3,00E-02
hsa-miR-324-5p	-2,66	9,20E-01
hsa-miR-204-5p	-2,65	2,00E-02
hsa-miR-2110	-2,63	1,40E-01
hsa-miR-143-3p	-2,59	2,00E-02

continua

conclusão		
miRNA	Fold-change (tumor x controle)	p valor
hsa-miR-365a-3p	-2,53	1,20E-01
hsa-miR-99a-5p	-2,45	1,00E-02
hsa-miR-145-5p	-2,39	3,00E-02
hsa-miR-133a	-2,13	1,10E-01
hsa-miR-32-5p	-2,02	1,10E-01
hsa-miR-363-3p	-2,02	8,00E-02
hsa-miR-495-3p	1,54	4,00E-01
hsa-miR-142-3p	1,64	9,00E-01
hsa-let-7e-5p	1,65	1,30E-01
hsa-miR-210	1,95	8,60E-01
hsa-miR-136-5p	2,05	7,20E-01
hsa-miR-501-3p	2,41	3,90E-01
hsa-miR-485-3p	2,53	2,66E-01
hsa-miR-205-5p	2,55	2,90E-01
hsa-miR-29b-2-5p	2,74	3,30E-01
hsa-miR-382-5p	3,01	5,20E-01
hsa-miR-502-3p	3,60	4,30E-01
hsa-miR-543	4,21	1,90E-02

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para uma melhor avaliação destes resultados, plotamos os valores em gráficos de dispersão (Figura 5.11).

O miRNA que apresentou maior significância estatística entre os grupos foi o miR-185-5p, sendo que este miRNA está menos expresso nas amostras tumorais cerca de oito vezes quando comparado às amostras controle. E alguns miRNAs importantes no contexto de CECP - miR-99a, miR-204, miR-133b, miR222 e miR-15a - apresentaram *fold-change* ≥ 2.0 e significância estatística.

continua

conclusão

Figura 5.11 - Gráfico de dispersão da comparação dos níveis de expressão dos miRNAs entre amostras de plasma de CECP e controle. *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$; $-dCt$: expressão de miRNAs normalizada pelo miR-93a

5.4.2 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide de base de língua e plasma de indivíduos controle

Tendo o conhecimento de que tumores de cavidade oral (assoalho de boca e borda de língua) e de orofaringe (base de língua) podem apresentar diferenças moleculares significativas, decidimos dividi-los em dois grupos e compará-los com as amostras de controle.

Para a análise da expressão diferencial de miRNAs entre as amostras de plasma de base de língua (n=15) e os controles (n=15) selecionamos *fold-change* acima de 1.5. Avaliamos também a significância estatística das diferenças entre os grupos, sendo que *p* valores ≤ 0.05 foram consideradas estatisticamente significativos (tabela 5.2).

Tabela 5.2 - miRNAs selecionados pela diferença de expressão entre as amostras tumorais de carcinoma epidermoide de base de língua e as amostras de controles (fold-change ≥ 1.5)

miRNAs	<i>Fold-change</i> (tumor de base de língua x controle)	<i>p</i> valor
hsa-miR-590-5p	-7,21	1,60E-03
hsa-miR-144-3p	-6,56	1,20E-03
hsa-miR-99a-5p	-5,63	$\leq 1,00E-04$
hsa-miR-424-5p	-5,05	1,00E-03
hsa-miR-143-3p	-4,75	7,00E-04
hsa-miR-326	-4,47	2,00E-03
hsa-miR-101-3p	-4,41	5,00E-04
hsa-miR-133b	-4,08	7,00E-04
hsa-miR-33a-5p	-3,93	4,00E-02
hsa-miR-185-5p	-3,86	7,00E-04
hsa-miR-150-5p	-3,22	4,90E-01
hsa-miR-19b-3p	-2,94	1,00E-02
hsa-miR-335-5p	-2,64	2,00E-02
hsa-let-7f-5p	-2,64	4,00E-04
hsa-miR-204-5p	-2,63	6,00E-02
hsa-miR-107	-2,55	6,40E-03
hsa-miR-365a-3p	-2,33	1,30E-01
hsa-miR-19a-3p	-2,30	1,00E-02
hsa-miR-148a-3p	-2,24	4,40E-02
hsa-let-7b-5p	-2,20	2,00E-02
hsa-miR-22-3p	-2,18	2,00E-02
hsa-miR-376a-3p	-2,16	3,00E-02

continua

conclusão

miRNAs	<i>Fold-change</i> (tumor de base de língua x controle)	<i>p</i> valor
hsa-let-7i-5p	-2,12	2,00E-03
hsa-miR-103a-3p	-2,03	1,70E-01
hsa-miR-186-5p	-1,97	2,00E-02
hsa-let-7g-5p	-1,94	1,00E-02
hsa-miR-154-5p	-1,77	2,20E-01
hsa-miR-18b-5p	-1,75	9,00E-02
hsa-miR-27b-3p	-1,70	2,00E-03
hsa-miR-30b-5p	-1,69	1,20E-02
hsa-miR-222-3p	-1,66	8,00E-02
hsa-miR-34a-5p	-1,64	2,90E-01
hsa-miR-29a-3p	-1,64	1,80E-01
hsa-miR-32-5p	-1,63	7,00E-02
hsa-miR-133a	-1,60	2,40E-01
hsa-miR-30d-5p	-1,50	2,60E-01
hsa-miR-15a-5p	1,54	8,90E-01
hsa-miR-20b-5p	1,55	9,50E-01
hsa-miR-200a-3p	1,65	7,50E-01
hsa-let-7d-3p	1,98	6,00E-02
hsa-miR-532-3p	1,99	5,00E-01
hsa-miR-181a-5p	2,01	1,70E-01
hsa-miR-136-5p	2,09	3,60E-01
hsa-let-7d-5p	2,29	5,00E-02
hsa-miR-92b-3p	2,33	2,30E-01
hsa-miR-146b-5p	2,33	1,50E-01
hsa-miR-382-5p	2,58	5,00E-01
hsa-miR-501-3p	2,79	9,00E-02
hsa-let-7c	3,06	3,00E-02
hsa-miR-375	3,29	1,60E-02
hsa-miR-205-5p	3,44	2,20E-01
hsa-miR-346	3,57	3,00E-02
hsa-let-7e-5p	3,79	1,00E-03
hsa-miR-485-3p	19,85	≤1,00E-04

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos

A maior parte dos miRNAs que apresentaram expressão diferencial estavam mais expressos nos controles quando comparados às amostras tumorais de base de língua. Dentre os miRNAs que apresentaram maiores diferenças entre os 2 grupos estão o miR-99a e o miR-485-3p, sendo que o miR-99a estava cinco vezes mais expresso nos controle e o miR-485-3p estava dezenove vezes mais expresso nas amostras tumorais. miRNAs importantes no contexto de CECP também apresentaram significância estatística e *fold-change* ≥ 1.5 : miR-133b, miR33a, miR19b, miR19a e miR30b. Para melhor compreensão do significado destes

resultados, os níveis de expressão foram também plotados em gráficos de dispersão (Figura 5.12).

Continua

Continua

Continua

Continua

continua

Conclusão

Figura 5.12 - Gráfico de dispersão da comparação dos níveis de expressão dos miRNAs entre amostras de plasma de carcinoma epidermoide de base de língua e controle. * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$; **** : $p \leq 0.0001$. -dCt: expressão de miRNAs normalizada pelo miR-93a

5.4.3 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma de pacientes portadores de carcinoma epidermoide da cavidade oral (assoalho de boca e borda de língua) e plasma de indivíduos controle

Para avaliar a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de plasma de portadores de CECp de assoalho de boca e borda de língua (n=30) e plasma de indivíduos controle (n=15), selecionamos *fold-change* acima de 1.5. Avaliamos também a significância estatística das diferenças entre os grupos, sendo que *p* valores ≤ 0.05 foram consideradas estatisticamente significativos (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - miRNAs selecionados pela diferença de expressão entre as amostras tumorais de carcinoma epidermoide de assoalho de boca e borda de língua e as amostras de controles (fold-change ≥ 1.5)

miRNA	<i>Fold-change</i> (Tumor de assoalho de boca e borda de língua x Controle)	<i>p</i> valor
hsa-miR-223-3p	-52,89	1,30E-03
hsa-miR-15a-5p	-33,79	3,50E-03
hsa-miR-122-5p	-25,42	4,80E-03
hsa-miR-185-5p	-10,01	1,30E-03
hsa-miR-18a-5p	-8,35	2,00E-02
hsa-miR-25-3p	-6,28	1,10E-01
hsa-miR-125b-5p	-6,21	3,00E-02
hsa-miR-338-3p	-5,73	2,00E-02
hsa-miR-424-5p	-4,79	2,00E-04
hsa-miR-195-5p	-4,77	7,00E-03
hsa-miR-375	-4,58	1,00E-02
hsa-miR-222-3p	-4,51	1,90E-03
hsa-miR-23a-3p	-4,18	7,00E-02
hsa-miR-423-3p	-4,15	2,80E-01
hsa-miR-324-5p	-3,71	6,00E-02
hsa-miR-2110	-3,52	2,00E-02
hsa-let-7c	-3,47	3,00E-02
hsa-miR-95	-3,21	1,10E-01
hsa-miR-145-5p	-3,16	4,00E-02
hsa-miR-150-5p	-2,57	9,00E-01
hsa-miR-363-3p	-2,47	1,60E-02
hsa-miR-204-5p	-2,46	3,00E-02
hsa-miR-605	-2,31	7,00E-02
hsa-miR-532-3p	-2,26	1,30E-01
hsa-miR-365a-3p	-2,14	1,30E-01
hsa-miR-20b-5p	-2,14	9,00E-02
hsa-miR-574-3p	-2,08	3,30E-01
hsa-miR-133a	-2,04	1,80E-01
hsa-miR-133b	-1,9	2,87E-01
hsa-miR-32-5p	-1,85	3,52E-01
		Continua

Conclusão

miRNA	<i>Fold-change</i> (Tumor de assoalho de boca e borda de língua x Controle)	<i>p</i> valor
hsa-miR-143-3p	-1,81	1,89E-01
hsa-miR-346	-1,76	3,25E-01
hsa-miR-128	-1,75	3,35E-02
hsa-let-7i-5p	-1,74	1,50E-01
hsa-miR-144-3p	-1,7	2,63E-01
hsa-miR-497-5p	-1,69	3,27E-01
hsa-miR-15b-5p	-1,67	3,12E-01
hsa-miR-629-5p	-1,64	3,29E-01
hsa-let-7a-5p	-1,61	3,02E-01
hsa-miR-148a-3p	-1,61	2,28E-01
hsa-miR-151a-5p	-1,61	5,52E-01
hsa-miR-320a	-1,61	9,91E-02
hsa-miR-30d-5p	-1,59	2,42E-01
hsa-miR-320b	-1,57	2,37E-01
hsa-miR-99a-5p	-1,57	2,17E-01
hsa-miR-20a-3p	-1,55	4,76E-01
hsa-miR-27b-3p	-1,54	3,84E-01
hsa-miR-10b-5p	-1,53	2,92E-01
hsa-miR-30a-5p	-1,51	2,68E-01
hsa-let-7b-5p	-1,51	2,67E-01
hsa-miR-301a-3p	1,52	3,83E-01
hsa-miR-1	1,55	6,87E-01
hsa-miR-16-2-3p	1,55	4,04E-01
hsa-miR-18b-5p	1,59	1,04E-01
hsa-miR-328	1,65	3,99E-01
hsa-miR-127-3p	1,67	4,23E-01
hsa-miR-339-5p	1,67	3,65E-01
hsa-miR-495-3p	1,73	4,21E-01
hsa-let-7i-3p	1,85	6,28E-01
hsa-miR-22-5p	1,9	2,98E-01
hsa-miR-136-5p	2,01	2,80E-01
hsa-miR-142-3p	2,06	3,60E-01
hsa-miR-205-5p	2,08	4,00E-01
hsa-miR-501-3p	2,29	7,60E-01
hsa-miR-29b-2-5p	2,65	1,20E-01
hsa-miR-382-5p	3,12	7,40E-01
hsa-miR-543	3,76	4,00E-02
hsa-miR-502-3p	5,25	7,10E-01

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Dos dezessete miRNAs identificados como diferencialmente expressos entre os 2 grupos e com significância estatística, destaca-se o miR-424-5p com expressão cerca de cinco vezes maior nos controles quando comparado às amostras tumorais. O único miRNA que apresentou maior expressão nas amostras tumorais e significância estatística quando comparado aos controles foi o miR-543, com aumento da expressão de quase quatro vezes. A Figura 5.13 apresenta gráficos de dispersão para estes resultados.

Continua

Continua

Continua

Figura 5.13 - Gráfico de dispersão da comparação dos níveis de expressão dos miRNAs entre amostras de plasma de carcinoma epidermoide de assoalho de boca e borda de língua e controle. * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$. -dCt: expressão de miRNAs normalizada pelo miR-93a

5.4.4 Comparação da expressão de miRNAs entre amostras de plasma associadas a tumores de base de língua com perfil metastático e não metastático

Para a comparação entre tumores metastáticos e não metastáticos, novamente avaliamos separadamente a expressão de miRNAs nas amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide de base de língua, e os carcinomas epidermoide da cavidade oral (borda de língua e assoalho de língua).

Para esta análise com amostras de base de língua utilizamos as 15 amostras de carcinoma incluídas nas placas de PCR array, sendo 10 amostras com perfil metastático (N+) e 5 amostras com perfil não-metastático (N0).

Selecionamos miRNAs que apresentaram diferença de expressão $\geq 1,5$ entre amostras de carcinoma epidermoide de base de língua metastáticas e não-metastáticas. Consideramos como diferença estatisticamente significativa resultados de p valor ≤ 0.05 entre os dois grupos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - miRNAs selecionados pela diferença de expressão entre as amostras tumorais de carcinoma epidermoide de base de língua metastáticas e não metastáticas (fold-change ≥ 1.5)

miRNAs	Fold-change (N+XN0)	p valor
hsa-miR-103a-3p	-3,89	6,70E-01
hsa-let-7d-5p	1,24	4,80E-01
hsa-miR-30e-3p	1,99	1,20E-01
hsa-miR-143-3p	2,00	1,40E-01
hsa-miR-133a	2,00	3,80E-01
hsa-miR-144-5p	2,07	1,20E-01
hsa-miR-338-3p	2,15	3,00E-01
hsa-miR-20b-5p	2,18	3,10E-01
hsa-miR-192-5p	2,21	3,00E-02
hsa-miR-223-5p	2,24	2,30E-01
hsa-miR-365a-3p	2,25	3,10E-01
hsa-miR-551b-3p	2,26	2,40E-01
hsa-miR-34a-5p	2,43	3,00E-01
hsa-miR-15a-5p	2,49	8,50E-01
hsa-miR-766-3p	2,54	1,20E-01
hsa-miR-18a-5p	2,56	3,00E-01
hsa-miR-99a-5p	2,69	1,10E-01
hsa-miR-22-5p	2,76	1,10E-01
hsa-miR-543	2,77	2,60E-01
hsa-miR-497-5p	2,91	3,10E-01
hsa-miR-222-3p	2,91	3,00E-01
hsa-let-7c	2,99	2,00E-01
hsa-miR-193b-3p	3,14	1,50E-01
hsa-miR-21-5p	3,20	5,10E-01
hsa-miR-501-3p	3,21	5,50E-02
hsa-miR-122-5p	3,26	1,00E-01
hsa-miR-155-5p	3,37	8,00E-02
hsa-miR-574-3p	3,37	8,00E-03
hsa-miR-199a-5p	3,66	1,50E-01
hsa-miR-339-3p	3,86	3,00E-01
hsa-miR-133b	4,13	1,70E-01
hsa-miR-885-5p	4,82	9,00E-02
hsa-miR-375	4,91	1,60E-01

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Observamos que dos 33 miRNAs que apresentaram diferença nos níveis de expressão, 32 miRNAs apresentavam maior expressão nas amostras metastáticas e 1 miRNA nas amostras não-metastáticas. O miR-375, seguido pelo miR-885 foram os miRNAs mais expressos nas amostras metastáticas quando comparado às

amostras não metastáticas, sendo que o miR-103a foi a molécula menos expressa nas amostras metastáticas.

Apesar do elevado número de miRNAs identificados nestas amostras, apenas o miR-574 e o miR-192 apresentaram expressão diferencial com significância estatística entre os dois grupos avaliados. A Figura 5.14 ilustra os padrões de dispersão destes resultados.

Figura 5.14 - Gráfico de dispersão da comparação dos níveis de expressão de miRNAs entre amostras de plasma de pacientes com tumores de base de língua com perfil N+ e N0. * : $p \leq 0.05$ ** : $p \leq 0.01$. -dCt: expressão de miRNAs normalizada pelo miR-191

5.4.5 Expressão diferencial entre amostras de plasma de portadores de carcinoma epidermoide da cavidade oral com perfil metastático e não metastático

Para esta avaliação, comparamos as 30 amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade oral analisadas por PCR *array*, sendo 19 com perfil metastático (N+) e 11 com perfil não metastático (N0).

Os miRNAs apresentados na tabela 5.5 foram selecionados por apresentarem *fold-change* ≥ 1.5 entre amostras N+ e N0. As diferenças entre os dois grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando os *p* valores eram ≤ 0.05 .

Tabela 5.5 - miRNAs selecionados pela diferença de expressão entre as amostras tumorais de carcinoma epidermoide da cavidade oral metastáticas e não metastáticas (fold-change ≥ 1.5)

miRNAs	<i>Fold-change</i> (N+ $\times$ N0)	<i>p</i> valor
hsa-miR-382-5p	-13,03	7,82E-02
hsa-miR-210	-8,7	1,69E-01
hsa-let-7i-3p	-6,38	2,92E-01
hsa-miR-25-3p	-4,17	2,99E-01
hsa-miR-660-5p	-3,77	2,18E-01
hsa-miR-26a-5p	-2,75	2,62E-01
hsa-let-7c	-2,66	2,26E-01
hsa-miR-92a-3p	-2,31	3,71E-01
hsa-miR-15a-5p	-2,01	6,35E-01
hsa-miR-766-3p	-1,99	2,41E-01
hsa-miR-27b-3p	-1,96	3,25E-01
hsa-miR-23a-3p	-1,78	6,05E-01
hsa-miR-200c-3p	-1,74	4,21E-01
hsa-miR-363-3p	-1,7	5,30E-01
hsa-miR-301a-3p	-1,68	3,25E-01
hsa-miR-125b-5p	-1,66	6,74E-01
hsa-miR-29b-2-5p	-1,61	3,58E-01
hsa-miR-495-3p	-1,56	5,79E-01
hsa-miR-154-5p	-1,52	5,75E-01
hsa-miR-409-3p	-1,51	5,75E-01
hsa-miR-29c-3p	1,53	5,36E-01

Continua

Continua

miRNAs	<i>Fold-change</i> (N+xN0)	<i>p valor</i>
hsa-miR-374a-5p	1,54	3,13E-01
hsa-miR-93-3p	1,55	3,30E-01
hsa-miR-222-3p	1,55	6,44E-01
hsa-miR-30a-5p	1,58	3,52E-01
hsa-miR-29a-5p	1,59	4,75E-01
hsa-miR-194-5p	1,63	2,75E-01
hsa-miR-192-5p	1,65	3,91E-01
hsa-miR-20a-5p	1,66	2,68E-01
hsa-miR-425-3p	1,66	3,64E-01
hsa-miR-20a-3p	1,67	4,62E-01
hsa-miR-151a-5p	1,71	6,13E-01
hsa-miR-629-5p	1,74	3,07E-01
hsa-miR-200a-3p	1,75	2,66E-01
hsa-miR-19b-3p	1,76	1,48E-01
hsa-miR-195-5p	1,78	4,71E-01
hsa-miR-140-3p	1,79	2,13E-01
hsa-miR-20b-5p	1,86	3,90E-01
hsa-miR-29a-3p	1,88	2,88E-01
hsa-miR-193b-3p	1,89	2,49E-01
hsa-miR-376a-3p	1,9	3,87E-01
hsa-miR-22-5p	1,91	3,55E-01
hsa-miR-151a-3p	1,98	2,50E-01
hsa-miR-99a-5p	1,99	1,30E-01
hsa-miR-485-3p	1,99	3,17E-01
hsa-miR-32-5p	2,03	3,70E-01
hsa-miR-296	2,08	5,02E-01
hsa-miR-142-3p	2,09	4,69E-01
hsa-let-7a-5p	2,12	2,43E-01
hsa-miR-10b-5p	2,14	1,52E-01
hsa-miR-204-5p	2,19	1,06E-01
hsa-miR-223-3p	2,25	6,47E-01
hsa-miR-30e-5p	2,25	1,24E-01
hsa-miR-1	2,32	5,71E-01
hsa-miR-16-2-3p	2,4	1,20E-01
hsa-miR-605	2,5	9,99E-02
hsa-miR-107	2,51	2,05E-01
hsa-miR-106a-5p	2,7	2,31E-01
hsa-miR-338-3p	2,76	2,57E-01
hsa-miR-185-5p	2,81	3,90E-01

Continua

Conclusão

miRNAs	<i>Fold-change</i> (N+<i>x</i>N0)	<i>p</i> valor
hsa-miR-205-5p	2,87	9,89E-02
hsa-miR-425-5p	3,	1,89E-01
hsa-miR-501-3p	3,17	4,59E-01
hsa-miR-18a-5p	3,28	2,97E-01
hsa-miR-122-5p	8,4	1,65E-01
hsa-miR-502-3p	11,88	2,30E-01

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Foram identificados 66 miRNAs com *fold-change* ≥ 1.5 entre as amostras de plasma de pacientes portadores de tumores de cavidade oral com perfil N+ e N0, sendo que 45 miRNAs estavam mais expressos nas amostras N+ e 21 miRNAs estavam mais expressos nas amostras N0. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre as comparações, mas conseguimos selecionar dentre os miRNAs apontados na tabela acima, alguns miRNAs que são importantes no contexto de CECP e que apresentam *fold-change* acima de 1.5: miR-30a, miR-106, miR-301a, miR-20b, miR-296, miR-99a, miR-204 e miR-205.

5.5 Níveis de expressão de miRNAs em amostras de plasma obtidas após ressecção cirúrgica

A fim de avaliarmos se a expressão dos miRNAs identificados como diferencialmente expressos entre amostras metastáticas e não metastáticas variaria após a cirurgia, selecionamos amostras de plasma de pacientes após 3 da ressecção cirúrgica. A avaliação foi realizada em amostras de plasmas de 7 pacientes, sendo 1 de base de língua, 3 de borda de língua e 3 de assoalho de boca, e destas, 2 com perfil metastático e 5 com perfil não metastático que possuíam plasma.

Para esta análise, selecionamos miRNAs obtidos a partir de diversas comparações realizadas nestes estudo e utilizamos ainda dados recentemente

publicados por nosso grupo a partir de amostras de tecido de carcinoma oral (Severino et al., 2015). Os miRNAs selecionados foram:

- miR-99a: mais expresso em amostras de plasma de indivíduos controle, em amostras de plasma N+ de cavidade oral e de orofaringe e em tecido de amostras de cavidade oral N+
- miR-20b: mais expresso em amostras de plasma de indivíduos controle e em amostras de plasma N+ de cavidade oral e orofaringe e em tecido de amostras de cavidade oral N+
- miR-106: mais expresso em amostras de plasma N+ de cavidade oral e em tecido de amostras de cavidade oral N+
- miR-204: mais expresso em amostras de plasma de indivíduos controle e em amostras de plasma N+ de língua e em tecido de amostras de cavidade oral N+
- miR-210: mais expresso em amostras de plasma de tumores e em amostras de plasma de cavidade oral N0
- miR-296: mais expresso em amostras N+ de cavidade oral e em tecido de amostras de cavidade oral N+
- miR-130b: mais expresso em amostras de tecido de cavidade oral N0

Na figura 5.15, estão ilustradas as diferenças dos níveis de expressão dos miRNAs no tempo 0 - no momento anterior à cirurgia e no tempo 3 - após 3 meses da ressecção cirúrgica.

Continua

Conclusão

Figura 5.15 - Comparação dos níveis de expressão dos miRNAs ente amostras de plasma de pacientes com CECP com perfil metastático (N+) e não-metastático (N0) pré-operados (F0) e após três meses da cirurgia de ressecção tumoral (F1). -dCt: expressão de miRNAs normalizada pelo miR-93a

Comparando amostras dos mesmos pacientes no momento do diagnóstico do tumor (F0) e após três meses da cirurgia (F1), observamos aumento da expressão dos miRNAs miR20b, miR-106 e miR99a tanto nas amostras metastáticas quanto das amostras não metastáticas de CECP. O miR-210 e miR296 não apresentaram mudança de expressão entre as amostras avaliadas. O miR-130b e o miR-204 apresentaram aumento de expressão nas amostras metastáticas quando comparou-se amostras de plasma de pacientes no momento do diagnóstico tumoral (F0) aos

mesmos pacientes após 3 meses da ressecção cirúrgica (F1). Não detectamos alteração na expressão de miR-30a nas amostras avaliadas.

Alguns dos resultados obtidos nesse projeto foram publicados e estão nos anexos de C a F.

6 DISCUSSÃO

MiRNAs circulantes detectados no plasma são de interesse clínico, devido a sua possível aplicação como biomarcadores detectáveis de forma minimamente invasiva. MiRNAs circulantes em plasma de indivíduos com CECP poderiam ser utilizados como marcadores de prognóstico e, em particular, como marcadores da presença de metástases. Por isso, neste estudo, padronizamos técnicas para a detecção de miRNAs circulantes em plasma e buscamos encontrar marcadores passíveis de serem utilizados para caracterizar amostras de indivíduos portadores de CECP com metástase em linfonodos ao diagnóstico, de forma a diferenciá-los de indivíduos que não apresentavam metástase ao diagnóstico.

A partir da seleção de miRNAs previamente identificados em soro e plasma de indivíduos saudáveis com base em relatos na literatura, fomos capazes de avaliar com sucesso a técnica de extração de miRNAs assim como a detecção de miRNAs por PCR em tempo real (Chen et al., 2008; Hunter et al., 2008).

A quantificação de miRNAs circulantes é um desafio pelos níveis protéicos elevados e pela baixa concentração de RNA em plasma e soro. No nosso trabalho, com base nos relatos da literatura, utilizamos moléculas carreadoras de RNA e *spike-ins* para aumentar o rendimento da extração e para o monitoramento da qualidade da extração em plasma, respectivamente, uma vez que a quantidade obtida é geralmente inferior ao limite necessário para quantificação e avaliação de qualidade por espectrofotometria (Kroh et al., 2010).

A normalização da expressão de miRNAs avaliada por PCR em tempo real em amostras de tecidos e linhagens celulares é comumente realizada a partir dos níveis de expressão de pequenos RNAs nucleolares (Peng et al., 2013; Torres et al., 2013). Constatamos neste trabalho, conforme descrito na literatura (Ai et al., 2010; Bryant et al., 2012), que a expressão destes pequenos RNAs era muito baixa e de fato inadequada para a normalização da expressão de miRNAs circulantes. Alguns estudos relatam a expressão constante do miR-16 entre indivíduos (Resnick et al., 2009; Huang et al., 2010) e, portanto, também avaliamos a expressão deste miRNA como alternativa para a normalização. Porém, em nossas amostras, observamos grande variabilidade. Nossos resultados estão de acordo com Chen et al. (2008) e Ng et al. (2009) que também observaram variabilidade na expressão de miR-16

quando estudaram amostras de soro e plasma no contexto de carcinoma colorretal. De forma similar, o miR-122, previamente descrito por McDonald et al. (2011) como eficaz para normalização, apresentou pouca estabilidade nas nossas amostras.

O trabalho de Blondal et al (2013) avaliou 1500 amostras de soro e plasma de indivíduos saudáveis, através da PCR em tempo real. Os autores identificaram 119 miRNAs comumente expressos, dentre os quais selecionamos miR-15b e miR-25 e 4 miRNAs que, além de já reportados em soro e plasma, foram selecionados com base em seu possível papel em CECP: o miR-21 e o miR-24-1, anteriormente identificados em plasma de pacientes com câncer oral (Lin et al., 2010; Hsu et al., 2012), e miR-192 e miR-221, por estarem super-expressos em amostras de tecido CECP (Avissar et al., 2009; Shiiba et al., 2010) para avaliar nossa capacidade de detecção de miRNAs. Pudemos observar expressão abundante destes miRNAs para todos os indivíduos, tanto nas amostras de soro quanto para plasma, resultado consistente com o trabalho de Blondal et al. (2013).

A influência da contaminação do plasma por células sanguíneas no perfil de expressão de miRNAs já foi demonstrada (McDonald et al., 2011; Kirschner et al., 2011; Blondal et al., 2013). Altos níveis de hemólise podem ser identificados facilmente pela mudança na coloração do plasma, porém alterações nos níveis de expressão de miRNAs podem ser causadas sem que sejam observadas mudanças visíveis da coloração do plasma (Kirschner et al., 2011). Alguns autores relataram que o miR-451 está envolvido nos estágios tardios da eritropoiese, sendo considerado eritrócito específico (Bruchova et al., 2007; Merkerova et al., 2008) e o grupo de Kirschner et al. (2011) reportou o aumento da expressão deste miRNA em 23 amostras de plasma hemolisado quando comparado a 22 amostras sem hemólise. Os nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois pudemos observar mudanças nos níveis de expressão do miR-451 na presença de hemólise no plasma e aumento da absorbância por espectrofotometria. Também observamos aumento da expressão do miR-451 à medida que a concentração de hemoglobina no plasma aumentava, conforme relatado por Blondal et al. (2013) e Kirschner et al. (2011). Avaliamos então se a presença de hemólise interferiria na expressão dos miRNAs escolhidos por estarem sabidamente expressos em plasma (miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24-1, miR-25, miR-122, miR-192 e o miR-221) e observamos que a hemólise alterava a expressão de miR-15b, miR-16, miR-21, miR-24-1, miR-25 e miR-192, porém não alterava a expressão de miR-221. O aumento associado à

hemólise para miR-15, miR-16 e miR-21 e a estabilidade da expressão do miR-122, na presença de hemólise, foram relatados por Kirschner et al. em seu trabalho publicado em 2013. Por outro lado, o miR-221 não apresentou diferença significativa de expressão entre as amostras e, até o momento, não se conhecem estudos que relatem a expressão constante e estável do miR-221 na presença de hemólise.

A etapa de seleção de pacientes e controles que obedecem os critérios de inclusão e exclusão para estudos retrospectivos é um desafio. Neste trabalho nos deparamos com alguns obstáculos como dados clínicos incompletos no bancos de dados e amostras de plasma não disponíveis nos centros de coleta devido a dificuldades inerentes ao processo de inclusão dos pacientes, porém a maior dificuldade foi encontrada quanto aos subsítios previamente estipulados para o estudo (base de língua, borda de língua e assoalho de boca). Sendo assim, a partir de 489 amostras de CECP e 261 amostras controle registradas como disponíveis para estudo, apenas 57 amostras tumorais e 15 amostras controle puderam de fato ser utilizadas.

Todos os miRNAs estudados através de placas de PCR array e escolhidos para este estudo, já haviam sido previamente identificados em plasma humano por estudos do tipo *screening* populacional (Blondal et al., 2013). Sendo assim, antes de avaliarmos quais miRNAs estariam expressos de forma diferente entre amostras de tumores metastáticos e não metastáticos, selecionamos aqueles que estariam expressos de forma consistente em amostras tumorais e em amostras controle.

Alguns miRNAs identificados em todas as amostras no grupo tumoral já estão descritos na literatura como miRNAs importantes no contexto de CECP, como o miR-23b (Scapoli et al., 2010), miR-132-3p (Wong QW et al., 2008), miR-210 (Scapoli et al., 2010; Hui et al., 2010), miR-92a (MacLellan et al., 2012), miR-29c (Chang et al., 2008) e o miR-21 (Chang et al., 2008; Hui et al., 2010) que apresentam maior expressão nas amostras de tecido tumoral de pacientes com CECP quando comparado às margens do tumor ou amostras de tecidos normais, e apresentam importante papel como possíveis biomarcadores de diagnóstico. O miR-21 também já foi identificado em amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide oral, quando comparado a amostras de indivíduos sadios pelo grupo do Hsu et al. (2012). O miR-885 e o miR-21 foram identificados com alta expressão em plasma de pacientes com CECP e observou-se que após tratamento radioterápico existiam alterações na expressão destes miRNAs (Summerer et al., 2013).

Outros miRNAs identificados no plasma dos pacientes estudados, já foram previamente identificados em plasma ou soro em indivíduos portadores de outros tipos de câncer. O miR-148b, por exemplo, foi identificado com alta expressão em pacientes com câncer de esôfago quando comparado a indivíduos sadios e indicado como biomarcador de diagnóstico para esses pacientes (Zhang et al., 2010). Os miRNAs miR-192-5p e o miR-885 foram indicados como biomarcadores de diagnóstico para doença inicial de carcinoma hepatocelular (Zhou et al., 2010) e o miR-199a-5p apresentou-se diferencialmente expresso entre amostras de soro de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células quando comparado a indivíduos sadios, e indicado como marcador para o diagnóstico para esse tipo de tumor (Chen et al., 2012).

Dos miRNAs identificados em todas as amostras controle, pudemos observar com base na literatura, que normalmente eles estão com baixa expressão nas amostras tumorais de CECp e outras neoplasias. O miR-145, let-7d, miR-25-3p e os miR-192-5p que foram descritos com baixa expressão nas amostras de tecido de carcinoma epidermoide de laringe quando comparado a margem livre de tumor (Ayaz et al., 2013). No estudo de Yang et al. (2013) foi observada baixa expressão do miR-145-5p em saliva de pacientes com lesão oral cancerizável quando comparado a amostras controle. A baixa expressão do miR-128, miR-30e, miR-148, miR-122-5p, miR-223 e miR-200c foi observada em linhagens celulares de carcinoma epidermoide oral quando comparado a queratinócitos orais normais (Kozaki et al., 2008). O miR-122-5p é um miRNA fígado específico, que encontra-se com baixa expressão em hepatocarcinomas e tem como gene alvo o AKT3 (Nassirpour et al., 2013). Em amostras de plasma de pacientes com carcinoma gástrico quando comparado a controles, o miR-122 foi identificado com baixa expressão, e em associação com a alta expressão do miR-192 foi indicado como biomarcador precoce (Chen et al., 2014). Em tumores de endométrio, a baixa expressão do miR-199a-3p quando comparado aos tecidos livres de tumor, está relacionado ao aumento da proliferação celular e desenvolvimento da doença (Wu et al., 2013). O miR-28-5p controla a proliferação celular e está pouco expresso em linhagens celulares de linfomas do tipo B quando comparado à cultura primária de células B (Schneider et al., 2014), e no mesmo sentido o miR-28-3p encontra-se em amostras de tecido tumoral colorretal quando comparado a amostras de tecido colorretal normais (Almeida et al., 2012). A baixa expressão do miR-132 foi

observada em amostras de tecido de CECP quando comparado aos tecidos livres de tumor (Rentoft et al., 2011), assim como a baixa expressão do miR-18a em amostras de carcinoma epidermoide de orofaringe pelo grupo de Gao et al. (2010). No estudo de Kikkawa et al. (2010) foi observada baixa expressão do miR-30e-3p em amostras de tecido com CECP quando comparado as margens livres de tumor. Não existem relatos da expressão do let-7i-5p, miR-144-3p, miR-532-5p, miR-425-3p, miR-629-5p, miR-766-3p, miR-324-3p, miR-29-3p relacionado a tumores na literatura.

Nas análises de expressão diferencial de miRNAs entre amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide comparado aos controles, identificamos miRNAs importantes em câncer. Alguns miRNAs importantes no contexto de CECP, como o miR-99a (Severino et al., 2013), miR-204 (Severino et al., 2013), miR-222 (Muller et al., 2008; Hu et al., 2009), miR-15a (Lajer et al., 2012), miR-144 (Zhang et al., 2015) e miR-195-5p (Kikkawa et al., 2010) já foram descritos na literatura com baixa expressão em tecidos de CECP quando comparados as margens livres de tumor, porém poucos foram avaliados em plasma. A baixa expressão do miR-133b foi relacionado à promoção do desenvolvimento de tumores de próstata, pelo fato deste miRNA modular a expressão de genes apoptóticos, que levam a morte celular (Patron et al., 2012). No trabalho de Luo et al. (2014), a baixa expressão do miR-95 em amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma de mama quando comparado as margens livres de tumor, foi relacionada ao aumento da proliferação e migração celular por ter como gene alvo a ciclina E. Esse trabalho também sugeriu o uso deste miRNA como marcador de prognóstico e potencial alvo terapêutico para câncer de mama. Outro miRNA identificado foi o miR-143, que apresentou baixa expressão em amostras de tecido de pacientes com carcinoma de próstata quando comparado as margens livres de tumor, e ele desempenha um papel de supressor tumoral, pois em ensaios de ganho-de-função deste miRNA, há diminuição da proliferação e migração (Xu et al., 2011).

Na análise dos tumores de orofaringe (base de língua) comparado aos controles, observamos a desregulação de miRNAs já discutidos anteriormente miR-99a, miR-133b, miR-30b e miR-185, porém há três outros miRNAs importantes no contexto de CECP que merecem destaque: miR-19a, miR-19b e o miR-30b. A baixa expressão do miR-19a e do miR-19b foi demonstrada pelo grupo de Lo (2012), que comparava tecidos tumorais e amostras de plasma de CECP quando comparado ao grupo controle. Estes miRNAs, assim como o miR-92 que também estava

desregulado, estão localizados no cluster miR-17-92 também conhecido como oncomiR1, que codifica miRNAs importantes no desenvolvimento e progressão tumoral (Mogilyansky; Rigoutsos, 2013). Normalmente os miRNAs codificados por esse cluster apresentam expressão aumentada em diferentes tumores, contrário do que pudemos observar nas nossas amostras. Contudo, acreditamos que esses miRNAs estejam sendo regulados por outros miRNAs que tem o papel de controlar o crescimento e progressão do tumor. A baixa expressão do miR-30b também foi observada em amostras de tecidos tumorais quando comparado as margens livres de tumor por Kikkawa et al. (2010).

A partir das análises da expressão diferencial de miRNAs entre amostras de plasma de carcinoma epidermoide da cavidade oral comparado aos controles, destacamos o miR-223 e o miR-543 por apresentarem maior expressão nos controles e nos tumores, respectivamente. O miR-223 já foi observado com baixa expressão em amostras de soro de pacientes com CECP quando comparado a amostras controle, e este miRNA foi sugerido como um possível biomarcador não-invasivo para identificação deste tipo de tumor (MacLellan et al., 2012). Quanto ao miR-543, não existe nenhuma evidência do aumento ou da diminuição da expressão desse miRNA na literatura de CECP. Porém, o aumento da expressão do miR-543 foi observada em amostras de soro de pacientes com carcinoma de células renais quando comparado ao plasma de indivíduos saudáveis (Wang et al., 2015). Em tecidos tumorais de carcinoma hepatocelular quando comparado à margem livre de tumor o miR-543 está super-expresso, e acredita-se que este miRNA desempenhe papel de oncogene por ter o *PAQR3* como seu gene alvo, que é o gene que codifica o receptor de adiponectina e está envolvido com o aumento da proliferação e desenvolvimento no carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2012; Wang et al., 2015).

Para a comparação entre tumores metastáticos e não metastáticos foram avaliadas separadamente a expressão de miRNAs nas amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide de base de língua e os carcinomas orais (borda de língua e assoalho de língua).

A comparação da expressão dos miRNAs nas amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide de base de língua metastático comparado às amostras de tumores não-metastáticos identificou dois miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa entre os grupos: miR-192-5p e miR-574-3p. Ambos apresentaram maior expressão nos tumores metastáticos. A super-

expressão do miR-192-5p foi observada em amostras de soro de pacientes com colangiosarcoma quando comparado a indivíduos saudáveis, sendo que os altos níveis de miR-192-5p foram relacionados a metástase linfonodal e sobrevida global reduzida. O autor do trabalho (Silakit et al., 2014), sugeriu que esse miRNA pode ser utilizado como marcador prognóstico não invasivo para pacientes com colangiosarcoma. Em câncer gástrico, a super-expressão do miR-192-5p foi detectada em amostras de tecido tumoral comparado à margem do tumor. Essa super-expressão foi relacionada às características clínicas do tipo tumoral, como metástase em linfonodos, indicando que o miR-192-5p possa ser um candidato à biomarcador de prognóstico do câncer gástrico (Xu; Fan, 2015). O grupo de Bryant et al. (2012) descreveu a super-expressão do miR-574-3p em amostras de urina de pacientes com carcinoma de próstata quando comparado aos controles, mostrando seu potencial como biomarcador. Em um estudo publicado recentemente, o miR-574-3p foi descrito como um marcador de prognóstico promissor e auxiliador no monitoramento de resposta terapêutica para pacientes com CECP (Summerer et al., 2015). As análises foram realizadas em plasma de pacientes com CECP comparado a indivíduos saudáveis, e o aumento da expressão do miR-574-3p foi relacionada à diminuição de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Apesar de não identificarmos diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de plasma de pacientes com carcinoma epidermoide de assoalho de boca e borda de língua metastáticas comparado às não-metastáticas, identificamos miRNAs diferencialmente expressos e que tem importante papel em metástases de CECP. Resultados semelhantes foram encontrados para alguns miRNAs, como miR-20b, miR-30a e miR-106, em estudo recente publicado por nosso grupo comparando amostras de carcinoma oral metastático e não metastático (Severino et al., 2015).

Os miRNAs que apresentaram maior expressão nas amostras de tecido e plasma de tumores metastáticos, foram o miR-20b, miR-30a, miR-106, miR-99a, miR-204, miR-205 e miR-296, e o miR-301a mais expresso nas amostras não-metastáticas. A expressão desses miRNAs também foi avaliada nas amostras de acompanhamento dos pacientes após 3 meses da ressecção cirúrgica.

O miR-20b regula a expressão de um gene com função de supressão tumoral, o *PTEN*, um gene alvo avaliado em câncer de mama (Zhou et al., 2014). O *PTEN* participa da regulação do ciclo celular, migração, invasão e metástase através da via de sinalização de PI3K/AKT (Chalhoub; Baker, 2009). A super-expressão

deste miRNA por ensaios funcionais, mostrou aumento na formação de colônias e reforçou a importância do miR-20b no desenvolvimento do câncer (Zhou et al., 2014). O aumento da expressão do miR-30a em câncer está relacionado ao processo metastático, possivelmente pelo fato deste miRNA ter como gene alvo o *RUNX3*, que tem função de supressão tumoral. Ensaios de perda de função deste gene levam ao aumento da invasão e aumento de vimentina, um marcador de célula mesenquimal (Liu X et al., 2013). Alguns trabalhos detectaram aumento da expressão do miR-106 entre amostras tumorais de CECP e margens livres de tumor e associaram este aumento com aumento de recorrência loco-regional e pior prognóstico (Childs et al., 2009; Hui et al., 2010). Esses resultados podem estar relacionados à função do miR-106 na transição epitélio-mesênquima através de TGF-beta e resposta a danos no DNA por regular negativamente o inibidor do ciclo celular, o gene p21 (Kan et al., 2009; Smith et al., 2012). Foi descrito que a expressão do miR-205 aumentava na presença de linfonodos metastáticos de CECP, enquanto tumores primários não expressavam essa molécula, e sugeriu que esse miRNA poderia ser utilizado como marcador de metástase em CECP (Fletcher et al., 2008; de Carvalho et al., 2015). Outro miRNA envolvido em processos metastáticos é o miR-296, por interagir, possivelmente, com o gene *ICAM-1*, que codifica uma molécula de adesão intercelular (Liu X et al., 2013).

O miR-130b foi selecionado por ter sido encontrado mais expresso em amostras de tecido de carcinoma oral não metastático (Severino et al., 2013; Hui et al., 2010). O papel deste miRNA em metástase foi recentemente relacionado à diminuição de migração e invasão, após ensaio de super-expressão em linhagens celulares de câncer de pulmão (Zhao et al., 2014). A baixa expressão do miR-204 foi detectada em tumores de CECP, possivelmente relacionada ao desbalanço genômico do locus 9q21.1-22.3, correspondente ao gene *TRPM3* (do inglês, *transient receptor potential melastatin 3*), gene associado com predisposição genética a tumores de cabeça e pescoço (Lee et al., 2010; Abou-Elhamd et al., 2008). Alvos preditos para o miR-204 que estão super-expressos em CECP tem funções relacionadas a adesão celular, regulação do ciclo celular e proliferação celular e a super-expressão do miR-204 inibe a interação célula-matriz, motilidade e invasão *in vitro* (Lee et al., 2010; Yang et al., 2010; Bao et al., 2013). O padrão de expressão de 19 genes alvo do miR-204 em diferentes subtipos tumorais de CECP

mostrou um possível papel desse miRNA no prognóstico de CECP (Chung et al., 2004).

Apesar da literatura descrever a redução dos níveis de expressão de miRNAs após cirurgia curativa (Hsu et al., 2012; Hung et al., 2013), não conseguimos observar este fato com os miRNAs e amostras analisadas neste estudo. Selecionamos principalmente miRNAs mais expressos em amostras de plasma de portadores de tumores metastáticos, e dois miRNAs mais expressos em amostras de plasma de tumores não metastáticos. A principal ideia era poder verificar, através da expressão destes miRNAs, se não haveriam tumores e/ou metástases presentes após a cirurgia. O baixo número de amostras analisadas após ressecção cirúrgica pode estar relacionado ao fato de não conseguirmos observar a diferença esperada neste trabalho. Entretanto, não existiam dados suficientes para afirmar que, no momento da análise realizada, os pacientes estariam, de fato, livres de tumor ou metástases. Também não era conhecido o tratamento em curso e seu efeito sobre a expressão de miRNAs. Sendo assim, apesar dos resultados insatisfatórios quanto aos miRNAs e amostras analisados 3 meses após cirurgia, acreditamos que análises complementares, tanto clínicas quanto experimentais, são necessárias antes de conclusões definitivas.

Os dados deste trabalho podem contribuir para o entendimento dos processos relacionados a metástases em CECP, uma vez que diversos miRNAs analisados são moléculas ativas na regulação de genes associados com este processo. Ao lado disso, foram identificados miRNAs aparentemente expressos de forma específica em tumores, bem como em sub-sítios específicos ou em plasma de pacientes que apresentaram comprometimento linfonodal. Estas informações corroboram a ideia de que miRNAs circulantes em plasma podem ser utilizados como marcadores para o diagnóstico e o prognóstico de CECP.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, fomos capazes de comparar a expressão de miRNAs entre amostras pareadas de plasma e soro de indivíduos sadios e identificar o tipo de amostra ideal para o estudo de miRNAs circulantes. Após identificar o plasma como o melhor tipo de amostra, padronizamos técnicas para identificar variáveis pré-analíticas de forma robusta, sensível e reproduzível quando comparado aos dados obtidos com a expressão de um miRNA frequentemente expresso em eritrócitos.

Apesar de desafiadora a seleção de amostras de pacientes em estudos retrospectivos, fomos capazes de obter o número total de amostras inicialmente planejadas para este projeto, e realizar eficientemente a comparação da expressão dos miRNAs entre grupos amostrais diferentes.

Assim, concluímos que os miRNAs circulantes presentes em plasma podem refletir características moleculares do tumor, e que a desregulação da sua expressão em contextos específicos, como subsítios tumorais e condições clínicas distintas, como a presença ou ausência de metástase, poderiam auxiliar no diagnóstico e na avaliação do prognóstico de portadores de CECP.

REFERÊNCIAS¹

- Abou-Elhamd KE, Habib TN, Moussa AE, Badawy BS. The role of genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2008; 265: 217–22.
- Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):73-7.
- Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettgowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science.* 2011 Aug 26;333(6046):1154-7.
- Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, et al. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* 2012 Apr;142(4):886-896.e9.
- American Cancer Society (2012). *Cancer Facts and Figures 2012*. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2012. Retrieved December 26.
- Andreasen D, Fog JU, Biggs W, Salomon J, Dahslveen IK, Baker A, et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods.* 2010 Apr;50(4):S6-9. Review.
- Arosarena OA, Madsen M, Haug R. Special considerations with floor of mouth and tongue cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2006;18(4):521-31.
- Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2850-5.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Özcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Sep;139(9):1499-506.

Babu J M, Prathibha R, Jijith VS, Hariharan R, Pillai MR. A Mir-Centric View of Head and Neck Cancers. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(1):67-72.

Bao W, Wang HH, Tian FJ, He XY, Qiu MT, Wang JY, et al. A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2013 Dec 9;12:155.

Barbano R, Palumbo O, Pasculli B, Galasso M, Volinia S, D'Angelo V, et al. A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. *PLoS One*. 2014 Oct 3;9(10):e108950.

Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilmann M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013 Jan;59(1):S1-6.

Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, et al. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6616-25.

Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jul 7;96(13):998-1006

Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*. 2005 Apr;35(3):187-93. Review.

Broumand V, Lozano TE, Gomez JA. Evaluation and staging of oral cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2006 Nov;18(4):435-44.

Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007 Nov;35(11):1657-67.

Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(4):768-74.

Cabanillas R, Rodrigo JP, Astudillo A, Domínguez F, Suárez C, Chiara MD. P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1791-8.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66. Review.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005;114:806-816.

Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Dec 15;123(12):2791-7.

Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50.

Chen AY, Myers JN. Cancer of the oral cavity. *Dis Mon*. 2001 Jul;47(7):275-361. Review.

Chen Q, Ge X, Zhang Y, Xia H, Yuan D, Tang Q, et al. Plasma miR-122 and miR-192 as potential novel biomarkers for the early detection of distant metastasis of gastric cancer. *Oncol Rep*. 2014 Apr;31(4):1863-70.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.

Chen X, Hu Z, Wang W, Ba Y, Ma L, Zhang C, et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1620-8.

Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, Nakazawa T, Shimizu K, Okamura H, Impey S, Obrietan K. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*. 2007 Jun 7;54(5):813-29.

Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2009;174(3):736-45.

Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2005 Sep 15;104(6):1113-28. Review. Erratum in: *Cancer*. 2005 Dec 1;104(11):2532.

Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res*. 2008 Jan;87(1):14-32. Review. Erratum in: *J Dent Res*. 2008 Feb;87(2):191.

Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):489-500.

Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6758-62.

Chung GE, Yoon JH, Myung SJ, Lee JH, Lee SH, Lee SM et al. High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2010;23(1):113-9.

De Carvalho AC, Scapulatempo-Neto C, Maia DC, Evangelista AF, Morini MA, Carvalho AL, et al. Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med*. 2015 May 9;13:108.

Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med*. 2010 Jun;16(6):257-67. doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.001. Review.

Duan L, Yao J, Wu X, Fan M. Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt-beta-catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells. *Biol Cell*. 2006 Aug;98(8):479-90.

Dünne AA, Müller HH, Eisele DW, Kessel K, Moll R, Werner JA. Meta-analysis of the prognostic significance of perinodal spread in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) patients. *Eur J Cancer*. 2006 Aug;42(12):1863-8. Epub 2006 Jul 10. Review.

Farshadpour F, Kranenborg H, Calkoen EV, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ, et al. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: influence of smoking and drinking. *Head Neck*. 2011 Jun;33(6):817-23.

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 20;100(4):261-9.

Falcone G, Felsani A, D'Agnano I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Apr 2;34:32.

Feber A, Xi L, Pennathur A, Gooding WE, Bandla S, Wu M, et al. MicroRNA prognostic signature for nodal metastases and survival in esophageal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2011;91(5):1523-30.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-14. Review.

Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205. *Transl Oncol*. 2008;Dec;1(4):202-8.

Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck*. 2003 Jan;25(1):67-73. Review.

Fujii M, Ishiguro R, Yamashita T, Tashiro M. Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Lett*. 2001 Oct 30;172(2):187-92.

Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, et al. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(6):399-408.

Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol.* 2003 Apr;39(3):207-12. Review.

Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control.* 2002 Sep-Oct;9(5):369-78. Review.

GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, IARC, Lyon, France, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso feito em 13 de setembro de 2015.

Gonzalez-Moles MA. Comment on: Küffer and Lombardi "Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of intraepithelial neoplasia", *Oral Oncology* 2002;38:125-30. *Oral Oncol.* 2002 Dec;38(8):809-10.

Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 25;104(39):15484-9.

Griffiths-Jones S, Russell JG, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research.* 2005;34(1):140-44.

Guo L, Bai H, Zou D, Hong T, Liu J, Huang J, et al. The role of microRNA-133b and its target gene FSCN1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Nov 30;33:99.

Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):335-9.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1130-4.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*. 2010;251(3):499-505.

Horner M, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, et al. SEER Cancer Statistics Review, Online. 1975-2006. 2009.

Hsu CM, Lin PM, Wang YM, Chen ZJ, Lin SF, Yang MY. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2012 Dec;33(6):1933-42.

Hu L, Ibrahim S, Liu C, Skaar J, Pagano M, Karparkin S. Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR-222. *Cancer Res*. 2009;69, 3374–81.

Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1129-39.

Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010 Jul 1;127(1):118-26.

Huang Z, Huang S, Wang Q, Liang L, Ni S, Wang L, et al. MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2582-9.

Hung PS, Liu CJ, Chou CS, Kao SY, Yang CC, Chang KW, Chiu TH, Lin SC. miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PLoS One*. 2013 Nov 26;8(11):e79926.

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694.

Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: The field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res*. 2009;69:7495–98.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341–54.

Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, Ro JY, et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*. 1998 Nov 5;17(18):2313-22.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134.

Joo YH, Jung CK, Kim MS, Sun DI. Relationship between vascular endothelial growth factor and Notch1 expression and lymphatic metastasis in tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Apr;140(4):512-8.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1577-81.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786.

Kalyankrishna S, Grandis J. R. Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2006 jun;24(17):2666-72.

Kan T, Sato F, Ito T, Matsumura N, David S, Cheng Y, et al. The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1689-700.

Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, et al. miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). *Br J Cancer*. 2010 Sep 7;103(6):877-84.

Kim V N. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):156-9.

Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, Reid G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24145.

Kirschner MB, Edelman JJ, Kao SC, Vallely MP, van Zandwijk N, et al. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet*. 2013 May 24;4:94.

Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT et al. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 1;15(11):3740-50.

Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105(1):104-11.

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285:17442–52.

Kosugi S, Nishimaki T, Kanda T, Nakagawa S, Ohashi M, Hatakeyama K. Clinical significance of serum carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9, and squamous cell carcinoma antigen levels in esophageal cancer patients. *World J Surg*. 2004 Jul;28(7):680-5.

Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*. 2008 Apr 1;68(7):2094-105.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010 Apr;50(4):298-301. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032. Epub 2010 Feb 8. Erratum in: *Methods*. 2010 Nov;52(3):268.

Kuriakose MA, Trivedi NP. Sentinel node biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Apr;17(2):100-10.

Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1434-40.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.

Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E, Rossing M, et al. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):830-40.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(5):672-5.

Lee YC, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlman H, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:3353–61.

Lee Y, Yang X, Huang Y, Fan H, Zhang Q, Wu Y. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis. *PLoS Comput Biol*. 2010 Apr 1;6(4):e1000730.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.

Lester SE, Wight RG. 'When will I see you again?' Using local recurrence data to develop a regimen for routine surveillance in post-treatment head and neck cancer patients. *Clin Otolaryngol*. 2009 Dec;34(6):546-51.

Lim YC, Koo BS, Lee JS, Lim JY, Choi EC. Distributions of cervical lymph node metastases in oropharyngeal carcinoma: therapeutic implications for the N0 neck. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1148-1152.

Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS, Chang KW. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol*. 2010 Mar;46(3):204-8.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:802–8.

Lipschitz DL, Kuhn R, Kinney AY, Donaldson GW, Nakamura Y. Reduction in salivary α -amylase levels following a mind-body intervention in cancer survivors--an exploratory study. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Sep;38(9):1521-31.

Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis*. 2010 May;16(4):360-4.

Liu CJ, Tsai MM, Tu HF, Lui MT, Cheng HW, Lin SC. miR-196a Overexpression and miR-196a2 Gene Polymorphism Are Prognostic Predictors of Oral Carcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2012 Nov 9. [Epub ahead of print]

Liu CJ, Shen WG, Peng SY, Cheng HW, Kao SY, Lin SC, Chang KW. miR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene. *Int J Cancer*. 2013 Jul 3. doi: 10.1002/ijc.28358. [Epub ahead of print]

Liu X, Jiang L, Wang A, Yu J, Shi F, Zhou X. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2009; 286, 217–222.

Liu X, Chen Q, Yan J, Wang Y, Zhu C, Chen C, et al. MiRNA-296-3p-ICAM-1 axis promotes metastasis of prostate cancer by possible enhancing survival of natural killer cell-resistant circulating tumour cells. *Cell Death Dis*. 2013 Nov 21;4:e928.

Lo WY, Wang HJ, Chiu CW, Chen SF. miR-27b-regulated TCTP as a novel plasma biomarker for oral cancer: from quantitative proteomics to post-transcriptional study. *J Proteomics*. 2012 Dec 21;77:154-66.

Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankov A, Hilbe W, Schwentner I, Sprinzl GM, et al. Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2006;42:109–111.

Long XB, Sun GB, Hu S, Liang GT, Wang N, Zhang XH, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1189-95.

Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck*. 2006 Mar;28(3):256-69. Review.

Luo Q, Wei C, Li X, Li J, Chen L, Huang Y, Song H, Li D, Fang L. MicroRNA-195-5p is a potential diagnostic and therapeutic target for breast cancer. *Oncol Rep*. 2014 Mar;31(3):1096-102.

Lv X, Xiang YQ, Cao SM, Qian CN, Li NW, Guo L, et al. Prospective validation of the prognostic value of elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with nasopharyngeal carcinoma: more distant metastases and shorter overall survival after treatment. *Head Neck*. 2011 Jun;33(6):780-5.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):781-9.

Maclellan SA, Lawson J, Baik J, Guillaud M, Poh CF, Garnis C. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med*. 2012 Oct;1(2):268-74. doi: 10.1002/cam4.17. Epub 2012 Jul 19.

McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011 Jun;57(6):833-40.

Melbø-Jørgensen C, Ness N, Andersen S, Valkov A, Dønnem T, Al-Saad S, et al. Stromal expression of MiR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS One*. 2014 Nov 17;9(11):e113039.

Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*. 2008 Oct;81(4):304-10.

Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29897-903.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.

Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci*. 2008 Feb;99(2):280-6.

Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M. Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann of Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104(9 Pt 1):678-84.

Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ*. 2013 Dec;20(12):1603-14.

Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H, et al. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1733-40.

Morris LG, Taylor BS, Bivona TG, Gong Y, Eng S, Brennan CW, et al. Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 22;108(47):19024-9.

Motokura T, Arnold A. Cyclin D and Oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Feb;3(1):5-10.

Mroczo B, Kozłowski M, Groblewska M, Łukaszewicz M, Nikliński J, Jelski W, et al. The diagnostic value of the measurement of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), squamous cell cancer antigen (SCC) and carcinoembryonic antigen (CEA) in the sera of esophageal cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2008 Mar;389(1-2):61-6.
Nana-Sinkam SP, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: opportunities for the development of microRNA-based drugs. *IDrugs*. 2010 Dec;13(12):843-6. Review.

Nassirpour R, Mehta PP, Yin MJ. miR-122 regulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting AKT3. *PLoS One*. 2013 Nov 7;8(11):e79655.

Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol Med*. 2004;37:768–84.

Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, Pumiglia K, Bennett JA, Melendez JA. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: Evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res*. 2003;9:424–32.

Nemunaitis J, Clayman G, Agarwala SS, Hrushesky W, Wells JR, Moore C, et al. Biomarkers Predict p53 Gene Therapy Efficacy in Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 15;15(24):7719-25.

Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375-81.

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb;10(2):111-22. Review.

Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res*. 2008 Mar-Apr;28(2B):1355-9.

Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:49-70.

Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2005 May 1;90(2):81-8.

Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*. 2011;29:1488–94.

Patron JP, Fendler A, Bild M, Jung U, Müller H, Arntzen MØ, Piso C, Stephan C, Thiede B, Mollenkopf HJ, Jung K, Kaufmann SH, Schreiber J. MiR-133b targets antiapoptotic genes and enhances death receptor-induced apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35345.

Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:6328–33.

Peng W, Chen ZY, Wang L, Wang Z, Li J. MicroRNA-199a-3p is downregulated in gastric carcinomas and modulates cell proliferation. *Genet Mol Res*. 2013 Aug 20;12(3):3038-47.

Pereira KM, Soares RC, Oliveira MC, Pinto LP, Costa Ade L. Immunohistochemical staining of Langerhans cells in HPV-positive and HPV-negative cases of oral squamous cells carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 2011 Aug;19(4):378-83.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000 Mar 18;355(9208):949-55.

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357(25):2552-61.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):226-30.

Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012 Mar;5(3):492-7.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.

Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2001 Feb;23(2):147-59. Review.

Rentoft M, Fahlén J, Coates PJ, Laurell G, Sjöström B, Rydén P, et al. miRNA analysis of formalin-fixed squamous cell carcinomas of the tongue is affected by age of the samples. *Int J Oncol.* 2011 Jan;38(1):61-9.

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):55-9.

Riedel F, Götte K, Goessler U, Sadick H, Hörmann K. Targeting chemotherapy-induced VEGF up-regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines. *Anticancer Res.* 2004 Jul Aug;24(4):2179-83.

Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck*. 2006 Jul;28(7):639-48. Review.

Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010 Oct-Dec;23(4):1229-34.

Schaaïj-Visser TB, Brakenhoff RH, Jansen JW, O'Flaherty MC, Smeets SJ, Heck AJ, et al. Comparative proteome analysis to explore p53 pathway disruption in head and neck carcinogenesis. *J Proteomics*. 2009 Jul 21;72(5):803-14.

Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Kowalski LP. Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology*. 1999 Jul;10(4):412-8.

Schneider C, Setty M, Holmes AB, Maute RL, Leslie CS, Mussolin L, et al. MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 3;111(22):8185-90.

Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, El Dinali M, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):3021-31.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.

Severino P, Brüggemann H, Andreghetto FM, Camps C, Klingbeil Mde F, de Pereira WO, et al. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. *BMC Cancer*. 2013 Nov 9;13:533.

Severino P, Oliveira LS, Andreghetto FM, Torres N, Curioni O, Cury PM, et al. Small RNAs in metastatic and non-metastatic oral squamous cell carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2015 Jun 24;8:31.

Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(13):1469-77.

Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. MicroRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). *Cancers*. 2010; 2(2):653-669.

Shin DM, Mao L, Papadimitrakopoulou VM, Clayman G, El-Naggar A, Shin HJ, Lee JJ, et al. Biochemopreventive therapy for patients with premalignant lesions of the head and neck and p53 gene expression. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Jan 5;92(1):69-73.

Silakit R, Loilome W, Yongvanit P, Chusorn P, Techasen A, Boonmars T, et al. Circulating miR-192 in liver fluke-associated cholangiocarcinoma patients: a prospective prognostic indicator. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014 Dec;21(12):864-72.

Skalsky RL, Cullen BR. Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One*. 2011;6(9):e24248.

Smith AL, Iwanaga R, Drasin DJ, Micalizzi DS, Vartuli RL, Tan AC, et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- β signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene*. 2012 Dec 13;31(50):5162-71.

Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, et al. Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. *Dig Dis Sci*. 2012 Apr;57(4):897-904.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 May;95(5):594-600.

Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis*. 2014 Jan 23;5:e1018.

Summerer I, Niyazi M, Unger K, Pitea A, Zangen V, Hess J, et al. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol*. 2013 Dec 28;8:296.

Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P, et al. Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2015 Jun 30;113(1):76-82.

Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):986-90.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1157-60.

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:2164–70.

Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol Oncol*. 2013 Sep;130(3):588-94.

Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2005 Dec;86(6):347-63. Review.

Tse GM, Chan AW, Yu KH, King AD, Wong KT, Chen GG, et al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007 Dec;14(12):3558-65.

Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*. 2010;102(7):1174-9.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11;359(11):1116-27.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10.

Volavsek M, Bracko M, Gale N. Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol*. 2003 Apr;117(4):286-93.

Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J*. 2009 Nov 28;207(10):471-5.

Wang C, Hu J, Lu M, Gu H, Zhou X, Chen X, et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 2015 Jan 5;5:7610.

Wang PR, Xu M, Toffanin S, Li Y, Llovet JM, Russell DW. Induction of hepatocellular carcinoma by in vivo gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 10;109(28):11264-9.

Wei J, Gao W, Zhu CJ, Liu YQ, Mei Z, Cheng T, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):407-14.

White NM, Fatoohi E, Metias M, Jung K, Stephan C, Yousef GM. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Feb;8(2):75-84. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.173.

Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(11):e27840.

Wong CH, Song C, Heng KS, Kee IH, Tien SL, Kumarasinghe P, et al. Plasma free hemoglobin: a novel diagnostic test for assessment of the depth of burn injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Apr;117(4):1206-13.

Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):257-69.

Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2588-92.

Wu D, Huang HJ, He CN, Wang KY. MicroRNA-199a-3p regulates endometrial cancer cell proliferation by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR). *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Sep;23(7):1191-7.

Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci.* 2011;102(3):522-9.

Yang CC, Hung PS, Wang PW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, Lin SC. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(5):397-404.

Yang CH, Yue J, Pfeffer SR, Fan M, Paulus E, Hosni-Ahmed A, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3). *J Biol Chem.* 2014 Sep 5;289(36):25079-87.

Yang F, Yin Y, Wang F, Wang Y, Zhang L, Tang Y, Sun S. MiR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway. *Hepatology* 2010; 51:1614–23.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008 Jun;14;(6):818-29. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009. Review.

Yang JQ, Zhao W, Duan H, Robbins ME, Buettner GR, Oberley LW, et al. v-Ha-RaS oncogene upregulates the 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) gene by increasing cellular superoxide production and activating NF-kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;31:520–29.

Yang Y, Li YX, Yang X, Jiang L, Zhou ZJ, Zhu YQ. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer.* 2013 Mar 19;13:129. doi: 10.1186/1471-2407-13-129.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004;304(5670):594-6.

Yu Y, Nangia-Makker P, Farhana L, G Rajendra S, Levi E, Majumdar AP. miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Mol Cancer.* 2015 May 1;14:98.

Xiao W, Bao ZX, Zhang CY, Zhang XY, Shi LJ, Zhou ZT, et al. Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS One.* 2012;7(6):e38648.

Xu B, Niu X, Zhang X, Tao J, Wu D, Wang Z, Li P, Zhang W, Wu H, Feng N, Wang Z, Hua L, Wang X. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Mol Cell Biochem*. 2011 Apr;350(1-2):207-13.

Xu YJ, Fan Y. MiR-215/192 participates in gastric cancer progression. *Clin Transl Oncol*. 2015 Jan;17(1):34-40.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.

Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem*. 2010 Dec;56(12):1871-9.

Zhang J, Qin X, Sun Q, Guo H, Wu X, Xie F, Xu Q, Yan M, Liu J, Han Z, Chen W. Transcriptional control of PAX4-regulated miR-144/451 modulates metastasis by suppressing ADAMs expression. *Oncogene*. 2015 Jun;34(25):3283-95.

Zhang T, Zhao D, Wang Q, Yu X, Cui Y, Guo L, et al. MicroRNA-1322 regulates ECRG2 allele specifically and acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*. 2012 Aug;52(8):581-90.

Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Hsu TC, Schantz SP. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Oct;9(10):1043-9.

Zhang ZQ, Meng H, Wang N, Liang LN, Liu LN, Lu SM, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2014 Jul 2;9:135.

Zhao Y, Miao G, Li Y, Isaji T, Gu J, Li J, Qi R. MicroRNA- 130b suppresses migration and invasion of colorectal cancer cells through downregulation of integrin β 1 [corrected]. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87938.

Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu LQ, Perry MC, Freter CE, Wang MX. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(6):575-86.

Zhou H, Wang H, Zhou D, Wang H, Wang Q, Zou S, Tu Q, Wu M, Hu H. Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2010 Apr;46(6):1056-61.

Zhou W, Shi G, Zhang Q, Wu Q, Li B, Zhang Z. MicroRNA-20b promotes cell growth of breast cancer cells partly via targeting phosphatase and tensin homologue (PTEN). *Cell Biosci*. 2014 Oct 14;4(1):62.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua contribuição como marcador de metástases em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço

Pesquisador: Patricia Severino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22983313.3.3001.0075

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 604.617-0

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

MiRNAs são pequenos RNAs não codificantes que atuam principalmente como reguladores gênicos. A desregulação dos miRNAs é estudada em processos de iniciação e progressão tumoral, onde esses pequenos RNAs desempenham papel oncogênico e de supressão tumoral, bem como como marcadores de prognóstico e ferramentas para o diagnóstico em câncer. Apesar de promissores, são poucos os estudos sobre a identificação de miRNAs circulantes em pacientes com câncer e ainda mais raros aqueles sobre miRNAs em plasma ou soro de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP). Este projeto tem como objetivo avaliar a expressão de miRNAs presentes em plasma de pacientes com CECP visando a identificação de possíveis marcadores moleculares de prognóstico e diagnóstico. Este tipo de abordagem constitui uma metodologia não invasiva e com grande potencial de aplicação em clínica. Padronizaremos metodologias de análise de miRNAs em plasma e soro. Com as padronizações bem estabelecidas, selecionaremos as amostras de pacientes com CECP que possuam as características clínicas e

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 604.617-0

patológicas necessárias para inclusão neste projeto. Em seguida, compararemos a expressão de miRNAs entre amostras de plasma ou soro de pacientes com CECP, de diferentes estádios, com e sem comprometimento linfonodal no momento da cirurgia. E por fim, validaremos os resultados de miRNAs circulantes, diferencialmente expressos, em amostras adicionais de plasma de pacientes com CECP que possuam características clínicas e patológicas semelhantes a aquelas do grupo inicial

O projeto é um subprojeto de um projeto FAPESP e foi apresentado de forma apropriada.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário do projeto é a identificação de miRNAs em plasma de pacientes com CECP e avaliar seu potencial como marcadores de prognóstico, em particular como marcador da presença de metástases. O Objetivo Secundário é padronizar a metodologia de extração e detecção de miRNAs presentes em plasma e soro de indivíduos saudáveis;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados de forma clara e completa.

Os riscos são mínimos para os pacientes e para os voluntários saudáveis. Estes riscos estão relacionados a coleta de sangue o qual o participante pode apresentar algum desconforto e apresentar hematoma e inchaço temporário.

O benefício maior está relacionado a contribuição científica, caso marcadores moleculares úteis sejam descobertos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresentado a FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Está completa. Foram apresentados:

Projeto

Folha de rosto

TCLE

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SÃO PAULO

CEP: 05.508-900

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 604.617-0

semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 12 de Abril de 2014

Assinador por:

Maria Gabriela Hays Biazevic
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 604617 gerado na data 18/12/2013 18:35:58, onde o número CAAE foi alterado de 22983313.3.0000.0071 para 22983313.3.3001.0075.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de microRNAs circulantes e avaliação de sua contribuição como marcador de metástases em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço

Pesquisador: Patricia Severino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22983313.3.0000.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 452.975

Data da Relatoria: 29/10/2013

Apresentação do Projeto:

Este projeto analisará os miRNAs, que são pequenos RNAs não codificantes que atuam principalmente como reguladores gênicos. A desregulação dos miRNAs é estudada em processos de iniciação e progressão tumoral, onde esses pequenos RNAs desempenham papel oncogênico e de supressão tumoral, bem como marcadores de prognóstico e ferramentas para o diagnóstico em câncer. Apesar de promissores, são poucos os estudos sobre a identificação de miRNAs circulantes em pacientes com câncer e ainda mais raros aqueles sobre miRNAs em plasma ou soro de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP). Este projeto tem como objetivo avaliar a expressão de miRNAs presentes em plasma de pacientes com CECP visando a identificação de possíveis marcadores moleculares de prognóstico e diagnóstico. Este tipo de abordagem constitui uma metodologia não invasiva e com grande potencial de aplicação em clínica. Padronizaremos metodologias de análise de miRNAs em plasma e soro. Com as padronizações bem estabelecidas, selecionaremos as amostras de pacientes com CECP que possuam as características clínicas e patológicas necessárias para inclusão neste projeto. Em seguida, compararemos a expressão de miRNAs entre amostras de plasma ou soro de pacientes com CECP, de diferentes estádios, com e sem comprometimento linfonodal no momento da cirurgia. E por fim, validaremos os resultados de miRNAs circulantes, diferencialmente expressos,

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP

Continuação do Parecer: 452.975

de Medicina de São José do Rio Preto. O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Processo no 25000.084206/2011-76, Parecer CONEP no 128/2012 registrado sob no 16491/CONEP, e o Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein é colaborador. Este projeto não foi submetido ao CEP Einstein na época da aprovação pela CONEP porque havia sido acordado que apenas os centros onde seriam realizadas coleta de amostras deveriam submeter o projeto para o seu CEP - inclusive conforme consta no parecer da CONEP apresentado em anexo. Porém, tendo em vista, as necessidades do nosso instituto e da pós-graduação onde o projeto de pesquisa se insere, foi solicitado ao CEP-Einstein seu parecer e/ou ciência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLE dos pacientes e voluntários estão de acordo com a resolução CNS 466/12

Os termos de apresentação obrigatórios estão adequados e claros. O Projeto conta com apoio financeiro da Fapesp.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado. Este projeto avaliará a identificação de possíveis marcadores moleculares de prognóstico e diagnóstico. Este tipo de abordagem constitui uma metodologia não invasiva e com grande potencial de aplicação em clínica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

DOCUMENTAÇÃO APROVADA PELO CEP DO HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN EM REUNIÃO REALIZADA EM 29/10/2013.

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Documento 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CASOS

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas e sobre o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço. O estudo está sendo conduzido pelo [Nome do Local, Centro Colaborador]. Seu médico nos forneceu seu nome e nos concedeu autorização para convidá-lo a participar deste estudo. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue e de tecido (tumor). Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas (sangue e tumor), que serão coletadas e armazenadas para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a) estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue enquanto estiver no hospital. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual. Se disponível, nós solicitaremos ao Departamento de Patologia do hospital uma pequena amostra do seu tumor.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Um dos testes a serem feitos nesse material é realizado em uma Instituição na Alemanha. No Brasil, não existem laboratórios que realizam esse teste. Por esse motivo, uma pequena quantidade de seu sangue será enviada à Alemanha para análise. Suas amostras serão armazenadas por 5 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas do presente estudo e, caso haja necessidade de prolongar esse tempo, você será chamado para confirmar ou não essa alteração. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação e para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico, mas esses resultados estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, o(a) Sr.(a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que você apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais

Julho, 2011

Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Doutor Paulo Prata
CEP 14 784-400, Barretos
Telefone (17) 3321 6600

2. Hospital Heliópolis, São Paulo
Coordenador: Marcos Brasilino de Carvalho
Hospital Heliópolis, São Paulo
Rua Cônego Xavier, 276 1o. andar, Sacomã
CEP 04231-030- São Paulo, SP
Telefone: (11) 5573 9998

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis:
Rua Cônego Xavier, 276, Sacomã
CEP 04231-030- São Paulo, SP
Telefone: (11) 2274 7600

3. Faculdade de Medicina, USP, São Paulo
Coordenador: Pedro Michaluart Jr
Faculdade de Medicina, USP, São Paulo
Av. Dr. Amaldo, 455, Cerqueira César
CEP: 01246903 - São Paulo, SP
Telefone: (11) 3069 6425

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo:
Av. Dr. Amaldo, 455, Cerqueira César
CEP: 01246903 - São Paulo, SP
Telefone: (11) 3061-8004

4. Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho
Coordenador: José Francisco de Góis Filho
Pesquisadores: José Francisco de Góis Filho, Érica Erina Fukuyama
Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho
Rua Dr. Cesário Motta Jr., 112, Vila Buarque
CEP 01221-020 , São Paulo, SP
Telefone: (11) 3350-7088

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho:
Rua Dr. Cesário Motta Jr., 112, Vila Buarque
CEP 01221-020 , São Paulo, SP
Telefone: (55) (11) 3350-7088

5. Faculdade de Medicina do ABC
Coordenador: Jossi Ledo Kanda
Faculdade de Medicina do ABC
Rua Silva Jardim 470
Sta Teresinha
CEP 09715-090 - São Bernardo do Campo, SP
Telefone: (11) 4345 4011

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC:
Av. Lauro Gomes 2000
VI. Sacadura Cabral
CEP 09060-870 – Santo André, SP
Telefone: (11) 4993-5400

Julho, 2011

do hospital, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado "sim" e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado "não". Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM	NÃO	Parte do estudo
☐	☐	Entrevista
☐	☐	Coleta e teste do sangue
☐	☐	Coleta de amostras de tumor e testes relacionados
☐	☐	Acesso aos prontuários médicos

Assinatura do participante

Data

Assinatura da testemunha

Data

Nome

Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone... ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe no endereço abaixo. O Comitê de Ética em Pesquisa, que analisou este estudo para garantir e proteger os seus direitos, também poderá ajudá-lo a tirar suas dúvidas.

O Termo de Consentimento de cada Instituição terá APENAS o nome e o endereço do Coordenador afiliado à Instituição onde está sendo obtido o TCLE. Ressalta-se que apenas cinco centros serão responsáveis pela coleta de amostras e de Termos de Consentimento.

1. Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos
Coordenador: André Lopes Carvalho
 Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos
 Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Doutor Paulo Prata
 CEP 14 784-400, Barretos
 Telefone (17) 3321 6800

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Fundação Pio XII:

Julho, 2011

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS CONTROLES

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas e sobre o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço. O estudo está sendo conduzido pelo [Nome do Centro Colaborador Local]. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se o(a) Sr.(a) concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue. Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. O(A) Sr.(a) pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer a amostra de sangue que será coletada e armazenada para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a) estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue serão enviadas a um laboratório para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Um dos testes a serem feitos nesse material é realizado em uma Instituição na Alemanha. No Brasil, não existem laboratórios que realizem esse teste. Por esse motivo, uma pequena quantidade de seu sangue será enviada à Alemanha. Suas amostras serão armazenadas por 5 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas do presente estudo e, caso haja necessidade de prolongar esse tempo, você será comunicado. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação e para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, mas esses resultados estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta de sangue, o(a) Sr.(a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que o(a) Sr.(a) apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da

Julho, 2011

equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado "sim" e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado "não". Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM	NÃO	Parte do estudo
☐	☐	Entrevista
☐	☐	Coleta e testes em amostras de sangue
☐	☐	Acesso aos prontuários médicos

_____	_____	_____	_____
Assinatura do Participante	Data	Assinatura da testemunha	Data
_____		_____	
Nome do Participante		Nome da testemunha	

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone... ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe no endereço abaixo. O Comitê de Ética em Pesquisa, que analisou este estudo para garantir e proteger os seus direitos, também poderá ajudá-lo a tirar suas dúvidas.

O Termo de Consentimento de cada Instituição terá APENAS o nome e o endereço do Coordenador afiliado à Instituição onde está sendo obtido o TCLE. Ressalta-se que apenas cinco centros serão responsáveis pela coleta de amostras e de Termos de Consentimento.

1. Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos

Coordenador: André Lopes Carvalho

Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos

Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Doutor Paulo Prata

CEP 14 784-400, Barretos

Telefone (17) 3321 6600

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Fundação Pio XII:

Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Doutor Paulo Prata

CEP 14 784-400, Barretos

Telefone (17) 3321 6600

2. Hospital Heliópolis, São Paulo

Coordenador: Marcos Brasilino de Carvalho

Hospital Heliópolis, São Paulo

Rua Cônego Xavier, 276 1o. andar, Sacomã

CEP 04231-030- São Paulo, SP

Telefone: (11) 5573 9998

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis:

Julho, 2011

Rua Cônego Xavier, 276, Sacomã
CEP 04231-030- São Paulo, SP
Telefone: (11) 2274 7600

3. Faculdade de Medicina, USP, São Paulo

Coordenador: Pedro Michaluart Jr
Faculdade de Medicina, USP, São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César
CEP: 01248903 - São Paulo, SP
Telefone: (11) 3069 6425

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, USP, São Paulo:

Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César
CEP: 01248903 - São Paulo, SP
Telefone: (11) 3061-8004

4. Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho

Coordenador: José Francisco de Góis Filho
Pesquisadores: José Francisco de Góis Filho, Érica Erina Fukuyama
Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho
Rua Dr. Cesário Motta Jr., 112, Vila Buarque
CEP 01221-020 , São Paulo, SP
Telefone: (11) 3350-7088

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho:

Rua Dr. Cesário Motta Jr., 112, Vila Buarque
CEP 01221-020 , São Paulo, SP
Telefone: (55) (11) 3350-7088

5. Faculdade de Medicina do ABC

Coordenador: Jossi Ledo Kanda
Faculdade de Medicina do ABC
Rua Silva Jardim 470
Sta Teresinha
CEP 09715-090 - Sao Bernardo do Campo, SP
Telefone: (11) 4345 4011

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC:

Av. Lauro Gomes 2000
VI. Sacadura Cabral
CEP 09060-870 – Santo André, SP
Telefone: (11) 4993-5400

ANEXO C – Artigo científico publicado durante o projeto

Severino et al. *BMC Medical Genomics* (2015) 8:31
DOI 10.1186/s12920-015-0102-4

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Small RNAs in metastatic and non-metastatic oral squamous cell carcinoma

Patricia Severino^{1*}, Liliane Santana Oliveira¹, Flávia Maziero Andreghetto¹, Natalia Torres¹, Otávio Curioni², Patricia Maluf Cury³, Tatiana Natasha Toporcov⁴, Alexandre Rossi Paschoal⁵ and Alan Mitchell Durham⁶

Abstract

Background: Small non-coding regulatory RNAs control cellular functions at the transcriptional and post-transcriptional levels. Oral squamous cell carcinoma is among the leading cancers in the world and the presence of cervical lymph node metastases is currently its strongest prognostic factor. In this work we aimed at finding small RNAs expressed in oral squamous cell carcinoma that could be associated with the presence of lymph node metastasis.

Methods: Small RNA libraries from metastatic and non-metastatic oral squamous cell carcinomas were sequenced for the identification and quantification of known small RNAs. Selected markers were validated in plasma samples. Additionally, we used *in silico* analysis to investigate possible new molecules, not previously described, involved in the metastatic process.

Results: Global expression patterns were not associated with cervical metastases. MiR-21, miR-203 and miR-205 were highly expressed throughout samples, in agreement with their role in epithelial cell biology, but disagreeing with studies correlating these molecules with cancer invasion. Eighteen microRNAs, but no other small RNA class, varied consistently between metastatic and non-metastatic samples. Nine of these microRNAs had been previously detected in human plasma, eight of which presented consistent results between tissue and plasma samples. MiR-31 and miR-130b, known to inhibit several steps in the metastatic process, were over-expressed in non-metastatic samples and the expression of miR-130b was confirmed in plasma of patients showing no metastasis. MiR-181 and miR-296 were detected in metastatic tumors and the expression of miR-296 was confirmed in plasma of patients presenting metastasis. A novel microRNA-like molecule was also associated with non-metastatic samples, potentially targeting cell-signaling mechanisms.

Conclusions: We corroborate literature data on the role of small RNAs in cancer metastasis and suggest the detection of microRNAs as a tool that may assist in the evaluation of oral squamous cell carcinoma metastatic potential.

RESEARCH PAPER

MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer

Adriana Sondermann^{1,2} · Flavia Maziero Andreghetto¹ ·
Ana Carolina Bernardini Moullet¹ · Elivane da Silva Victor¹ ·
Marília Germanos de Castro³ · Fábio Dumas Nunes⁴ ·
Lenine Garcia Brandão² · Patrícia Severino¹

Received: 7 December 2014 / Accepted: 18 May 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Despite low mortality rates, nodal recurrence in papillary thyroid carcinoma occurs in up to 20 % of patients. Emerging evidences indicate that dysregulated microRNAs are implicated in the process of metastasis. In the present study, we investigated whether miR-9, miR-10b, miR-21 and miR-146b levels are predictive of papillary thyroid carcinoma recurrence. Using macro-dissection followed by quantitative real-time PCR, we measured miR-9, miR-10b, miR-21 and miR-146b expression levels in formalin-fixed, paraffin-embedded samples of 66 patients with papillary thyroid carcinoma categorized into two groups: the recurrent group (n = 19) and the non-recurrent group (n = 47). All patients underwent total thyroidectomy and were followed for at least 120 months after surgery to be considered recurrence-free. Univariate and multivariate analysis were performed using the Cox proportional hazard model in order to identify associations between multiple clinical variables and microRNA expression levels and papillary thyroid carcinoma recurrence. MiR-9 and miR-21 expression levels were found to be significant prognostic factors

for recurrence in patients with papillary thyroid carcinoma (HR = 1.48; 95 % CI 1.24–1.77, $p < 0.001$; and HR = 1.52; 95 % CI 1.18–1.94, $p = 0.001$; respectively). Multivariate analysis involving the expression level of miR-9 and miR-21 and various clinical parameters identified the expression of these microRNAs as independent prognostic factors for papillary thyroid cancer patients. In conclusion, our results support the potential clinical value of miR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid carcinoma.

Keywords microRNA · Papillary thyroid cancer · Recurrence · Metastasis

Abbreviations

PTC	Papillary thyroid carcinoma
miR	microRNA
PCR	Polymerase chain reaction
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
UICC	Union for International Cancer Control
TNM	Tumor, nodes, metastasis
ATA	American Thyroid Association
MSKCC–NY	Memorial Sloan Kettering Cancer Center–New York
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
HR	Hazard ratio
CI	Confidence interval
cm	Centimeter
EGFR	Epidermal growth factor receptor
MMP16	Matrix metalloproteinase 16
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
STMN1	Stathmin 1

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10585-015-9724-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Patrícia Severino
patricia.severino@einstein.br

¹ Albert Einstein Research and Education Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein, 627, São Paulo, SP 05652-000, Brazil

² Department of Head and Neck Surgery, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Pathology, Hospital Sírio Libanês, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

RESEARCH ARTICLE

Open Access

MicroRNA expression profile in head and neck cancer: *HOX*-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation

Patricia Severino^{1*}, Holger Brüggemann², Flavia Maziero Andreghetto¹, Carme Camps³, Maria de Fatima Garrido Klingbeil⁴, Welbert Oliveira de Pereira¹, Renata Machado Soares¹, Raquel Moyses⁵, Victor Wünsch-Filho⁶, Monica Beatriz Mathor⁴, Fabio Daumas Nunes⁷, Jiannis Ragoussis² and Eloiza Helena Tajara⁸

Abstract

Background: Current evidence implicates aberrant microRNA expression patterns in human malignancies; measurement of microRNA expression may have diagnostic and prognostic applications. Roles for microRNAs in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are largely unknown. HNSCC, a smoking-related cancer, is one of the most common malignancies worldwide but reliable diagnostic and prognostic markers have not been discovered so far. Some studies have evaluated the potential use of microRNA as biomarkers with clinical application in HNSCC.

Methods: MicroRNA expression profile of oral squamous cell carcinoma samples was determined by means of DNA microarrays. We also performed gain-of-function assays for two differentially expressed microRNA using two squamous cell carcinoma cell lines and normal oral keratinocytes. The effect of the over-expression of these molecules was evaluated by means of global gene expression profiling and cell proliferation assessment.

Results: Altered microRNA expression was detected for a total of 72 microRNAs. Among these we found well studied molecules, such as the miR-17-92 cluster, comprising potent oncogenic microRNA, and miR-34, recently found to interact with p53. *HOX*-cluster embedded miR-196a/b and miR-10b were up- and down-regulated, respectively, in tumor samples. Since validated *HOX* gene targets for these microRNAs are not consistently deregulated in HNSCC, we performed gain-of-function experiments, in an attempt to outline their possible role. Our results suggest that both molecules interfere in cell proliferation through distinct processes, possibly targeting a small set of genes involved in cell cycle progression.

Conclusions: Functional data on miRNAs in HNSCC is still scarce. Our data corroborate current literature and brings new insights into the role of microRNAs in HNSCC. We also show that miR-196a and miR-10b, not previously associated with HNSCC, may play an oncogenic role in this disease through the deregulation of cell proliferation. The study of microRNA alterations in HNSCC is an essential step to the mechanistic understanding of tumor formation and could lead to the discovery of clinically relevant biomarkers.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

High-throughput sequencing of small RNA transcriptomes reveals critical biological features targeted by microRNAs in cell models used for squamous cell cancer research

Patricia Severino^{1*}, Liliane Santana Oliveira^{1,2}, Natalia Torres³, Flavia Maziero Andreghetto¹, Maria de Fatima Guarizo Klingbeil³, Raquel Moyses⁴, Victor Wunsch-Filho⁵, Fabio Daumas Nunes⁶, Monica Beatriz Mathor³, Alexandre Rossi Paschoal^{2,7} and Alan Mitchell Durham²

Abstract

Background: The implication of post-transcriptional regulation by microRNAs in molecular mechanisms underlying cancer disease is well documented. However, their interference at the cellular level is not fully explored. Functional *in vitro* studies are fundamental for the comprehension of their role; nevertheless results are highly dependable on the adopted cellular model. Next generation small RNA transcriptomic sequencing data of a tumor cell line and keratinocytes derived from primary culture was generated in order to characterize the microRNA content of these systems, thus helping in their understanding. Both constitute cell models for functional studies of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), a smoking-related cancer. Known microRNAs were quantified and analyzed in the context of gene regulation. New microRNAs were investigated using similarity and structural search, *ab initio* classification, and prediction of the location of mature microRNAs within would-be precursor sequences. Results were compared with small RNA transcriptomic sequences from HNSCC samples in order to access the applicability of these cell models for cancer phenotype comprehension and for novel molecule discovery.

Results: Ten miRNAs represented over 70% of the mature molecules present in each of the cell types. The most expressed molecules were miR-21, miR-24 and miR-205. Accordingly, miR-21 and miR-205 have been previously shown to play a role in epithelial cell biology. Although miR-21 has been implicated in cancer development, and evaluated as a biomarker in HNSCC progression, no significant expression differences were seen between cell types. We demonstrate that differentially expressed mature miRNAs target cell differentiation and apoptosis related biological processes, indicating that they might represent, with acceptable accuracy, the genetic context from which they derive. Most miRNAs identified in the cancer cell line and in keratinocytes were present in tumor samples and cancer-free samples, respectively, with miR-21, miR-24 and miR-205 still among the most prevalent molecules at all instances. Thirteen miRNA-like structures, containing reads identified by the deep sequencing, were predicted from putative miRNA precursor sequences. Strong evidences suggest that one of them could be a new miRNA. This molecule was mostly expressed in the tumor cell line and HNSCC samples indicating a possible biological function in cancer.

(Continued on next page)