**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

AGNES ASSAO

**Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente
malignas e no câncer de lábio**

**BAURU
2019**

AGNES ASSAO

**Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente
malignas e no câncer de lábio**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências, no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de
Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Versão corrigida

**BAURU
2019**

Assao, Agnes

Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente malignas e no câncer de lábio./ Agnes Assao. – Bauru, 2019.

110 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Agnes Assao

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 63879016.5.0000.5417
Data: 08/02/2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Kazuyoshí e Marisa, pois o ensino sempre será a maior dádiva e o maior legado que eles deixam para nós, seus filhos.

AGRADECIMENTOS

*À Professora **Denise Tostes Oliveira**, meu maior exemplo de pessoa, professora e pesquisadora. As palavras não são suficientes para agradecer-lhe. Obrigada por participar comigo desta história e ser a principal incentivadora para que todos os capítulos fossem intensamente vividos. Agradeço por toda sua paciência, ensinamento compartilhado e confiança depositada. À sua amizade e ao apoio prestado nas horas mais difíceis. É uma grande honra ser sua orientada. Obrigada de coração!*

*Aos meus pais, **Kazuyoshí e Marisa**, por acreditarem nos meus sonhos e apoiarem as minhas decisões. Por todo carinho e amor imensuráveis dispensados a todos seus filhos. Por toda educação que nos deram e, principalmente, por abdicarem de si mesmos por nós. Nossa eterna gratidão.*

*Ao meu amor, **José Guilherme**, meu porto-seguro. Suas palavras, gestos e carinho nos momentos mais difíceis foram essenciais para que eu pudesse seguir em frente e vencer as batalhas diárias. Ao seu lado, tudo ficou mais leve. Que nosso amor seja sempre alicerce e paz.*

*Ao meu irmão **Denís**, por todo apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu irmão, **Régis**, pela sua contribuição essencial durante minha formação. Nunca esquecerei toda sua ajuda e incentivo.*

*Aos meus queridos sobrinhos, **Juri** e **Jun**, que na linda pureza e inocência das crianças, frutificam o amor em nossos corações.*

*Às pequenas, **Maria Clara** e **Livia**, anjos que a vida trouxe para mim e que agradeço a Deus por colocá-las em meu caminho.*

*À minha querida amiga **Kellen Cristine Tjioe**. Por toda ajuda profissional e pessoal. Sem você, esta história não teria sido a mesma, não teria tido a mesma alegria. Gratidão por nossa amizade.*

*Ao meu querido amigo **Victor Faria Munhoz**. Aquele ombro amigo que sempre esteve pronto para atender-me.*

*Aos meus padrinhos, **Tieko** e **Pedro**, grandes exemplos de pessoa para mim. E às minhas primas, **Bruna** e **Andrea**, amigas e companheiras desde a infância.*

*Às minhas cunhadas, **Grazi**, **Samantha** e **Julliani**, por toda ajuda e incentivo.*

*Aos meus colegas de pós-graduação: **Silas**, **Talita**, **Natália**, **Diego**, **Alexandre**, **Nara**, **Karen**, **Pepe**, **Heliton** e **Marcela**. Obrigada pela ajuda e parceria.*

*Às amigas: **Caroline Nascimento**, **Caroline Rocha**, **Mariane**, **Samanta**, **Maria Fernanda**, **Elisa Fernandes**, **Bárbara** e **Poliana**, por todos os bons momentos que vivemos.*

*Aos Professores do Departamento de Patologia Bucal: **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira** e **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara**, por cada ensinamento compartilhado. Minha profunda gratidão.*

*Aos funcionários do Departamento de Patologia: **Viviane Parísi** e **Marina Corrêa**, por toda ajuda sempre prestada. Especialmente, agradeço à técnica do laboratório de Patologia, **Fátima Silveira**, pela ajuda na confecção das lâminas. Além do enorme carinho e paciência que teve comigo. Muito obrigada!*

*Aos professores colaboradores do A. C. Camargo Câncer Center: **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalsi** e **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**. Obrigada pela atenção e pela contribuição inestimável para realização deste trabalho.*

*Especialmente, à professora colaboradora do A. C. Camargo Cancer Center: **Profa. Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo**. Obrigada por receber-me tão bem em seu laboratório. Toda sua ajuda e contribuição foram imprescindíveis para a realização desta pesquisa.*

*À técnica do Centro Integrado de Pesquisas do A.C. Camargo Cancer Center: **Kátia Klug de Oliveira**. Muito obrigada por todo ensinamento, paciência e ajuda na realização da parte técnica deste trabalho.*

*Às professoras colaboradoras da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp: **Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domíngues** e **Profa. Dra. Eliana Maria Minicucci**, pela ajuda inestimável na obtenção da amostra deste trabalho.*

*Ao **Professor Dr. José Roberto Pereira Lauris**, por seus ensinamentos e pelo auxílio na análise estatística.*

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- Unesp, por confiarem e permitirem que eu desse os primeiros passos na docência.

Aos professores do Curso de Odontologia do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - Unifio, por acreditarem no meu trabalho.

Às alunas de iniciação científica: Yara Costa, Paula Yoshino e Maria Carolina Malta Medeiros. Agradeço pela troca de experiências e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo**, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

À **Comissão de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, na pessoa da Presidente, Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo.

Ao **A.C. Camargo Cancer Center**, na pessoa do seu presidente, Prof. Dr. José Ermírio de Moraes Neto e ao **Centro Integrado de Pesquisas do A.C. Camargo Cancer Center**, na pessoa da Superintendente de Pesquisas, Vilma Regina Martins.

À **Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu- Universidade Estadual Paulista**, na pessoa do diretor, **Prof. Dr. Pasqual Barretti**.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo suporte financeiro, sob a forma de bolsa de doutorado (870891/1999-5) e à **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro (código de financiamento 001).

Muito Obrigada!

*“É o tempo da travessia:
E, se não ousarmos fazê-la,
Teremos ficado, para sempre,
À margem de nós mesmos.”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Os miRNAs são pequenas moléculas não codificantes de RNA, cuja expressão desregulada vem sendo associada à progressão das lesões potencialmente malignas para o câncer de boca. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31, e miRNA-345 nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificando se estes miRNAs podem ajudar a identificar o risco de transformação maligna e a evolução para o câncer. Foram selecionados, a partir de material emblocado em parafina, 19 queilites actínicas sem displasia epitelial, 32 queilites actínicas com displasia epitelial, 42 carcinomas espinocelulares de lábio inferior e 10 amostras de mucosa bucal com padrão de normalidade, provenientes da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. A quantificação dos miRNAs nas amostras foi realizada por meio da reação de polimerase em cadeia, em tempo real (RT-PCR). A partir da diferença da expressão relativa de cada miRNA em relação ao epitélio labial normal, a expressão dos miRNAs foi classificada em aumentada, equivalente ou diminuída. A comparação quantitativa das expressões dos miRNAs analisados nas queilites actínicas com e sem displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram diferentes níveis de expressão dos miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31, e miRNA-345 no epitélio bucal das lesões investigadas. Houve uma expressão aumentada dos miRNA-181b, miRNA-31 e miRNA-345 na maioria das queilites actínicas sem displasia epitelial. Entretanto, nas queilites actínicas com displasia epitelial e nos CEC de lábio inferior, a expressão dos miRNA-181b, miRNA-31 e miRNA-345, foi equivalente àquela da mucosa bucal com padrão de normalidade. O aumento da expressão do miRNA-21 nos CEC de lábio inferior foi estatisticamente significativo ($p=0,022$) quando comparado às queilites actínicas com displasia epitelial. A partir desses resultados, conclui-se que os miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 são expressos no epitélio bucal da região de lábio e o aumento da expressão do miRNA-21 pode ajudar a identificar as queilites actínicas com displasia epitelial que apresentam um risco de evolução para o carcinoma espinocelular de lábio.

Palavras-chave: Queilite. Câncer labial. MicroRNAs.

ABSTRACT

MicroRNA expression in oral potentially malignant disorders and in lower lip cancer

Micro-RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, which expression has been associated with the progression of oral potentially malignant disorders to oral cancer. The aim of this study was to analyze the expression of miR-181b, miR-21, miR-31 and miR-345 in actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinomas, and to verify if these miRNAs can be helpful to determine the risk of malignant progression to oral cancer. The sample was selected from formalin-fixed paraffin embedded tissues of 19 actinic cheilitis without epithelial dysplasia, 32 actinic cheilitis with epithelial dysplasia, 42 lower lip squamous cell carcinomas and 10 normal oral mucosa, from the Bauru School of Dentistry (USP) and from the Botucatu School of Medicine (UNESP). Micro-RNA expression was quantified by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The differences between the relative miRNA expression in the sample and in the normal lip epithelium were obtained and classified according to these values in up-regulated, equivalent or down-regulated. The expression of the selected miRNAs in actinic cheilitis, with and without epithelial dysplasia, and in lower lip squamous cell carcinomas was statistically compared by Kruskal-Wallis test and *p* values lower than 0.05 were considered statistically significant. The results showed that different levels of miR-181b, miR-21, miR-31, e miR-345 were detected in the oral epithelium of actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinomas. The miR-181b, miR-31 and miR-345 were upregulated in most of the actinic cheilitis without epithelial dysplasia. However, the expression of miR-181b, miR-31 and miR-345 in actinic cheilitis with epithelial dysplasia and in lower lip cancer was equivalent to the normal oral mucosa. Additionally, the increased expression of miR-21 in lower lip squamous cell carcinomas was statistically significant ($p=0.022$) when compared to actinic cheilitis with epithelial dysplasia. Based on our results, we concluded that miR-181b, miR-21, miR-31 and miR-345 are expressed in oral epithelium of the lip region and that the up-regulation of miR-21 can be helpful to identify patients with actinic cheilitis presenting epithelial dysplasia and higher risk of progression to lip cancer.

Keywords: Cheilitis. Lip Cancer. miRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Biogênese dos miRNAs. Nesta figura pode-se observar a via regulatória envolvida na formação dos miRNAs e como essas moléculas regulam as funções dos genes. Pri-miRNA, miRNA primário transcrito; pré-miRNA, miRNA precursor, RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA.....	31
Figura 2 -	Em A, observa-se a lâmina em Hematoxilina e Eosina e a lâmina com corte de 3-4µm da amostra. Em B, após delimitação da área a ser analisada, realizou-se a contraposição das lâminas e demarcação da área a ser raspada. Em C, nota-se o processo de raspagem (<i>scrape</i>) da lâmina, com auxílio de um bisturi estéril. Em D, o material coletado foi armazenado em microtubos e mantido a -80°C.....	50
Figura 3 -	Espectrofotômetro, tipo NanoDrop, utilizado para quantificação de RNA.....	52
Figura 4 -	Termociclador Applied Biosystems, utilizado para síntese de cDNA.....	54
Figura 5 -	Aparelho e software SDS 2.3 utilizado para correr as placas de PCR e análise do perfil de amplificação da expressão dos miRNAs.....	56
Figura 6 -	Distribuição das amostras na placa para análise de PCR, incluindo o “pool” de amostras de tecido sem alterações e o NTC, sem tecido para análise, todas em duplicata e distribuídas em relação aos miRNAs selecionados e miRNA endógeno.....	57
Figura 7 -	Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica sem displasia epitelial. Em C e D, queilite actínica com displasia epitelial leve, com alterações da arquitetura epitelial restrita ao terço inferior (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x).....	67
Figura 8 -	Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica com displasia epitelial moderada, com alteração da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio, com hipercromatismo celular e pleomorfismo moderado. Em C e D, queilite actínica com displasia epitelial intensa, com alterações da arquitetura epitelial em mais de 2/3 de sua extensão, apresentando pleomorfismo celular, hipercromatismo e mitoses atípicas (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x).....	69

Figura 9 -	Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, nota-se o padrão de invasão em cordões e ilhotas tumorais em continuidade com a mucosa labial. No detalhe, em C e D, nota-se as células neoplásicas bizarras com intenso pleomorfismo, alteração da relação núcleo/citoplasma, hipercromatismo e presença de figuras de mitoses (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x)...	71
Figura 10 -	Análise da expressão relativa dos miRNAs 181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 nas amostras de queilites actínicas sem (QSD) e com displasia epitelial (QCD), e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC). As barras representam a porcentagem de pacientes que apresentaram diminuição da expressão, aumento da expressão e expressão equivalente à da mucosa bucal normal.....	76
Figura 11 -	Análise conjunta da expressão relativa dos miRNAs nas amostras de queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. As barras representam a distribuição do número de pacientes com diminuição da expressão, aumento da expressão e expressão equivalente à da mucosa bucal normal.....	77
Figura 12 -	Distribuição da expressão relativa de miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC).....	80
Figura 13 -	Distribuição da expressão relativa de miRNA-21 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC).....	81
Figura 14 -	Distribuição da expressão relativa de miRNA-31 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC).....	82
Figura 15 -	Distribuição da expressão relativa de miRNA-345 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes e volumes utilizados na reação de transcrição reversa para cada amostra.....	53
Tabela 2 -	Reagentes e volumes utilizados para amplificação de cDNA.....	55
Tabela 3 -	Ensaio TaqMan miRNA selecionados para estudo.....	55
Tabela 4 -	Distribuição dos 93 pacientes portadores de queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio inferior, segundo as características demográficas. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 2000 a 2017.....	63
Tabela 5 -	Distribuição das características microscópicas das 51 queilites actínicas, analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	64
Tabela 6 -	Características microscópicas utilizadas para graduação da displasia epitelial das 32 queilites actínicas com displasia epitelial, segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017.....	65
Tabela 7 -	Expressão relativa dos miRNAs 181b, miRNA-31, miRNA-31 e miRNA-345 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, em comparação com as amostras de mucosa bucal normal. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	75
Tabela 8 -	Distribuição da expressão relativa dos miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	80
Tabela 9 -	Distribuição da expressão relativa do miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345), nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	81

Tabela 10- Distribuição da expressão relativa do miRNA-31 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	82
Tabela 11- Distribuição da expressão relativa do miRNA-345 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
:	Proporção
°C	Graus Celsius
>	Menor
<	Maior
≥	Menor ou igual
≤	Maior ou igual
Bcl-2	Proteína de células B de linfoma 2
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEC	Carcinoma Espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGF 3	Fator de crescimento de fibroblastos 3
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HE	Hematoxilina e Eosina
LRIG1	Proteína leucina rica em imunoglobulina 1
MiRNA	micro-RNA
mL	Mililitro
μL	Micro litro
ng	Nanogramas

Nº	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de significância
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDCD4	Gene regulador da morte celular programada 4
PTEN	Proteína homóloga de fosfatase e tensina
QSD	Queilites actínicas sem displasia
QCD	Queilites actínicas com displasia
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RNA_m	RNA mensageiro
RNA (RISC)	Complexo de silenciamento induzido por RNA
rpm	Rotações por minuto
R_q	Quantificação relativa
RTqPCR	Reação quantitativa, em cadeia, da polimerase, com transcrição reversa, em tempo real.
SP	Estado de São Paulo
SPSS	Statistics Standard Edition Software (Pacote estatístico para Ciências Sociais)
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição
TNM	Sistema de Classificação Tumores Malignos (Tumor Node Metastasis)
UTR	Região não traduzida
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1	MICRORNAS.....	29
2.2	BIOGÊNESE DOS miRNAs.....	29
2.3	PARTICIPAÇÃO DOS miRNAs NO CÂNCER.....	32
2.4	PARTICIPAÇÃO DOS miRNAs NAS LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS.....	35
3	PROPOSIÇÃO.....	41
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	47
4.2	REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS.....	47
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	48
4.3.1	Graduação da displasia epitelial.....	48
4.4	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS.....	51
4.5	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR).....	52
4.6	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E QUANTIFICAÇÃO.....	54
4.7	ANÁLISE DOS DADOS.....	57
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4.9	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	58

5	RESULTADOS.....	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	61
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	62
5.2.1	Caracterização das queilites actínicas em Hematoxilina e Eosina.....	62
5.2.2	Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio em Hematoxilina e Eosina.....	71
5.3	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs.....	73
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAs.....	73
5.5	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO QUANTITATIVA DOS miRNAs NAS QUEILITES ACTÍNICAS E NOS CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA.....	78
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXOS.....	105

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo que ocorre em múltiplas etapas, na qual as alterações genéticas, incluindo aberrações cromossômicas, mutações no DNA, como amplificações e/ou deleções, resulta na ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor, induzindo alterações na função da proteína codificada por estes genes (TROIANO et al., 2018; WANG; HE; ZHOU, 2018).

Nas últimas décadas, alguns genes envolvidos nos diferentes tipos de câncer foram descritos e algumas evidências de que os microRNAs (miRNAs) podem bloquear a ação de diversos oncogenes e de genes supressores de tumor, incrementaram as pesquisas sobre a participação deles na oncogênese (BARTEL, 2009; COURTHOD et al., 2014; CHATTOPADHYAY et al., 2016; CAO et al., 2018). Os micro-RNAs são pequenos RNAs, não codificados, responsáveis pela regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, ou seja, controlam os níveis de RNA mensageiros (RNAm) que codificam a produção de proteínas dentro da célula (BARTEL, 2009; MIN et al., 2015; CAO et al., 2018). Os miRNAs podem clivar ou impedir que os RNAm sejam lidos e produzam as proteínas (MIN et al., 2015), exercendo assim um papel em diversos processos celulares, como na proliferação celular, no controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação, invasão, e em funções específicas dos tecidos, como na resposta imune, secreção de hormônios e angiogênese, processos esses implicados no desenvolvimento e evolução do câncer (RAMASSONE et al., 2018).

Recentes avanços na expressão dos miRNAs tem permitido conhecer sua participação na patogênese de diferentes tipos de câncer e em diferentes estágios da doença (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; CAO et al., 2018; WANG; HE; ZHOU, 2018). A identificação do padrão de expressão de microRNAs específicos para os cânceres de cabeça e pescoço, assim como para os carcinomas espinocelulares de boca, reforça sua utilização como possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico desses tumores (MACLELLAN et al., 2012; COURTHOD et al., 2014; ZHANG et al., 2017; TROIANO et al., 2018). Além disso, estes microRNAs apresentam boa estabilidade no sangue periférico, fluidos corporais e em intervenções pouco ou não invasivas, o que desperta o interesse clínico para sua utilização no diagnóstico precoce e como alvos para novas estratégias terapêuticas e de prevenção dos diferentes tipos de cânceres (LIU, C. J. et al., 2010; CAO et al., 2018; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018).

Especificamente em lesões potencialmente malignas bucais como as leucoplasias, as pesquisas vêm sugerindo que o padrão de expressão de alguns miRNAs, podem ser utilizados como biomarcadores indicativos do risco de transformação maligna (CERVIGNE et al., 2009; XIAO et al., 2012; YANG, Y. et al., 2013; BRITO, J. A. et al., 2014; MAIMAITI et al., 2015; ZHU et al., 2015; HUNG et al., 2016; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018). Atualmente, o critério utilizado para prever o risco de progressão das lesões potencialmente malignas, como as leucoplasias e as queilites actínicas, é baseado, principalmente, na presença ou ausência de displasia epitelial, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (GALE, 2005; REIBEL, 2017). No entanto, embora estes critérios para classificação das displasias epiteliais estejam bem definidos, existem muitas discordâncias inter e intra-examinadores, principalmente devido à subjetividade da graduação das displasias epiteliais, o que influencia diretamente na definição da conduta terapêutica e no prognóstico do paciente (SPEIGHT et al., 2015; REIBEL, 2017; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018; NAGATA et al., 2018).

Portanto, o uso de critérios somente histopatológicos tornou-se insuficiente para prever o risco de progressão das lesões potencialmente malignas, como as leucoplasias e queilites actínicas, para o carcinoma espinocelular de boca e lábio, respectivamente (PILATI et al., 2017; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018). Até o momento, ainda não existem marcadores biológicos que ajudem a distinguir os diferentes graus de displasia epitelial, como da displasia severa ou carcinoma *in situ*, e do carcinoma espinocelular em estágios iniciais (PILATI et al., 2017; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018). Dessa forma, o aumento da expressão de alguns miRNAs em leucoplasias bucais, como os miRNA-21, miRNA-181b e miRNA-345, sugere um maior risco de progressão destas lesões para o carcinoma espinocelular de boca e reforça a possibilidade de utilizá-los como biomarcadores na detecção precoce do câncer de boca (CERVIGNE et al., 2009; BRITO, J. A. et al., 2014).

O aumento da expressão de miRNA-31 também foi observado em cânceres de cabeça e pescoço (LIU, C. J. et al., 2010) e em leucoplasias bucais que evoluíram para carcinomas espinocelulares de boca (CHATTOPADHYAY et al., 2016; HUNG et al., 2016). A desregulação de miRNA-31 em conjunto com a presença de displasia epitelial foi considerado um fator de risco independente na progressão das lesões potencialmente malignas para o câncer de boca (CHATTOPADHYAY et al., 2016; HUNG et al., 2016).

As lesões com risco eminente de crescimento celular descontrolado e progressão para o carcinoma espinocelular de lábio, como as queilites actínicas, são de particular interesse em

países tropicais, como o Brasil, onde a exposição crônica à radiação solar ultravioleta causa alterações genótípicas e fenótípicas nas células epiteliais, predispondo ao câncer (VIEIRA et al., 2012; GARCIA et al., 2016; PILATI et al., 2017). Entretanto, a participação destes miRNAs na carcinogênese labial tem sido pouco explorada na literatura inglesa. Considerando-se que, além das mudanças morfológicas envolvidas nas queilites actínicas, também ocorrem alterações genéticas na sua progressão para o câncer de lábio, o presente estudo teve por objetivo investigar a participação de alguns micro-RNAs neste processo de desenvolvimento da carcinogênese na região de lábio inferior.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) representam uma classe de pequenos RNAs não codificantes, que possuem de 20 a 24 nucleotídeos, e que modulam diretamente a expressão gênica em níveis pós-transcricionais, ligando-se na região não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro alvo (RNAm). Como uma importante molécula regulatória, cada miRNA pode regular centenas de genes alvo e diferentes miRNAs podem regular coordenadamente o mesmo RNAm (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; WANG; HE; ZHOU, 2018). Através dessa regulação, os miRNAs desempenham um papel em diversos processos celulares, como a proliferação celular, controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular, invasão e funções específicas dos tecidos, como as respostas imunes, secreção de hormônios e angiogênese. Portanto, os miRNAs vem sendo associados com o desenvolvimento e as diferentes fases da evolução do câncer (SUN et al., 2014; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; RAMASSONE et al., 2018; TROIANO et al., 2018; WANG; HE; ZHOU, 2018).

2.2 BIOGÊNESE DOS miRNAs

Em humanos, a biogênese dos miRNAs inicia-se com a transcrição para um miRNA primário (pri-miRNA), pela enzima RNA polimerase II. Após a transcrição, por meio da ligação do miRNA primário ao complexo de proteínas formado por Drosha e DGCR8, da família RNase III, ocorre a clivagem das bandas 3' e 5', dando origem ao pré-miRNA no núcleo. Em seguida, com a ajuda das proteínas transportadoras, como o complexo exportin 5-RAN-GTP, os pré-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma da célula. No citoplasma, os pré-miRNAs são clivados pela enzima Dicer, outro membro da família RNase III, resultando em miRNAs maduros de fita dupla, com cerca de 21-30 nucleotídeos. Consequentemente, o miRNA de fita dupla é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que se ligará à região 3'-UTR do gene alvo do RNAm para regular sua expressão. O pareamento de bases entre a fita de miRNA e o RNA mensageiro-alvo faz com que o complexo RISC reprima a tradução ou clive o RNAm. Dessa forma, o gene do qual o RNAm alvo foi gerado é

silenciado (Figura 1). Como uma importante molécula regulatória da expressão gênica *in vivo*, cada miRNA regula centenas de genes alvo e diferentes miRNAs podem regular o mesmo RNAmensageiro, formando um complexo mecanismo regulatório que controla múltiplas atividades nas células (WANG; HE; ZHOU, 2018).

Reforça-se que a maioria dos miRNAs liga-se à região 3'UTR ou 5'UTR do RNAmensageiro alvo e, de acordo com o grau de ligação, regulam a translação de proteínas ou a degradação do RNAmensageiro (DENG et al., 2016). A estabilidade da interação miRNA-RNAmensageiro é essencial para reprimir o potencial gene alvo (BARTEL, 2004). Cada RNAmensageiro pode ser alvo de diferentes miRNAs e um único miRNA pode atingir diferentes RNAmensageiros. Assim o silenciamento da expressão gênica por miRNAs e mudanças no nível de expressão de miRNAs pode resultar em efeitos significativos na saúde humana, ou mesmo no desenvolvimento de doenças, como o câncer (MOLLAEI; SAFARALIZADEH; ROSTAMI, 2019).

Dessa forma, mutações nos genes que codificam as enzimas envolvidas na via da biogênese dos miRNAs, como as enzimas Dicer, Drosha ou exportin, têm sido envolvidas no desenvolvimento de diversos tipos de câncer (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; WANG; HE; ZHOU, 2018).

Fonte: RUPAIMOOLE; SLACK, 2017.

Figura 1 - Biogênese dos miRNAs. Nesta figura pode-se observar a via regulatória envolvida na formação dos miRNAs e como essas moléculas regulam as funções dos genes. Pri-miRNA, miRNA primário transcrito; pré-miRNA, miRNA precursor, RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA

2.3 PARTICIPAÇÃO DOS miRNAs NO CÂNCER

A carcinogênese é um processo complexo que envolve múltiplas etapas e uma sinergia de múltiplos genes (WANG; HE; ZHOU, 2018). O desenvolvimento tumoral resulta da ativação de oncogenes e da inativação de genes supressores de tumor, incluindo mutações genéticas, ampliações, translocações cromossômicas e inserções gênicas (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; TROIANO et al., 2018; WANG; HE; ZHOU, 2018). A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor poderá levar, eventualmente, à divisão celular descontrolada e, possivelmente, ao desenvolvimento do tumor (WANG; HE; ZHOU, 2018). Os miRNAs relacionados ao câncer podem ser divididos em miRNAs supressores de tumor e em miRNAs oncogênicos (oncomiRs). A super regulação de miRNAs oncogênicos ou a baixa regulação dos miRNAs supressores de tumor, tem sido relatados em diversos tipos de câncer, incluindo os de boca, assim como nas lesões potencialmente malignas (SUN et al., 2014; WANG; HE; ZHOU, 2018; MOLLAEI; SAFARALIZADEH; ROSTAMI, 2019). Além disso, tem sido sugerido que os miRNAs podem servir como potenciais marcadores tumorais para o diagnóstico e prognóstico do câncer, e também alvos promissores para agentes terapêuticos neoplásicos (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; WANG; HE; ZHOU, 2018; MOLLAEI; SAFARALIZADEH; ROSTAMI, 2019).

Um dos miRNAs que vem sendo amplamente estudado e já se apresenta como um miRNA oncogênico, regulador chave do comportamento biológico de células tumorais, incluindo os processos de apoptose, proliferação, invasão e metástase é o miRNA-21 (SUN et al., 2014; RAMASSONE et al., 2018). A maior expressão do miRNA-21 foi relatada em diversos tipos de cânceres, como no câncer de boca (ZHOU et al., 2014), cabeça e pescoço (LI et al., 2009; LIU, X. et al., 2009; CHEN et al., 2013; HEDBACK et al., 2014; SUN et al., 2014), hepatocelular (MENG et al., 2007) entre outros. Inúmeros genes alvos do miRNA-21 foram identificados e confirmados experimentalmente, sendo a maioria deles reconhecidos como genes supressores de tumor (CHEN et al., 2013). Entre os genes alvos do miRNA-21 que vêm sendo validados, podemos citar a proteína homóloga de fosfatase e tensina (PTEN) nos carcinomas hepatocelulares (MENG et al., 2007); o gene regulador de morte celular 4 (PDCD4) nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (SUN et al., 2014); e a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT) nos carcinomas espinocelulares de boca (ZHOU et al., 2014). Algumas investigações confirmaram, em amostras teciduais e em linhagens de cânceres de cabeça e pescoço, o aumento da regulação do miRNA-21, destacando sua

participação no aumento da proliferação celular ou na supressão da apoptose das células cancerosas (LIU, X. et al., 2009; BRITO, J. A. et al., 2014; SUN et al., 2014). Clinicamente, o aumento da expressão miRNA-21, considerado como um oncogene, foi associado a um pior prognóstico e menor sobrevida para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço (LI et al., 2009; CHEN et al., 2013; HEDBACK et al., 2014).

Outro miRNA que vem sendo investigado nos processos neoplásicos, incluindo os carcinomas espinocelulares de boca, é o miRNA-31 (LIU, C. J. et al., 2010; LIU, C. J. et al., 2012; SIOW et al., 2014; YAN et al., 2017). Em um estudo conduzido por Siow et al. (2014), a expressão diferencial de miRNAs foi analisada em oito amostras de carcinomas espinocelulares de boca e comparada com quatro amostras de tecidos não tumorais, obtidos a partir de blocos embebidos em parafina e fixados em formol. Uma amostra independente de 26 carcinomas espinocelulares de boca e três de mucosa bucal normal foi utilizada para validação do estudo. Dentre os miRNAs que apresentaram diferenças significativas, foram identificados o miRNA-21, miRNA-200c, miRNA-31 e miRNA-375. Como a expressão de miRNA-21 já foi destacada em outros trabalhos, os autores enfatizaram a expressão aumentada do miRNA-31 e diminuída do miRNA-375 como a diferença mais significativa do estudo. A associação com as características clínico-patológicas mostrou que a expressão do miRNA-31 foi significativamente maior nos estágios iniciais do carcinoma espinocelular de boca. Além disso, estava altamente expresso nos tumores com ausência de comprometimento linfonodal, o que reforça o fato deste miRNA estar envolvido nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de boca. Baseados em uma análise da via de ativação do miRNA-31, os autores sugerem que o miRNA-31 regula a proteína supressora de tumor p16 e pode ser responsável por suprimir o p16 e promover assim o desenvolvimento do tumor. A partir de uma análise multivariada, os autores observaram que a superexpressão do miRNA-31 é um fator independente indicativo dos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, sugerindo que este miRNA apresenta um papel em uma fase específica do tumor. Portanto, os autores concluíram que, diferentes miRNAs podem apresentar um papel em diferentes estágios da carcinogênese bucal. Enquanto alguns miRNAs podem se apresentar super expressos em estágios iniciais, outros podem apresentar uma baixa expressão em estágios mais avançados da doença.

Outro miRNA que apresentou particular interesse em estudos iniciais do desenvolvimento tumoral em boca é o miRNA-181b, membro da família de miRNA-181s (CERVIGNE et al., 2009; YANG, C. C. et al., 2011; DENG et al., 2016). A família do miRNA-181 participa da progressão no ciclo celular e sobrevida da célula pela regulação dos genes

p27Kipl e Bcl-2, sendo a regulação do miRNA-181 mediada pelo silenciamento de fatores de transcrição específicos nos diferentes tipos de cânceres (YANG, C. C. et al., 2011; BRITO, J. A. et al., 2014). O aumento da expressão do miRNA-181b foi inicialmente observado na progressão de leucoplasias bucais para o carcinoma invasivo (CERVIGNE et al., 2009). Considerando este papel do miRNA-181 como um potencial biomarcador na progressão do carcinoma espinocelular de boca, Yang et al. (2011) analisou a expressão de miRNA-181a e miRNA-181b no tecido e no plasma de pacientes pela reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como por meio de ensaios de migração, invasão e formação de colônias. Os resultados deste trabalho mostraram que pacientes com um aumento da expressão de miRNA-181 estavam mais propensos a desenvolver metástases linfonodais, invasão vascular e consequentemente, apresentavam pior prognóstico. Os ensaios funcionais revelaram que o aumento da expressão do miRNA-181 estava implicado no aumento da migração e invasão, porém não permitiu a ancoragem independente para o crescimento das células tumorais. Dessa forma, os autores confirmaram estudos prévios (CERVIGNE et al., 2009) em que o aumento da expressão de miRNA-181 nos tecidos e no plasma pode ser um potencial biomarcador para identificar pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentam metástase linfonodal.

Em seguida, Deng et al. (2016) também analisaram a expressão do miRNA-181b, em carcinomas verrucosos e carcinomas espinocelulares de boca, por meio da análise de PCR e verificaram a expressão imuno-histoquímica da proteína de células B de linfoma 2 (Bcl-2) e da proteína leucina rica em imunoglobulina 1 (LRIG1) nestes tumores. A expressão de miRNA-181 e de Bcl-2 foram significativamente maiores nos carcinomas verrucosos, em comparação com o tecido normal, porém a expressão foi menor quando comparada com os carcinomas espinocelulares de boca. O gene alvo do miRNA-181b, LRIG1, apresentou uma expressão menor nos carcinomas verrucosos de boca quando comparado com os tecidos normais, porém a expressão foi maior quando comparado com os carcinomas espinocelulares de boca. A partir desses resultados, os autores sugeriram que a expressão do miRNA-181b pode estar associada com o grau de malignidade dos tumores, visto que os carcinomas verrucosos são considerados tumores de baixo grau e com melhor prognóstico, em comparação com os carcinomas espinocelulares de boca. Além disso, também sugeriram uma via regulatória alternativa deste miRNA, que pode regular indiretamente a via de sinalização de Bcl-2, que envolve LRIG1.

Em uma revisão sistemática e meta-análise conduzida por Troiano et al. (2018), foi avaliada a relação entre a expressão de miRNAs e a sobrevida de pacientes com carcinomas espinocelulares de boca. Os trabalhos selecionados para este estudo foram identificados nas

bases científicas (Medline, PubMed, Scopus, Web of Science e Google Scholar). A análise qualitativa dos trabalhos foi realizada e as informações foram coletadas comparando as taxas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global em pacientes com a alta expressão de miRNAs, comparados com aqueles que apresentavam a baixa expressão destes miRNAs. Um total de 9 miRNAs (miRNA-21, miRNA-455-5p, miRNA-372; miRNA-29b, miRNA 1246; miRNA-196a e miRNA-181) apresentaram-se super-regulados e foram correlacionados com pior prognóstico, enquanto a baixa expressão foi detectada em 7 miRNAs e correlacionada com a pior sobrevida (miRNA-204, miRNA-101; miRNA-32; miRNA-20a; miRNA-16; miRNA-17 e miRNA-125b). A partir desta revisão sistemática, os autores concluíram que os diversos miRNAs identificados estão associados com um pior prognóstico para os pacientes com carcinomas espinocelulares de boca e confirmam que estes podem ser utilizados na prática clínica para prever o prognóstico dos pacientes com câncer de boca, baseados no adequado poder estatístico das evidências que observaram.

Em relação ao miRNA-345, também alvo deste trabalho, os estudos publicados na literatura analisaram a expressão deste miRNA em lesões potencialmente malignas bucais e no carcinoma espinocelular de boca (CERVIGNE et al., 2009; BRITO et al., 2014), porém não foram encontrados outros trabalhos avaliando a expressão deste miRNA tumores malignos da região de cabeça e pescoço.

Considerando os estudos realizados até o momento com os miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-181b nos diversos tipos de câncer, incluindo os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, e de boca, nos propusemos a analisar a expressão destes miRNAs (miRNA-21, miRNA-31, miRNA-181b e miRNA-345) na carcinogênese bucal, especificamente nas lesões potencialmente malignas e nos carcinomas espinocelulares que ocorrem no lábio inferior.

2.4 PARTICIPAÇÃO DOS miRNAs NAS LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS

Nas lesões potencialmente malignas que afetam a boca, alguns estudos envolvendo os miRNAs foram realizados, visando utilizá-los como biomarcadores da progressão destas lesões para o carcinoma espinocelular (CERVIGNE et al., 2009; YANG, C. C. et al., 2011; XIAO et al., 2012; BRITO, J. A. et al., 2014; MAIMAITI et al., 2015; ZHU et al., 2015; HUNG et al., 2016). Até o momento, não existem marcadores moleculares específicos, sendo que a presença

e o grau de displasia epitelial permanecem como o método histopatológico de referência utilizado para prever o potencial maligno das lesões orais suspeitas (SPEIGHT, 2007). Neste sentido, os esforços com a finalidade de se identificar alterações genéticas e possíveis biomarcadores do câncer de boca são de considerável importância (KALAVREZOS; SCULLY, 2015).

Especificamente em lesões potencialmente malignas bucais como as leucoplasias, as pesquisas vêm demonstrando o envolvimento de alguns miRNAs no risco de sua transformação maligna (CERVIGNE et al., 2009; YANG, C. C. et al., 2011; XIAO et al., 2012; BRITO, J. A. et al., 2014; MAIMAITI et al., 2015; ZHU et al., 2015; HUNG et al., 2016).

Estudos iniciais de Cervigne et al. (2009) quantificaram as mudanças na expressão de miRNAs em leucoplasias e no carcinoma espinocelular de boca, a fim de identificarem os miRNAs relacionados com a progressão da doença. Foram analisadas as diferenças na expressão de miRNAs de 43 leucoplasias progressivas, ou seja, que evoluíram para o carcinoma espinocelular, de 12 pacientes e 4 leucoplasias não progressivas, ou seja, que não evoluíram para o carcinoma espinocelular de boca, de 4 pacientes, sendo essas expressões validadas por meio da análise de PCR. A expressão global dos miRNAs analisados diferenciaram os casos de leucoplasias progressivas e carcinoma espinocelular de boca; e leucoplasias não progressivas e mucosa bucal normal. Um total de 109 miRNAs estavam altamente expressos na leucoplasia progressiva e no carcinoma espinocelular de boca invasivo. Desses, os miRNA-21, miRNA-181b e miRNA-345 foram os que apresentaram maior expressão, sendo associados à progressão da lesão e possivelmente, à evolução para o carcinoma espinocelular de boca. Os autores sugeriram, portanto, que esses miRNAs podem ser potenciais biomarcadores em leucoplasias bucais que possuem maior risco de transformação maligna.

Posteriormente, Xiao et al. (2012) utilizaram amostras de miRNA por *microarrays* de tecidos congelados, para verificarem a expressão de miRNAs em leucoplasias bucais com e sem transformação maligna. Neste estudo, observou-se, uma super-regulação dos miRNA-31, miRNA-142-5p, miRNA-33a, miRNA-1259, miRNA-146b-5p, miRNA-886-3p, miRNA-886-5p, miRNA-519d e miRNA-301a; e uma sub-regulação dos miRNA-572, miRNA-611, miRNA-602, miRNA-675, miRNA-585, miRNA-623, miRNA-637, miRNA-1184. Por meio da análise de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), confirmou-se que o miRNA-31 é altamente expresso nas leucoplasias bucais com risco de transformação maligna. Os autores também analisaram a expressão do fator de crescimento de fibroblastos 3 (FGF3) na região 3'UTR, alvo do miRNA-31 e observaram uma menor expressão deste fator quando havia a

super-regulação de miRNA-31. Dessa forma, o miRNA-31 foi relacionado com a modulação de algumas funções biológicas, como proliferação celular, migração e invasão do carcinoma espinocelular de boca, sugerindo um papel do miRNA-31 na progressão das leucoplasias bucais para o câncer de boca, por meio da regulação da expressão de FGF3.

Também Yang et al. (2013) investigaram alguns miRNAs como potenciais biomarcadores de leucoplasias bucais e carcinomas espinocelulares de boca. Primeiramente, os autores analisaram os miRNAs de leucoplasias com baixo grau de displasia epitelial que não sofreram transformação maligna (n=7) e leucoplasias com baixo grau de displasia epitelial que evoluíram para leucoplasias com displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma espinocelular de boca (n=7). As alterações encontradas teciduais foram similares às encontradas em amostras de saliva desses pacientes. Os autores observaram uma super-expressão dos miRNA-708, miRNA-10B, miRNA-19a, miRNA-30e, miRNA-26a e miRNA-660, e uma menor expressão dos miRNA-99, miRNA-15a, miRNA-197, miRNA-145 e miRNA-150. Os autores concluíram que alguns miRNAs estão diferentemente expressos em leucoplasias de baixo grau de displasia epitelial, com diferentes potenciais de progressão maligna. Além disso, esses miRNAs diferentemente expressos em amostras teciduais também podem ser detectados em saliva, mesmo em estágios iniciais das neoplasias. Embora sem diferenças estatisticamente significativas, o estudo também observou a expressão do miRNA-181b, o qual apresentou uma baixa regulação em leucoplasias progressivas e maior expressão nas leucoplasias não progressivas, sugerindo um papel deste miRNA como supressor de tumor na iniciação da carcinogênese ou ainda, quando sub-expresso, poderia contribuir para a progressão das lesões precursoras do câncer. Os autores sugerem que a análise de miRNA em saliva consiste em um método promissor para detecção precoce de alterações de miRNAs visando monitorar as lesões potencialmente malignas.

Estudos mais recentes, conduzidos por Brito et al. (2014) analisaram as alterações de miRNA em 22 amostras de peças cirúrgicas de leucoplasias bucais, 17 carcinomas espinocelulares de boca e 6 amostras de mucosa bucal normal, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste trabalho objetivou-se analisar a expressão dos miRNA-21, miRNA-181b e miRNA-345 nas leucoplasias bucais e verificar a associação desses miRNAs com as características clínicas e citopatológicas utilizadas para graduar as displasias epiteliais, como: mitoses atípicas, número de células com relação núcleo citoplasma alterado e hiperchromatismo. Os miRNA-21, miRNA-181b e miRNA-345 foram escolhidos, baseados no estudo realizado anteriormente, por Cervigne et al. (2009). Os resultados mostraram uma maior expressão do

miRNA-345 na leucoplasia bucal, cujas células apresentavam aumento do tamanho e número de nucléolos, ou com aumento da relação núcleo/citoplasma. Também foi observado uma maior expressão dos miRNA-21 e miRNA-181b, nas células com maior número de mitoses atípicas, aumento da relação núcleo/citoplasma e hipercromatismo. Dessa forma, os autores confirmaram que alguns parâmetros histopatológicos utilizados para graduar as displasias epiteliais estão associados com a expressão alterada desses miRNAs em leucoplasias bucais, sugerindo-os como potenciais marcadores dessas lesões com maior potencial de transformação maligna.

Recentemente, Zhu et al. (2014) desenvolveram um método para detectar os genes que encontram-se alterados na progressão maligna das leucoplasias bucais, por meio de uma perspectiva sistemática. Baseados na interação proteína-proteína e na expressão genética, os autores identificaram alguns módulos que podem estar associados ao desenvolvimento do câncer. Particularmente, os miRNAs envolvidos na regulação desses módulos do câncer bucal, foram objeto deste estudo. Com esta finalidade, algumas bases genéticas foram obtidas através da plataforma NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) e os seguintes miRNAs reguladores desses genes foram relacionados com a progressão do câncer: miRNA-499-5p, miRNA-549, miRNA-205, miRNA-525-5p, miRNA-21, miRNA-323-3p, miRNA-423-3p, miRNA-491-3p. Os autores propuseram uma nova forma para identificar genes que possuem papéis importantes no desenvolvimento do câncer de boca. Os miRNAs identificados apresentam uma relação chave com a progressão das leucoplasias orais para o câncer de boca e os autores sugerem que esses miRNAs sejam mais profundamente estudados, pois forneceram novas perspectivas relacionadas à carcinogênese oral.

Utilizando a mesma base genética NCBI Gene Expression Omnibus (GEO), Maimaiti et al. (2015) também analisaram as alterações de miRNA envolvidos na transformação maligna de leucoplasias bucais. Foram identificados 38 miRNAs que se apresentavam diferentemente expressos nesses tecidos, porém apenas 3 desses miRNAs foram selecionados por estarem associados à iniciação e à progressão das lesões potencialmente malignas (miRNA-129-5p; miRNA-339-5p, miRNA-31). A partir dessa plataforma desenvolvida e dos estudos disponíveis sobre a transformação maligna de leucoplasias orais, os autores sugerem que os 3 miRNAs selecionados (miRNA-129-5p; miRNA-339-5p, miRNA-31) podem interferir nas leucoplasias orais, conferindo um maior potencial maligno ou agressivo à essas lesões. No entanto, sugerem que outros estudos sejam realizados para validar a expressão desses miRNAs.

A expressão dos miRNAs 21 e 31 também foi analisada por Hung et al. (2015) em salivas de 20 pacientes e em 46 amostras teciduais de pacientes com leucoplasias. Um aumento estatisticamente significativo foi observado na saliva dos pacientes com lesões potencialmente malignas, comparado ao grupo controle. Já nos pacientes com recorrência e/ou transformação maligna da lesão, foi observado um aumento da expressão do miRNA-31, porém não do miRNA-21, no epitélio bucal. Além disso, o aumento da expressão do miR-31, assim como a displasia epitelial, foram considerados fatores de risco independente para progressão das lesões potencialmente malignas. Dessa forma, a presença da displasia epitelial e a super-expressão do miRNA-31, em conjunto, podem prever o aumento da probabilidade de incidência ou recorrência, e/ou da transformação maligna dessas lesões.

Como pode ser observado nesta revisão da literatura, nas lesões potencialmente malignas que afetam a boca, os estudos dos miRNA têm sido realizados buscando verificar se algum deles pode ser utilizado como biomarcador da progressão destas lesões para o carcinoma espinocelular. Entretanto, os estudos ainda são contraditórios quanto ao papel exercido por esses miRNAs na etiopatogenia dos carcinomas espinocelulares de boca, particularmente daqueles que ocorrem na região do lábio.

A identificação da expressão de miRNAs em lesões potencialmente malignas de boca, como as queilites actínicas, poderá contribuir para um conhecimento mais amplo de sua participação na evolução das lesões e no risco de sua transformação maligna, permitindo assim, auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de lábio.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de queilites actínicas com e sem displasia epitelial e de carcinomas espinocelulares de lábio inferior, propôs-se a:

- identificar a expressão dos miRNA-21, miRNA-31, miRNA-181b e miRNA-345 no epitélio labial destas lesões;
- verificar, se a expressão dos miRNAs seleccionados (miRNA-21, miRNA-31, miRNA-181b e miRNA-345), pode estar associada com a progressão das queilites actínicas para o carcinoma espinocelular de lábio inferior;
- e contribuir com o conhecimento da participação dos miRNAs na carcinogênese labial.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por 19 pacientes portadores de queilite actínica sem displasia epitelial, 32 pacientes portadores de queilite actínica com displasia epitelial e 42 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos a tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, no período de 2007 a 2017, e disponíveis em parafina.

Parte da amostra também foi obtida a partir de biópsias incisionais de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio inferior diagnosticados e armazenados em parafina, no Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, USP, no período de 2000 a 2017.

Os prontuários dos pacientes foram analisados, sendo utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes com diagnóstico de queilite actínica (com displasia epitelial leve, moderada e intensa, ou sem displasia), e de carcinoma espinocelular de lábio inferior, confirmado por exame anatomopatológico;
- pacientes submetidos a cirurgia como tratamento inicial;
- fragmentos das lesões suficientes para análise microscópica e extração de RNA;
- disponibilidade dos blocos de parafina para processamento, assim como adequada conservação dos espécimes.

4.2 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações referentes aos pacientes foram obtidas a partir dos prontuários eletrônicos dos pacientes do Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, assim como a partir dos laudos dos exames anátomo-patológicos. As informações dos pacientes pertencentes ao Departamento de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia de Bauru, foram coletadas a partir da ficha de

requisição e do laudo dos exames anátomo-patológicos. Todas as informações foram registradas em formulário próprio (Anexo A). Estes registros incluíram informações clínicas, como identificação do paciente, gênero, idade, ocupação, cor e, microscopicamente, o diagnóstico da biópsia e a presença ou não de displasia epitelial.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.3.1 Graduação da displasia epitelial

A classificação das alterações epiteliais e a graduação da malignidade do epitélio das queilites actínicas foi realizada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (GALE, 2005; REIBEL, 2017), baseados nos aspectos arquiteturais do epitélio, como descrito a seguir:

- hiperplasia: aumento do número de células na camada espinhosa (acantose) e/ou na camada parabasal e basal. A arquitetura do epitélio mostra uma estratificação regular, porém sem atipia;
- displasia leve: observa-se uma alteração da arquitetura epitelial, limitada ao terço inferior, acompanhada de uma atipia celular;
- displasia moderada: observa-se uma alteração da arquitetura epitelial, que se estende ao terço médio do epitélio, acompanhado de atipia celular;
- displasia severa/intensa: as alterações da arquitetura epitelial estendem-se a mais de dois terços do epitélio, apresentando atipia celular;
- carcinoma *in situ*: as alterações são observadas em toda extensão do epitélio, porém sem invasão, acompanhadas por uma atipia celular pronunciada. Figuras mitóticas atípicas são normalmente vistas no carcinoma *in situ*.

Os critérios utilizados para diagnóstico das displasias, de acordo com as alterações arquiteturais foram:

- estratificação irregular do epitélio;
- perda de polaridade das células basais;
- cristas epiteliais em forma de gota;

- aumento do número de figuras mitóticas;
- mitoses superficiais atípicas;
- queratinização prematura de células individuais (queratose);
- pérolas de queratina no interior das cristas epiteliais;
- perda de coesão epitelial.

Os critérios utilizados para diagnóstico das displasias, de acordo com as alterações celulares foram:

- alteração no tamanho dos núcleos (anisonucleose);
- alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- alteração no tamanho da célula (anisocitose);
- alteração na forma da célula (pleomorfismo);
- alteração na relação núcleo/citoplasma;
- núcleo com tamanho aumentado;
- figuras de mitose atípicas;
- aumento no número e tamanho dos nucléolos;
- hiperchromatismo.

A análise morfológica dos espécimes selecionados foi realizada, em cortes de 3µm de espessura, obtidas a partir de peças cirúrgicas e biópsias, incluídas em parafina das queilites actínicas com e sem displasia epitelial e dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Estes cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.).

Além disso, foram selecionadas 10 amostras de mucosa bucal de lábio inferior, com padrão de normalidade, sem evidências de neoplasia, para fins de comparação dos resultados de RT-qPCR.

A confirmação do diagnóstico, com base na morfologia das lesões foi realizada individualmente por dois pesquisadores (A.A. e D.T.O.), utilizando-se um microscópio óptico binocular, modelo Axiokop 2 Plus (ZEISS, Jena, Alemanha), sendo os pontos de discordância reavaliados e estabelecidos por consenso. Neste momento, selecionou-se um corte representativo

da lesão de cada espécime, analisando-se todo fragmento presente na lâmina, para a determinação das características microscópicas e seleção da região para extração do RNA da amostra.

Após delimitação da área mais representativa da lesão em H.E., foram realizados 20 cortes de 3-4 μ m de espessura, de cada amostra de queilite actínica, de carcinoma espinocelular de lábio inferior e de mucosa bucal com padrão de normalidade. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, as lâminas referentes aos pacientes com queilite actínica sem displasia epitelial, com displasia epitelial, pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior e mucosa bucal com padrão de normalidade, foram submetidas à raspagem do epitélio lábia,l na área delimitada (*scrape*), por meio da contraposição das lâminas (Figura 2). O material removido foi colocado em tubos de microcentrifugação (1,5mL), armazenados a -80°C para posterior etapa de extração.

Figura 2 - Em A, observa-se a lâmina em Hematoxilina e Eosina e a lâmina com corte de 3-4 μ m da amostra. Em B, após delimitação da área a ser analisada, realizou-se a contraposição das lâminas e demarcação da área a ser raspada. Em C, nota-se o processo de raspagem (*scrape*) da lâmina, com auxílio de um bisturi estéril. Em D, o material coletado foi armazenado em microtubos e mantido a -80°C

4.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS

O RNA total foi extraído de 19 queilites actínicas sem displasia epitelial, 32 queilites actínicas com displasia epitelial, 42 carcinomas espinocelulares de lábio inferior e de 10 fragmentos de mucosa bucal normal. Com esta finalidade, o *kit* para extração de RNA de amostras em parafina (Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE - Life Technologies), foi utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante.

A extração e isolamento do RNA nas amostras de queilites actínicas, carcinomas espinocelulares e mucosa bucal normal foram realizadas em etapas, sendo selecionadas 10 amostras para extração por dia. Estas amostras foram descongeladas e primeiramente, realizou-se a desparafinização dos tecidos, adicionando-se 1mL de xilol em cada amostra. As amostras foram agitadas em vortex e aquecidas a 50°C, 300 rotações por minuto (rpm), durante 3 minutos. Após este período, o material foi centrifugado durante três minutos, velocidade máxima (14.000 rpm) e temperatura ambiente (21°C), até observar-se a formação de um pellet. O xilol sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi realizada a lavagem das amostras, utilizando-se 1mL de etanol e agitadas em vortex. O material foi novamente centrifugado, durante 3 minutos, em temperatura ambiente e velocidade máxima. O etanol remanescente foi removido e descartado. Este procedimento de lavagem foi repetido até remoção completa do xilol. Em seguida, o material foi colocado em centrífuga a vácuo (SPEEDVAC), durante 5 minutos, temperatura entre 37 a 40°C, até secagem completa das amostras.

Procedeu-se então à etapa de digestão, adicionando-se 4μL de protease e 200 μL de buffer de digestão em cada amostra. As amostras foram aquecidas, durante 15 minutos, temperatura de 50°C, seguida de outra incubação, por mais 15 minutos e temperatura de 80°C.

Para o isolamento do RNA, foi pipetado na amostra, 790μL de uma mistura de etanol/isolante aditivo. Em seguida, foi utilizado uma coluna, a qual foi inserida em um tubo suporte de 2mL. Para cada amostra, foi pipetado 700 μL da mistura etanol/aditivo/amostra no tubo que continha o filtro. O material foi centrifugado, a 10.000 x g, por 30 segundos, para permitir que a mistura passasse pela coluna. A fase inferior (aquosa) foi descartada e pipetado mais 90μL da mistura de etanol/isolante aditivo/amostra. O material foi novamente centrifugado, a 10.000 x g, por 30 segundos, para permitir que a mistura passasse pela coluna. Em seguida, foi feita a lavagem com 700μl de solução de lavagem à coluna, de acordo com o fabricante. O material foi centrifugado a 10.000 x g, por 30 segundos, à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado. A lavagem e a centrifugação foram repetidas, porém desta vez com

500µl de solução de lavagem e o filtrado novamente descartado. Em seguida, adicionou-se 60µl DNase e incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente (22-25°C). As lavagens foram repetidas com as soluções de lavagem e centrifugadas, conforme os passos anteriores. Uma centrifugação adicional foi realizada, agora à velocidade máxima, por 1 minuto, para secar bem a coluna. A coluna foi então transferida para um novo tubo de 2mL, sendo então pipetado 20µl de água livre de nucleases no centro da coluna, incubada por 1 minuto, a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação adicional, durante 1 minuto e velocidade máxima, para passar a mistura pela coluna. A coluna foi descartada e o material eluído, sendo este armazenado a -80°C.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro tipo NanoDrop (Thermo Scientific), conforme pode-se observar na Figura 3.

Figura 3 - Espectrofotômetro, tipo NanoDrop, utilizado para quantificação de RNA

4.5 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR)

Para a reação de transcrição reversa e síntese de DNA complementar (cDNA), foi seguido o protocolo do fabricante do *kit* TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Life Technologies). Os reagentes deste kit e o volume utilizado para uma reação está especificado na Tabela 1. Estes reagentes converterão o RNA total em DNA complementar, quando utilizados com os micro-RNAs selecionados e um RNA endógeno (RNU-44).

A mistura dos reagentes para a reação de transcrição reversa foi realizada, utilizando os volumes de cada reagente, conforme especificação do fabricante e proporcionadas, de acordo com o número de reações desejada.

Para cada 15 μL de reação, foi utilizada a proporção de 10ng de RNA total para 7 μL do *mix* de transcrição reversa. Cada amostra foi proporcionada, de acordo com o rendimento individual obtido de cada uma quando da extração de RNA e foram devidamente aliquotadas para que se obtivesse a proporção final de 5 μL de RNA total. Então, 12 μL da combinação do RNA total e do *mix* foi dispensado em cada poço. Acrescentou-se mais 3 μL de cada primer de miRNA (RT primer), totalizando 15 μL /poço.

Tabela 1 - Reagentes e volumes utilizados na reação de transcrição reversa para cada amostra

Componente	Mix (volume/15 μL de reação)
dNTP mix	0,15 μL
Multiscribe RT enzyme	1,00 μL
10x RT Buffer	1,5 μL
RNase Inhibitor	0,19 μL
Água livre de RNase	4,16 μL
Total	7,00 μL

*Cada 15 μL de reação consiste de 7 μL de máster mix, 3 μL de primer e 5 μL da amostra de RNA.

Para análise comparativa, foram selecionadas 10 amostras de mucosa bucal normal. A viabilidade destas amostras foi previamente analisada e testada, sendo selecionadas 10 amostras que apresentaram uma curva de amplificação satisfatória para fazerem parte do “*pool*”. Assim, para o grupo controle, selecionou-se 1 ng de cada uma das 10 amostras de mucosa bucal normal e dispensou-se o correspondente a 5 μL deste grupo nos poços. Em seguida, os tubos foram incubados e inseridos no termociclador (Figura 4). Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer, a -20°C .

Figura 4 - Termociclador Applied Biosystems, utilizado para síntese de cDNA

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E QUANTIFICAÇÃO

O sistema de detecção utilizado, visa avaliar o nível de expressão de miRNAs através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Para esse sistema, utilizou-se o *mix* de reações do *kit* TaqMan Universal PCR Master Mix, conforme a recomendação do fabricante e proporções especificadas na Tabela 2.

A preparação da mistura de reagentes para a reação de PCR foi feita em fluxo laminar estéril e protegido da luz ambiente. As amostras foram corridas em duplicatas, sendo preparado em cada poço 1,33µL de cada amostra, 1 µL de cada ensaio (TaqMan miRNA assays), 10 µL do reagente TaqMan Universal PCR Master Mix e 7,67 µL de água livre de RNase, totalizando 20 µL em cada poço. Os ensaios utilizados foram especificados na Tabela 3.

Cada componente da tabela acima foi inserido, de acordo com o volume especificado, totalizando 20 µL e proporcionado para 96 poços.

A placa foi selada com filme óptico e inserida no aparelho de amplificação de PCR em tempo real (Applied Biosystems), conforme pode-se observar na Figura 5. O *software* foi programado previamente para análise dos miRNAs selecionados (miR-21, miR-31, miR-345, miR-181b) e do RNA endógeno, RNU-44, especificados para cada amostra de cada poço.

Tabela 2 - Reagentes e volumes utilizados para amplificação de cDNA

Componente	Volume por 20 µL de reação	
	Uma reação	Três duplicatas*
Ensaio TaqMan	1,0 µL	3,60 µL
Produto da reação RT	1,33 µL	4,80 µL
TaqMan Universal PCR master mix	10,00 µL	36,00 µL
Água livre de RNase	7,67 µL	27,61 µL
Volume total	20,00 µL	72,01 µL

*O volume de duplicatas inclui 20% de excesso para compensar o volume perdido durante as pipetagens.

Tabela 3 - Ensaios TaqMan miRNA selecionados para estudo

Ensaio miRNA	Código	Nome do Ensaio
miRNA-31	002279	hsa-miR-31
miRNA-345	002186	hsa-miR-345
miRNA-21	000397	hsa-miR-21
miRNA-181b	001098	hsa-miR-181b
RNU-44	001094

Figura 5 - Aparelho e *software* SDS 2.3 utilizado para correr as placas de PCR e análise do perfil de amplificação da expressão dos miRNAs

Para análise comparativa, em todas as placas, além das amostras dos grupos de estudo selecionados, haviam também poços destinados para o “*pool*” de amostras normais e alguns poços para análise de viabilidade do produto, controle, sem amostra (NTC), conforme pode-se observar na Figura 6.

Para comprar a expressão dos miRNAs nas amostras de queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio inferior, foi utilizado o *software* RqManager, que utiliza o método de comparação $\Delta\Delta C_t$ para calcular a quantidade relativa de expressão gênica.

O cálculo gerado pelo *software* fornece os valores quantitativos (C_t). Além disso, considera a média dos valores de C_t e a partir destes, fornece o valor de normalização, ΔC_t (C_t médio do miRNA – C_t médio do RNU44).

A quantificação relativa final (Rq) é obtida como um aumento ou diminuição da expressão de miRNA, em relação ao da amostra calibradora (*pool* de mucosa bucal normal), conforme a fórmula (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001):

$$Rq = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Sendo, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ amostra} - \Delta C_t \text{ calibrador (pool)}$

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MIR-21		MIR-31		MIR-181B		MIR-345		RNU44		Vazias	
A
B
C
D
E
F
POOL
NTC

Figura 6 - Distribuição das amostras na placa para análise de PCR, incluindo o “pool” de amostras de tecido sem alterações e o NTC, sem tecido para análise, todas em duplicata e distribuídas em relação aos miRNAs selecionados e RNA endógeno

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Para comparar a expressão dos miRNAs nas amostras de queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio inferior, foi utilizado o *software* RqManager, que utiliza o método de comparação $\Delta\Delta Ct$ para calcular a quantidade relativa de expressão dos miRNAs.

A partir destes resultados, a amostra foi categorizada de acordo com o aumento ou diminuição da expressão de miRNA, sendo os resultados da quantificação relativa menores ou iguais a 0,5 classificados como diminuição da expressão do miRNA e os maiores ou iguais a 2, como aumento da expressão de miRNA. Os valores na faixa compreendida entre 0,5 e 2 foram classificados com expressão equivalente ao do tecido labial com padrão de normalidade (BRITO, B. L. et al., 2016).

As etapas de extração do RNA total, reação de transcrição reversa e amplificação do cDNA, quantificação e análise dos dados foram realizadas em parceria com o Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos resultados relativos à expressão dos miRNAs, os valores de normalidade foram avaliados utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação de três grupos, adotando-se nível de significância de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software IBM, SPSS Statistics, versão 22.0.

4.9 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo em reunião do dia 08 de fevereiro de 2017, sob o nº 1.929.331 – CAAE 63879016.5.0000.5417 (Anexo B). As instituições co-participantes, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e Centro Internacional de Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center, também aprovaram a realização do trabalho nas respectivas instituições.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Após o levantamento dos pacientes portadores de queilites actínicas e carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos a tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), no período de 2007 a 2017; e no Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP), no período de 2000 a 2017, foram aplicados os critérios de inclusão e selecionados 93 pacientes para realização deste estudo. Os pacientes com queilite actínica tratados na Faculdade de Medicina de Botucatu foram submetidos à vermelhonectomia do lábio inferior e à remoção cirúrgica dos carcinomas espinocelulares. Por outro lado, aqueles tratados na Faculdade de Odontologia de Bauru (21 pacientes) foram submetidos à biópsias excisionais das queilites actínicas ou a biópsias incisionais dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

A amostra foi dividida, após confirmação do laudo histopatológico, sendo composta por 19 pacientes com queilite actínica sem displasia epitelial, 32 pacientes com queilite actínica com displasia epitelial (sendo 5 com displasia epitelial leve, 22 com displasia epitelial moderada e 5 com displasia epitelial intensa) e 42 pacientes com carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

A distribuição das queilites actínicas e dos carcinomas espinocelulares de lábio mostrou-se maior nos pacientes do gênero masculino (100% dos pacientes com queilite actínica sem displasia epitelial, 87,5% com queilite actínica com displasia epitelial e 54,76% dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior).

Em relação à cor, dentre os pacientes com queilite actínica sem e com displasia epitelial, a maioria era composta por pacientes da cor branca (75% e 100%, respectivamente), assim como naqueles com carcinoma espinocelular de lábio inferior (100%).

Quanto à idade, observou-se que a idade mínima entre os pacientes portadores de queilites actínicas sem displasia epitelial foi de 35 anos e a idade máxima foi de 79 anos. Entre os pacientes com queilite actínica com displasia epitelial, a idade mínima foi de 34 anos e a máxima foi de 88 anos. Já nos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior,

a idade mínima observada foi de 22 anos e a idade máxima foi de 98 anos. A média de idade entre os pacientes com queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio inferior foi de 62 anos.

Quanto aos fatores de risco para a queilite actínica e o câncer de lábio, obtidos a partir dos prontuários dos pacientes, pode-se observar que 46,67% e 40% dos pacientes com queilite actínica sem e com displasia epitelial apresentavam, respectivamente, exposição crônica ao sol devido à sua ocupação. Para os pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, observou-se que 16% apresentavam exposição crônica ao sol, devido à ocupação. Como descrito na Tabela 4, na maioria dos pacientes com queilite actínica ou câncer de lábio inferior não houve associação com a exposição crônica ao sol.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.2.1 Caracterização das queilites actínicas em Hematoxilina e Eosina

As 51 queilites actínicas que compõem a amostra deste estudo foram provenientes tanto de biópsias excisionais, quanto da excisão cirúrgica por vermelhectomia, procedimento este utilizado como protocolo cirúrgico do Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

O epitélio presente nas 51 queilites actínicas estava hiperplásico em 76,47% da amostra, sendo atrófico em 23,53% e ulcerado em 19,61% dos espécimes. Além disso, 70,59% das queilites actínicas apresentavam um epitélio ortoqueratinizado e em 29,41% observou-se ora uma ortoqueratinização, ora uma paraqueratinização.

A presença da transformação basofílica do colágeno pode ser constatada em 84,31% das queilites actínicas sendo o infiltrado inflamatório mononuclear predominante em 88,23% da amostra.

A classificação da intensidade da displasia epitelial seguiu os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (GALE, 2005; REIBEL, 2017), com base nas alterações de arquitetura epitelial e da morfologia celular. De acordo com estes critérios, as displasias foram classificadas em leve (9,80%), moderada (43,14%) ou intensa (9,80%). Os critérios microscópicos analisados estão descritos na Tabela 5.

Dezenove pacientes (37,26%) da amostra com queilite actínica não apresentaram displasia epitelial. Microscopicamente, observou-se que nestes pacientes o epitélio era predominantemente hiperortoqueratinizado e hiperplásico, com camada granulosa bem evidente, estratificação normal e sem atipia celular. Além disso, subjacente, no tecido conjuntivo, era possível notar-se a presença de transformação basofílica do colágeno e discreto infiltrado inflamatório (Figuras 7A e 7B).

Tabela 4 - Distribuição dos 93 pacientes portadores de queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio inferior, segundo as características demográficas. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 2000 a 2017

Variável		Queilite Actínica sem displasia epitelial N (%)	Queilite Actínica com displasia epitelial N (%)	CEC N (%)
Gênero	Masculino	19 (100%)	28 (87,5%)	33 (78,6%)
	Feminino	0	4 (12,5%)	9 (21,4%)
Raça*	Branca	6 (75%)	24 (100%)	32 (100%)
	Não branca	2 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
Idade*	≤ 62 anos	8 (53,33%)	17 (53,12%)	16 (39,02%)
	> 62 anos	7 (46,67%)	15 (46,88%)	25 (60,98%)
Ocupação*	Com exposição crônica ao sol	7 (46,7%)	13 (40,6%)	3 (14,3%)
	Sem exposição crônica ao sol	8 (53,3%)	18 (56,3%)	18 (85,7%)
TOTAL		19	32	42

*Excluídos pacientes com informação ignorada.

Já nas queilites actínicas com displasia epitelial leve, observou-se que as alterações estruturais do epitélio estavam restritas ao 1/3 inferior do epitélio, com um pleomorfismo celular discreto (Figuras 7C e 7D). As queilites actínicas com displasia epitelial moderada apresentavam estas alterações estruturais do epitélio atingindo o 1/3 médio do epitélio, com atipia e pleomorfismo celular acentuados, intenso hipercromatismo, presença de mitoses

atípicas e com perda da polaridade da camada basal (Figuras 8A e 8B). Em relação às queilites actínicas com displasia epitelial intensa, as alterações estruturais estendiam-se ao 1/3 superior do epitélio, com uma atipia celular e pleomorfismo mais intenso, presença de mitose atípicas, cristas em gota, disqueratoses e hiperchromatismo evidente. A graduação final das queilites actínicas foi baseada na presença de alterações da arquitetura epitelial e de atipias celulares, conforme os critérios estabelecidos pela OMS (Figuras 8C e 8D e Tabela 6).

Tabela 5 - Distribuição das características microscópicas das 51 queilites actínicas, analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

Características Microscópicas	Queilite Actínica N (%)
Epitélio	
Hiperplásico	39 (76,47%)
Atrófico	12 (23,53%)
Ulceração presente	10 (19,61%)
Ulceração ausente	41 (80,39%)
Queratinização	
Ortoqueratinizado	39 (70,59%)
Ortoqueratinizado/Paraqueratinizado	15 (29,41%)
Displasia Epitelial	
Ausente	19 (37,26%)
Leve	5 (9,80%)
Moderada	22 (43,14%)
Intensa	5 (9,80%)
Transformação Basofílica do Colágeno	
Presente	43 (84,31%)
Ausente	8 (15,69%)
Infiltrado inflamatório	
Mononuclear	45 (88,23%)
Polimorfonuclear	6 (11,77%)
TOTAL	51

Tabela 6 - Características microscópicas utilizadas para graduação da displasia epitelial das 32 queilites actínicas com displasia epitelial, segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017

Estruturas analisadas	Queilite Actínica com displasia N (%)
Alteração da arquitetura epitelial	
Limitada ao 1/3 inferior	15 (46,87%)
Extensão para 1/3 da camada média	8 (25%)
Extensão para 2/3 da camada média	9 (28,13%)
Estratificação irregular	9 (28,13%)
Perda da polaridade	16 (50%)
Cristas em forma de gota	14 (43,75%)
Mitoses atípicas	17 (53,13%)
Disqueratoses	4 (12,5%)
Pérolas de queratina	4 (12,5%)
Tamanho do núcleo alterado	22 (68,75%)
Forma do núcleo alterado	23 (71,88%)
Tamanho das células alterado	27 (84,37%)
Forma das células alterada	27 (84,37%)
Alteração núcleo/citoplasma	25 (78,12%)
Hipercromatismo	13 (40,62%)
TOTAL	32

Figura 7 - Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica sem displasia epitelial. Em C e D, queilite actínica com displasia epitelial leve, com alterações da arquitetura epitelial restrita ao terço inferior (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x)

Figura 8 - Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica com displasia epitelial moderada, com alteração da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio, com hiperchromatismo celular e pleomorfismo moderado. Em C e D, queilite actínica com displasia epitelial intensa, com alterações da arquitetura epitelial em mais de 2/3 de sua extensão, apresentando pleomorfismo celular, hiperchromatismo e mitoses atípicas (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x)

5.2.2 Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio em Hematoxilina e Eosina

Os 42 carcinomas espinocelulares de lábio analisados neste estudo eram predominantemente tumores bem diferenciados (T1N0M0) e microscopicamente, apresentavam intensa queratinização, discreto pleomorfismo nuclear, figuras de mitose e presença de moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 9). A presença de infiltração da musculatura esquelética foi observada em 35,71% dos tumores e a infiltração perineural foi detectada em apenas 9,5% dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. De acordo com as informações presentes nos prontuários, 75,76% dos tumores apresentavam margens cirúrgicas livres da neoplasia. O padrão de invasão tumoral observado na maioria dos tumores era formado por cordões e ilhotas de células neoplásicas, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, nota-se o padrão de invasão em cordões e ilhotas tumorais em continuidade com a mucosa labial. No detalhe, em C e D, nota-se as células neoplásicas bizarras com intenso pleomorfismo, alteração da relação núcleo/citoplasma, hiperchromatismo e presença de figuras de mitoses (Hematoxilina e Eosina, A e C = 200x, B e D = 400x)

5.3 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs

A partir da síntese do cDNA referentes aos miRNA-21, miRNA-31, miRNA-181b, miRNA345 e RNU44 nas 94 amostras de queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio e nas amostras de mucosa bucal normal, para o *pool*, foi então realizada a amplificação do cDNA.

Por meio dos ensaios de RT-qPCR, foi realizada a quantificação da expressão dos miRNAs nos casos selecionados, de acordo com o método de comparação $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão relativa dos miRNAs foi obtida a partir da média da expressão do miRNA selecionado e da média da expressão do RNA endógeno, RNU44 (ΔC_t). A quantificação relativa final (Rq) dos miRNAs nas amostras de queilites e carcinomas foi classificada como um aumento ou diminuição da expressão de miRNA, em relação à expressão da amostra calibradora (*pool* de mucosa bucal normal), e determinada pelo seguinte valor (BRITO, B. L. et al., 2016):

Baixa/ Diminuição da expressão: $\leq 0,5$

Alta/ Aumento da expressão: $\geq 2,0$

As amostras com expressão entre 0,5 e 2,0 não foram consideradas como alteradas em relação a mucosa bucal normal.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAs

A análise da expressão relativa do miRNA-181b mostrou que em 52,6% das queilites actínicas sem displasia epitelial houve um aumento da expressão deste miRNA, enquanto que 26,3% dos pacientes com queilite actínica sem displasia epitelial apresentou uma diminuição da expressão de miRNA-181b, em relação à expressão do *pool*, formado por amostras de mucosa bucal normal. Já para o grupo das queilites actínicas com displasia epitelial, observou-se que houve um aumento da expressão de miRNA-181b em 3,1% dos pacientes e uma diminuição da expressão em 31,3% dos pacientes. Em relação aos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, notou-se um aumento da expressão de

miRNA-181b em 16,7% dos pacientes e a diminuição foi observada em 35,7%, conforme ilustrado na Tabela 7 e Figura 10.

O miRNA-21 apresentou menor expressão em 42,1% dos pacientes com queilites actínicas sem displasia epitelial, enquanto 21,1% desses pacientes apresentaram a maior expressão relativa do miRNA-21, conforme pode-se observar na Tabela 7 e Figura 10. Nas queilites actínicas com displasia epitelial observou-se que 65,6% dos pacientes apresentaram uma menor expressão do miRNA-21, enquanto que em 9,4% a expressão foi alta, quando comparada à expressão da amostra calibradora, formada pelo pool de mucosa bucal normal. Nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, houve uma maior expressão de miRNA-21 em 21,4% dos pacientes, enquanto que em 33,3% desses a expressão estava diminuída.

A expressão do miRNA-31 apresentou-se elevada em 47,4% dos pacientes com queilites actínicas sem displasia epitelial, sendo que 36,8% desses pacientes apresentaram uma menor expressão do miRNA-31. Nas queilites actínicas com displasia epitelial, observou-se que 18,8% dos pacientes apresentaram a maior e menor expressão do miRNA-31. Para os carcinomas espinocelulares de lábio inferior, houve uma maior expressão do miRNA-31 em 16,7% dos pacientes, enquanto que 33,3% dos pacientes com câncer de lábio apresentou menor expressão deste miRNA. Estes resultados relativos à expressão de miRNA-31 estão ilustrados na Tabela 7 e Figura 10.

O aumento da expressão do miRNA-345 foi observado em 47,4% dos pacientes com queilites actínicas sem displasia epitelial e em 26,3% desses pacientes, a expressão do miR-345 estava diminuída, quando comparados aos valores médios relativos à amostra de mucosa bucal normal. Nos pacientes com queilites actínicas com displasia epitelial, a expressão do miR-345 estava aumentada em 6,3% dos pacientes e em 15,6% houve uma menor expressão. Já em relação aos pacientes com carcinomas espinocelulares de lábio inferior, 33,3% apresentaram uma diminuição da expressão do miRNA-345, enquanto em 16,7% a expressão foi maior deste miRNA, conforme pode-se observar na Tabela 7 e Figura 10.

A análise conjunta da expressão dos miRNAs (miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345) nas queilites actínicas sem displasia epitelial, com displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de boca está ilustrado na Figura 11.

Tabela 7 - Expressão relativa dos miRNAs 181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, em comparação com as amostras de mucosa bucal normal. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

	Queilite Actínica sem displasia epitelial	Queilite Actínica com displasia epitelial	CEC
miRNA-181b			
Diminuição	5 (26,3%)	10 (31,3%)	15 (35,7%)
Normal	4 (21,1%)	21 (65,6%)	20 (47,6%)
Aumento	10 (52,6%)	1 (3,1%)	7 (16,7%)
miRNA-21			
Diminuição	8 (42,1%)	21 (65,6%)	14 (33,3%)
Normal	7 (36,8%)	8 (25%)	19 (45,2%)
Aumento	4 (21,1%)	3 (9,4%)	9 (21,4%)
miRNA-31			
Diminuição	7 (36,8%)	6 (18,8%)	14 (33,3%)
Normal	3 (15,8%)	20 (62,6%)	21 (50%)
Aumento	9 (47,4%)	6 (18,8%)	7 (16,7%)
miRNA-345			
Diminuição	5 (26,3%)	5 (15,6%)	14 (33,3%)
Normal	5 (26,3%)	25 (78,1%)	21 (50%)
Aumento	9 (47,4%)	2 (6,3%)	7 (16,7%)
TOTAL	19	32	42

N: número de pacientes; CEC: carcinomas espinocelulares de lábio.

Figura 10 - Análise da expressão relativa dos miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 nas amostras de queilites actínicas sem (QSD) e com displasia epitelial (QCD), e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC). As barras representam a porcentagem de pacientes que apresentaram diminuição da expressão, aumento da expressão e expressão equivalente à da mucosa bucal normal

Figura 11 - Análise conjunta da expressão relativa dos miRNAs nas amostras de queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. As barras representam a distribuição do número de pacientes com diminuição da expressão, aumento da expressão e expressão equivalente à da mucosa bucal normal

5.5 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO QUANTITATIVA DOS miRNAs NAS QUEILITES ACTÍNICAS E NOS CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA

A quantificação dos diferentes miRNAs (miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31, miRNA-345) nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio foi comparada estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, conforme pode-se observar nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 e Figuras 12, 13, 14 e 15.

A mediana da expressão relativa do miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial foi de 2,03 com um valor mínimo de 0,14 e um valor máximo de 11,56. Nas queilites actínicas com displasia epitelial, a mediana da expressão relativa deste miRNA foi de 0,72 com uma variação mínima de 0,20 e máxima de 3,05. Nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, observou-se uma mediana de expressão de 0,65 com variação máxima de 12,44 e mínima de 0,08. Não houve diferença estatisticamente significativa na mediana da expressão relativa de miRNA-181b entre as queilites actínicas sem e com displasia epitelial e o CEC de lábio inferior, conforme ilustrado na Tabela 8 e Figura 12.

A distribuição da expressão relativa do miRNA-21 nas queilites actínicas sem displasia epitelial apresentou uma mediana de 0,78 sendo o valor máximo de 15,94 e mínimo de 0,05. Nas queilites actínicas com displasia epitelial foi encontrado uma variação máxima de 3,50 e mínima de 0,05, sendo a mediana de 0,38, enquanto que nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, a mediana de expressão do miRNA-21 foi 0,85, sendo o valor máximo e mínimo de 10,11 e 0,08, respectivamente. Uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,022$) entre a expressão relativa do miRNA-21 nas queilites actínicas com displasia epitelial e os carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi detectada pelo teste de Kruskal-Wallis, como descrito na Tabela 9 e Figura 13.

Em relação à expressão relativa do miRNA-31 nas queilites actínicas sem displasia epitelial, nota-se que o valor da mediana foi de 1,80 com variação mínima de 0,05 e máxima de 14,31. Nas queilites actínicas com displasia epitelial, houve uma expressão relativa máxima de 3,64 e mínima de 0,24, sendo a mediana de 0,88. Para os carcinomas espinocelulares de lábio inferior, a mediana da expressão relativa do miRNA-31 foi de 0,84 com uma variação máxima de 28,82 e mínima de 0,02, conforme pode ser visualizado na Tabela 10 e Figura 14. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre a expressão relativa do miRNA-31 nas queilites actínicas e no carcinoma espinocelular de lábio.

Uma expressão relativa do miRNA-345 de 1,32 foi observada na mediana das queilites actínicas sem displasia epitelial, sendo o valor máximo de 10,48 e o mínimo de 0,14. Nas queilites actínicas com displasia epitelial, a mediana da expressão relativa encontrada foi de 0,85 variando de 3,46 (máximo) a 0,25 (mínimo), enquanto que nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior a variação máxima foi de 11,0 e a mínima de 0,14 sendo a mediana da expressão relativa do miRNA-345 de 1,02. As diferenças da expressão relativa de miRNA-345 entre as queilites actínicas com e sem displasia epitelial e os carcinomas espinocelulares de lábio inferior não foram estatisticamente significativas, como pode-se observar na Tabela 11 e Figura 15.

Tabela 8 - Distribuição da expressão relativa dos miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

miRNA-181b					
	Mediana	1º Quartis	3º Quartis	Mínimo	Máximo
QASD	2,03	0,62	3,89	0,14	11,56
QACD	0,72	0,38	1,15	0,20	3,05
CEC	0,65	0,36	1,39	0,08	12,44

n: número de pacientes; **QASD:** queilite actínica sem displasia epitelial; **QACD:** queilite actínica com displasia epitelial; **CEC:** carcinomas espinocelulares de lábio; **p:** nível descritivo do teste Kruskal-Wallis.

Figura 12 - Distribuição da expressão relativa de miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC)

Tabela 9 - Distribuição da expressão relativa do miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345), nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

miRNA-21						
	Mediana	1º Quartis	3º Quartis	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
QASD	0,78 ^{ab}	0,15	1,94	0,05	15,94	0,022
QACD	0,38 ^a	0,23	0,77	0,05	3,50	
CEC	0,85 ^b	0,42	2,00	0,08	10,11	

n: número de pacientes; **QASD:** queilite actínica sem displasia epitelial; **QACD:** queilite actínica com displasia epitelial; **CEC:** carcinomas espinocelulares de lábio inferior; ***p*:** nível descritivo do teste Kruskal-Wallis. Grupos com letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

Figura 13 - Distribuição da expressão relativa de miRNA-21 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC)

Tabela 10 - Distribuição da expressão relativa do miRNA-31 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

miRNA-31					
	Mediana	1º Quartis	3º Quartis	Mínimo	Máximo
QASD	1,80	0,18	2,90	0,05	14,31
QACD	0,88	0,63	1,48	0,24	3,64
CEC	0,84	0,20	1,69	0,02	28,82

n: número de pacientes; **QASD:** queilite actínica sem displasia epitelial; **QACD:** queilite actínica com displasia epitelial; **CEC:** carcinomas espinocelulares de lábio inferior; **p:** nível descritivo do teste Kruskal-Wallis.

Figura 14 - Distribuição da expressão relativa de miRNA-31 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC)

Tabela 11 - Distribuição da expressão relativa do miRNA-345 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (n=19), com displasia epitelial (n=32) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (n=42). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP, 2007 a 2017. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, SP, 2000 a 2017

miRNA-345						
	Mediana	1º Quartis	3º Quartis	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
QASD	1,32	0,42	3,55	0,14	10,48	
QACD	0,85	0,57	1,46	0,25	3,46	0,499
CEC	1,02	0,32	1,59	0,14	11,00	

n: número de pacientes; **QASD:** queilite actínica sem displasia epitelial; **QACD:** queilite actínica com displasia epitelial; **CEC:** carcinomas espinocelulares de lábio inferior; ***p*:** nível descritivo do teste Kruskal-Wallis.

Figura 15 - Distribuição da expressão relativa de miRNA-345 nas queilites actínicas sem displasia epitelial (QASD), com displasia epitelial (QACD) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (CEC)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A identificação de lesões potencialmente malignas, que ocorrem na boca e possuem um maior risco de evolução para o câncer, ainda é um desafio, visto que os atuais métodos de avaliação, baseados na graduação da displasia epitelial são entremeados de subjetividade intra e inter-examinadores, apresentam pobre e variada reprodutibilidade, além de valor prognóstico limitado (GALE, 2005; SPEIGHT, 2007; SPEIGHT et al., 2015; GARCIA et al., 2016; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018; NAGATA et al., 2018). Atualmente, o exame clínico e histopatológico, incluindo a graduação da displasia epitelial, constituem o método padrão utilizados para predizer o potencial de transformação maligna das lesões, pois ainda não existem biomarcadores validados que possam auxiliar na identificação dessas lesões (SPEIGHT, 2007; GARCIA et al., 2016; EL-SAKKA; KUJAN; FARAH, 2018; NAGATA et al., 2018).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, sugeriu o uso de um sistema binário de classificação das displasias epiteliais orais em baixo ou alto grau de transformação maligna, visando melhorar a reprodutibilidade e o consenso na avaliação e graduação das displasias epiteliais. Ressalta-se, porém, que este sistema binário ainda requer uma validação antes de ser aplicado, rotineiramente, na classificação das displasias epiteliais que ocorrem na mucosa bucal (REIBEL, 2017). No estudo de Nagata et al. (2018), que utilizou os dois métodos de classificação das displasias epiteliais, os autores afirmaram que existem discrepâncias entre os dois métodos, pois dentre as lesões consideradas como de baixo risco de malignização pelo sistema binário sugerido pela OMS em 2017, algumas apresentavam desde a displasia epitelial leve até a moderada e a intensa, quando classificada pelo método anteriormente proposto pela OMS, em 2005.

Assim sendo, no presente estudo, optamos por utilizar na análise das queilites actínicas, a classificação da displasia epitelial graduando em leve, moderada e intensa, conforme proposto pela Organização Mundial da Saúde, em 2005. Além disso, todos os carcinomas espinocelulares de lábio selecionados para esta investigação apresentavam invasão tecidual local, porém sem comprometimento linfonodal, sendo clinicamente classificados como T1N0M0.

As queilites actínicas são consideradas lesões potencialmente malignas, que afetam principalmente o lábio inferior, com risco eminente de crescimento celular descontrolado e transformação para o carcinoma espinocelular de lábio (VIEIRA et al., 2012; PILATI et al.,

2017). Mesmo com sua etiologia bem estabelecida relacionada à exposição cumulativa da radiação ultravioleta e com possibilidade de prevenção por ocorrer numa região da boca de fácil acesso e visualização, em países tropicais como o Brasil, as incidências de queilite actínica e do câncer de lábio inferior apresentam considerável importância (VIEIRA et al., 2012; GARCIA et al., 2016). Além disso, as taxas de transformação maligna das queilites actínicas, a presença e a intensidade da displasia epitelial aumentam a chance de progressão desta lesão para o carcinoma espinocelular de lábio (GARCIA et al., 2016; PILATI et al., 2017; NAGATA et al., 2018), sendo este um dos fatores que motivou a realização desta investigação.

No presente estudo, a partir dos dados clínicos e demográficos da população analisada, notou-se que a maioria dos pacientes com queilites actínicas sem e com displasia epitelial eram homens da cor branca, com idade entre 34 e 88 anos, informações semelhante à população brasileira analisada por Garcia et al. (2016) e por Nagata et al. (2018). Em relação aos carcinomas espinocelulares de lábio, houve um predomínio de pacientes do gênero masculino (54,76%), sendo todos pacientes brancos (100%). A média de idade conjunta dos pacientes com queilites actínicas e daqueles com carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi de 62 anos, dados esses semelhantes aos encontrados por Garcia et al. (2016) e por Nagata et al. (2018).

Quanto aos fatores de risco para o desenvolvimento das queilites actínicas e do câncer de lábio, observou-se que a exposição crônica ao sol ocorreu em 46,67% dos pacientes com queilites actínicas sem displasia epitelial, 40% dos pacientes com queilites actínicas com displasia epitelial e 16% dos pacientes com câncer de lábio. Entretanto, como a ocupação foi uma informação frequentemente ausente nos prontuários médicos de nossa amostra, provavelmente, estes valores não refletem com precisão o perfil da população estudada no que se refere a porcentagem de pacientes que apresentavam exposição crônica ao principal fator de risco para as lesões investigadas, ou seja, a radiação ultravioleta.

Em relação às amostras de biopsias excisionais de queilites actínicas selecionadas neste estudo, junto à Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), deve ser ressaltado que o protocolo adotado nesta instituição para o tratamento destas lesões potencialmente malignas, preconiza a vermelhonectomia do lábio inferior. Embora nem todas as instituições preconizem este protocolo de tratamento, Vieira et al. (2012) afirmaram que somente a análise da peça cirúrgica obtida pela vermelhonectomia permite uma análise histopatológica completa, englobando todo o tecido e as margens cirúrgicas, com maior possibilidade de detecção de uma possível área de invasão tumoral que poderia passar despercebida na análise do patologista. As amostras de queilites actínicas, obtidas da Faculdade de Odontologia de Bauru, foram

selecionadas a partir de biopsias incisionais, aplicando-se os critérios de inclusão, como material emblocado em parafina suficiente para análise microscópica e extração de RNA.

Microscopicamente, as características observadas na maioria das queilites actínicas de nossa amostra apresentavam um epitélio hiperplásico (76,47%), ortoqueratinizado (70,59%), com a presença de transformação basofílica do colágeno (84,31%) e com predomínio de um infiltrado inflamatório crônico mononuclear (88,23%), confirmando assim as observações de outros autores (VIEIRA et al., 2012; GARCIA et al., 2016).

Com relação a classificação da displasia epitelial presente nas queilites actínicas observou-se um predomínio da displasia epitelial de grau moderado (43,14%) em nossa amostra, e de acordo com o sistema binário proposto pela OMS em 2017, essas displasias epiteliais moderadas poderiam ser classificadas como de baixo risco de malignização. Considerando a discrepância observada por Nagata et al. (2018) entre a classificação das displasias epiteliais de 2005 e as sugestões propostas pela OMS em 2017, particularmente para as queilites actínicas, concordamos com outros autores (SPEIGHT et al., 2007; GARCIA et al., 2016; PILATI et al., 2017; NAGATA et al., 2018) que afirmam que a busca de marcadores moleculares mais específicos para graduação precisa da displasia epitelial se faz necessária, com a finalidade de obter-se um diagnóstico e prognóstico mais seguro da possibilidade de evolução dessas lesões potencialmente malignas para o câncer bucal.

Assim sendo, visando trazer contribuições relacionadas à carcinogênese bucal, o presente estudo foi proposto e motivado, também pelas evidências recentes de que as mudanças nos níveis de expressão os miRNAs estão associados ao desenvolvimento e às diferentes fases de evolução do câncer (SUN et al., 2014; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; RAMASSONE et al., 2018; TROIANO et al., 2018; WANG; HE; ZHOU, 2018).

Tendo em vista as limitações observadas para classificação das displasias epiteliais, assim como, da displasia epitelial severa e o carcinoma espinocelular de lábio inferior, buscamos verificar neste trabalho a expressão dos miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. A seleção destes miRNAs foi realizada com base em estudos prévios de leucoplasia bucal, outra lesão potencialmente maligna, (CERVIGNE et al., 2009; YANG et al., 2011; XIAO et al., 2012; BRITO et al., 2014; MAIMAITI et al., 2015; ZHU et al., 2015; HUNG et al., 2016), onde foram associados com a evolução destas lesões para o carcinoma espinocelular de boca. Deve ser ressaltado que, os miRNAs selecionados para nosso estudo possuem um papel importante na carcinogênese bucal, porém, ainda não foram investigados em queilites actínicas e no câncer

de lábio inferior. Assim sendo, um dos objetivos do presente trabalho foi conhecer o padrão de expressão destes miRNAs, nas lesões potencialmente malignas e no câncer, que ocorrem especificamente na região do lábio inferior.

Para a quantificação da expressão de miRNA em nossa amostra de queilites actínicas sem e com displasia epitelial, e de carcinomas espinocelulares de lábio inferior, realizamos a extração do material na região do epitélio labial, a partir de amostras de lesões fixadas em formol e embocadas em parafina. Nossos resultados corroboram com observações prévias de Cervigne et al. (2009) e de Siow et al. (2014), afirmando que os tecidos incluídos em parafina podem ser utilizados para análise da expressão de miRNAs, pois estes não são afetados pela fixação em formol. Os autores (SIOW et al., 2014) justificaram que esta adequada conservação do material genético relacionada aos miRNAs ocorre em decorrência de seu tamanho menor (aproximadamente 20 nucleotídeos) e à estabilidade de sua estrutura molecular.

A expressão relativa ($\Delta\Delta Ct$) dos miRNAs analisados em cada amostra foi classificada, de acordo com os valores apresentados, como expressão aumentada, equivalente à mucosa bucal normal ou diminuída (BRITO B. L. et al., 2016). Considerando esta classificação, observamos que a expressão relativa do miRNA-181b estava aumentada em 52,6% das queilites actínicas sem displasia epitelial, enquanto que na maioria das queilites actínicas com displasia epitelial (65,6%) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (47,65%) a expressão foi equivalente à da mucosa bucal normal (Tabela 7 e Figura 10). A distribuição dos valores quantitativos das amostras para o miRNA-181b, comparada pelo teste de Kruskal-Wallis, mostra que os valores da mediana do miRNA-181b nas queilites actínicas sem displasia epitelial foi de 2,03, nas queilites actínicas com displasia epitelial foi 0,72 e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, este valor foi de 0,65 (Tabela 8). Ou seja, nota-se que houve, mesmo sem diferença estatisticamente significativa, uma tendência à diminuição da expressão do miRNA-181b, com o aumento das alterações celulares genotípicas que caracterizavam a evolução para o câncer. Nossos resultados contrastam com aqueles obtidos em leucoplasias bucais e carcinomas espinocelulares de boca, onde o aumento da expressão do miRNA-181b foi verificado nas neoplasias malignas mais avançadas (CERVIGNE et al., 2009; YANG et al., 2011; YANG et al., 2013; BRITO et al., 2014; DENG et al., 2016). Por outro lado, corroboramos com os achados de Brito et al. (2014), que mesmo com a super-regulação do miRNA-181b, não foram observados associação significativa da expressão de miRNA-181b com o grau de displasia epitelial em leucoplasias bucais e com os resultados de Yang et al. (2013) que identificaram, a partir da análise da saliva dos pacientes, uma redução da expressão

do miRNA-181b nas leucoplasias bucais que progrediam para o câncer e nos carcinomas espinocelulares de boca.

Um dos resultados mais interessantes obtidos no presente estudo foi a expressão do miRNA-21 nas queilites actínicas com displasia epitelial e no CEC de lábio. A distribuição dos valores quantitativos do miRNA-21 (Tabela 9 e Figura 13) mostra que houve um aumento, estatisticamente significativo ($p=0,022$), na mediana da expressão de miRNA-21 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior quando comparado às queilites actínicas com displasia epitelial (Tabela 9 e Figura 13). Não conseguimos detectar diferenças significativas quando comparamos os grupos acima com as queilites actínicas sem displasia epitelial e, isto provavelmente ocorreu porque tínhamos valores discrepantes da expressão do miRNA-21, o que influenciou o valor da mediana impossibilitando uma análise mais precisa.

Nossos resultados da expressão do miRNA-21 confirmam estudos prévios, em carcinomas hepatocelulares (MENG et al., 2007) e em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (LI et al., 2009; LIU, X. et al., 2009; CHEN et al., 2013; HEDBACK et al., 2014; SUN et al., 2014), que descreveram uma associação entre a maior expressão de miRNA-21 com a progressão destas neoplasias malignas. Este aumento da expressão do miRNA-21 como descrito no presente estudo, foi igualmente reportado nas leucoplasias bucais (CERVIGNE et al., 2009, BRITO et al., 2014; ZHU et al., 2014; HUNG et al., 2015) e nos carcinomas espinocelulares de boca (LI et al., 2009; SIOW et al., 2014; ZHOU et al., 2014; TROIANO et al., 2018) sugerindo, portanto, um papel deste miRNA na evolução das lesões potencialmente malignas para o câncer de boca. Considerando ainda os genes alvo (TPM-1, PTEN, PDCD4) regulados pelo miRNA-21, que desempenham importantes funções na carcinogênese, como inibição da apoptose e controle da proliferação celular, podemos sugerir que o aumento da expressão de miRNA-21 pode auxiliar na identificação de pacientes com queilites actínicas com displasia epitelial com maior risco de evolução para o carcinoma espinocelular de lábio inferior. Por ser este estudo pioneiro na investigação do miRNA-21 nas queilites actínicas e no câncer de lábio inferior, e em função da reduzida amostra de queilites actínicas com displasia epitelial analisada, outras investigações se fazem necessárias para confirmarem nossos resultados.

O aumento da expressão relativa do miRNA-31 foi observado na maioria das queilites actínicas sem displasia epitelial (47,4%), entretanto, nas queilites actínicas com displasia epitelial (62,6%) e nos CEC (50%) a expressão deste miRNA foi equivalente àquela observada na mucosa bucal normal (Tabela 7 e Figura 10). Quando comparamos a mediana da expressão do miRNA-31 entre as diferentes lesões estudadas, verificamos que, embora sem diferença

estatisticamente significativa, houve uma tendência a diminuição desta expressão nas queilites actínicas com displasia epitelial (mediana = 0,88) e nos CEC de lábio (mediana = 0,84), comparado com as queilites actínicas sem displasia epitelial (mediana = 1,80), conforme pode ser observado na Tabela 10 e Figura 14.

Os resultados descritos acima para o miRNA-31 contrastam com aqueles de Xiao et al. (2012) e Maimaiti et al. (2015) ao sugerirem que este miRNA é altamente expresso em leucoplasias bucais com risco de transformação maligna, e de Siow et al. (2014), onde a expressão do miRNA-31 foi significativamente maior nos estágios iniciais do carcinoma espinocelular de boca, comparado aos estágios mais avançados da doença, provavelmente, participando da inibição de vias regulatórias da oncogênese nos estágios iniciais do câncer. Também foi observada esta alta expressão em amostras de saliva e plasma de pacientes com carcinomas espinocelulares de boca (LIU C. J. et al., 2010; LIU C. J. et al., 2012). Entretanto, nossos resultados estão próximos àqueles de Hung et al. (2015) que sugeriram que uma maior expressão do miRNA-31 pode ocorrer antes do desenvolvimento da displasia epitelial, pois não encontraram associação da expressão deste miRNA com o grau de displasia epitelial em amostras de saliva de lesões potencialmente malignas, como as leucoplasias bucais. Com base em nossos resultados e nas discrepâncias dos trabalhos encontrados na literatura científica, concordamos que a expressão do miRNA-31 merece ser melhor analisada em queilites actínicas e no câncer de lábio inferior para um melhor entendimento de sua participação nas fases iniciais ou avançadas da carcinogênese labial.

O outro miRNA avaliado no presente trabalho foi o miRNA-345 sendo que sua expressão relativa aumentada foi observada na maioria das queilites actínicas sem displasia epitelial (47,4% das lesões). Por outro lado, na maior parte das queilites actínicas com displasia epitelial (78,1%) e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (50%), a expressão relativa do miRNA-345 foi compatível com aquela da mucosa bucal normal (Tabela 7 e Figura 10). A análise pelo método de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre a mediana da expressão do miRNA-345 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial e no carcinoma espinocelular de lábio inferior (Tabela 11 e Figura 15). Porém, se compararmos os valores da mediana, na base numérica encontrada em cada grupo de lesões estudadas, verificamos, embora sem diferença estatisticamente significativa, uma tendência de pequena redução da expressão do miRNA-345 nas queilites actínicas com displasia epitelial e no CEC de lábio inferior se comparado com as queilites actínicas sem displasia epitelial.

A análise do miRNA-345 em lesões potencialmente malignas de boca como as leucoplasias bucais, foram realizados em poucos estudos (CERVIGNE et al., 2009; BRITO et al., 2014), sendo descrito um aumento da expressão deste miRNA nestas lesões, o que contrasta com nossos resultados. Estes autores (CERVIGNE et al., 2009; BRITO et al., 2014), sugeriram que o miRNA-345 pode estar envolvido na proliferação e invasão das células malignas, porém, não investigaram detalhadamente seu papel na carcinogênese bucal. Assim sendo, reforçamos que o envolvimento do miRNA-345 em lesões potencialmente malignas como as leucoplasias bucais e as queilites actínicas assim como no câncer de boca, requer outros estudos.

Concluindo, os resultados de nosso estudo são pioneiros na análise da expressão dos miRNAs 181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345, em lesões potencialmente malignas, como as queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Os diferentes níveis de expressão destes miRNAs, identificados no presente trabalho, fortemente reforçam a necessidade de outras investigações para conhecer sua participação precisa na carcinogênese bucal, particularmente na evolução das lesões potencialmente malignas para o câncer de boca. Além disso, com base em nossos resultados sugerimos que o aumento da expressão do miRNA-21 pode ajudar a identificar as queilites actínicas com displasia epitelial que apresentam um risco de evolução para o carcininocelular de lábio inferior.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir da análise da expressão de miRNAs nas queilites actínicas com e sem displasia epitelial, e nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificamos que:

- a) diferentes níveis de expressão dos miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 foram detectados no epitélio bucal das lesões investigadas;
- b) uma maior expressão dos miRNA-181b, miRNA-31 e miRNA-345 foi observada na maioria das queilites actínicas sem displasia epitelial;
- c) nas queilites actínicas com displasia epitelial e nos CEC de lábio inferior, a expressão do miRNA-181b, miRNA-31 e miRNA-345, foi equivalente a expressão destes miRNAs na mucosa bucal com padrão de normalidade na maior parte das amostras;
- d) o miRNA-21 apresentou uma diminuição de sua expressão na maior parte das queilites actínicas com displasia epitelial;
- e) o aumento da expressão do miRNA-21 nos CEC de lábio inferior foi estatisticamente significativo ($p=0,022$) quando comparado com às queilites actínicas com displasia epitelial.

Com base nos resultados acima, podemos concluir que os miRNA-181b, miRNA-21, miRNA-31 e miRNA-345 são expressos no epitélio bucal da região de lábio e o aumento da expressão do miRNA-21 pode ajudar a identificar as queilites actínicas com displasia epitelial que apresentam um risco de evolução para o carcinoma espinocelular de lábio inferior.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.
- BRITO, B. L. et al. Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 9, p. 647-654, 2016.
- BRITO, J. A. et al.. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 3, p. 211-216, 2014.
- CAO, M. et al. MicroRNAs as effective surrogate biomarkers for early diagnosis of oral cancer. **Clin Oral Investig**, v. 22, n. 2, p. 571-581, 2018.
- CERVIGNE, N. K. et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 24, p. 4818-4829, 2009.
- CHATTOPADHYAY, E. et al. Expression deregulation of mir31 and CXCL12 in two types of oral precancers and cancer: importance in progression of precancer and cancer. **Sci Rep**, v. 6, n., p. 32735, 2016.
- CHEN, D. et al.. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **J Oral Maxillofac Res**, v. 4, n. 1, p. e2, 2013.
- COURTHOD, G. et al. The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5704-5716, 2014.
- DENG, Z. Y. et al. Investigation of the association between miR181b, Bcl2 and LRIG1 in oral verrucous carcinoma. **Mol Med Rep**, v. 14, n. 4, p. 2991-2996, 2016.
- EL-SAKKA, H.; KUJAN, O.; FARAH, C. S. Assessing miRNAs profile expression as a risk stratification biomarker in oral potentially malignant disorders: A systematic review. **Oral Oncol**, v. 77, n., p. 57-82, 2018.
- GALE, N. P. et al. In: Press, L. I. (Ed.). **WHO Classification of tumors. Pathology and Genetics: head and neck tumors**. France, 2005,
- GARCIA, N. G. et al. Loss of cytokeratin 10 indicates malignant transformation in actinic cheilitis. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 4, p. 745-752, 2016.

- HEDBACK, N. et al. MiR-21 expression in the tumor stroma of oral squamous cell carcinoma: an independent biomarker of disease free survival. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95193, 2014.
- HUNG, K. F. et al. MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. **Oral Oncol**, v. 53, n., p. 42-47, 2016.
- KALAVREZOS, N.; SCULLY, C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. **Dent Update**, v. 42, n. 9, p. 866-868, 871-864, 877, 2015.
- LI, J. et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 12, p. 3998-4008, 2009.
- LIU, C. J. et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. **Oral Dis**, v. 16, n. 4, p. 360-364, 2010.
- LIU, C. J. et al. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 34, n. 2, p. 219-224, 2012.
- LIU, X. et al. MicroRNA profiling and head and neck cancer. **Comp Funct Genomics**, v., n., p. 837514, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MACLELLAN, S. A. et al. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. **Cancer Med**, v. 1, n. 2, p. 268-274, 2012.
- MAIMAITI, A. et al. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets associated with the malignant transformation of oral leukoplakia. **Gene**, v. 558, n. 2, p. 271-277, 2015.
- MENG, F. et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 647-658, 2007.
- MIN, A. et al. MicroRNAs as Important Players and Biomarkers in Oral Carcinogenesis. **Biomed Res Int**, v. 2015, n., p. 186904, 2015.
- MOLLAEI, H.; SAFARALIZADEH, R.; ROSTAMI, Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. **J Cell Physiol**, v., n., p., 2019.
- NAGATA, G. et al. Evaluation of epithelial dysplasia adjacent to lip squamous cell carcinoma indicates that the degree of dysplasia is not associated with the occurrence of invasive carcinoma in this site. **J Cutan Pathol**, v., n., p., 2018.

PILATI, S. et al. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. **Oral Dis**, v. 23, n. 2, p. 219-224, 2017.

RAMASSONE, A. et al. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 2, p., 2018.

REIBEL, J. G. et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: Press, I. (Ed.). **WHO Classification of Head and Neck Tumors**. Lyon. France, 2017,

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 3, p. 203-222, 2017.

SLOW, M. Y. et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. **Oral Dis**, v. 20, n. 4, p. 345-351, 2014.

SPEIGHT, P. M. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. **Head Neck Pathol**, v. 1, n. 1, p. 61-66, 2007.

SPEIGHT, P. M. et al. Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 120, n. 4, p. 474-482 e472, 2015.

SUN, Z. et al. miR-21 increases the programmed cell death 4 gene-regulated cell proliferation in head and neck squamous carcinoma cell lines. **Oncol Rep**, v. 32, n. 5, p. 2283-2289, 2014.

TROIANO, G. et al. Predictive Prognostic Value of Tissue-Based MicroRNA Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Dent Res**, v. 97, n. 7, p. 759-766, 2018.

VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-114, 2012.

WANG, R. H.; HE, L. Y.; ZHOU, S. H. The role of gene sculptor microRNAs in human precancerous lesions. **Onco Targets Ther**, v. 11, n., p. 5667-5675, 2018.

XIAO, W. et al. Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38648, 2012.

YAN, Z. Y. et al. Integrated Analysis and MicroRNA Expression Profiling Identified Seven miRNAs Associated With Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Cell Physiol**, v. 232, n. 8, p. 2178-2185, 2017.

YANG, C. C. et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 5, p. 397-404, 2011.

YANG, Y. et al. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. **BMC Cancer**, v. 13, n., p. 129, 2013.

ZHANG, H. et al. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Identified Based on Gene Expression Data and MicroRNA-mRNA Network Analysis. **Comput Math Methods Med**, v. 2017, n., p. 9803018, 2017.

ZHOU, X. et al. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. **Oncol Rep**, v. 31, n. 5, p. 2173-2180, 2014.

ZHU, G. et al. Identification of Gene and MicroRNA Signatures for Oral Cancer Developed from Oral Leukoplakia. **Biomed Res Int**, v. 2015, n., p. 841956, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Formulário utilizado na coleta dos dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com queilites actínicas, carcinoma espinocelular de lábio inferior e sem doença

REGISTRO DA COLETA DE DADOS

Faculdade de Odontologia de Bauru / USP

Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia - Área de Concentração em Patologia Bucal

Faculdade de Medicina de Botucatu/ Unesp

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Botucatu

Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente malignas e no câncer de lábio.

Dra. Denise Tostes Oliveira, Ms. Agnes Assao, Dra. Eliana Maria Minicucci; Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____
2. RGH: _____
3. Idade: _____ anos
4. Gênero: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino
5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-não branca
6. Profissão: _____

Cirurgia:

7. Data da biópsia: ____/____/____
8. Data da cirurgia: ____/____/____

Análise Microscópica:

9. Número do AP: _____
10. Diagnóstico Anatomopatológico: _____
11. Grau de displasia: _____
12. Atipia celular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
13. Alterações arquitetura celular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
14. Margens: ☐ 0- Livres ☐ 1- Comprometidas

ANEXO B – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente malignas e no câncer de lábio.

Pesquisador: Agnes Assao

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 63879016.5.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.929.331

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa "Análise da expressão de miRNAs em lesões potencialmente malignas e no câncer de lábio" apresenta como pesquisador responsável Agnes Assao, orientada pela Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, e como integrantes da pesquisa Cláudia Malheiros Coutinho Camillo e Maria Aparecida Custodio Domingues. Como desenho apresenta: Análise da expressão de miRNAs em 45 queilites actínicas com diferentes graus de displasia, 30 carcinomas espinocelulares de lábio e 15 mucosa bucal normal, a fim de comparar a expressão de alguns mi-RNA (a especificar) no epitélio normal, displásico e neoplásico da região do lábio; correlacionar as alterações da expressão destes miRNA com a transformação maligna das queilites actínicas. A amostra a ser utilizada será cedida pelo Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina e Botucatu, UNESP. A análise do miRNA será realizada em parceria com o Centro Integrado de Pesquisas do Hospital do Câncer- A.C. Camargo.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a expressão de alguns mi-RNA ((miR-21, miR-31, miR-181b e miR-345) no epitélio normal, displásico e neoplásico da região do lábio e correlacionar com as alterações da expressão

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 1.929.331

destes mi-RNA (miR-21, miR-31, miR-181b e miR-345) com a transformação maligna das queilites actínicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa será realizada a partir de blocos de parafina, sendo que os riscos da extração dos miRNAs a partir destes blocos dependem do estado de conservação destas peças. No entanto, a partir de um estudo piloto realizado no centro integrado de pesquisas do Hospital do Câncer A.C. Camargo, conseguiu-se a extração desses miRNAs.

Benefícios:

A identificação da expressão de miRNAs alterados em lesões potencialmente malignas de boca poderiam prever a possível evolução da doença, e dessa forma, prevenir o paciente, por meio do diagnóstico precoce da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta-se bem detalhado, faz parte da linha de pesquisa da orientadora e não apresenta comprometimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados, inclusive de coparticipação.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 08.02.2017, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 1.929.331

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_783601.pdf	18/01/2017 17:28:29		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAGNES.docx	18/01/2017 17:27:23	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_CEP_Agnes.pdf	17/01/2017 14:15:58	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Botucatu_Agnes.pdf	17/01/2017 14:14:36	Agnes Assao	Aceito
Outros	QuestionarioTecnicoPesquisador.doc	24/11/2016 13:05:16	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_aquiescencia_depto.jpg	24/11/2016 13:03:31	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoCompromissoPesquisadorResultadosPesquisa.jpg	24/11/2016 13:01:59	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_coparticipante_unesp.pdf	23/11/2016 19:55:58	Agnes Assao	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_coparticipante_ACCamargo.pdf	23/11/2016 19:55:29	Agnes Assao	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	26/10/2016 19:35:02	Agnes Assao	Aceito
Outros	termo.pdf	29/09/2016 11:17:56	Agnes Assao	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 16 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

**Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador)**

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br