GILBERTO MENDES MENDERICO JÚNIOR

Expressão de micro-RNAs associados a invasão tumoral e prognóstico em carcinoma de células escamosas de cavidade oral

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e Medicina Perioperatória

Orientador: Prof. Dr. Leandro Luongo de Matos

SÃO PAULO 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Menderico Júnior, Gilberto Mendes

Expressão de micro-RNAs associados a invasão tumoral e prognóstico em carcinoma de células escamosas de cavidade oral / Gilberto Mendes Menderico Júnior. -- São Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e Medicina Perioperatória. Orientador: Leandro Luongo de Matos.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Boca 3.MicroRNAs 4.Carcinogênese 5. Prognóstico.

USP/FM/DBD-105/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

"Algumas batalhas são vencidas com espadas e lanças, outras com papel e caneta"

George R.R. Martin

À minha família, por estar ao meu lado desde os meus primeiros passos.

À minha esposa, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Leandro Luongo de Matos pela orientação, paciência e dedicação, que possibilitaram que esta tese se tornasse realidade.

Agradeço a meus pais, Lana e Gilberto, e minha irmã Vivian, por serem o exemplo da construção de um núcleo familiar sólido e humano.

À minha esposa Juliana Pastorelli Braga, cuja amizade, exemplo profissional e companheirismo me inspiram a ser uma pessoa melhor diariamente.

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP, aos colegas e aos Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea, Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski e Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão pelo acolhimento e ensinamento nesta casa, desde a residência médica até a pós-graduação.

À Disciplina de Patologia da FMUSP, aos colegas e aos Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, Dr. Evandro Sobroza de Mello pelos ensinamentos e apoio irrestrito a esta tese.

A todos da Faculdade de Ciências Médicas de Santos (Centro Universitário Lusíada), alunos, ex-alunos, corpo docente, coordenação e funcionários, por me ensinar a ser aluno, médico e professor. Arambacã!

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMABC, na figura da Dra. Jossi Ledo Kanda e todos colegas que tornam meu trabalho mais prazeroso e pelo apoio nesta tese. Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina do ABC, especialmente Thérèse Rachel Teodoro e Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal, pelo confecção dos microRNAs.

Aos pesquisadores do Laboratório de Investigação Médica 28 (LIM-28) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em especial Marina Ishikawa Pamela e Pâmela de Oliveira Soares, pelo apoio técnico.

Aos pesquisadores do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em especial Alda Wakamatsu e Aline K. Assato pelo apoio técnico na confecção dos TMAs e nos estudos imunoistoquímicos.

À Maria Helena Vargas pelo apoio na revisão de texto e diagramação desta tese.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Agradecimento Especial

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

pelo apoio que possibilitou a realização desta tese.

Processo número 2016/01740-6.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas Lista de figuras Lista de quadros Lista de tabelas Resumo Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
 3 REVISÃO DA LITERATURA 3.1 O Carcinoma da cavidade oral 3.2 Regulação do microambiente e da matriz extracelular por MicroRNAs 	7 8 16
3.2.1 Remodelamento da matriz extracelular	16
3.2.2 Regulação do microambiente por microRNA	23
3.2.3 Influência dos microRNAs no remodelamento da matriz	•
extracelular	31
4 MÉTODOS	35
4.1 Ética	36
4.2 Desenho do estudo	36
4.3 Métodos	38
4.3.1 Confecção do microarranjo tecidual (TMA)	38
4.3.2 I ecnica de imunoistoquímica	
4.3.3 Techica de delecção de microRivas	44
4.3.3.1 EXilação de concentração e diluição do PNA obtido	44 17
4.3.3.2 Quantinicação da concentração e diluição do TNA Oblido	، ب ۸۸
4 3 3 4 Amplificação do microRNA	49
4.3.3.5 Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase quantitativo (<i>RT-qPCR</i>) com o sistema <i>TaqMan MicroRNA</i>	
Assay-Array	49
4.3.3.6 Análise da expressão dos microRNAs e procedimentos de	
normalização	53
4.3.4 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	57
5.1 Caracterização dos grupos	58
5.2 Análise do perfil de microRNAs na diferenciação entre mucosa	
normal e o carcinoma de células escamosas da cavidade oral	60
5.3 Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos na mucosa normal e no carcinoma de células escamosas da	
cavidade oral	65

5.4	Análise do perfil de microRNAs na diferenciação entre os tumores superficiais e espessos da cavidade oral, em	
	comparação com a mucosa normal	70
5.5	5 Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos nos	
	tumores superficiais e espessos da cavidade oral, em	
	comparação com a mucosa normal	82
5.6	o Comparação entre os achados da expressão diferencial de	
	microRNAs e o perfil da expressão de marcadores	
	imunoistoquímicos no carcinoma de células escamosas da	
		87
5.7	Impacto clínico da expressao de microRNAs e de marcadores	
	imunoistoquímicos no carcinoma de celuías escamosas da	02
		93
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÕES	110
8	ANEXOS	113
9	REFERÊNCIAS	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	- Ligando-se na região 3' não traduzida
AGO	- Argonautas
AML-α	- Actina de músculo liso α
anti-CTLA-4	- Anti cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
anti-EGFR	- Anti-Receptor do fator de crescimento epidérmico
anti-PD-L1	- Anti programmed death-ligand1
AP-1	- Ligante de ativação de proteína
Bcl-2	- B-cell Lymphoma 2
CAFs	- Fibroblastos associados ao câncer
CD34	- Cluster of differentiation 34
cDNA	- DNA complementar
CEC	- Carcinoma de células escamosas
CECCO	- Carcinomas de células escamosas da cavidade oral
CK8	- Citoqueratina 8
c-MET	- Receptor de fator de crescimento hepatocitário
COX-2	- Ciclooxigenase 2
Ct	- Cycle threshold
DGCR8	- DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DMV	- Densidade de microvasos
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DP	- Desvio padrão
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epitelial
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbant assay
EMT	- Transição epiteliomesenquimal
EP	- Erro padrão
erbB2	- Erythroblastic leucemia viral oncogen homolog 2
FAP	- Proteína ativadora de fibroblastos
FDR	- False discovery ratio

FGF	- Fator de crescimento fibroblástico
GAG	- Glicosaminoglicanas
GLUT1	- Transportador da glicose tipo 1
H_2O_2	- Água oxigenada
HE	- Hematoxilina e eosina
HIF	- Expressão do fator indutor de hipóxia-1α
Hpa1	- Heparanase-1
Hpa-2	- Heparanase-2
IC	- Intervalo de confiança
ICESP	- Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
MAPquinases	- Mitogen activated protein kinases
MEC	- Matriz extracelular
MeV	- Multi Experimental Viewer versão 4.5.0
miRNAs	- microRNA
mix	- Mistura
MMP-2	- Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	- Metaloproteinase de matriz 9
MMPs	- Metaloproteinases de matriz
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
PG	- Proteoglicanos
poliA	- Poliadenosina
pro-MMPs	- Pró-metaloproteinase de matriz
PTEN	- Fosfatase homóloga a tensina
qPCR	- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo
RANKL	- Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RISC	- RNA induced silence complex
RNA	- Ácido ribonucleico
ROC	- Receiver Operating Characteristic
RT	- Reação de transcrição reversa

SAM	- Significance Analysis of Microarrays
SCC9	- Cultura de células de Carcinoma de células escamosas de
	língua
SDF1	- Fator 1 derivado de células estromais
S-GAG	- Glicosaminoglicanos sulfatados
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFβ	- Fator de crescimento e transformação beta
TIMPs	- Inibidores teciduais da metaloproteinase
TMA	- Microarranjo tecidual
TNM	- Estadiamento tumor/ linfonodo/metástase à distância
TP53	- Proteína de tumor 53 kDa
TPM1	- Tropomiosina 1
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	- Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia demonstrando histologicamente a frente de crescimento infiltrativa do carcinoma de células escamosas da cavidade oral através do estroma	10
Figura 2 -	Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pontes intercelularesem um carcinoma espinocelular da cavidade oral.	11
Figura 3 -	Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pontes intercelulares no <i>stratum spinosum</i> da epiderme	11
Figura 4 -	Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pérolas córneas em um carcinoma espinocelular da cavidade ora	12
Figura 5 -	llustração esquemática demonstrando a mensuração da espessura tumoral	14
Figura 6 -	Biogênese e ação dos miRNA	25
Figura 7 -	Alguns miRNAs identificados na progressão do câncer de cabeça e pescoço	27
Figura 8 -	Gráficos de boxplot demonstrando a normalização das amostras por quantil	54
Figura 9 -	Dendograma hierárquico demonstrando a segregação entre os grupos tumoral e mucosa sadia através dos miRs 21-5p, 320a, 106-5p e 222-3p	63
Figura 10 -	<i>Heatmap</i> demonstrando os miRNAs diferentemente expressos e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia, considerando-se somente os miRNAs diferentemente expressos na análise multivariada (miR - 21-5p, miR320a, miR-106b-5p e miR-222-3p)	64
Figura 11 -	Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) demonstrando a acurácia no diagnóstico do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação à mucosa sadia dos miRNAs 21-5p, 106b-5p, 222-3p e 320a	65

Figura 12 - Imunoexpressão diferencial dos diversos marcadores imunoistoquímicos entre os espécimes de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e a mucosa sadia66
Figura 13 - Imunoexpressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos relacionados à matriz extracelular entre os espécimes de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e a mucosa sadia
Figura 14 - Dendograma hierárquico não demonstrando uma adequada segregação entre os grupos tumorais (superficial e espesso) e mucosa sadia através do miR- 133a-3p73
Figura 15 - <i>Heatmap</i> demonstrando os miRNAs diferentemente expressos e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia, pela análise de <i>Significance Analysis of Microarrays</i>
Figura 16 - <i>Heatmap</i> e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia pelos miRs diferentemente expressos (miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p)75
Figura 17 - <i>Heatmap</i> e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia pelo miR- 133a-3p75
Figura 18 - Gráficos de <i>boxplot</i> demonstrando a expressão diferencial entre miR-1-3p, miR-133a-3p e miR-21-5p e os grupos de estudo77
Figura 19 - Dendograma hierárquico demonstrando uma boa segregação entre os tumores superficias e espessos através dos miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p78
Figura 20 - Dendograma hierárquico não demonstrando uma adequada segregação entre os grupos tumorais (superficial e espesso) e mucosa sadia através do miR- 133a-3p isoladamente
Figura 21 - <i>Heatmap</i> e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais espessos e superficiais pelos miR-1-3p, miR-133a-3p e miR-21-5p80
Figura 22 - <i>Heatmap</i> e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais espessos e superficiais80

Figura 23 -	Curva ROC <i>(Receiver Operating Characteristic)</i> demonstrando a acurácia no diagnóstico dos casos espessos do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação aos tumores superficiais para os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p
Figura 24 -	Imunoexpressão diferencial de metaloproteinase-2 (MMP-2) nos fibroblastos relacionados ao tumor (B: tumor superficial; C: tumor espesso), em comparação à mucosa sadia (A). Nota-se evidente aumento na expressão de MMP-2 nos fibroblastos dos espécimes tumorais, especialmente nos casos espessos
Figura 25 -	Imunoexpressão diferencial de metaloproteinase-9 (MMP-9) nos fibroblastos relacionados ao tumor (B: tumor superficial; C: tumor espesso), em comparação à mucosa sadia (A)
Figura 26 -	Curvas ROC <i>(Receiver Operating Characteristic)</i> demonstrando a acurácia no diagnóstico dos casos espessos do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação aos tumores superficiais para os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p, estratificados para os valores de corte
Figura 27 -	Gráfico de Kaplan Meier demonstrando taxas semelhantes de sobrevivências globais acumuladas para os miRNAs 1-3p (61,3% x 72,9%; p=0,588 - teste de Log-Rank) e 21-5p (72,2% x 60%; p=0,435 - teste de Log-Rank), porém nota-se uma tendência a maior sobrevivência global para os pacientes com miR-133a-3p maiores ou iguais a -0,902 (53,0% x 88,9%; p=0,070 - teste de Log-Rank)
Figura 28 -	Gráfico de Kaplan Meier demonstrando taxa semelhante de sobrevivência livre de doença acumulada para o miR- 21-5p (85,2% x 80%; p=0,615 - teste de Log-Rank), porém nota-se uma tendência a maior sobrevivência global para os pacientes com miR-1-3p menores que 0,583 (74,9% x 100%; p=0,162 - teste de Log-Rank) e miR-133a-3p menores que - 0,902 (72% x 100%; p=0,089 - teste de Log-Rank), com nenhum caso de recidiva para estes grupos de pacientes em ambas as análises

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Estudos que relacionam a espessura tumoral e a taxa de metástase linfonodal no carcinoma de células escamosas da cavidade oral	.15
Quadro 2 -	Substratos das metaloproteinases de matriz	.20
Quadro 3 -	Alguns miRNAs identificados no carcinoma de células escamosas de cavidade oral, seus alvos moleculares e mecanismos de ação	.28
Quadro 4 -	Painel de micro-RNAs selecionados	.50
Quadro 5 -	Sequência dos primers utilizados na pesquisa dos microRNAs	.51

LISTA DE TABELAS

59	bela 1 - Características demográficas, clínicas e anatomopatológicas dos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral incluídos no estudo
61	pela 2 - Análise univariada da expressão diferencial de microRNAs entre a mucosa normal e os espécimes tumorais, normalizados pelo miR-let-7i
62	Dela 3 - Análise multivariada por regressão linear, demonstrando os coeficientes do modelo com os quatro microRNAs diferentemente expressos, na diferenciação entre as amostras tumorais e a mucosa sadia
68	 Dela 4 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos na diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia
69	pela 5 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos estratificados na diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia
71	pela 6 - Análise univariada da expressão diferencial de microRNAs entre os espécimes de carcinoma de células escamosas superficiais e espessos, em comparação à mucosa sadia, normalizados pelo miR-let-7i
72	pela 7 - Análise univariada da expressão diferencial de microRNAs por pares entre os espécimes de carcinoma de células escamosas superficiais e espessos e a mucosa sadia, normalizados pelo miR-let-7i
83	pela 8 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos, além da mucosa sadia
84	bela 9 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos estratificados na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos, além da mucosa sadia
88	oela 10 - Associações significativas entre os valores contínuos dos diversos microRNAs e os marcadores imunoistoquímicos
90	oela 11 - Associações entre o miR-1-3p e os marcadores imunoistoquímicos

Tabela 12 -	Associações entre o miR-21-5p e os marcadores imunoistoquímicos	.91
Tabela 13 -	Associações entre o miR-133a-3p e os marcadores imunoistoquímicos	.92
Tabela 14 -	Análise de acurácia dos valores de corte dos miR 1-3p, 21-5p e 133a-3p no diagnóstico dos tumores espessos em relação aos tumores superficiais	.94
Tabela 15 -	Associação entre os valores estratificados dos miRs 1- 3p, 21-5p e 133a-3p e variáveis histopatológicas e de seguimento dos pacientes com carcinoma da cavidade oral	.95

RESUMO

Menderico Júnior GM. *Expressão de micro-RNAs associados a invasão tumoral e prognóstico em carcinoma de células escamosas de cavidade oral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O carcinoma de células escamosas da cavidade oral é uma doença de alta incidência e prognóstico ruim. Dentre os principais fatores prognósticos estão a presença de metástases para linfonodos cervicais e a profundidade de invasão ou espessura do tumor primário. É demonstrado que quanto maior a espessura tumoral, maiores as taxas de metástases para linfonodos regionais e menor os índices de sobrevivência global e livre de doença. Vários fatores moleculares vêm sendo estudados para determinar este comportamento invasivo, dentre eles, os microRNAs. Os microRNAs são pequenos segmentos de RNA não codificantes que desempenham papel na proliferação, invasão e regulação de microambiente tumoral. Objetivo: Relacionar o perfil dos microRNAs e dos constituintes da matriz extracelular com o processo de invasão tumoral, perfil demográfico e prognóstico do carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Métodos: Estudo retrospectivo com material proveniente do bloco de parafina do remanescente do material de análise anatomopatológico de pacientes operados por carcinoma de células escamosas da cavidade oral, que apresentavam espessura tumoral de 5, 15 e 25mm, além de um grupo de amostras de mucosas orais sadias de pacientes pareados. Foi realizada extração do RNA dos blocos parafinados, seguida de amplificação do material através de DNA complementar para microRNAs relacionados a adesão, migração, proliferação celular, apoptose, além de constituintes modificadores da matriz extracelular. Foram também realizadas reações de imunoistoquímica para marcadores envolvidos nos mesmos processos biológicos. Resultados: Dos 26 espécimes de carcinoma de células escamosas, 12 constituíram o grupo de tumores superficiais (com 5mm de espessura) e 14 o grupo de tumores espessos (com 15 e 25mm de espessura). A maioria dos pacientes era do sexo masculino (9 de cada grupo, 75% e 64,3%, respectivamente, com média de idade de 62,1 e 62,6 anos, respectivamente, e com um caso de óbito (8,3%) no grupo de tumores superficiais e sete (50%) dentre aqueles com neoplasias espessas. O mir21-5p foi o que apresentou melhor diferenciação entre os grupos de mucosa

sadia e tumor. Na comparação entre os grupos de tumores superficial e espesso, o miRs 1-3p, 133-3p e 21-5p obtiveram melhor performance na diferenciação entre os dois grupos, estando os dois primeiros subexpressos no grupo e tumores espessos e o mir21-5p superexpresso nestes pacientes. O miR21-5p foi o que apresentou a maior acurácia na diferenciação entre neoplasias superficiais e espessas (AUC=0,753; IC95%: 0,549 - 0,957). Quanto a avaliação por imunoistoquímica, o grupo de tumores espessos apresentou maior imunorreatividade às metaloproteinases 2 e 9 e laminina alfa nos fibroblastos relacionados ao tumor, com consequente degradação da membrana basal, aferida por maior perda de continuidade do colágeno tipo IV. Este processo foi ainda associado à menor e maior expressão de miRNA1-3p e de miRNA21-5p, respectivamente. Conclusões: Entre as amostras de neoplasias espessas, miRNAs 1-3p, 133-3p apresentaram-se subexpressos e de miR21-5p superexpresso em relação às neoplasias mediando o processo de invasão tumoral através superficiais. da degradação matriz extracelular devido à alta da expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9 em fibroblastos relacionados ao tumor e menor continuidade de colágeno tipo IV na membrana basal.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Boca; microRNAs; Carcinogênese; Prognóstico.

ABSTRACT

Menderico Júnior GM. *Micro-RNAS expression associated with tumor invasion and prognosis in oral cavity squamous cell carcinoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: Squamous cell carcinoma of the oral cavity is a disease of high incidence with a poor prognosis. Among the main prognostic factors are the presence of metastases in cervical lymph nodes and depth of invasion or thickness of the primary tumor. It has been shown that as tumor thickness increases, there are higher rates of metastases in regional lymph nodes and lower rates of global and disease-free survival. Several molecular factors have been studied to determine this invasive behavior, including microRNAs. MicroRNAs are small segments of noncoding RNA that play a role in the proliferation, invasion and regulation of tumor microenvironments. **Objective**: To evaluate the microRNA and extracellular matrix component profiles with the tumor invasion process, demographic profile and prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Methods**: This was a retrospective study using paraffin-embedded material remaining from anatomical pathology analyses of patients operated on for squamous cell carcinoma of the oral cavity who presented tumor thicknesses of 5, 15 and 25 mm, in addition to a group of oral mucosa samples from paired patients. RNA extraction was performed using the paraffin blocks, followed by complementary DNA amplification of microRNAs related to adhesion, migration, cell proliferation, apoptosis, and constituents that modify the extracellular matrix. We also performed immunohistochemical reactions for markers involved in the same biological processes. Results: Twelve of the 26 squamous cell carcinoma specimens comprised the superficial tumor group (5 mm in thickness), and 14 comprised the thick tumor group (15 and 25 mm thick); the majority of the patients were male (9 in each group, 75% and 64.3%, respectively, with mean ages of 62.1 and 62.6 years, respectively), with 1 death (8.3%) in the superficial tumor group and 7 deaths (50%) among those in the thick neoplasm group. mir21-5p showed the best differentiation between the healthy mucosa and tumor groups. In the comparison between the superficial and thick tumor groups, miRs 1-3p, 133-3p and 21-5p showed better performance in the differentiation between the two groups, with the first 2 underexpressed and mir21-5p overexpressed in the thick tumor group.

miR21-5p presented the highest accuracy for the differentiation between superficial and thicker tumors (AUC = 0.753; 95% CI: 0.549 - 0.957). Regarding the immunohistochemistry assessment, the thick tumor group showed greater immunoreactivity to metalloproteinases 2 and 9 and laminin alpha in fibroblasts related to the tumor, with consequent degradation of the basement membrane, as measured by a greater loss of continuity of type IV collagen. This process was also associated with lower and higher expression of miRNA1-3p and miRNA21-5p, respectively. **Conclusions**: Among the samples of thick neoplasms, miRNAs 1-3p and 133-3p were underexpressed and miR21-5p was overexpressed in relation to those expressed in superficial neoplasms, mediating the process of tumor invasion through the degradation of the extracellular matrix due to the high expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in fibroblasts related to the tumor and lower continuity of type IV collagen in the basement membrane.

Descriptors: Carcinoma, squamous cell; Mouth; MicroRNAs; Carcinogenesis; Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna da cavidade oral é um verdadeiro problema de saúde pública em diversos países devido à sua alta incidência e mortalidade¹.

O câncer da cavidade oral tem um prognóstico ruim com uma taxa de sobrevivência global em cinco anos em torno de 50%². Isso se deve ao fato de a doença ser, na maioria das vezes, diagnosticada em estádios avançados, especialmente em vigência de doença metastática cervical³.

Aproximadamente 90% dos casos nas neoplasias malignas da cavidade oral são carcinomas de células escamosas (CECCO), também chamados de carcinomas epidermoides ou espinocelulares⁴. Algumas características histopatológicas estão comprovadamente associadas a um pior prognóstico nesses pacientes, tais como: a presença de metástases linfonodais, extravasamento extracapsular dos linfonodos metastáticos, invasão angiolinfática, invasão perineural e a resposta inflamatória peritumoral⁵.

Em um período relativamente recente, diversos estudos têm avaliado a espessura tumoral, ou a profundidade de invasão, como um parâmetro objetivo da invasão da neoplasia aos tecidos profundos. O aumento na profundidade de invasão e a proliferação microvascular causados pelo crescimento tumoral podem levá-lo a uma maior proximidade com vasos sanguíneos e linfáticos o que irá, por sua vez, aumentar a capacidade de a neoplasia gerar metástases⁶. Como consequência, a espessura tumoral tem sido associada ao comprometimento linfonodal, uma vez que esse é o fator prognóstico mais importante do CECCO. Entretanto, alguns autores identificaram ainda a espessura tumoral como um fator independente relacionado a maiores taxas de recidiva local e menores índices de sobrevivência livre de doença, sobrevivência global ou doença-específica^{7,8}.

O CECCO desenvolve-se devido a uma série de alterações moleculares, sobretudo em decorrência da exposição a fatores de risco que levam a lesões de mucosa progressivas e histopatologicamente bem definidas: displasia leve, moderada e severa; carcinoma *in situ;* e doença invasiva⁹. Os critérios para classificação dessas lesões e sua progressão continuam sendo bastante estudados¹⁰.

Apesar de todo o estudo da carcinogênese do CECCO, ainda são pouco conhecidos os mecanismos pelos quais alguns tumores apresentam um comportamento mais invasivo. Com essa característica, os tumores passam a apresentar uma maior espessura tumoral e comprometer sobremaneira o prognóstico desses pacientes. A degradação e a desorganização da matriz extracelular podem estar envolvidas nesse processo⁷⁻⁹.

Dentre os principais biomarcadores para a iniciação, promoção e progressão tumoral que vêm sendo estudados estão os micros ácidos ribonucleicos, mais conhecido como microRNAs (miRNAs)¹¹. Os miRNAs são pequenas moléculas não-codificantes de ácido ribonucleico (RNA), com

importante função na regulação celular e do microambiente tumoral por meio de regulação gênica. Atuam sobre a degradação do RNA mensageiro ou inibição do processo de tradução, apresentando-se como um dos principais fatores epigenéticos, com importante papel no câncer e em diversas doenças^{12,13}.

Pouco foi estudado sobre a importância dessas moléculas na carcinogênese, na progressão tumoral e especialmente no prognóstico dos pacientes com CECCO. Também é pouco explorado o papel dos constituintes da matriz extracelular e de seu remodelamento no processo de invasão tumoral no CECCO, especialmente mediado pelos miRNAs. Ainda, para essa neoplasia, a espessura tumoral, reflexo do processo de invasão tumoral do estroma adjacente à mucosa, é bem documentada como um fator isolado de pior prognóstico, porém pouco se sabe das causas moleculares envolvidas nesse processo⁷⁻⁹.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve os seguintes objetivos:

 Avaliar o papel do remodelamento da matriz extracelular, bem como o envolvimento dos microRNAs no processo de carcinogênese do carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

 Avaliar o papel do remodelamento da matriz extracelular no processo de invasão tumoral dos carcinomas de células escamosas da cavidade oral e identificar quais microRNAs estão relacionados a este processo.

 Relacionar o perfil de microRNAs e do remodelamento da matriz extracelular com variáveis demográficas, histopatológicas e imunoistoquímicas dos pacientes acometidos por carcinomas de células escamosas da cavidade oral.

 Relacionar o perfil de microRNAs e do remodelamento da matriz extracelular com o prognóstico dos pacientes acometidos por carcinoma espinocelular de cavidade oral.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O carcinoma da cavidade oral

O carcinoma de cabeça e pescoço representa uma categoria de neoplasias malignas oriundas da mucosa do trato aerodigestivo superior. São, portanto, classificados segundo o epicentro primário da lesão: cavidade oral, faringe (rinofaringe, orofaringe ou hipofaringe) e laringe. Apesar de se tratar de uma entidade de fatores de risco semelhantes, o manejo e o prognóstico do tumor, mesmo que de mesma etiologia, são bastante diferentes a depender do subsítio anatômico acometido^{1,14}.

Dentre estas topografias de origem do carcinoma de cabeça e pescoço, a cavidade oral é a de maior incidência. O tumor pode ser originários da língua oral, soalho da boca, mucosa jugal, rebordo alveolar, palato duro e trígono retromolar, sendo a língua a topografia mais comum^{15,16}.

As neoplasias malignas da cavidade oral são grandes problemas de saúde pública em diversos países devido à sua alta incidência e mortalidade. Dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer demonstram um aumento na incidência de cânceres de boca entre os anos de 2012 e 2018, indo de 300.373 para 354.864 novos casos, com um número proporcionalmente mantido de óbitos, de 145.353 (48,4%) em 2012 e 177.384 (50%) em 2018^{1,17,18}.

No Brasil, estima-se cerca de 11.200 novos casos em homens e 3500 em mulheres de câncer da cavidade oral diagnosticados no biênio 2018-2019². Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo, respectivamente, o 5º o 12º mais frequente entre todos os cânceres^{2,19}.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente na Região Sudeste do Brasil (13,77/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (9,72/100 mil) e Nordeste (6,72/100 mil), ocupa a quinta posição. Nas Regiões Sul (15,40/100 mil) e Norte (3,59/100 mil), ocupa a sexta posição. Para as mulheres, é o 11º mais frequente na Região Nordeste (3,12/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (2,96/100 mil) e Norte (1,78/100 mil), é o 12º mais frequente. Nas Regiões Sudeste (3,64/100 mil) e Sul (3,59/100 mil), ocupa a 13ª e 15ª posições, respectivamente¹⁹.

O carcinoma de cavidade oral tem seu pico na faixa etária da sexta e sétima décadas de vida apesar de, nos últimos anos, ter sua incidência aumentada em pacientes mais jovens²⁰.

Aproximadamente 90% dos casos de neoplasias malignas da cavidade oral são carcinomas de células escamosas (CEC) ou também chamados de carcinomas epidermoides ou espinocelulares (Figura 1)⁴. Os 10% restantes representam neoplasias malignas raras (formas não usuais do CEC, tumores de glândulas salivares menores, melanomas, linfomas, sarcomas e tumores malignos de origem odontogênica)²¹.



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 1 - Fotomicrografia demonstrando histologicamente a frente de crescimento infiltrativa do carcinoma de células escamosas da cavidade oral através do estroma (HE: 50X)

O CEC desenvolve-se no epitélio escamoso ou epitélio malpighiano, tendo características comuns a estes, quando bem diferenciados, tais como: (a) células em arranjo estratificado de formato poligonal ou cuboidal com projeções citoplasmáticas terminando em desmossomos, lembrando espinhos, em cuja microscopia óptica tem o aspecto de pontes intercelulares (Figura 2) no espaço entre as células, remetendo a células do *stratum spinosum* da epiderme (Figura 3); (b) citoqueratinas comuns a esse epitélio, tendo assim, a capacidade queratinização extracelular, com arranjo concêntrico, recebendo o nome de pérolas córneas (Figura 4)²²⁻²⁴.



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 2 - Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pontes intercelulares (seta amarela) em um carcinoma espinocelular da cavidade oral. (HE: 400X)



Fonte: New York University School of Medicine Cell Biology, Tissue and Organs Study Units²⁵.

Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pontes intercelulares (seta amarela) no *stratum spinosum* da epiderme. (HE: 1000X)



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 4 - Fotomicrografia demonstrando histologicamente a presença de pérolas córneas (seta vermelha) em um carcinoma espinocelular da cavidade oral. (HE: 100X)

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CECCO. Nos países ocidentais, os principais agentes carcinógenos são o tabaco e o abuso do álcool. Em países orientais, o hábito de mascar folha de betel com noz de areca tem grande importância, apresentando relação com mais de 50% dos casos de CECCO da Índia. Outros fatores que devem ser levados em consideração são: a susceptibilidade genética de cada indivíduo, o uso de próteses dentárias mal adaptadas com trauma crônico, hábitos alimentares, condições má higiene oral, bem como baixas socioeconômicas²⁶⁻²⁹.

O tratamento do CECCO é baseado na cirurgia para ressecção com margens da lesão em casos precoces, associados a investigação dos linfonodos cervicais e, em casos avançados, o tratamento é multimodal, associando-se a cirurgia com radioterapia com ou sem quimioterapia adjuvante. Novas drogas têm sido desenvolvidas e aplicadas na terapêutica desses pacientes, o que inclui anticorpos monoclonais, tais como o cetuximabe que tem ação do receptor do fator de crescimento epidérmico (anti-EGFR), e imunoterapia, através do uso de inibidores de checagem de ponto *(checkpoint)*, aumentando o reconhecimento das células neoplásicas por células apresentadoras de antígeno (anti-CTLA-4 e anti-PD-L1)³⁰.

O prognóstico dos pacientes com CECCO é ruim, apesar dos avanços terapêuticos, mantendo-se a taxa de sobrevivência em 5 anos em torno de 50%, sendo esta cerca de apenas 20% naqueles com estádios avançados (III ou IV)^{31,32}.

Existem diversos fatores prognósticos determinantes de sobrevivência global, específica ou livre de doença, que inclusive determinam as decisões terapêuticas. O principal sistema prognóstico é o estádio TNM, que leva em consideração o tamanho do tumor primário e, na sua última atualização de 2018, sua profundidade de invasão (estádio T), a presença de envolvimento de linfonodos regionais pela doença (estádio N) e a presença de doença metastática a distância (estádio M). Outros parâmetros biológicos, moleculares ou histopatológicos têm sido identificados nas últimas décadas³³⁻³⁶.

Algumas características histopatológicas estão comprovadamente associadas a um pior prognóstico nesses pacientes. A presença de metástases linfonodais, extravasamento extracapsular dos linfonodos metastáticos, margens cirúrgicas comprometidas por neoplasia ou exíguas
(menos de 5 mm de distância entre a lesão e da margem livre), invasão angiolinfática, invasão perineural, resposta inflamatória peritumoral, profundidade de invasão são exemplos de fatores relacionados a desfecho desfavorável e que não são contemplados na classificação TNM⁵.

A espessura tumoral tem sido demonstrada como um parâmetro objetivo da invasão da neoplasia aos tecidos profundos, sendo definida como a distância entre o ponto de invasão mais profundo pela neoplasia e a superfície da mucosa normal adjacente à neoplasia (Figura 5)^{8,37}. Com a progressão da neoplasia através de sua infiltração e o aumento de contato com vasos linfáticos e sanguíneos, gera maior taxa de metástase linfonodal^{6,38}. Como consequência, a espessura tumoral tem sido associada ao comprometimento linfonodal (Quadro 1), uma vez que esse é o fator prognóstico mais importante do CECCO, com maiores taxas de recidiva local, menores índices de sobrevivência livre de progressão de doença e sobrevivência global ou específica^{7,8}.



Fonte: Adaptado de Pinto *et al.*⁸.

Figura 5 - Ilustração esquemática demonstrando a mensuração da espessura tumoral. A medida é realizada da superfície da mucosa normal adjacente ao ponto mais profundo de invasão do tumor

Estudo	N	Topografia da cavidade oral avaliada	Valor de corte da espessura tumoral	Taxa de metástase para linfonodos regionais (%)
Wang <i>et al.</i> ³⁹	78	Língua	<2mm 2,1 - 3,9mm >4mm	10,0 42,1 46,6
Ahmed <i>et al.</i> ⁴⁰	78	Língua	≤5mm >5mm	0,0 69,0
Loganathan <i>et al.</i> 41	81	Língua	≤5mm >5mm	16,0 62,5
Vishak <i>et al.</i> ⁴²	57	Língua	≤3mm >3mm	7,4 63,3
Matos <i>et al.</i> ⁷	74	Língua	≤7mm >7mm	0,0 51,0
Hakeen <i>et al.</i> ⁴³	176	Língua	≤5mm >5mm	23 39
Balasubramanian <i>et al.</i> ⁴⁴	343	Língua Soalho da boca	≤4mm >4mm ≤2mm >2mm	6,8 44,38 14,28 45,6

Quadro 1 - Estudos que relacionam a espessura tumoral e a taxa de metástase linfonodal no carcinoma de células escamosas da cavidade oral

n = número de pacientes analisados.

Observação: somente incluídos estudos que mensuraram a espessura tumoral a partir da superfície da mucosa adjacente ao tumor.

O processo de progressão tumoral do CECCO, desde a ação dos carcinógenos sobre o epitélio com a iniciação, seguido da displasia do epitélio, até a invasão do estroma pelo carcinoma, exibe várias alterações genéticas e epigenéticas que estão em constante estudo. São descritas a perda de alelos nos braços cromossômicos 3p, 9p e 17p, a amplificação e superexpressão de oncogenes myc, erbB2 e ciclina D1, o aumento na expressão de citoqueratina 8 (CK8), a hipermetilação que leva à inativação dos genes p16 e p53, a perda da heterozigosidade do alelo do p53, a superexpressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), o descontrole da proliferação confirmado pela aumento da expressão imunoistoquímica do antígeno Ki67 e diversas outras^{45,46}.

3.2 Regulação do microambiente e da matriz extracelular por MicroRNAs

Durante as duas últimas décadas, as neoplasia malignas sólidas têm ultrapassado a visão reducionista de uma massa de células que se multiplicam de modo independente ao tecido circunjacente, conforme a clássica definição de Rupert Allan Willis^{47,48}, tornando-se um grupo de células heterogêneas aliadas a uma complexa rede de células normais, como fibroblastos, miofibroblastos, pericitos, adipócitos, células endoteliais e células do sistema imune que formam o estroma neoplásico e, assim, criam o chamado "microambiente tumoral"^{49,50}. Com o crescimento do carcinoma, o microambiente permite que células neoplásicas estabeleçam uma comunicação parácrina entre as mesmas e com o estroma, criando um dinâmico circuito de diversas moléculas que cooperam para a infiltração do carcinoma e, assim, abrindo o seu caminho para tornar-se uma doença fatal, através de sua resistência e disseminação⁵¹.

3.2.1 Remodelamento da matriz extracelular

O tecido conjuntivo é um tecido de origem mesodérmica, que, em animais e plantas, tem função de sustentação, preenchimento, armazenamento e nutrição. É composto por duas partes: (a) células derivadas de células mesenquimais: fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, lipócitos, adipócitos, mastócitos, plasmócitos, macrófagos, além de células especializadas, como condroblastos e células hematopoiéticas; (b) matriz extracelular (MEC): composta por fibras colágenas, reticulares e elásticas, imerso na substância fundamental, composta por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas secretadas pelos fibroblastos⁵²⁻⁵⁴. Além de proporcionar suporte estrutural ao tecido, a MEC regula o comportamento celular, influenciado em sua proliferação, diferenciação, migração, morfologia, atividade funcional e sobrevivência^{55,56}.

As macromoléculas que constituem a MEC, junto com as proteínas fibrilares, mantêm sua homeostase, assim, a integridade e os arranjo do colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos sulfatados (S-GAG) são fundamentais em tal processo^{57,58}.

O colágeno é a proteína fibrosa insolúvel mais abundante da MEC, constituindo o principal elemento estrutural da MEC, promovendo força tênsil, regulação de adesão celular, quimiotaxia e migração. Vinte e oito tipos de colágenos foram identificados nos vertebrados, apesar destes serem constituídos preferencialmente pelos tipos I, II e III. A maior parte dos tipos de colágenos apresenta a molécula em formato de tripla-hélice que compõem superestruturas maiores, como feixes fibrilares, no caso do colágeno tipo I, presente no interstício, ou em forma reticular, no caso do colágeno tipo IV, presente na membrana basal⁵⁹.

A síntese do colágeno envolve várias modificações após sua tradução, em especial, a hidroxilação da prolina e lisina, glicosilação da lisina e clivagem dos propetideos N e C terminais. Após esta clivagem, as moléculas iniciam a formação de ligação covalente entre si através dos resíduos de lisinas, aumentando a resistência tênsil das fibras⁵⁹. O colágeno tipo IV é formado por uma rede de fibras formando uma estrutura

semelhante a uma bainha que é a membrana basal. Suas cadeias tem o formato de triplas-hélice, medindo 40 nm de comprimento, formando um grande domínio C-terminal globular, e um domínio N-terminal de estrutura desconhecida, mas que apresentam ligações covalentes laterais, formando a estrutura tetramérica do colágeno tipo IV⁶⁰.

As glicoproteínas têm função de proporcionar adesão célula-matriz e são compostas em especial pela laminina, fibronectina, vitronectina, fibulina, fibrilina, tenascina-C, trombospondina 1 e mucina. A laminina é uma molécula heterotrimérica cruciforme, formada por três cadeias (α , β e γ). Nos vertebrados, foram identificadas cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ . As isoformas da laminina são identificadas conforme as cadeias que formam os trímeros, apresentando distribuição tecidual diversa⁶¹. A laminina tem função primordial na membrana basal, fazendo a ligação coesiva entre células epiteliais e componentes estruturais, como o colágeno tipo IV e proteoglicanos⁶²⁻⁶⁴. Essa ligação é feita, em especial, pelas integrinas, uma família de proteínas transmembrana, heterodimérica, formada por duas unidades glicoproteicas α e β , com grande concentração na superfície celular⁵⁵.

Os S-GAG são polissacarídeos que desempenham um papel vital na organogênese, apoptose, crescimento celular, adesão, controle do ciclo celular, angiogênese e sinalização de fatores de crescimento, estando o heparan sulfato, condroitin sulfato, queratan sulfato, ácido hialurônico e o dermatan sulfato envolvidos nesses eventos⁶⁵. Com exceção do ácido hialurônico, os S-GAG apresentam ligação covalente com um esqueleto proteico formando os proteoglicanos⁶⁶. O decorin é um proteoglicano formado pela ligação covalente

entre uma proteína de 42 kDa e uma molécula simples de GAG, podendo ser o condroitin sulfato ou o dermatan sulfato⁶⁷. Os proteoglicanos de heparan sulfato formam uma família que está presente na superfície celular, ancorados por uma porção transmembrana hidrofóbica do esqueleto proteico, formando a família dos sindecans, que apresentam importante papel em atividades biológicas tanto fisiológicas quanto patológicas^{68,69}.

Está bem estabelecido na literatura que o estroma neoplásico tem relação direta com seu comportamento biológico, consequentemente, interferindo no comportamento clínico do tumor e em seu prognóstico. O potencial de interação entre a neoplasia e os componentes do tecido conjuntivo determina o seu fenótipo invasivo, e a alteração estrutural ou a degradação da MEC constituem fatores preponderantes, o que propicia uma lesão de caráter mais agressivo e também determinando a presença de metástases^{63,70}.

A degradação da membrana basal é o evento principal que leva um carcinoma *in situ* a se tornar um carcinoma invasivo, o que permite a invasão das células através do tecido conjuntivo^{71,72}. O estudo de García *et al.*⁷³ demonstrou maior perda de continuidade de componentes da membrana basal em paralelo com a evolução da displasia até o carcinoma de células escamosas invasivo. A degradação da membrana basal e o remodelamento da MEC, quebrando esta barreira para invasão é dado por proteases ou endoglicosidades, expressas pelas células neoplásicas ou por fibroblastos adjacente ou associados ao câncer, como a catepsina, a família das metaloproteinases ou as heparanases^{74,75}.

As metaloproteinases (MMPs) foram descritas em 1962 por Gross e Lapiere como colagenases que participavam da reabsorção da cauda de girinos⁷⁶. Até o presente momento, há 24 MMPs descritas, subdivididas em subgrupos conforme estrutura e substrato envolvidos (Quadro 2). As MMPs formam uma família de endopeptidades zinco e cálcio-dependentes capazes de degradar todos componentes da MEC e da membrana basal. Apresentam função em eventos fisiológicos como crescimento, angiogênese, reparo tecidual, involução uterina pós-parto e placentação^{74,77}. A desregulação das MMPs tem sido associada a diversas doenças como desordens autoimunes, aterosclerose, pré-eclâmpsia e ao câncer^{77,78}.

Grupo	Metaloproteinase	Substrato da Matriz Extracelular
Colagenases	MMP-1, MMP-8, MMP- 13, MMP-18	Colágenos fibrilares tipos I, II, III, VII, VIII e X,aggrecan
Gelatinases	MMP-2, MMP-9	Gelatina, colágenos dos tipos IV, V, VII, X e XIV, elastina, galectina-3, aggrecan e fibronectina
Estromelisina	MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-12	Proteoglicanas fibronectina, laminina, caseína, gelatina, colágenos dos tipos III, IV, IX e X
Matrilisinas	MMP-7 e MMP-26	Fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanas, E-caderinas
Tipo membrana	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-25	Tenascina C, fibronectina, laminina

Quadro 2 - Substratos das metaloproteinases de matriz

Fonte: Adaptado de Cathcart et al.79

A secreção das MMPs ocorre em forma de zimogênios ou próenzimas (pro-MMPs) mantidas inativas pela interação entre o íon zinco do domínio catalítico e o grupo sulfidril-cistina do domínio N-terminal. A ativação tecidual das pro-MMPs é dada pela quebra dessa interação, expõe o zinco no domínio catalítico para ligação a uma molécula de água, indispensável para o processo catalítico. As responsáveis por esta ativação são proteinaises como a plasmina, tripsina, calicreína, podendo ser realizada por metaloproteinaises, sendo sua inibição executada pelos inibidores teciduais da metaloproteinase (TIMPs)^{74,78,80,81}.

A atividade das MMPs tem regulação estrita, sendo baixa em tecidos intactos, com sua transcrição regulada por fatores de crescimento e citocinas, induzidas por estresse físico, transformação oncogênica, além de interações célula-célula e célula-MEC. Os genes responsáveis da transcrição de MMPs através de ativação extracelular (MMP-1 / MMP-13 / MMP-3 / MMP-10 / MMP-7 / MMP-12/ MMP-9 / MMP-19) contém um ligante de ativação de proteína (AP-1) responsivos a fatores de crescimento e estímulos oncogênicos⁸².

As metaloproteinases estão presentes em quase todas neoplasias malignas, participando do remodelamento da MEC, angiogênese, crescimento tumoral, com consequente invasão tumoral e desenvolvimento de metástases, tornando a lesão mais agressiva, com consequente pior prognóstico. A expressão aumentada das MMPs tem ainda correlação positiva com neoplasia mais agressivas⁸³.

O subgrupo das gelatinases, formado pela gelatinase A (MMP-2) e a gelatinase B (MMP-9), representa o subgrupo mais importante, dentre as MMPs, na progressão do câncer. Esta importância é dada pela capacidade única das gelatinases de degradar o colágeno tipo IV, alicerce da membrana basal, primeira barreira de invasão das neoplasias malignas epiteliais^{84,85}.

Logo, muitas neoplasias malignas podem apresentar aumento na expressão das gelatinases, em especial a MMP-2⁷⁹.

A degradação dos proteoglicanos, na maioria das vezes é dada por endocitose, sofrendo ação de endossomos ou de enzimas lisossomais por endo ou exoglicosidases. Dentre as principais endoglicosidades, está a heparanase, ou heparanase-1 (Hpa1). A heparanase é uma enzima isolada em 1976 em tecido placentário, e trata-se de uma endo-β-glucoronidases que tem a função de hidrolisar ligações glicosídicas intrassacarídicas entre a hexosamina (glucosamina-N-acetilada) e o ácido glucurônico do heparan sulfato e da heparina^{86,87}. Apresenta importância em fenômenos fisiológico e patológicos como no processo inflamatório, reparo tecidual, crescimento tumoral, metástases e angiogênese. Dois mecanismos são os responsáveis pelos múltiplos efeitos da heparanase: (a) degradação dos proteoglicanos de heparan sulfato da superfície celular da MEC e da membrana basal; (b) a degradação de heparan sulfato pela heparanase gera uma variedade de fragmentos com diversas atividades biológicas, como agentes guimiotáticos e fatores de crescimento. As moléculas geradas podem levar a proliferação celular e aumento da sobrevivência da célula, além de promoção da angiogênese^{88,89}. Através deste mecanismo, a heparanase induz o aumento da transcrição de genes pró-angiogênicos (VEGF, COX-2, MMP-9, por exemplo), mitogênicos (HGF, por exemplo), osteolíticos (RANKL), próinflamatórios (TGF α , IL-1, IL-6, por exemplo) e vários outros genes⁹⁰.

A heparanase tem sua expressão aumentada em vários tipos de câncer, como ovário, pâncreas, mieloma, cólon, bexiga, rim, sistema nervoso

central, próstata, mama, fígado, linfomas e no carcinoma de cabeça e pescoço. Vários estudos mostram a relação entre a maior expressão da heparanase e neoplasias de maior volume, maior taxa de angiogênese, metástase e pior prognóstico, consequência de sua ampla atividade no microambiente tumoral, formação de exossomos, autofagia, quimiorresistência e ativação de receptores tipo Toll⁹⁰⁻⁹².

No ano 2000, no trabalho de McKenzie *et al.*⁹³ foi clonada uma proteína homologa à heparanase em células de mamíferos, de localização intracelular, porém com distribuição tecidual diferente da heparanase, sendo denominada heparanase-2 (Hpa-2). Tal enzima, apresenta 59% de similaridade com a Hpa-1, porém está desprovida de sua atividade catalítica. A Hpa-2 apresenta ação inibitória sobre a Hpa-1, além de regular genes que afetam a vascularização tumoral, fibrose tumoral, apoptose, diferenciação celular, estresse sobre o retículo endoplasmático, resultando em supressão tumoral⁹⁴. Esta ação inibitória não parece ser direta sobre a molécula da Hpa-1, mas sim por competição, dado que a ligação entre a Hpa-2 e o heparan sulfato tem maior afinidade que a Hpa-1^{95,96}.

3.2.2 Regulação do microambiente por microRNA

A modulação pós-transcricional da expressão gênica por miRNAs é um importante mecanismo de regulação celular e também do microambiente, não só dos mecanismos fisiológicos como também do desenvolvimento e progressão do câncer, em especial em sua ação sobre genes supressores tumorais e oncogenes. MiRNAs são pequenas moléculas de 19 a 25 nucleotídeos de comprimento não-codificantes de RNA que regulam negativamente a expressão do gene no nível pós-transcricional, induzindo a inibição da tradução ou degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) ligando-se na região 3' não traduzida (3'UTR) destes por emparelhamento total ou parcial de bases complementares⁹⁷.

Os genes que codificam para os miRNAs são transcritos em um produto denominado miRNA primário (pri-microRNA), que é uma molécula longa de fita dupla com uma alça que lembra um grampo. Isso ocorre, na maioria das vezes, por intermédio da RNA-polimerase II. Durante seu processo de maturação ainda no núcleo, o pri-microRNA sofre a ação de um complexo enzimático composto pela ribonuclease classe II DROSHA e pela proteína DGCR8 que cliva a molécula em um produto menor chamado de pré-microRNA, o qual é transportado para o citoplasma pela Exportina 5 ou pelo CRM1⁹⁸. No citoplasma, o pré-microRNA sofre ação de outro complexo enzimático chamado DICER, gerando um fragmento de RNA dupla-fita com 19 a 25 nucleotídeos. Uma das fitas deste fragmento é incorporada ao RNA *induced silence complex* (RISC) e age no reconhecimento e silenciamento do RNA mensageiro, reação esta catalisada pelas proteínas Argonautas (AGO), fosforiladas pela via da MAPquinases. Portanto, os miRNAs estão diretamente relacionados ao controle de expressão gênica, sendo responsáveis pelo controle pós-transcricional com possibilidade de inibir a tradução de proteínas específicas (Figura 6)99-101.



Adaptado de Fuziwara et al. 101.

Figura 6 - Biogênese e ação dos miRNA. Transcrição do miRNA pela polimerase II produz o pri-miRNA que é quebrado pelo complexo DROSHA/DGCR8 no precursor do miRNA (pre-miRNA) e exportado ao citoplasma. Processado pela endonuclease DICER (associado com a proteína AGO) é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), e suas duas fitas são separadas, constituindo o miRNA maduro

O primeiro miRNA, lin-4, foi identificado em 1993, enquanto o segundo miRNA, let-7, foi descrito somente em 2000 em *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódeo. Porém, foi em 2001 que o termo miRNA foi introduzido para designar esta classe de RNAs de fita simples. Desde então, o campo dos miRNAs tem sido extensivamente explorado, havendo mais de 2500 miRNAs maduros humanos identificados¹⁰².

Alguns estudos evidenciaram que a expressão miRNA está desregulada em vários tipos de câncer e que os perfis de expressão miRNA são capazes de classificar alguns tumores humanos, que podem ser relacionados ainda com desfechos clínicos em pacientes com neoplasias malignas¹⁰³. O envolvimento dos miRNAs com câncer humano

pode estar relacionado ao fato de mais de 50% dos genes do miRNA estarem localizados em sítios frágeis de cromossomos que estão frequentemente deletados ou rearranjados no câncer. A desregulação da expressão dos miRNAs pode influenciar na diferenciação e proliferação celular, e, por isso, podem, por si só, atuar como oncogenes ou genes supressores de tumor¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

Recentemente, os miRNAs têm sido implicados no ajuste fino de vários aspectos do desenvolvimento tumoral, incluindo diferenciação celular, adesão célula-célula e célula-estroma, apoptose, invasão e proliferação, além de novas perspectivas nos tratamentos imunoterápicos¹⁰⁸⁻¹¹².

Os miRNA participam como moduladores pleiotrópicos da expressão gênica em uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos celulares, incluindo o câncer, tornando-se foco de intensa pesquisa nos últimos anos, em especial, sua participação no microambiente tumoral, visando estratégias de intervenção e controle futuras. Estudos com carcinoma colorretal mostraram maior infiltração neoplásica com o aumento da expressão do miR-21 nos fibroblastos do estroma, determinado pela secreção de fatores de crescimento como fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento e transformação beta (TGFβ), assim como a degradação da matriz extracelular propiciada pelas MMPs^{51,113}. A ação do miR-143 e let-7c, associado à queda da expressão do miR-146b, mostra maior taxa de invasão e migração celular em gliomas, quando há aumento da expressão de MMP-16¹¹⁴.

Uma série de miRNAs foi identificada como relacionada às diversas etapas da carcinogênese do câncer de cabeça e pescoço (Figura 7). Também foram identificados miRNAs relacionados a mecanismos de crescimento, anti-apoptose, regulação do ciclo celular, proliferação, migração, invasão e metástase especificamente no CECCO (Quadro 3)^{38,108,109}.



Fonte: Valente CMD, 2017¹¹⁵ Adaptado de John *et al.*¹⁰⁵.

Figura 7 - Alguns miRNAs identificados na progressão do câncer de cabeça e pescoço

mi-RNA	Alvo molecular	Mecanismo de ação
miR-21	TPM1, PTEN, P12 (CDK2AP1)	Proliferação celular, quimiossensibilidade e quimiorresistência e quando superexpresso está associado a maior progressão de doença e menor sobrevivência
miR-221	PTEN, TIMP3	Carcinogênese
miR-184	Desconhecido	Proliferação celular; inibição da apoptose e quando superexpresso está associado a maior volume de doença tumoral
miR-31	FIH	Proliferação celular, migração e quando superexpresso está associado a maior volume de doença tumoral
let-7b	DICER, MYC, RAS, HMGA2	Supressão da proliferação celular
let-7d	MYC, RAS, HMGA2	Quando pouco expresso está associado a menor tempo de sobrevivência, recidiva de doença e metástases a distância
let-7i	MYC, RAS, HMGA2	Quando pouco expresso está associado a metástases linfonodais
miR-375	PDK1	Diminui a proliferação celular e a clonigenicidade, induz a interrupção do ciclo celular e quando pouco expresso indica tecido tumoral
miR-222	MMP1, SOD2	Inibe a invasão celular
miR-138	RhoC, ROCK2	Inibe a migração celular e o mecanismo de invasão, promove a interrupção do ciclo celular e inibe a apoptose
miR-1	TAGLN2	Inibe a proliferação celular, a migração e a invasão e medeia a apoptose e a interrupção do ciclo celular
miR-133a	CAV1, GSTP1	Inibe a proliferação celular, a migração e a invasão e induz a apoptose
miR-34a	CDK4, Ciclinas E2 e D1, E2F3, Bcl-2, MYCN, Notch1/2, SIRT1	Supressor tumoral, inibe a proliferação celular, a migração e a invasão e induz a apoptose

Quadro 3 - Alguns miRNAs identificados no carcinoma de células escamosas de cavidade oral, seus alvos moleculares e mecanismos de ação¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

Um estudo realizado em 2007 por Metheetrairut *et al.*¹¹⁶ analisou 42 pacientes com CECCO, cujas amostras do produto da resseção cirúrgica foram submetidas a pesquisa de mutação do gene supressor tumoral TP53 e da expressão de miR-34a, que tem sido associado a apoptose e regulação

do ciclo celular. Os pacientes com expressão normal do miR-34 apresentavam o gene TP53 intacto, ao passo que havia uma menor expressão desse nos pacientes com mutação do TP53. A expressão do miR-34b/b*/c estava reduzida nos pacientes que mantiveram o hábito tabágico, assim como aqueles que o cessaram há menos de 15 anos, estando esta expressão normal naqueles que nunca fumaram ou cessaram há mais de 15 anos. O miR-34, ainda, mostra uma ação supressora tumoral tanto no CECCO quanto em outras neoplasias malignas, como as pulmonares, por exemplo¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Em estudo multicêntrico, realizado por Wilkins *et al.*¹²⁰, envolvendo 2038 pacientes com diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço (cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe) e 2408 controles, foi realizada a genotipagem de células obtidas através da raspagem da cavidade oral e coletas de sangues, mostrando maior sobrevivência acumulada nos pacientes com maior expressão de miR-100.

O estudo de Li *et al.*¹²¹ de 2009 contou com 103 pacientes, sendo analisadas as amostras de CECCO e a mucosa sadia adjacente à lesão, obtidas por meio de procedimento cirúrgico. As amostras foram submetidas a PCR quantitativo para miRNA-21 e a reação imunoistoquímica para fosfatase homóloga a tensina (PTEN) e tropomiosina 1 (TPM1). O miRNA-21 mostrou-se superexpresso em relação à mucosa adjacente, tendo expressão inversa em relação ao PTEN e ao TPM1, cujos genes que as codificam têm sua expressão inibida pelo miRNA-21, inibindo assim a apoptose. Em análise multivariada, os maiores níveis de expressão do miRNA-21 estavam associados com doença em estádios III e IV, neoplasias pouco diferenciadas e presença de metástases linfonodais, mostrando que a expressão do miRNA-21 foi um importante fator prognóstico para o paciente com CECCO.

O trabalho de Baghaei *et al.*¹²² de 2018, por meio de 49 amostras de lesões e mucosas sadias de pacientes com CECCO, detectou menor expressão do miRNA-26b, que tem ação reguladora sobre o PTEN, nos pacientes com presença de metástases em linfonodos e invasão angiolinfática, demonstrando assim, o papel importante desse miRNA como um supressor tumoral.

Os miRNAs também se mostram estáveis não somente em tecidos processados e conservados em parafina, mas também no soro e plasma após coleta de sangue¹²³. As moléculas de miRNAs mostram-se estáveis por 24 horas em temperatura ambiente e 72 horas em refrigeração nas amostras de plasma/soro coletadas¹²⁴. Dessa forma, a dosagem sérica dos miRNAs, assim como em outros fluídos como na saliva ou na urina, pode ser um método para estabelecer o diagnóstico precoce do CECCO, assim como determinar o seu prognóstico¹²⁵⁻¹²⁸.

O estudo de Chen *et al.*¹²⁹ publicado em 2018 contou com 121 casos de CECCO e 55 pacientes saudáveis, sendo utilizado o qRT-PCR nas dosagens dos níveis séricos de miRNA-99a. Estes se mostraram significativamente reduzidos nos pacientes com CECCO em relação aos pacientes saudáveis. Dentro do grupo de pacientes com CECCO, aqueles com níveis séricos menores, encontravam-se em estádios avançados da doença, assim como lesões pouco diferenciadas. Em contrapartida,

pacientes com maiores níveis séricos de miRNA-99a apresentam maior sobrevivência geral, assim como sobrevivência livre de doença. O teste mostrou ainda especificidade de 83,6% e sensibilidade de 80,2% no rastreio de pacientes com CECCO.

O estudo publicado em 2017, realizado por Yan *et al.*¹³⁰, em um centro na China e outro na Dinamarca, contou com 8 pacientes com CECCO e dois controles no primeiro centro e 20 pacientes com CECCO e 18 controles de pacientes voluntários saudáveis no segundo centro. Foi realizada a coleta de sangue dos pacientes no pré-operatório e 9 e 12 meses após o procedimento e, por meio de qRT-PCR, foi realizado o sequenciamento de miR-148a-3p, miR-26a-5p, miR-21-5p, miR-375, miR-92b-3p e miR-486-5p. A redução da expressão de miR-375, miR-92b-3p e miR-486-5p mostrou-se altamente associada à recorrência da doença.

3.2.3 Influência dos microRNAs no remodelamento da matriz extracelular

Através de sua função da regulação gênica pós-transcricional, a expressão dos miRNAs é fundamental no controle em uma ampla gama de processos celulares, e dentre estes, estão a manutenção e o remodelamento dos componentes da MEC. Um equilíbrio fino entre estes dois processos determina a composição final e a influência destes sobre suas células residentes. A alteração deste equilíbrio pode resultar em alterações teciduais importantes sobre a MEC, influenciando na progressão de diversas doenças, incluindo o câncer^{131,132}.

A ação regulatória dos miRNAs sobre o remodelamento da MEC pode ser exercida diretamente, por meio da inibição de RNAs mensageiros na tradução de proteínas que a compõe, como por exemplo, as moléculas de adesão celular e seus receptores como caderinas e integrinas. O segundo mecanismo de ação se dá de forma indireta, modulando a expressão de genes que regulam a síntese ou a degradação de moléculas da MEC, como citocinas e fatores de crescimento^{131,132}.

Numerosos miRNAs têm sido implicados em processos patológicos que tem como base o remodelamento da MEC, como desordens metabólicas e o câncer. O câncer, conforme já discutido previamente, tem como base a proliferação celular e a quebra da barreira da membrana basal e da matriz extracelular para sua progressão, envolvendo a migração celular e angiogênese, e o desenvolvimento de metástases, logo, a ação dos miRNAs terá protagonismo dada sua importância no equilíbrio da MEC^{132,133}. Dentre os miRNAs com tal papel, o miR-21 apresenta inibição sobre o inibidor tecidual das MMPs 3 (TIMP3), estando elevado em células de glioblastomas, e com a consequente menor expressão do TIMP3, apresenta maior atividade das MMPs, resultando em maior invasão tecidual pela neoplasia¹³⁴. Esta atividade do miR-21, aliado ao miR-10b também mostra aumento da expressão de MMP-2 e do EGFR, com importante papel na progressão tumoral do carcinoma hepatocelular. A interação com as MMPs por parte dos miRNAs tem impacto na migração e invasão tumoral não somente por meio do remodelamento da MEC, mas também na angiogênese e na transição epiteliomesenquimal (EMT)¹³⁵. A MMP-9 também tem sua ação aumentada em estudos *in vitro*, sendo implicada em maior invasão tumoral e formação de metástases, secundária a alteração de expressão dos miRNAs miR-29b e miR-491-5p¹³¹.

A alteração de deposição do colágeno, em especial o colágeno tipo I, e da laminina acarreta a redução da rigidez da MEC e alteração da polaridade das células epiteliais, facilitando a progressão das células neoplásicas, demonstrado em estudos com modelo animal ou *in vitro*^{131,136}. O estudo de Shi *et al.*¹³⁷ com células de carcinoma mamário demonstrou a inibição do gene COLA2A1, que regula a síntese da cadeia alfa 1 do colágeno tipo I, por parte do miR-301, que está relacionado a doença com recidiva linfonodal e à distância. Enquanto o trabalho de Sengupta *et al.*¹³⁶, o miR-29c apresentava com menor expressão no carcinoma de nasofaringe em comparação com amostras de epitélio sadio da nasofaringe. O miRNA-29c em menores níveis estavam relacionados aos maiores níveis de RNAm de componentes fibrilares da MEC, como COLA1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2 e COL15A1.

Glicoproteínas de adesão, como a tenascina-C, envolvidas na iniciação e progressão das neoplasias, com alta participação na proliferação celular, formação de metástases e angiogênese, podem ter sua expressão aumentada no caso de subexpressão do miR-335, que possui ação de supressão tumoral sobre a 3'UTR da tenascina-C e do fator de transcrição SOX4 em carcinomas mamários^{131,138}.

Os PG e as S-GAG têm importante papel de interação entre as células neoplásicas e o microambiente tumoral, por meio da integração de

sinais de fatores de crescimento, citocinas e integrinas, e adesão célulacélula e célula-matriz. A desregulação de suas expressões está presente em diversos tumores, resultado dessa modulação de eventos moleculares que são relevantes na progressão tumoral. Os miRNAs tem sido evidenciados como um importante fator nesta desregulação, resultando em padrões de expressão aberrantes das PGs e S-GAGs, assim como em enzimas responsáveis por sua biossíntese¹³⁹. O estudo de Uen *et al.*¹⁴⁰ com células de carcinoma mamário MCF-7, por meio da técnica de transferência *western* (*Western blot*) e ensaio de luciferase *in vitro*, mostrou o aumento da expressão do sindecan-1 estava associado a subexpressão de miR-122-5p. A supressão do sindecan-1 reduziu a mobilidade das células neoplásicas, enquanto a superexpressão desse, levou ao aumento ao aumento da mobilidade.

4 MÉTODOS

4.1 Ética

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição sob o número CAAE: 59617616.4.0000.0065 (Anexo A). Todos os pacientes incluídos que estão vivos mantêm seguimento ambulatorial na instituição e foram submetidos à apreciação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B) no momento de seu retorno ambulatorial habitual. Houve a dispensa da assinatura do TCLE pelo Comitê de Ética em Pesquisa para os pacientes que faleceram ou que não foram localizados para prover assinatura do mesmo.

4.2 Desenho do estudo

O presente estudo foi constituído por uma coorte retrospectiva de 341 pacientes portadores de carcinoma de células escamosas da cavidade oral operados pelo Serviço da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 2009 a 2015.

Os dados demográficos, clínicos, histopatológicos e de seguimento foram obtidos através da análise do prontuário digital dos pacientes. Para os pacientes selecionados para análise molecular, foi realizada revisão da espessura tumoral por um patologista experiente.

O material utilizado na análise molecular foi uma parte pequena do remanescente tumoral do exame anatomopatológico que se encontrava em blocos de parafina. O material foi fornecido pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, colaborador desse estudo.

Para a análise molecular foram selecionados 26 pacientes, divididos em dois grupos: o grupo de tumores superficiais, com 12 pacientes, que corresponde àqueles indivíduos cuja neoplasia apresentava espessura de 5 mm; e o grupo de tumores espessos, com 14 pacientes, que equivale aos indivíduos com maior espessura tumoral de 15 e 25 mm para efeito comparativo. Foram selecionados os espécimes de pacientes com valores fixos de 5 mm, 15 mm e 25 mm de espessura tumoral, visando a otimização de recursos e maior agilidade na condução dos testes moleculares, sem prejuízo na qualidade e relevância das análises, uma vez que se trata de um estudo de coorte retrospectivo e incluídos todos os espécimes disponíveis dentro da coorte nos respectivos valores de espessura tumoral determinados. Foram também incluídos 11 espécimes "controle", de indivíduos com características epidemiológicas semelhantes, de mucosa bucal sadia obtidos de cirurgias orais por afecções benignas da boca (por exemplo, mucoceles ou fibromas de mucosa). Este grupo foi constituído para a comparação entre as expressões dos biomarcadores e miRNAs, não só entre os grupos de espécimes tumorais, mas também a fim de se identificar eventuais padrões diferenciais de expressão. Dessa maneira, o estudo molecular foi constituído de 37 amostras.

4.3 Métodos

4.3.1 Confecção do microarranjo tecidual (TMA)

As áreas representativas das neoplasias ou de tecido normal foram marcadas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina e marcadas nas áreas correspondentes nos tecidos fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina. Os blocos doadores foram fixados na base do aparelho e posteriormente, perfurados com agulha de 2,0 mm em quatro áreas de interesse, previamente demarcados de acordo com a correspondência nas lâminas de hematoxilina e eosina.

O bloco receptor de TMA foi confeccionado a 56°C com parafina de elevada pureza contendo polímero em molde com cassete comum. Esses constituintes são necessários para garantir a posterior execução de cortes histológicos delgados e homogêneos, além de evitar possíveis rachaduras no ato da perfuração das agulhas. O recipiente foi mantido em estufa à 60°C por 18 horas (*overnight*) para a retirada de possíveis bolhas e estabilização da parafina, sendo imediatamente levados à geladeira para a solidificação rápida. Finalmente, o bloco recebeu acabamento e foi aparado em micrótomo rotativo para garantir uma superfície completamente reta e lisa. Determinada a profundidade entre 0,8 e 0,9 cm, o "bloco receptor" estava pronto para receber os cilindros de até 0,6 cm de profundidade.

O bloco receptor foi fixado e centralizado à base do aparelho de precisão (Beecher Instruments[®], Silver Spring, MD, EUA), recebendo as

transferências dos blocos doadores, seguindo a orientação de um mapa dos casos previamente planejado em linhas e colunas, contendo os quatro primeiros *spots* na primeira linha, tecido renal de controle proveniente de necrópsia. Após a execução de todos os *spots* com 0,4 mm de distância entre si, o bloco pronto foi colocado em estufa a 60°C para amolecer a parafina e realizou-se o nivelamento dos *spots* pressionando a superfície do bloco em superfície lisa.

O bloco de TMA contendo os espécimes foi seccionado a 3 µm de espessura em micrótomo convencional (Leica Instruments, Wetzlar, Alemanha), utilizando lâminas silanizadas (StarFrost[®]). Os primeiros cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina- eosina e analisadas para identificar possíveis perdas teciduais.

4.3.2 Técnica de imunoistoquímica

Foram realizadas as reações imunoistoquímicas para proteína p16 (clone E6H4, pH 9.3, pronto para uso, Ventana, EUA), proteína p53 (clone DO-7, pH 9.3, pronto para uso, Ventana, EUA), produto do fator de crescimento epidérmico (EGFR, EGFR pharmDxTM kit., pH 9.3, Dako Byogen, EUA), *cluster of differentiation* 34 (CD34, clone QBEnd-10, pH 9.3, pronto para uso, Ventana, USA), proteína BCL-2 (clone SP66, pH 9.3, pronto para uso, Ventana, EUA), colágeno tipo IV (clone CIV22, pH 9.3, pronto para uso, Ventana, EUA), metaloproteinase de matriz tipo 2 (MMP-2, clone sc-13595, pH 6.3, diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnology[®], Dallas, Texas, EUA), metaloproteinase de matriz tipo 9 (MMP-9, clone sc-6840, pH 6.3, diluição

1:100, Santa Cruz Biotechnology[®], Dallas, Texas, EUA), heparanase (HPA1 H80, clone sc25825, pH 6.3, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology[®], Dalas, Texas, EUA), heparanase 2 (HPSE2 C-17 - sc-14900 HPA2 goat pAb, pH 9.3, diluição 1:200, Santa Cruz Biotechnology[®], Dalas, Texas, EUA), laminina α (goat polyclonal antibody M-20 sc-6017, pH 9.3, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology[®], Dalas, Texas, EUA), laminina β (goat polyclonal antibody (C-19) sc-6018, pH 9.3, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology[®], Dallas, Texas, EUA), syndecan 1 (B-A38 – mouse monoclonal antibody, pronto para uso, pH 9.3, Cell Marque Corporation, EUA), syndecan 4 (H-140: sc-15350, diluição 1:100, pH 9.3, Santa Cruz Biotechnology[®], Dalas, Texas, EUA), VEGFR3 (rabbit polyclonal Abcam ab27278, diluição 1:100, pH 6.3) e decorin (N-15: sc-22613 goat polyclonal antibody, diluição 1:100, pH 9.3, Santa Cruz Biotechnology[®], Dalas, Texas, EUA).

As lâminas foram submetidas à reação imunoistoquímica com sistema de detecção Envision FLEX (Dako[®], Agilent Technology Company, Dinamarca). Este sistema detecta anticorpos primários de coelho e camundongo e a reação é visualizada por Envision FLEX DAB mais cromógeno de acordo com o procedimento descrito a seguir. O passo inicial foi realizado em PTLink (Dako[®], Agilent Technology Company, Dinamarca), equipamento responsável pela desparafinização e recuperação antigênica de tecidos parafinados, em tampão de pH alto ou baixo, de acordo com os anticorpos utilizados subsequentemente. O equipamento foi programado para realizar a desparafinização a 60°C por vinte minutos, seguida de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por vinte minutos e hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com

três banhos de trinta segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por trinta segundos, lavagem em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com a incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6.0 (PMB1-125, Spring Bioscience[®], Suiça) ou solução tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB4-125, Spring Bioscience[®], Suiça) em panela a vapor (após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação) e colocado em suporte de lâminas por 35 minutos. Deixou-se esfriar por vinte minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada, seguida de lavagens em água corrente, água destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas com Cas Block[®] (00-8120, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) por 10 minutos a 37^o C.

Posteriormente, realizou-se a incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 minutos a 37º C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4ºC. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas em solução de lavagem por cinco minutos e com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, RE7 159, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37º, seguindo-se da incubação com NovoLink (Polimer Leica Biosystems,

Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37º e lavagens com tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada. Para especificamente os anticorpos primários produzidos em cabra, utilizou-se o anti-goat IgG Vector (Immpress[®] HRP Reagent Kit – Peroxidase, MP-7405, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) por 30 minutos a 37º C.

Depois da incubação das lâminas em solução de lavagem por 5 minutos, a reação imunoistoquímica foi revelada com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth, São Paulo) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37°C.

Finalmente, as lâminas foram submetidas a solução de lavagem por 5 minutos e contracoradas com hematoxilina de Meyer por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada, imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%), seguido de lavagens em água corrente e água destilada. A desidratação foi realizada em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de 1 minuto cada), respectivamente, diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (1.07961.0100, Entellan, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imunoistoquímica compreendem, um controle sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos da reação.

As reações imunoistoquímicas nos TMAs foram avaliadas em

microscopia óptica (microscópio Nikon eclipse e200[®], Tóquio, Japão) e por meio do software Pannoramic Viewer[®] (3DHistech Ltd, Budapeste, Hungria).

A imunorreatividade ao EGFR, p53, p16, BCL-2, colágeno tipo IV, MMP-2, MMP-9, HPA1, HSPE2, decorin, syndecan-1, syndecan-4, laminina α e laminina β foi mensurada a partir da porcentagem de células tumorais positivas para a coloração presentes nos quatro cortes e a frequência, de modo semiquantitativo, dividida em seis classes: 0%; >0-10%; >10-25%; >25-50%; >50-75%; >75%. A imunorreatividade do p16 foi considerada nas células basais e parabasais coradas. A imunorreatividade às MMP-2, MMP-9, laminina α e laminina β foi considerada, separadamente, em células neoplásicas e fibroblastos do estroma neoplásico¹⁴¹⁻¹⁴⁶.

Quanto ao antígeno ki-67, sua avaliação foi realizada de forma quantitativa com a contagem das primeiras 500 células neoplásicas detectadas, contando a partir do primeiro corte avaliado, excluindo áreas de inflamação, fibrose, necrose e má fixação, conforme o padronizado para análises de reações imunoistoquímica em TMA. Após a contagem de 500 células, foi obtida a porcentagem de células coradas, independentemente da intensidade da marcação¹⁴⁷.

A imunorreatividade ao CD34 e VEGFR3 permitiu calcular a densidade de microvasos (DMV), obtida por meio da média aritmética do número de vasos presentes nos quatro cortes do mesmo paciente. Todas as células endoteliais coradas ou do agrupamento de células foram contadas como um microvaso. Para análise, foi realizada contagem no aumento de 400x¹⁴⁸.

4.3.3 Técnica de detecção de microRNAs

4.3.3.1 Extração de RNA a partir de material parafinado

Para extração de RNA a partir de material parafinado foi utilizado o kit MagMAX[®] FFPE RNA *Ultra Kit* (Applied Biosystems[®], Foster City, Ca, USA), para isso foi seguido o seguinte protocolo.

As amostras individuais foram compostas por cinco cortes de 5 µm de material parafinado, totalizando 25 µm, dispostas em microtubos. Para cada amostra foi utilizado 1 mL de xilol absoluto, seguido de um suave vórtex e *spin* em velocidade máxima de 14.000 rpm, com o propósito de garantir que todo o tecido se mantivesse submerso no solvente durante a incubação em banho maria a 50°C por 3 minutos.

Em seguida as amostras foram centrifugadas por dois minutos em velocidade máxima de 14.000 rpm para a precipitação do tecido, desta forma permitindo a remoção e descarte do sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol absoluto, seguidos de um vórtex e uma centrifugação de dois minutos em velocidade máxima de 14.000 rpm para nova precipitação do tecido, seguido da remoção e descarte do sobrenadante.

O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez e, após a remoção do sobrenadante, as amostras foram centrifugadas a vácuo por 20 minutos a 45°C. Em seguida, para cada amostra, foram adicionados 110 µL de solução de protease (*Protease Solution*). Essa solução continha 10 µL de protease (armazenada a 4°C) e 100 µL de *buffer protease* (armazenado em temperatura ambiente), seguido de suave homogeneização com a pipeta e incubação em banho a 55°C por uma hora.

Em seguida, as amostras foram rapidamente centrifugadas (*spin*) em velocidade máxima de 14.000 rpm e incubadas em banho a 90°C por 1 hora. Após a incubação, foram novamente centrifugadas rapidamente (*spin*) em velocidade máxima de 14.000 rpm e resfriadas na geladeira. Em cada amostra foram adicionados 20 µL de *Nucleic Acid Binding Beads*.

A seguir, foram adicionados 450 µL do RNA *Rebinding Buffer Solution,* que continha 200 µL de *Binding Buffer* e 250 µL de isopropanol. Em cada amostra, misturaram-se (*shaker*) as amostras por cinco minutos na velocidade 10 ou de 1.150 rpm. As amostras foram colocadas em suporte magnético por dois minutos ou até os *beads* estarem precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã).

Com os *beads* precipitados na parede, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com pipeta, em seguida lavou-se os *beads* com 500 µL de RNA *Wash Buffer*, misturou-se (*shaker*) por um minuto na velocidade 10 ou de 1.150 rpm até a mistura estar totalmente na cor chocolate. As amostras foram novamente colocadas em suporte magnético por dois minutos ou até os *beads* estarem precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã).

O procedimento anterior foi repetido novamente. Entretanto, ao invés de utilizar o RNA *Wash Buffer* foi utilizado o RNA *Wash Solution 2*. Após o sobrenadante ter sido removido, foram misturadas (*shaker*) por dois minutos na velocidade 10 ou 1.150 rpm para secar os *beads*, tomando cuidado para não deixar secar em excesso.

Ao fim dessa etapa, acrescentaram-se 100 μ L de DNAse Solution, que continha 20 μ L de DNAse, 10 μ L de *buffer* e 70 μ L de água *nuclease* *free*, nos *beads*, misturaram-se (*shaker*) as amostras na velocidade 8 ou 1000 rpm por 20 minutos a 37°C ou temperatura ambiente.

A seguir, foram adicionados 450 µL do RNA *Binding Buffer* em cada amostra. A solução continha 200 µL de *Binding Buffer* e 250 µL de isopropanol. Continuando, misturaram-se (*shaker*) as amostras por cinco minutos na velocidade 10 ou de 1.150 rpm. As amostras foram colocadas em suporte magnético por dois minutos ou até os *beads* estarem precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã).

Em repetição, com os *beads* precipitados na parede, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com pipeta. Em seguida, lavaram-se os *beads* com 500 µL de RNA *Wash Buffer*, misturou-se (*shaker*) por um minuto na velocidade 10 ou de 1.150 rpm até a mistura estar totalmente na cor chocolate. As amostras foram novamente colocadas em suporte magnético por dois minutos ou até os *beads* estarem precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã).

O procedimento anterior foi repetido. Entretanto, ao invés de utilizar o RNA *Wash Buffer* foi utilizado o RNA *Wash Solution 2*. Após o sobrenadante ter sido removido, foram misturadas (*shaker*), por 1 minuto, na velocidade 10 ou 1.150 rpm. As amostras foram colocadas em suporte magnético por dois minutos ou até os *beads* estarem precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã). Com os *beads* precipitados na parede, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com pipeta e misturou-se (*shaker*) por três minutos na velocidade 10 ou 1.150 rpm, tomando cuidado para não deixar secar em excesso.

Para a última etapa adicionaram-se 50 µL de *Elution Solution* nos *beads*, misturou-se (*shaker*) por cinco minutos na velocidade 10 ou 1150 rpm até a mistura estar totalmente na cor chocolate. Em seguida, colocaram-se as amostras no suporte magnético por dois minutos e os *beads* estares precipitados voltados para o suporte magnético (contra o imã).

Para finalizar a etapa, passou-se o sobrenadante (RNA purificado) para um tubo limpo e livre de RNAse e manteve-se no gelo para mensurar a concentração de RNA. Em caso de armazenamento, pode-se manter a -20°C por até 1 mês ou -80°C por mais de 1 mês.

4.3.3.2 Quantificação da concentração e diluição do RNA obtido

No kit de obtenção de miRNA a partir do DNA complementar (cDNA), é dito que a concentração de RNA precisa estar entre 1ng e 10ng, para garantir que essa condição seja validada, foi realizada a quantificação da concentração de RNA das amostras obtidas. Com a quantificação realizada, 10 µL da solução-mãe foram passadas para um novo tubo e, a partir deste novo tubo, utilizaram-se 2 µL para diluir a solução mãe até que atingisse um padrão de concentração de aproximadamente 10ng/µL e, desta forma, fosse possível obter o cDNA por protocolo adequado.

4.3.3.3 Obtenção do cDNA

Para o início do protocolo de obtenção de cDNA, preparou-se a mistura (mix) *Poly (A) Reaction* para 11 reações que continha 5,5 μ L de 10x *Poly A Buffer*, 5,5 μ L de ATP, 3,3 μ L de *Poly A Enzyme* e 18,7 μ L de RNA*se free water*. Com esse mix pronto, em um novo tubo, adicionaram-se 2 μ L do RNA a 10 ng/ μ L extraído anteriormente e 3 μ L do mix *Poly (A) Reaction*. Foi realizado, então, vórtex e *spin* e em seguida uma ciclagem (37°C por 45 minutos, 65°C por 10 minutos e 4°C em *Hold*).

Seguindo com o protocolo, foi preparado o mix *Ligation Reaction* para 11 reações que continha 33 μ L de 5x DNA *Ligase Buffer*, 49,5 μ L de 50% PEG 8000, 6,6 μ L de 25x *Ligation Adaptor*, 16,5 μ L de RNA*se Ligase* e 4,4 μ L de RNA*se free water* que foi finalizado com vórtex e *spin*.

Ao produto da primeira ciclagem acrescentaram-se 10 μ L do mix Ligation Reaction, seguido por vórtex, spin e uma segunda ciclagem (16°C por 60 minutos e 4°C em Hold). Enquanto isso, preparou-se o mix RT Reaction Mix para 11 reações, que continha 66 μ L de 5x RT Buffer, 13,2 μ L de dNTP Mix (25nM cada), 16,5 μ L de 20x Universal RT Primer, 33 μ L de 10x RT Enzyme Mix e 36,3 μ L de RNAse free water, finalizado de vórtex e spin.

Nesse momento, pode ser realizada a quantificação de cDNA, caso fosse de interesse. Ao produto da segunda ciclagem, acrescentaram-se 15 µL do mix RT *Reaction Mix*, finalizando com vórtex, *spin* e uma terceira ciclagem (42°C por 15 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C em *Hold*). Em caso de armazenamento, pode-se manter o produto da terceira ciclagem a -20°C por até 2 meses.

4.3.3.4 Amplificação do microRNA

Para início do protocolo de amplificação do miRNA foi preparado o mix *miR-AMP Reaction* para 11 reações que continha 275 µL de 2x *miR-AMP Master Mix*, 27,5 µL de 20x *miR-AMP Primer Mix* e 192,5 µL de RNA*se free water*, seguido de vórtex e *spin*.

Transferiram-se 5 µL da reação de RT armazenada em -20°C ao fim da etapa de obtenção de cDNA para um novo tubo e acrescentaram-se 45 µL do mix *miR-AMP*, seguido de vórtex, *spin* e uma ciclagem (um ciclo de 95°C por 5 minutos, 14 ciclos de 95°C por 3 segundos, 60°C por 30 segundos, um ciclo de 99°C por 10 minutos, 4°C em *Hold*). Em caso de armazenamento, pode-se manter o produto desta ciclagem a -20°C por até 2 meses.

4.3.3.5 Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase quantitativo (*RT-qPCR*) com o sistema *TaqMan MicroRNA Assay-Array*

A determinação da expressão dos miRNAs foi realizada por qPCR utilizando o sistema TaqMan[®] Low Density Array (TLDA; Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Ma, USA). A reação de qPCR ocorre de modo exponencial, sendo assim, a cada ciclo da reação, novas moléculas de cDNA dupla-fita são sintetizadas. O fluoróforo utilizado no processo é incorporado a cada cadeia de DNA recém-sintetizada, e, consequentemente, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente. Dessa forma, o número de ciclos correspondentes ao início da emissão de fluorescência (ciclo *threshold* – Ct) é inversamente proporcional ao nível de expressão do transcrito, sendo menor durante a aquisição de sinal de amostras que
possuem maior abundância do gene em questão. O sistema TLDA é composto por uma placa de 384 poços que foi customizado para conter em triplicata pares de *primers* liofilizados específicos para a amplificação de 63 miRNAs humanos e um de *Caenorhabditis elegans* o cel-miR39, podendo ser avaliados dois pacientes por placa. Os miRNAs foram escolhidos baseados em extensa revisão da literatura sobre o papel de miRNAs e a ação sobre diversos efeitos biológicos, conforme demonstrado no Quadro 4. Foram ainda incluídos os miR-147b, miR-107, miR27a, miR-124, miR-219a e cel-miR-39 na tentativa de usá-los como normalizadores de reação, conforme descrito por Bufalino *et al.*¹⁴⁹.

Efeito biológico / Alvo molecular	micro-RNAs
Metaloproteinases	miR-9, miR-29b, miR-125b, miR-212, miR-132, miR-320, miR-373, miR-520c
Heparanase	miR-10b, miR-30a, miR-155, miR1258
Syndecans	miR-10b, miR-143, miR-494
Decorin	miR21
Laminina	miR218
Adesão celular	let-7, miR-9, miR-17, miR-21, miR29b, miR-30a, miR-31, miR-192, miR-200, miR-335, miR-375
Migração	miR10a, miR-29c, miR-96, miR-125a, miR-126, miR-143, miR- 200b, miR-200c, miR-204, miR-223, miR-320a, miR-340
Invasão	miR-1, miR-10a, miR-34c, miR-96, miR-99a, miR-125a, miR-126, miR-133a, miR-137, miR-138, miR-200a, miR-211, miR-221, miR-222, miR-320a, miR-330, miR-340, miR-375, miR-378, miR-489
Proliferação celular	miR34a, miR-125b, miR-133a, miR-184, miR 221

	Quadro 4 -	Painel (de mi	icro-RNAs	selecionados
--	------------	----------	-------	-----------	--------------

As sequências dos primers utilizados estão demonstradas no Quadro 5.

microRNA	Sequência dos primers
cel-mir-39-3p	
hsa-let-7b-5p	
hsa-let-7d-5n	
hsa-let-7i-5n	
hsa-mir-1-3p	
hsa-mir-106b-5n	
hsa-mir-107	
hsa mir 10a 5p	
hsa mir 10b 5p	
hsa-mir-124-3p	
hsa mir 1259	
hsa mir 125a 3n	
haa mir 1256 5n	
haa mir 126 2n	
haa mir 120-3p	
hsa-mir 122-3p	
nsa-mir 127	
nsa-mir-137	
nsa-mir-138-5p	AGCUGGUGUGUGAAUCAGGCCG
nsa-mir-143-3p	
nsa-mir-14/b	
nsa-mir-155-5p	
nsa-mir-16-5p	
nsa-mir-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-mir-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU
hsa-mir-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-mir-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
hsa-mir-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
hsa-mir-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA
hsa-mir-203a-3p	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
hsa-mir-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
hsa-mir-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG
hsa-mir-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-mir-211-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU
hsa-mir-212-3p	UAACAGUCUCCAGUCACGGCC
hsa-mir-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU
hsa-mir-219a-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU
hsa-mir-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-mir-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-mir-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-mir-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC
hsa-mir-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-mir-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-mir-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-mir-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-mir-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
hsa-mir-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA
hsa-mir-330-3p	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA
hsa-mir-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
hsa-mir-340-5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
hsa-mir-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
hsa-mir-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
hsa-mir-373-3p	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU
hsa-mir-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-mir-376c-3p	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU
hsa-mir-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
hsa-mir-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC
hsa-mir-489-3p	GUGACAUCACAUAUACGGCAGC
hsa-mir-494-3p	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
hsa-miR-498	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUC
hsa-mir-518d-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG
hsa-mir-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-940	AAGGCAGGGCCCCCGCUCCCC
hsa-mir-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU
hsa-mir-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG

Quadro 5 - Sequência dos primers utilizados na pesquisa dos microRNAs

Na reação de transcrição reversa (RT), o RNA total (10 ng) foi convertido em cDNA com o auxílio do kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Syntesis (Applied Biosystems[®], Foster City, Ca, EUA). Na primeira etapa, foi feita a adição de cauda de poliadenosina (poliA) com adição de 0,5µL do tampão poli(a) 10x, 0,5µL de ATP, 0,3µL de enzima Poli(A) e 1,7µL de água livre de RNAse adicionados a 10ng de RNA total. Em um termociclador, a mistura foi submetida a duas etapas: (a) poliadenilação (37°C por 45 minutos) e (b) inativação da enzima para finalizar a reação (65°C por 10 minutos). Em seguida foi feita a ligação de adaptadores nos quais 10 µL da mistura (tampão de DNA ligase 1,5x; polietilenoglicol 22,5x; adaptador de ligação 1,5x e RNA ligase) é adicionado ao produto da reação anterior. A reação foi realizada a 16°C por 60 minutos. Em seguida foi realizada a reação de RT com adição de 15 µL da mistura (tampão de RT 1x; dNTPs 4mM; oligonucleotídeo universal RT 1x; enzima de RT 1x). A reação aconteceu a 42°C por quinze minutos e foi inativada com incubação a 85°C por 5 minutos. Cinco microlitros do cDNA foram submetidos a uma amplificação com 45 µL da mistura (master mix miR-Amp 1x e mix miR-Amp primer 1x). Em um termociclador, a mistura foi submetida às seguintes temperaturas: 95°C por 5 minutos; 14 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos; 99°C por 10 minutos. Antes da reação, o cDNA amplificado foi diluído 1:10 em tampão Tris-EDTA 0,1x – uma mistura com 110 µL do cDNA diluído, 220 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x e 110 µL de água ultrapura. Dessa mistura, 100 µl foram aplicados por canaleta, sendo que uma placa do sistema TLDA foi dividida para duas amostras. Após a aplicação das amostras, a placa foi submetida a duas centrifugações de um minuto cada, na rotação de 1.200 rpm, selada e a reação foi realizada no equipamento 7900-HT PCR System (Applied Biosystems[®], Foster City, Ca, EUA) nas seguintes condições: a 92°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos.

4.3.3.6 Análise da expressão dos microRNAs e procedimentos de normalização

Para análises de expressão do perfil de miRNAs, os valores de cycle threshold (Ct) foram determinados com a plataforma Cloud (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Ma, EUA). miRNAs com valores de Ct > 38 foram considerados como indeterminados e descartados. Apenas os miRNAs detectados em pelo menos 68% das amostras foram considerados para as análises estatísticas. Dessa forma, foram descartadas as expressões dos seguintes 23 miRNAs: miR-107, miR-10a-5p, miR-124-3p, miR-125a-3p, miR-132-3p, miR-137, miR-138-5p, miR-147b, miR-204-5p, miR-211-5p, miR-212-3p, miR-218-5p, miR-219a-5p, miR-330-3p, miR-335-5p, miR-340-5p, miR-34c-5p, miR-489-3p, miR-494-3p, miR-498, miR-518d-5p, miR-940 e miR-96-5p. A normalização entre as amostras foi realizada pelo método Quantil utilizando programa Expander¹⁵⁰ (disponível 0 em http://acgt.cs.tau.ac.il/expander), conforme demonstrado na Figura 8.



Figura 8 - Gráficos de boxplot demonstrando a normalização das amostras por quantil

Para escolha de normalizador interno da amostra, os miRNAs detectados em 100% das amostras foram testados quanto sua estabilidade intra-amostra e entre os diferentes grupos biológicos com o programa NormFinder (Departamento de Medicina Molecular, Hospital Universitário Aarhus, Dinamarca; disponível em: https://moma.dk/normfinder-software), sendo as diretrizes propostas por Andersen *et al.*¹⁵¹. Após este procedimento, o miR-let-7i foi utilizado na normalização dos valores de expressão de todos os demais miRNAs. Dessa forma, os valores de expressão dos miRNAs foram demonstradas através do - Δ Ct.

4.3.4 Análise estatística

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua de distribuição paramétrica foram organizados e descritos através da média e do desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP). Para as categorizadas, foram utilizadas frequências absolutas e relativas. Os valores de corte de variáveis quantitativas foram determinados por análise de curva Receiver Operating Characteristic (ROC) e as qualitativas, por associação de categorias. Para a comparação de duas populações amostrais, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e entre três ou mais populações, o teste de Kruskall-Wallis com teste auxiliar de Dunn. Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas com aplicação do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. As análises de sobrevivência foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas pelo teste de Log-Rank. Variáveis com p<0,10 à análise univariada foram submetidas a análises multivariadas, que foram realizadas através de modelos de regressão linear, para variáveis independentes quantitativas, ou logística, para variáveis independentes qualitativas. Clusteres hierárquicos não supervisionados das amostras e dos miRNAs baseados em distância Euclidiana com ligação completa foram realizados com os miRNAs diferencialmente expressos. Estimativas de acurácia (área sob a curva ROC - AUC), além de sensibilidade e especificidade foram determinadas também por análises de curva ROC (os valores de Z-score da expressão foram utilizados nos casos de miRNAs superexpressos e o negativo do Z-score nos casos daqueles subexpressos). Em todas essas análises, foi utilizado o

programa estatístico SPSS[®] versão 26.0 (SPSS[®] Inc; Ilinois, EUA). Ainda, as comparações estatísticas da expressão dos miRNAs nos diferentes grupos biológicos foram realizadas usando os testes de *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) e os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com ajuste de *false discovery ratio* (FDR), quando utilizadas, com o emprego do programa Multi Experimental Viewer (MeV) versão 4.5.0; disponível em: http://mev.tm4.org, que também foi utilizado na obtenção dos gráficos de *heatmap*.

RESULTADOS

Após a caracterização dos grupos, os resultados advindos na presente tese, serão primeiramente demonstrados na diferenciação entre o carcinoma de células escamosas da cavidade oral e a mucosa sadia e, posteriormente, na diferenciação entre os tumores superficiais e espessos, em comparação à mucosa normal. Por último, serão abordadas as comparações entre as expressões de miRNAs e os marcadores imunoistoquímicos, além do possível impacto clínico dos achados, atendendo à sequência dos objetivos propostos.

5.1 Caracterização dos grupos

Foram incluídos 11 espécimes de mucosa sadia obtidos de cirurgias por tumores benignos da cavidade oral, o que caracterizou o grupo "controle" do estudo. Destes, 9 (81,8%) eram homens, apresentavam média de idade de 54 anos (DP de 9,2 anos) e 6 (54,5%) eram ainda tabagistas.

Os 26 espécimes de câncer da cavidade oral foram compostos por 12 tumores classificados como "superficiais" (com 5 mm de espessura) e 14 tumores classificados como "espessos" (com 15 ou 25 mm de espessura). As características demográficas, clínicas e anatomopatológicas estão demonstradas na Tabela 1. Nota-se a semelhante distribuição dos grupos quanto às variáveis demográficas dos dois grupos, porém com tumores com características anatomopatológicas e de seguimento mais desfavoráveis naqueles com tumores espessos, como era de se esperar dado ao fato de a espessura tumoral ser um fator sabidamente de pior prognóstico nestes pacientes.

Tabela 1 - Característicasdemográficas,clínicaseanatomopatológicasdospacientescomcarcinomadecélulas escamosas da cavidade oral incluídos no estudo

Variável	Grupo de tumores superficiais (5 mm de espessura)	Grupo de tumores espessos (15 ou 25 mm de espessura)
Sexo Masculino	9 (75%)	9 (64,3%)
Idade*	62,1 \pm 11,1 anos	$62,6\pm7,6\text{ anos}$
Sítio Primário		
Área retromolar	2 (16,7%)	-
Rebordo gengival	1 (8,3%)	2 (14,2%)
Língua	8 (66,7%)	5 (35,7%)
Soalho de boca	1 (8,3%)	3 (21,4%)
Mucosa jugal	-	1 (7,1%)
Palato duro	-	3 (21,4%)
Tabagismo	9 (75%)	11 (78,6%)
Etilismo	5 (41,7%)	10 (71,4%)
Grau de diferenciação		
Bem	5 (41,7%)	3 (21,4%)
Moderadamente	6 (50%)	10 (71,4%)
Pouco	1 (8,3%)	1 (7,1%)
Invasão perineural	0 (0%)	9 (64,3%)
Invasão angiolinfática	1 (8,3%)	2 (14,3%)
Metástases linfonodais	5 (41,7%)	10 (71,4%)
Extravasamento capsular	4 (80%)	7 (70%)
Radioterapia adjuvante	5 (41,7%)	11 (78,6%)
Quimioterapia adjuvante	2 (16,7%)	4 (28,6%)
Recidiva locorregional	0 (0%)	2 (14,3%)
Metástases à distância	0 (0%)	2 (14,3%)
Morte	1 (8,3%)	7 (50%)

* Média ± Desvio-padrão

5.2 Análise do perfil de microRNAs na diferenciação entre mucosa normal e o carcinoma de células escamosas da cavidade oral

Os espécimes de ambos os grupos tumorais (superficial ou espesso) foram agrupados nessa primeira análise para a diferenciação da expressão entre os miRNAs e a mucosa normal.

Observou-se a menor expressão de miR-10b-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-320a, miR-485-5p e miR-99a-5p e maior expressão de miR-106b-5p, miR-21-5p, miR-223-3p e miR-34a-5p no tecido tumoral, quando comparado à mucosa sadia, à análise univariada. Os resultados completos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 -	Anális	e u	nivariada	da expres	ssã	o dif	erencial de	microRNAs
	entre	а	mucosa	normal	е	os	espécimes	tumorais,
	normalizados pelo miR-let-7i							

microPNA	Mucosa	normal	ormal Tun		n§
IIICIONNA	Média	EP	Média	EP	þ.
miR-let7b-5p	-1,427	0,275	-1,824	0,213	0,332
miR-let7d-5p	-4,606	0,366	-5,213	0,198	0,192
miR-1-3p	-1,779	0,399	-0,212	0,275	0,120
miR-106b-5p	-4,496	0,395	-3,219	0,295	0,030
miR-10b-5p	-2,908	0,270	-4,216	0,195	<0,001
miR-1258	-0,745	0,206	-1,056	0,156	0,228
miR-125b-5p	-0,190	0,226	-0,648	0,174	0,132
miR-126-3p	-0,955	0,254	-1,143	0,201	0,614
miR-133a-3p	-2,280	0,518	-2,509	0,726	0,485
miR-143-3p	-1,444	0,347	-0,616	0,144	0,028
miR-155-5p	-6,445	0,658	-6,598	0,364	0,949
miR-16-5p	-4,411	0,397	-4,018	0,226	0,454
miR-17-5p	-4,737	0,416	-5,141	0,342	0,562
miR-184	-3,706	0,864	-3,533	0,424	0,864
miR-192-5p	-4,221	1,012	-4,731	0,555	0,828
miR-200a-3p	-2,763	0,189	-2,678	0,243	0,961
miR-200b-3p	-0,822	0,311	-0,337	0,279	0,256
miR-200c-3p	-1,836	0,173	-1,524	0,217	0,460
miR-203a-3p	-2,535	0,383	-3,227	0,275	0,271
miR-205-5p	0,197	0,407	-0,091	0,213	0,316
miR-21-5p	-2,010	0,260	0,229	0,176	<0,001
miR-221-3p	-1,582	0,296	-2,542	0,230	0,012
miR-222-3p	-4,557	0,238	-5,913	0,316	0,013
miR-223-3p	-5,383	0,326	-3,959	0,206	0,005
miR-27a-3p	-2,493	0,350	-1,786	0,183	0,097
miR-29a-3p	-3,036	0,412	-2,791	0,178	0,653
miR-29b-3p	-3,261	0,315	-2,501	0,188	0,109
miR-29c-3p	-2,961	0,353	-2,365	0,155	0,130
miR-30a-5p	-0,904	0,358	-0,637	0,304	0,553
miR-31-5p	-4,736	0,578	-4,627	0,292	0,701
miR-320a	-0,538	0,318	-1,794	0,294	0,016
miR-34a-5p	-3,005	0,301	-2,162	0,162	0,033
miR-373-3p	-6,741	0,690	-7,719	0,393	0,219
miR-375	-1,246	0,381	-0,662	0,203	0,196
miR-376c-3p	-6,667	0,297	-6,685	0,485	0,668
miR-378a-3p	-2,452	0,301	-2,950	0,452	0,876
miR-485-5p	-2,970	0,554	-5,621	0,448	0,008
miR-9-5p	-2,377	0,936	-2,015	0,301	0,781
miR-99a-5p	-1,786	0,293	-2,738	0,191	0,013

EP = erro-padrão; § - Mann-Whitney

À análise multivariada (Tabela 3), notou-se que, dentre os miRNAs identificados como diferentemente expressos, foram preditores de malignidade a alta expressão dos miR-21-5p, e miR-106-5p e a baixa expressão do miR-320a, e miR-222-3p. Ainda, a associação desses quatro miRNAs demonstrou uma boa diferenciação entre as amostras (modelo de regressão linear; R²=0.926, EP=0,119; p=0,001), segundo demonstrado no Dendograma da Figura 9.

Tabela 3 - Análise multivariada por regressão linear, demonstrando os
coeficientes do modelo com os quatro microRNAs
diferentemente expressos, na diferenciação entre as
amostras tumorais e a mucosa sadia

microRNA	Beta	IC95%	р
miR-21-5p	0,131	0,070 0,1	91 <0,001
miR-320a	-0,092	-0,139 -0,0	045 0,001
miR-106b-5p	0,149	0,094 0,2	03 <0,001
miR-222-3p	-0,107	-0,158 -0,0	056 0,001



Figura 9 - Dendograma hierárquico demonstrando a segregação entre os grupos tumoral e mucosa sadia através dos miRs 21-5p, 320a, 106-5p e 222-3p

A análise de *heatmap* utilizando-se os miRNAs diferentemente expressos à análise estatística multivariada (aumento de miR-21-5p e miR-106b-5p e diminuição na expressão de miR320a, e miR-222-3p) é demonstrado na Figura 10. Nota-se também uma boa segregação entre as amostras sadias e tumorais utilizando-se os quatro miRNAs selecionados.



Figura 10 - *Heatmap* demonstrando os miRNAs diferentemente expressos e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia, considerando-se somente os miRNAs diferentemente expressos na análise multivariada (miR -21-5p, miR320a, miR-106b-5p e miR-222-3p). Os *spots* em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs

Estimando-se a acurácia no diagnóstico diferencial entre os tecidos tumorais e a mucosa sadia, o miR-21-5p (AUC=0,972; IC95%: 0,911 - 1,000) foi o de melhor desempenho estatístico, seguido do miR-222-3p (AUC=0,798; IC95%: 0,620 - 0,975), miR-320a (AUC=0,786; IC95%: 0,570 – 1,030) e do miR-106-5p (AUC=0,770 IC95%: 0,586 - 0,954), estudados como variáveis contínuas. As curvas são demonstradas na Figura 11.



Figura 11 - Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) demonstrando a acurácia no diagnóstico do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação à mucosa sadia dos miRNAs 21-5p, 106b-5p, 222-3p e 320a

5.3 Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos na mucosa normal e no carcinoma de células escamosas da cavidade oral

Em relação aos marcadores imunoistoquímicos (Figuras 12 e 13), notou-se uma maior expressão de p53, EGFR, metaloproteinase-2 (MMP-2), laminina beta, Ki67 e CD34 nas células tumorais quando comparado à mucosa sadia. Ainda, evidenciou-se maior expressão de MMP-2, MMP-9, laminina alfa e laminina beta nos fibroblastos relacionados ao tumor, além de menor continuidade de colágeno tipo IV na membrana basal. Os dados completos estão demonstrados nas Tabelas 4 (dados brutos) e 5 (dados resultados estratificados). Esses demonstram maiores índices de proliferação celular, neoangiogênese e degradação da matriz extracelular nos espécimes tumorais, inclusive mediada por fibroblastos.



Figura 12 - Imunoexpressão diferencial dos diversos marcadores imunoistoquímicos entre os espécimes de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e a mucosa sadia. (imunoistoquímica, peroxidase, 200x)



Figura 13 - Imunoexpressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos relacionados à matriz extracelular entre os espécimes de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e a mucosa sadia (imunoistoquímica, peroxidase, 200x; 400x colágeno tipo IV na mucosa sadia) colágeno (imagens b, c, f e g) seta vermelha indica a marcação em fibroblastos e (imagem j) a seta azul indica presença de colágeno tipo IV na membrana basal e seta vermelha ausência

Grupo	00/	0.400/	Imunoex	xpressão	50 75 0/	> 7 50/	p§
	0%	0-10%		25-50% CL2	50-75%	>75%	
controle tumor	0 (0%) 1 (3,8%)	11 (100%) 22 (33,3%)	0 (0%) 2 (97,7%)		-	0 (0%) 1 (3,8%)	0,594
controle tumor	4 (36,4% 1 (3,8%)	7 (63,6%) 20 (76,9%)	р 0 (0%) 1 (3,8%)	0 (0%) 1 (3,8%)	0 (0%) 3 (11,5%)	-	0,080
controle tumor	2 (18,2%) 3 (11,5%)	9 (81,8%) 10 (38,5%)	p 0 (0%) 3 (11,5%)	53 0 (0%) 2 (7,7%)	0 (0%) 5 (19,2%)	0 (0%) 3 (11,5%)	0,127
controle tumor	-	1 (9,1%) 1 (3,8%)	EG 5 (45,5%) 0 (0%)	GFR 2 (18,2%) 15 (57,7%)	2 (18,2%) 8 (30,8%)	1 (9,1%) 2 (7,7%)	0,040
controle tumor	-	1 (9,1%) 1 (7 7%)	MMP-2 Fi 6 (54,5%) 4 (15 4%)	ibroblasto 4 (36,4%) 11 (42,3%)	0 (0%) 8 (30 8%)	0 (0%)	0,082
tunioi		1 (1,1 70)	MMP-2	2 Lesão	0 (00,070)	1 (0,070)	
controle tumor	-	4 (36,4%) 1 (3,8%)	3 (27,3%) 0 (0%) MMP-9 Fi	2 (18,2%) 7 (26,9%) ibroblasto	2 (18,2%) 9 (34,6%)	0 (0%) 9 (34,6%)	0,001
controle tumor	8 (72,7%) 0 (0%)	2 (18,2%) 8 (30,8%)	0 (0%) 5 (19,2%)	1 (9,1%) 9 (34,6%)	0 (0%) 4 (15,4%)	-	<0,001
controle tumor	5 (45,5%) 0 (0%)	3 (27,3%) 11 (42,3%)	1 (9,1%) 8 (30,8%)	2 (18,2%) 6 (23,1%)	0 (0%) 1 (3,8%)	-	0,006
controle	1 (9,1%)	6 (54,5%)	Heparana 3 (27,3%)	se (HPA-1) 1 (9,1%)	0 (0%)	-	
tumor	5 (19,2%)	9 (34,6%)	11	0 (0%)	1 (3,8%)	-	0,343
			Laminina β	Fibroblasto			
controle tumor	0 (0%) 7 (26,9%)	4 (36,4%) 14 (53,8%)	2 (18,2%) 5 (19,2%)	4 (36,4%) 0 (0%)	1 (9,1%) 0 (0%)		0,004
controle tumor	9 (81,8%) 3 (11,5%)	2 (18,2%) 13 (50%)	0 (0%) 6 (23,1%)	0 (0%) 1 (3,8%)	0 (0%) 3 (11,5%)	-	0,001
controle tumor	0 (0%) 5 (19 2%)	11 (100%) 10 (38 5%)	0 (0%) 6 (23 1%)	0 (0%)	0 (0%) 3 (11 5%)	-	0,018
controle	4 (36,4%)	7 (63,6%)	Laminina 0 (0%)	a α Lesão 0 (0%)	-	-	0,090
tumor	2(7,7%)	18 (68,2%)	5 (19,2%) Heparanas	1 (3,8%) se 2 (HPA-2)	-	-	-,
controle	3 (27,3%)	8 (72,7%)	0(0%)	0(0%)	-	-	0,384
tumor	5 (19,2%)	15 (57,7%)	4 (15,4%) Synde	ecan 1	-	-	
controle	-	-	-	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)	0,450
tumor	-	-	- Synde	ecan 4	12 (40,270)	7 (20,970)	
controle	3 (27,3%) 12 (46,2%)	7 (63,6%) 14 (53.8%)	-	1 (9,1%)	-	-	0,205
tumor	12 (40,2 /0)	14 (55,6 %)	Colágen	no tipo IV	-	-	
controle tumor	-	- 3 (11,5%)	- 5 (19,2%)	1 (9,1%) 10 (38,5%)	7 (63,6%) 7 (26,9%)	3 (27,3%) 1 (3,8%)	0,015
controle	-	2 (18,2%)	1 (9,1%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	-	
tumor	-	5 (19,2%)	11 (42,3%)	9 (34,6%)	1 (3,8%)	-	0,148
controle			(42,070) Ki - 23,5 34 5	- 67 * (2,5) (3,0)			0,009*
tunior			CD	(0,0))34 *			
controle tumor			81,3 84,2 VFG	(7,9) (5,9) i FR3 *			0,460*
controle tumor			17,3 30,0	(5,7) (8,3)			0,707*

Tabela 4 -Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos na
diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia

* Média (erro-padrão); teste de Mann-Whitney. § - qui-quadrado

Grupo / Marcador	Imunoex	pressão	n§
BCI 2	<10%	>10%	P
controle	11 (100%)	0 (0%)	
tumor	23 (88 5%)	3 (11 5%)	0,240
p16	≤50%	>50%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0.440
tumor	21 (80,8%)	5 (19,2%)	0,118
p53	≤25%	>25%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0.010
tumor	16 (61,5%)	10 (38,5%)	0,016
EGFR	≤25%	>25%	
controle	6 (54,5%)	5 (45,5%)	<0.001
tumor	1 (3,8%)	25 (98,2%)	-0,001
MMP-2 Fibroblasto	≤50%	>50%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0.025
tumor	17 (65,4%)	9 (34,6%)	0,020
MMP-2 Lesão	≤50%	>50%	
controle	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0,004
tumor	8 (30,8%)	18 (69,2%)	
WIWF-9 FIDFODIASTO	≥∠3%	>25%	
controle	13 (50%)	13 (50%)	0,019
	<25%	>25%	
ininir -3 Lesau controle	9 (81 8%)	2 (18 2%)	
tumor	19 (73 1%)	7 (26 9%)	0,572
Heparanase (HPA-1)	<10%	>10%	
controle	7 (63.6%)	4 (36.4%)	
tumor	14 (53.8%)	12 (46.2%)	0,582
Laminina ß Fibroblasto	≤10%	>10%	
controle	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0.000
tumor	5 (19,2%)	21 (80,8%)	0,008
Laminina β Lesão	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0.016
tumor	16 (61,5%)	10 (38,5%)	0,010
Laminina α Fibroblasto	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0.010
tumor	15 (57,7%)	11 (42,3%)	-,
Laminina α Lesão	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	0,082
	20 (78,9%)	6 (23,1%)	
neparaliase 2 (NFA-2)	≤10% 11 (100%)	210%	
tumor	20 (76 9%)	6 (23 1%)	0,082
Syndecan 1	<75%	>75%	
controle	8 & 2.7%)	2 (27.3%	
tumor	19 (73.1%)	7 (26.9%)	0,963
Syndecan 4	Presente	Ausente	
controle	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0.005
tumor	14 (53,8%)	12 (46,2%)	0,285
Colágeno tipo IV	≤50%	>50%	
controle	0 (0%)	11 (100%)	<0.001
tumor	18 (69,2%)	8 (30,8%)	NO,001
Decorin	≤25%	>25%	
controle	3 (27,3%)	8 (72,7%)	0,057
tumor	16 (61,5%)	10 (38,5%)	- / - * -
KI-D/		>30%	
controle	10 (90,9%)	14 (52 00()	0,011
CD34	12 (40,2%) <100	14 (00,8%)	
controle	10 (90 9%)	1 (9 1%)	
tumor	15 (57 7%)	11 (42 3%)	0,049
VEGER3	<30	>30	
controle	7 (63.6%)	4 (36 4%)	
tumor	16 (61 5%)	10 (38 5%)	0,603
tanio	10 (01,070)	10 (00,070)	

Tabela 5 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos estratificados na diferenciação entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia

§ - Teste exato de Fisher

5.4 Análise do perfil de microRNAs na diferenciação entre os tumores superficiais e espessos da cavidade oral, em comparação com a mucosa normal

Na comparação entre os grupos, considerando-se separadamente os grupos de tumores superficiais (com 5 mm de espessura) e espessos (com 15 ou 25 mm de espessura), observou-se uma diferença de expressão nos miRs 1-3p, 10b-5p, 133a-3p, 21-5p, 222-3p, 223-3p, 223-3p, 485-5p e 99a-5p no tecido tumoral, quando comparado à mucosa sadia (Tabela 6). Nas análises por pares (Tabela 7), notou-se uma significativa menor expressão do miR-133a-3p nos tumores espessos quando comparados aos espécimes superficiais do carcinoma de células escamosas, porém sem uma adequada segregação entre as amostras (Figura 14). As demais diferenças encontradas referem-se basicamente a diferenças de expressão entre os espécimes tumorais e a mucosa sadia, mais bem exploradas na sessão 5.2.

Tabela 6 - Análise univariada da expressão diferencial de microRNAs entre os espécimes de carcinoma de células escamosas superficiais e espessos, em comparação à mucosa sadia, normalizados pelo miR-let-7i

microRNA	Mucosa	a sadia	Tun supe	nores rficiais	Tum	n§	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	_ P
miR-let7b-5p	-1,427	0,275	-1,822	0,353	-1,825	0,269	0,521
miR-let7d-5p	-4,606	0,366	-5,217	0,328	-5,209	0,249	0,400
miR-1-3p	-1,779	0,399	0,437	0,378	-0,811	0,327	0,009
miR-106b-5p	-4,496	0,395	-3,115	0,536	-3,312	0,315	0,068
miR-10b-5p	-2,908	0,270	-4,137	0,308	-4,296	0,252	0,003
miR-1258	-0,745	0,206	-0,894	0,264	-1,180	0,189	0,326
miR-125b-5p	-0,190	0,226	-0,541	0,262	-0,740	0,238	0,251
miR-126-3p	-0,955	0,254	-0,911	0,336	-1,342	0,237	0,534
miR-133a-3p	-2,280	0,518	-0,565	0,583	-4,176	1,084	0,032
miR-143-3p	-1,444	0,347	-0,691	0,231	-0,551	0,185	0,085
miR-155-5p	-6,445	0,658	-6,988	0,608	-6,268	0,433	0,660
miR-16-5p	-4,411	0,397	-4,040	0,244	-4,000	0,374	0,737
miR-17-5p	-4,737	0,416	-5,273	0,550	-5,046	0,451	0,657
miR-184	-3,706	0,864	-3,291	0,789	-3,734	0,443	0,135
miR-192-5p	-4,221	1,012	-4,181	0,883	-5,226	0,698	0,465
miR-200a-3p	-2,763	0,189	-3,049	0,436	-2,361	0,236	0,721
miR-200b-3p	-0,822	0,311	-0,528	0,489	-0,174	0,317	0,494
miR-200c-3p	-1,836	0,173	-1,898	0,319	-1,204	0,278	0,258
miR-203a-3p	-2,535	0,383	-2,916	0,271	-3,494	0,452	0,418
miR-205-5p	0,197	0,407	0,002	0,349	-0,171	0,269	0,488
miR-21-5p	-2,010	0,260	-0,209	0,246	0,604	0,207	<0,001
miR-221-3p	-1,582	0,296	-2,421	0,324	-2,637	0,329	0,042
miR-222-3p	-4,557	0,238	-6,352	0,513	-5,630	0,398	0,032
miR-223-3p	-5,383	0,326	-4,094	0,290	-3,845	0,298	0,036
miR-27a-3p	-2,493	0,350	-1,735	0,303	-1,832	0,226	0,241
miR-29a-3p	-3,036	0,412	-2,896	0,307	-2,695	0,202	0,858
miR-29b-3p	-3,261	0,315	-2,445	0,277	-2,549	0,264	0,264
miR-29c-3p	-2,961	0,353	-2,399	0,244	-2,335	0,207	0,309
miR-30a-5p	-0,904	0,358	-0,587	0,456	-0,677	0,423	0,829
miR-31-5p	-4,736	0,578	-5,010	0,282	-4,326	0,466	0,531
miR-320a	-0,538	0,318	-1,842	0,451	-1,753	0,401	0,056
miR-34a-5p	-3,005	0,301	-2,161	0,255	-2,163	0,216	0,102
miR-373-3p	-6,741	0,690	-7,956	0,596	-7,482	0,533	0,137
miR-375	-1,246	0,381	-0,464	0,302	-0,859	0,271	0,252
miR-376c-3p	-6,667	0,297	-6,540	0,755	-6,804	0,661	0,271
miR-378a-3p	-2,452	0,301	-2,019	0,589	-3,748	0,611	0,092
miR-485-5p	-2,970	0,554	-5,570	0,603	-5,655	0,644	0,041
miR-9-5p	-2,377	0,936	-2,047	0,432	-1,983	0,442	0,799
miR-99a-5p	-1,786	0,293	-2,530	0,256	-2,916	0,278	0,003

§ (Kruskall-Wallis)

Tabela 7 - Análise univariada da expressão diferencial de microRNAs por pares entre os espécimes de carcinoma de células escamosas superficiais e espessos e a mucosa sadia, normalizados pelo miR-let-7i

microRNA	Controle x Superficial*	Controle x Espesso*	Superficial x Espesso*
miR-1-3p	0,002	0,162	0,069
miR-10b-5p	0,005	0,002	0,750
miR-133a-3p	0,072	0,699	0,012
miR-21-5p	0,009	<0,001	0,085
miR-221-3p	0,064	0,015	0,641
miR-222-3p	0,011	0,062	0,352
miR-223-3p	0,043	0,004	0,365
miR-485-5p	0,019	0,018	0,892
miR-99a-5p	0,112	0,008	0,310

* Valores de p (teste auxiliar de Dunn)



Figura 14 - Dendograma hierárquico não demonstrando uma adequada segregação entre os grupos tumorais (superficial e espesso) e mucosa sadia através do miR-133a-3p

Como a discriminação pela análise anterior não foi capaz de segregar adequadamente os grupos considerando todos os miRNAs na diferenciação dos três grupos (tumores superficiais e espessos e a mucosa sadia), foi realizada a análise de SAM. Com esta, foram identificados 4 miRNAs diferentemente expressos (miR-1-3p, miR-21-5p, miR-133a-3p e miR485-5p) com um FDR de 0,000 e taxa de miRNAs falsos-positivos de 0,000, demonstrados na Figura 15.



Figura 15 - Heatmap demonstrando os miRNAs diferentemente expressos e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia, pela análise de Significance Analysis of Microarrays. Os spots em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs

Excluindo-se o miR-485-5p e utilizando-se somente os miRNAs com melhores resultados à análise de diferenciação entre os tumores superficiais e espessos (aqueles com valores de p<0,10), ou seja, os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p, percebe-se ainda uma melhor aglutinação dos grupos, conforme demonstrado na Figura 16. Ainda, uma análise considerando somente o miR-133a-3p, o único diferentemente expresso entre os tumores superficiais e espessos é representada na Figura 17.



Figura 16 - *Heatmap* e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia pelos miRs diferentemente expressos (miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p). Os *spots* em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs



Figura 17 - *Heatmap* e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos e a mucosa sadia pelo miR-133a-3p. Os *spots* em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs

Visando encontrar miRNAs que pudessem promover a diferenciação entre os tumores superficiais e os espessos e, dessa forma, avaliar os miRNAs envolvidos no processo de invasão tumoral, os espécimes de mucosa sadia foram excluídos. Encontrou-se uma menor expressão de miR-1-3p e de miR-133a-3p, além de uma maior expressão de miR-21-5p (respectivamente, p=0,040, p=0,017 e p=0,020 – teste de Mann-Whitney) nos espécimes espessos quando comparados aos tumores superficiais, demonstrados na Figura 18. À regressão linear, que incluiu também o miR-378a-3p (com menor expressão marginal à análise univariada nos tumores espessos; p=0,060), apenas o miR-133a-3p manteve-se como único determinante de tumores espessos (modelo de regressão linear; R²=0,224; EP=0,459; p=0,017).



Figura 18 - Gráficos de *boxplot* demonstrando a expressão diferencial entre miR-1-3p, miR-133a-3p e miR-21-5p e os grupos de estudo. Houve uma significativa menor expressão de miR-1-3p e de miR-133a-3p, além de uma maior expressão de miR-21-5p (*p=0,040, **p=0,017 e ***p=0,020 teste de Mann-Whitney) nos espécimes espessos quando comparados aos tumores superficiais (excluindo-se o grupo de espécimes de mucosa sadia da análise)

Mantendo-se ainda somente os espécimes tumorais (superficiais e espessos), nota-se uma boa segregação entre os grupos através da expressão dos três miRNAs (mir-1-3p, miR-133a-3p e miR-21-5p) e, de uma maneira menos precisa, pelo miR133a-3p isoladamente, conforme demostrado, respectivamente nas Figuras 19 e 20, respectivamente.



Figura 19 - Dendograma hierárquico demonstrando uma boa segregação entre os tumores superficias e espessos através dos miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p



Figura 20 - Dendograma hierárquico não demonstrando uma adequada segregação entre os grupos tumorais (superficial e espesso) e mucosa sadia através do miR-133a-3p isoladamente O *heatmap* com os miRs 1-3p, 133a-3p e 21-5p também demonstrou um bom agrupamento dos casos (Figura 21).



Figura 21 - *Heatmap* e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais espessos e superficiais pelos miR-1-3p, miR-133a-3p e miR-21-5p. Os *spots* em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs

Já utilizando-se somente o miR-133a-3p, o único diferentemente

expresso entre os tumores superficiais e espessos, é demonstrada na Figura





Figura 22 - *Heatmap* e a análise de cluster hierárquico das amostras na diferenciação entre os espécimes tumorais espessos e superficiais. Os *spots* em amarelo representam amostras com menor expressão e os em azul com maior expressão de miRNAs

Estimando-se então a acurácia no diagnóstico diferencial entre os tumores espessos e os superficiais, o miR-21-5p (AUC=0,753; IC95%: 0,553 - 0,953), miR-133a-3p (AUC=0,756; IC95%: 0,559 - 0,954) e o miR-1-3p (AUC=0,740; IC95%: 0,537 - 0,944) tiveram desempenhos semelhantes, individualmente. As curvas são demonstradas na Figura 23.



Figura 23 - Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) demonstrando a acurácia no diagnóstico dos casos espessos do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação aos tumores superficiais para os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p

5.5 Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos nos tumores superficiais e espessos da cavidade oral, em comparação com a mucosa normal

Analisando-se os marcadores imunoistoquímicos diferentemente expressos entre os tumores superficiais e espessos, notou-se maior expressão de MMP-2, MMP-9, laminina alfa nos fibroblastos relacionados ao tumor dos tumores espessos e também de MMP-2 nas células tumorais, também dos tumores espessos, além de menor continuidade progressiva (mucosa vs. tumores superficiais vs. neoplasias espessas) de colágeno tipo IV na membrana basal. Excluindo-se os espécimes de mucosa sadia e analisando somente os espécimes tumorais, evidenciou-se maior expressão de MMP-2 (p=0,014 – teste exato de Fisher) e metaloproteinase-9 (MMP-9; p=0,024 – teste exato de Fisher) nos fibroblastos relacionados ao tumor), em uma análise de subgrupo, conforme demonstrado nas Figuras 24 e 25. Notou-se também uma maior degradação da membrana basal, aferida pela maior perda de continuidade do colágeno tipo IV nos tumores espessos, apesar de não estatisticamente diferente, provavelmente pelo pequeno universo amostral, (78,6% de continuidade superior a 50% da membrana basal nos tumores superficiais, em comparação a 58,3% nos espessos; p=0,401 - teste exato de Fisher). As demais diferenças encontradas referem-se basicamente a diferenças entre a expressão tumoral em comparação à mucosa sadia que foram exploradas na sessão 5.3. Os resultados completos estão detalhados nas Tabelas 8 (dados brutos) e 9 (dados estratificados).

Tabela 8 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicos na diferenciação entre os espécimes tumorais superficiais e espessos, além da mucosa sadia

Grupo	0%	0-10%	Imunoexpr 10-25%	essão 25-50%	50-75%	>75%	p [§]
			BCL2	1			
controle	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	-	-	0 (0%)	0.570
espesso	1 (7,1%)	12 (85,7%)	1 (85,7%)	-	-	0 (0%)	0,570
	,		p16			. ,	
controle	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	0 157
espesso	1 (7.1%)	10 (83,3%)	0 (0%)	1 (7.1%)	0 (0%)	-	0,157
·	,		p53		. ,		
controle	2 (18,2%)	9 (81,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)	0.010
espesso	3 (21,4%)	4 (28,5%)	0 (0%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	1 (7,1%)	0,010
			EGFR				
controle	-	1 (9,1%)	5 (45,5%)	2 (18,2%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	0.018
espesso	-	1 (7,1%)	0 (0%)	8 (57,1%)	5 (35,7%)	0(0%)	0,010
		MMP	-2 Fibroblasto				
controle	-	1 (9,1%) 2 (16 7%)	6 (54,5%) 3 (25%)	4 (36,4%)	0 (0%) 1 (8 3%)	0 (0%)	0.021
espesso	-	0 (0%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	7 (50%)	1 (7,1%)	0,021
		1 (00, 19())	MMP-2 Le	esão	0 (10 00()	0 (00()	
controle	-	4 (36,4%)	3 (27,3%)	2 (18,2%) 4 (33,3%)	2 (18,2%) 5 (41 7%)	0 (0%) 2 (16 7%)	0.005
espesso	-	0 (0%)	0 (0%)	3 (21,4%)	4 (28,6%)	7 (505)	0,000
	0 (70 70)	0 (40 0)()	MMP-9 Fibro	oblasto	0 (00()		
controle	8 (72,7%)	2 (18,2%) 6 (50%)	0 (0%)	1 (9,1%) 3 (25%)	0 (0%)	-	<0.001
espesso	0 (0%)	2 (14,3%)	2 (14,3%)	6 (42,9%)	4 (28,6%)	-	
control-	5 (AE 50/)	2 (27 20/)	MMP-9 Le	2 (18 20/)	0 (09/)		
superficial	0 (0%)	3 (25%)	4 (33,3%)	2 (10,2%) 4 (33,3%)	1 (8,3%)	-	0,016
espesso	0 (0%)	8 (57,1%)	4 (28,6%)	2 (14,3%)	0 (0%)	-	
controle	1 (0.1%)	6 (54 5%)	Heparanase	(HPA-1) 1 (0 1%)	0 (0%)	_	
superficial	4 (33,3%)	4 (33,3%)	4 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	-	0,348
espesso	1 (7,1%)	5 (35,7%)	7 (50%)	0 (0%)	1 (7,1%)	-	
controle	0 (0%)	4 (36 4%)	Laminina β Fit	4 (36 4%)	1 (9 1%)	-	
superficial	5 (41,7%)	4 (33,3%)	3 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	-	0,010
espesso	2 (14,3%)	10 (71,4%)	2 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	-	
controle	9 (81.8%)	2 (18.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	
superficial	1 (8,3%)	7 (58,3%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	-	0,007
espesso	2 (14,3%)	6 (42,9%)	4 (28,6%)	0 (0%)	2 (14,3%)	-	
controle	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	
superficial	4 (33,3%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	-	0,018
espesso	1 (7,1%)	5 (35,7%)	4 (28,6%) Laminina α	2 (14,3%) Lesão	2 (14,3%)	-	
controle	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	
superficial	1 (8,3%)	8 (66,7%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	-	-	0,218
espesso	1 (7,176)	10 (7 1,4%)	3 (21,4%) Heparanase 2	(HPA-2)	-	-	
controle	3 (27,3%)	8 (72,7%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	
superficial	4 (33,3%)	5 (41,7%) 10 (71 4%)	1 (8,3%) 3 (21.4%)	2 (16,7%)	-	-	0,110
cahesso	1 (1,170)	10 (7 1,470)	Syndeca	in 1	-	-	
controle	-	-	-	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)	0.544
superticial espesso	-	-	-	2 (16,7%) 5 (35,7%)	6 (50%) 6 (42,9%)	4 (33,3%) 3 (21,4%)	0,544
			Syndeca	in 4			
controle	3 (27,3%)	7 (63,6%)	-	1 (9,1%)	-	-	0.507
espesso	6 (42,9%)	6 (57,1%)	-	0 (0%)	-	-	0,007
			Colágeno t	ipo IV	7 (00 000)	0 (07 00)	
controle superficial	-	-	- 3 (25%)	4 (33.3%)	7 (63,6%) 5 (41,7%)	3 (27,3%)	0.019
espesso	-	3 (21,4%)	2 (14,3%)	6 (42,9%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	-,
controle	_	2 (18 2%)	Decori	n 6 (54 5%)	2 (18 2%)		
superficial	-	3 (25%)	6 (50%)	3 (25%)	0 (0%)	-	0,315
espesso	-	2 (14,3%)	5 (35,7%)	5 (42,9%)	1 (7,1%)	-	
controle			KI-67 23.5 (2.5)			
superficial			39,4 (5,2)			0,011*
espesso			30,3 (3,2) *			
controle			81,3 (7,9)			
superficial			92,4 (7,0)			0,407*
espesso			//,2 (VEGFR	ठ,9) 3*			
controle			17,3 (5,7)			
superficial			21,7 (37 1 (*	7,8) 13.9)			0,862*
000000			01,1(,-/			

* Média (erro-padrão); teste de Kruskal-Wallis; § - Qui-quadrado

Tabela 9 - Expressão diferencial de marcadores imunoistoquímicosestratificados na diferenciação entre os espécimes tumoraissuperficiais e espessos, além da mucosa sadia

Grupo / Marcador	Imunoe	xpressão	p [§]
BCL2	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	
superficial	10 (83,3%)	2 (16,7%)	0,338
espesso	13 (92,9%)	1 (7,1%)	
p16	≤50%	>50%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	
superficial	10 (83,3%)	2 (16,7%)	0,276
espesso	11 (78,6%)	3 (21,4%)	
p53	525%	>25%	
controle	7 (50%)	0 (0%) 7 (50%)	0.020
espesso	9 (75%)	3 (25%)	0,020
EGER	<25%	>25%	
controle	6 (54,5%)	5 (45.5%)	
superficial	0 (0%)	12 (100%)	0,001
espesso	1 (7,1%)	13 (92,9%)	
MMP-2 Fibroblasto	≤50%	>50%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	
superficial	11 (91,7%)	1 (8,3%)	0,001
espesso	6 (52,9%)	8 (57,1%)	
MMP-2 Lesao	≤50%	>50%	
controle	9 (81,8%)	2 (18,2%) 7 (59.2%)	0.010
espesso	2 (21 3%)	11 (78.6%)	0,010
MMP-9 Fibroblasto	≤25%	>25%	
controle	10 (90,9%)	1 (9,1%)	
superficial	9 (75%)	3 (25%)	0,003
espesso	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
MMP-9 Lesão	≤25%	>25%	
controle	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
superficial	7 (58,3%)	5 (41,7%)	0,228
espesso	12 (85,7%)	2 (14,3%)	
Heparanase (HPA-1)	≤10% 7 (62.6%)	>10%	
cuporficial	9 (66 7%)	4 (30,476)	0.409
espesso	6 (42.9%)	8 (57,1%)	0,400
Laminina β Fibroblasto	≤10%	>10%	
controle	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
superficial	3 (25%)	6 (75%)	0,025
espesso	2 (14,3%	12 (85,7%)	
Laminina β Lesão	≤10%	>10%	
controle	9 (66 7%)	0 (0%)	0.047
espesso	8 (57 1%)	6 (42 9%)	0,047
Laminina α Fibroblasto	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	
superficial	9 (75%)	3 (25%)	0,007
espesso	6 (42,9%)	8 (57,1%)	
Laminina α Lesão	≤10%	>10%	
controle	11 (100%)	0(0%)	0.010
superricial	9(75%)	3 (25%)	0,213
Henaranase 2 (HPA-2)	<10%	>10%	
controle	11 (100%)	0 (0%)	
superficial	9 (75%)	3 (25%)	0,213
espesso	11 (78,6%)	2 (21,4%)	
Syndecan 1	≤75%	>75%	
controle	8 (2,7%)	2 (27,3%	
superficial	8 (66,7%)	4 (33,3%)	0,793
espesso Syndogen 4	11 (78,6%) Procente	3 (21,4%)	
controle	8 (72 7%)	3 (27 3%)	
superficial	6 (50%)	6 (50%)	0.527
espesso	8 (57,1%)	6 (42,9%)	-,
Colágeno tipo IV	≤50%	>50%	
controle	0 (0%)	11 (100%)	
superficial	7 (58,3%)	5 (41,7%)	<0,001
espesso	11 (78,6%)	3 (21,4%)	
Decorin	≤25% 2 (27.2%)	>25%	
controle	9 (21,3%)	3 (25%)	0 072
espesso	7 (50%)	7 (50%)	0,012
ki-67	≤30% [′]	>30%	
controle	10 (90,9%)	1 (9,1%)	
superficial	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0,037
espesso	7 (50%)	7 (50%)	
CD34	5100 10 (00 0%)	>100	
controle	10 (90,9%) 6 (50%)	1 (9,1%) 6 (50%)	0.106
superincial	9 (64.3%)	5 (57%)	0,100
VEGFR3	≤30	>30	
controle	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
superficial	8 (66,7%)	4 (33,3%)	0,876
espesso	8 (57,1%)	6 (42,9%)	

§ - Qui-quadrado



Figura 24 - Imunoexpressão diferencial de metaloproteinase-2 (MMP-2) nos fibroblastos (seta) relacionados ao tumor (B: tumor superficial; C: tumor espesso), em comparação à mucosa sadia (A). Nota-se evidente aumento na expressão de MMP-2 nos fibroblastos dos espécimes tumorais, especialmente nos casos espessos. (imunoistoquímica, peroxidase, 200x)


Figura 25 - Imunoexpressão diferencial de metaloproteinase-9 (MMP-9) nos fibroblastos (seta) relacionados ao tumor (B: tumor superficial; C: tumor espesso), em comparação à mucosa sadia (A). Nota-se evidente aumento na expressão de MMP-9 nos fibroblastos dos espécimes tumorais, especialmente nos casos espessos. (imunoistoquímica, peroxidase, 200x)

5.6 Comparação entre os achados da expressão diferencial de microRNAs e o perfil da expressão de marcadores imunoistoquímicos no carcinoma de células escamosas da cavidade oral

Inicialmente os valores contínuos das expressões dos miRNAs foram comparados aos diversos marcadores imunoistoquímicos classificados em alta ou baixa marcação. Houve diversas associações significativas e somente estas serão demonstradas na Tabela 10. Identificou-se expressões significativamente mais altas de let-7d-5p e miR17-5p e aumento de Bcl-2, menor expressão de miR-378a-3p e maiores taxas de MMP-2 nos fibroblastos peritumorais, maior expressão de miR-29a-3p e taxas mais altas de MMP-2 nas células tumorais, expressão mais alta de miR-485-5p e maiores índices de p53, maior expressão de miR-200b-3p e aumento nas taxas de laminina beta nos fibroblastos relacionados ao tumor, maior expressão de miR-29a-3p e maiores taxas de laminina beta nas células neoplásicas, maior expressão de miR-376c-3p acompanhada de mais heparanase 2 nas células tumorais, maior expressão de miR-155-5p e maiores taxas de laminina alfa nos fibroblastos relacionados ao tumor, maior expressão de miR-494-3p e menor continuidade do colágeno tipo IV na membrana basal, maior expressão de miR-203a-3p e maiores taxas de decorin, maior expressão de miR-27a-3p e menor expressão de miR-9-5p com maiores taxas de Ki67, maior expressão de miR-99a-5p e maior densidade de microvasos ao CD34 e também menor expressão de miR-221-3p associado a maior densidade de microvasos corados pelo VEGFR3.

microPNA	Marc	ador Imu	noistoquí	mico	§
IIICIORNA	Marc	auorinnu	noistoqui	IIICO	p٩
		BC	:1-2		
	1	0%	>1(0%	
miR-let-7d-5p*	-5,162	0,179	-3,569	0,232	0,005
miR-1-3p	-0,793	0,241	2,040	0,000	0,007
miR-106b-5p	-3,759	0,242	-1,203	0,424	0,012
miR-126-3p	-1,190	0,161	0,000	0,419	0,032
miR-16-5p	-4,268	0,194	-2,588	0,431	0,018
miR-17-5p*	-5,293	0,262	-2,777	0,785	0,011
miR-221-3p	-2,339	0,205	-1,258	0,370	0,027
miR-222-3p	-5,638	0,252	-3,383	0,201	0,016
miR-27a-3p	-2,108	0,171	-0,705	0,230	0,003
miR-376c-3p	-7.154	0.312	-3.214	0.952	0.004
miR-99a-5p	-2.535	0.181	-1.541	0.329	0.041
	N	MP-2 (fib	roblastos	;)	-,-
	≤ 5	0%	>5(, 0%	
miR-let-7b-5p	-1 518	0 199	-2 289	0.267	0.039
miR-1-3p	-0 439	0,302	-1 235	0 417	0.019
miR-133a-3n	-1 205	0 373	-5 928	1 329	0.001
miR-192-5n	-4 085	0,559	-5,953	0 754	0.028
miR-375	-0.674	0,000	-1 449	0,733	0,020
miR-378a-3n*	-2 205	0.281	-1,440	0,200	0,016
miP 485 5p	-2,203	0,201	6 711	0,015	0,010
mix-405-5p	-4,407	MMD_2	(lesão)	0,795	0,039
	< 5	∩%	(10300)	n %	
miP 202 20	2 166	0.336	2 633	0 150	0.047
mint-258-5p	-5,100	0,000	-2,000 52	0,100	0,047
	< 2	p: ۲۰	33	E0/	
miP 485 5n	5 179	0 500	1 805	0.506	0.036
шк-465-5р	-5,476	0,590	-4,000	0,590	0,030
	Lain			5105)	0.040
	C ∠	0 0 70	0 474	0%	0,012
mik-2000-3p	-1,123	0,273	-0,174	0,277	
	L		beta (lesac)	
	1 ≤	0 0 1 0	210	0 000	0.000
тік-29а-3р	-3,070	0,210	-2,340	0,223	0,008
	E C	eparanas	e z (lesao))	
	7 055	0%	> 1(0%	0.004
miR-376C-3p*	-7,255	0,307	-3,667	0,839	0,001
mik-3/8a-3p	-3,145	0,332	-1,14/	0,946	0,013
	Lam	11111111111111111111111111111111111111		510S)	
	2 1 00	0 277	- F F 4 4	0 404	0.006
miR-155-5p"	-7,100	0,377	-5,514	0,421	0,000
mik-16-5p	-4,451	0,218	-3,393	0,325	0,032
miR-17-5p	-5,441	0,349	-4,228	0,360	0,011
mik-2000-3p	-1,097	0,130	-0,955	0,374	0,016
	~ 2	E0/		E0/	
miB 202a 2n	≥∠	0 2 5 0	2 6 2 1	0.257	0.021
mik-205a-5p	-3,449	Colágon	-2,021	0,237	0,031
	< 1	50		0%	
miP 494 3n	3 297	0 720	5 0 2 7	0.527	0.042
шк-494-5р	-3,207	0,729	-3,921 67	0,327	0,042
	< 3	N	>3(n%	
miR-16-5n	_1 512	0.258	-3 500	0.251	0.017
miR 17 5p	5 503	0,200	4 100	0,231	0,002
miR 2002 20	3 050	0,010	2 1 9 2	0,430	0,002
miP 272 3p*	-3,039	0,224	1 616	0,241	0,013
miR 376c 3p	-2,207	0,213	5 830	0,235	0,044
miP 9 5n*	-7,409	0,470	2 650	0,343	0,040
mix-5-5p	-1,505	0,004	-2,000	0,001	0,010
	-</th <th>100</th> <th>51</th> <th>00</th> <th></th>	100	51	00	
miR-106b-5n	_/ 1/5	0 300	-2 630	0.003	0 022
miR-125	-4,143	0,303	-2,000	0,230	0,022
miR-99a-5n*	-2 602	0.216	-2 140	0.283	0.015
mix-oou-op	-2,002	VEG	FR3	0,200	0,010
	< 1	30	>?	30	
miR-125b-5p	-0.358	0.165	-0.765	0.253	0.014
miR-143-3n	-0.641	0.215	-1 224	0 174	0.017
miR-221-3n*	-1 992	0 214	-2 703	0.366	0.020
miR-27a-30	-1.863	0 253	-2 200	0.165	0.031
miR-29c-30	-2 3/7	0 217	-2 761	0 154	0.047
miR-99a-5n	-2,325	0.196	-2 668	0.328	0.027

Tabela 10 - Associações significativas entre os valores contínuos dos
diversos microRNAs e os marcadores imunoistoquímicos

* miRs diferentemente expressos à análise multivariada por regressão linear (valores de miRs demonstrados por média e erro-padrão); § - Mann-Whitney

Quando os valores estratificados por cortes estatísticos dos miRNAs diferentemente expressos nas análises anteriores (miR-1-3p, miR-21-5p e miR-133a-3p) foram comparados aos marcadores imunoistoquímicos, também estratificados, notou-se uma maior expressão de MMP-2 pelos fibroblastos relacionados ao tumor quando o miR1-3p foi inferior a 0,583 e quando o miR21-5p é maior ou igual a 0,742. Ainda, há maior expressão de CD34 quando os valores de miR-133a-3p são maiores ou iguais a -0,902. Os resultados completos dessas análises estão demonstrados nas Tabelas 11 a 13.

miR-1-3p	Marcador Imunoistoquímico	p [§]
> 0 592	Bcl-2 (> 10%)	
≥ 0,583 < 0.583	0 / 17 (0%)	0,093
-,	p16 (>50%)	
≥ 0,583	2 / 8 (25%)	1,000
< 0,583	053 (>25%)	
≥ 0,583	3 / 8 (37,5%)	1 000
< 0,583	7 / 17 (41,2%)	1,000
> 0 583	EGFR (>25%) 8 / 8 (100%)	
< 0,583	16 / 17 (94,1%)	1,000
	MMP-2 - fibroblastos (>50%)	
≥ 0,583	0 / 8 (0%)	0,026
< 0,505	MMP-2 - lesão (>50%)	
≥ 0,583	5 / 8 (62,5%)	1 000
< 0,583	12 / 17 (70,6%)	1,000
> 0 583	MMP-9 - fibroblastos (>25%) 3 / 8 (37 5%)	
< 0,583	10 / 17 (58,8%)	0,411
	MMP-9 - lesão (>25%)	
≥ 0,583 < 0,583	2 / 8 (25%) 5 / 17 (20.4%)	1,000
< 0,505	Heparanase (>10%)	
≥ 0,583	2 / 8 (25%)	0 234
< 0,583	9 / 17 (52,9%)	0,204
> 0.583	$\frac{7}{8} (87.5\%)$	
< 0,583	13 / 17 (76,5%)	1,000
	Laminina beta - lesão (>10%)	
≥ 0,583 < 0.583	3 / 8 (37,5%) 6 / 17 (35,3%)	1,000
	Laminina alfa - fibroblastos (>10%)	
≥ 0,583	3 / 8 (37,5%)	1.000
< 0,583	/ / 1/ (41,2%) Laminina alfa - Iesão (>10%)	
≥ 0,583	2 / 8 (25%)	1.000
< 0,583	3 / 17 (17,6%)	1,000
> 0 593	Heparanase 2 (>10%)	
≥ 0,583 < 0.583	3 / 17 (17.6%)	1,000
.,	Syndecan 1 (>75%)	
≥ 0,583	3 / 8 (25%)	0,640
< 0,505	Svndecan 4 (presente)	
≥ 0,583	5 / 8 (62,5%)	0 411
< 0,583	7 / 17 (41,2%)	0,771
≥ 0.583	6 / 8 (75%)	
< 0,583	11 / 17 (64,7%)	1,000
	Decorin (>25%)	
≥ 0,583 < 0.583	2 / 8 (25%) 8 / 17 (47 1%)	0,402
- 0,000	Ki-67 (>30%)	
≥ 0,583	4 / 8 (50%)	1,000
< 0,583	9 / 17 (52,9%) CD34 (>100)	, .
≥ 0,583	4 / 8 (50%)	0.007
< 0,583	6 / 17 (35,3%)	0,667
> 0 500	VEGFR3 (>30)	
≥ 0,583 < 0.583	9 / 17 (52.9%)	0,088
< 0,583	9 / 17 (52,9%)	0,000

Tabela 11 - Associações entre o miR-1-3p e os marcadores imunoistoquímicos

miR-21-5p	Marcador Imunoistoquímico	p§
	Bcl-2 (> 10%)	
≥ 0,742	1 / 10 (10%)	1,000
< 0,/42	2/16(12,5%)	
> 0 742	2 / 10 (20%)	
2 0,742 < 0 742	3 / 16 (18.8%)	1,000
< 0,74Z	n53 (>25%)	
> 0 742	5 / 10 (50%)	
< 0.742	5 / 16 (31.3%)	0,425
-,	EGFR (>25%)	
≥ 0,742	9 / 10 (90%)	0.395
< 0,742	16 / 16 (100%)	0,385
	MMP-2 - fibroblastos (>50%)	
≥ 0,742	6 / 10 (60%)	0.046
< 0,742	3 / 16 (18,8%)	0,040
	MMP-2 - lesão (>50%)	
≥ 0,742	7 / 10 (70%)	1,000
< 0,/42	11/16(68,8%)	
> 0 749	7 / 10 (70%)	
< 0,742	6 / 16 (37 5%)	0,226
V,I TL	MMP-9 - lesão (>25%)	
≥ 0,742	2 / 10 (20%)	0.000
< 0,742	5 / 16 (31,3%)	0,668
	Heparanase (>10%)	
≥ 0,742	4 / 10 (40%)	0 701
< 0,742	8 / 16 (50%)	0,701
	Laminina beta - fibroblastos (>10%)	
≥ 0,742	8 / 10 (80%)	1,000
< 0,742	13 / 16 (81,3%)	·
> 0 742	Laminina beta - lesao (>10%)	
≥ 0,742 < 0,742	6 / 16 (37 5%)	1,000
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	l aminina alfa - fibroblastos (>10%)	
≥ 0.742	6 / 10 (60%)	0.000
< 0,742	5 / 16 (31,3%)	0,228
	Laminina alfa - lesão (>10%)	
≥ 0,742	2 / 10 (20%)	1 000
< 0,742	4 / 16 (25%)	1,000
	Heparanase 2 (>10%)	
≥ 0,742	2 / 10 (20%)	1,000
< 0,742	4 / 10 (25%) Syndocan 1 (575%)	
> 0 742	4 / 10 (40%)	
< 0.742	3 / 16 (18 8%)	0,369
· · · · ·	Syndecan 4 (presente)	
≥ 0,742	4 / 10 (40%)	0.701
< 0,742	8 / 16 (50%)	0,701
	Colágeno tipo IV (=50%)</th <th></th>	
≥ 0,742	9 / 10 (90%)	0.099
< 0,742	9 / 16 (56,3%)	0,000
	Decorin (>25%)	
≥ 0,742	5 / 10 (50%) 5 / 16 (24 20/)	0,425
< U,/42	Ki.67 (>30%)	
> 0 742	4 / 10 (40%)	
< 0.742	10 / 16 (62.5%)	0,422
-,	CD34 (>100)	
≥ 0,742	4 / 10 (40%)	1,000
< 0,742	7 / 16 (43,8%)	1,000
	VEGFR3 (>30)	
≥ 0,742	3 / 10 (30%)	0.683
< 0,742	7 / 16 (43,8%)	0,000

Tabela 12 - Associações entre o miR-21-5p e os marcadores imunoistoquímicos

miR-133a-3p	Marcador Imunoistoquímico	p§
≥ -0,902	2 / 10 (20%)	0.500
< -0,902	1 / 16 (6,3%)	0,538
> 0.002	p16 (>50%)	
≥ -0,902 < -0,902	3 / 16 (18,8%)	1,000
	p53 (>25%)	
≥ -0,902 < -0.902	4 / 10 (40%) 6 / 16 (37 5%)	1,000
<-0,50Z	EGFR (>25%)	
≥ -0,902	10 / 10 (100%)	1.000
< -0,902	15 / 16 (93,8%) MMP-2 - fibroblastos (>50%)	,
≥ -0,902	2 / 10 (20%)	0.200
< -0,902	7 / 16 (43,8%)	0,399
> -0 902	MMP-2 - Iesao (>50%) 6 / 10 (60%)	
< -0,902	12 / 16 (75%)	0,664
	MMP-9 - fibroblastos (>25%)	
≥ -0,902 < -0 902	4 / 10 (40%) 9 / 16 (56 3%)	0,688
(0,002	MMP-9 - lesão (>25%)	
≥ -0,902	3 / 10 (30%)	1,000
< -0,902	4 / 16 (25%) Henaranase (>10%)	,
≥ -0,902	4 / 10 (40%)	0 701
< -0,902	8 / 16 (50%)	0,701
> -0 902	Laminina beta - fibroblastos (>10%)	
< -0,902	13 / 16 (81,3%)	1,000
	Laminina beta - lesão (>10%)	
≥ -0,902 < -0.902	4 / 10 (40%) 6 / 16 (37 5%)	1,000
	Laminina alfa - fibroblastos (>10%)	
≥ -0,902	3 / 10 (30%)	0,428
< -0,902	Laminina alfa - lesão (>10%)	
≥ -0,902	3 / 10 (30%)	0 644
< -0,902	3 / 16 (18,8%)	0,011
≥ -0.902	4 / 10 (40%)	0.400
< -0,902	2 / 16 (12,5%)	0,163
> 0.002	Syndecan 1 (>75%)	
< -0,902	5 / 16 (31,3%)	0,668
	Syndecan 4 (presente)	
≥ -0,902 < -0 902	6 / 10 (60%)	0,422
	Colágeno tipo IV (=50%)</th <th></th>	
≥ -0,902	7 / 10 (70%)	1,000
< -0,902	11 / 16 (68,8%) Decorin (>25%)	,
≥ -0,902	2 / 10 (20%)	0.010
< -0,902	8 / 16 (50%)	0,210
> -0 902	кі-б/ (>30%) 4 / 10 (40%)	
< -0,902	10 / 16 (62,5%)	0,422
	CD34 (>100)	
≥ -0,902 < -0.902	4 / 10 (70%) 4 / 16 (25%)	0,043
,	VEGFR3 (>30)	
≥ -0,902	2 / 10 (20%)	0,218
< -0,902	8 / 16 (50%)	-,

Tabela 13 - Associações entre o miR-133a-3p e os marcadores imunoistoquímicos

5.7 Impacto clínico da expressão de microRNAs e de marcadores imunoistoquímicos no carcinoma de células escamosas da cavidade oral

Como já demonstrado, os miRNAs diferentemente expressos na diferenciação entre os tumores superficiais e espesso da cavidade oral foram os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p. Tais valores de expressão foram estudados visando categorizá-los em grupos de maior ou menor expressão. Os valores de corte determinados pela análise de curva ROC, bem como o estudo de acurácia estão demonstrados na Tabela 14 e Figura 26. Percebe-se uma certa semelhança na acurácia diagnóstica dos três miRNAs na distinção dos tumores espessos em relação aos superficiais do carcinoma de células escamosas.



Figura 26 - Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) demonstrando a acurácia no diagnóstico dos casos espessos do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em comparação aos tumores superficiais para os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p, estratificados para os valores de corte

microRNA	Valor de corte	Sensibilidade	Especificidade	AUC	IC9	5%
miR-1-3p	< 0,583	0,923	0,583	0,753	0,552	0,954
miR-21-5p	≥ 0,742	0,615	0,917	0,766	0,572	0,960
miR-133a-3p	< -0,902	0,846	0,667	0,756	0,557	0,956

Tabela 14 - Análise de acurácia dos valores de corte dos miR 1-3p, 21-5p e 133a-3p no diagnóstico dos tumores espessos emrelação aos tumores superficiais

Os valores estratificados desses três miRNAs foram então analisados quanto a características histopatológicas e de seguimento dos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, porém não foram encontradas associações significativas, conforme detalhado na Tabela 15. Entretanto, analisando-se os valores contínuos das expressões dos miRNAs, notou-se que os casos com metástases linfonodais apresentarem menores índices de miR-29a-3p, os pacientes com extravasamento extracapsular dos linfonodos metastáticos apresentaram maiores níveis de miR-let-7d-5p, miR-125b-5p e miR-222-3p, os pacientes que cursaram com recidiva locorregional apresentaram valores menores de miR 99a-5p e aqueles que apresentaram qualquer tipo de recidiva de doença ao longo do acompanhamento apresentaram menores taxas de mir-99a-5p e de miR-221-3p. As análises dos demais miRNAs e também quanto a invasão perineural, invasão angiolinfática, metástases a distância e morte, não demonstraram diferenças significativas (dados não demonstrados). É importante ressaltar que essas análises são limitadas dado o número reduzido de casos e, consequentemente, de desfechos clínicos e histopatológicos.

 Tabela 15 - Associação entre os valores estratificados dos miRs 1-3p,

 21-5p e 133a-3p e variáveis histopatológicas e de seguimento dos pacientes com carcinoma da cavidade oral

 microRNA

microRNA	Desfecho analisado	р [§]
miR-1-3p		
> 0 500	Invasão Perineural	
2 0,583	1 / 8 (12,5%) 8 / 17 (47 1%)	0,182
< 0,585	Invasão Angiolinfática	
≥ 0.583	1 / 8 (12 5%)	
< 0,583	2 / 17 (11,8%)	1,000
-	Metástase Linfonodal	
≥ 0,583	4 / 8 (50%)	1 000
< 0,583	10 / 17 (58,8%)	1,000
> 0 592	Extravasamento Capsular	
≤ 0,583	4 / 4 (100%) 6 / 10 (60%)	0,251
< 0,585	Recidiva Locorregional	
≥ 0,583	0 / 8 (0%)	4 000
< 0,583	2 / 17 (11,8%)	1,000
	Metástase a Distância	
≥ 0,583	0 / 8 (0%)	1.000
< 0,583	2 / 1 / (11,8%) Regiding de Deseres	,
> 0 583		
< 0.583	4 / 17 (23 5%)	0,269
. 0,000	Morte	
≥ 0,583	2 / 8 (25%)	1 000
< 0,583	6 / 17 (35,3%)	1,000
miR-21-5p	· ~ · ·	
N 0 740	Invasão Perineural	
≤ 0,/42 < 0 7/2	0 / 10 (00%) 4 / 16 (25%)	0,234
· v,/ 74	Invasão Angiolinfática	
≥ 0,742	1 / 10 (10%)	1 000
< 0,742	2 / 16 (12,5%)	1,000
	Metástase Linfonodal	
≥ 0,742	7 / 10 (70%)	0.428
< 0,742	8 / 16 (50%)	, -
> 0 742	5 / 7 (71 4%)	
< 0.742	6/8(75%)	1,000
- 0,172	Recidiva Locorregional	
≥ 0,742	2 / 10 (20%)	0 420
< 0,742	0 / 16 (0%)	0,138
	Metástase a Distância	
≥ 0,742	0 / 10 (0%)	0,508
< 0,/42	Z / 10 (12,3%) Recidiva de Doenca	
≥ 0.742	2 / 10 (20%)	A
< 0,742	2 / 16 (12,5%)	0,625
.,	Morte	
≥ 0,742	4 / 10 (40%)	0.664
< 0,742	4 / 16 (25%)	0,004
mIR-133a-3p		
> -0 002	111vasao Perineurai 2 / 10 (20%)	
< -0,502	7 / 16 (43.8%)	0,399
0,002	Invasão Angiolinfática	
≥ -0,902	0 / 10 (0%)	0.262
< -0,902	3 / 16 (18,8%)	0,202
	Metástase Linfonodal	
≥ -0,902	4 / 10 (40%)	0,228
< -0,902	TT / TO (08,8%)	,
> -0 902	3/4 (75%)	
< -0.902	8 / 11 (72.7%)	1,000
- ,• •=	Recidiva Locorregional	
≥ -0,902	0 / 10 (0%)	0 508
< -0,902	2 /16 (12,5%)	0,506
	Metástase a Distância	
≥ -0,902	0 / 10 (0%)	0,508
< -0,902	Z / 10 (12,5%) Recidiva de Doenca	
> _0 902	0 / 10 (0%)	
< -0,902	4 /16 (25%)	0,136
	Morte	
≥ -0,902	1 / 10 (10%)	0 099
< -0,902	7 / 16 (12,5%)	0,039

Os valores estratificados dos três miRNAs foram ainda estudados na quanto à sobrevivência global (Figura 27) e livre de doença (Figura 28). Notou-se uma tendência a melhores taxas de sobrevivência global e livre de doença nos pacientes com miR-133a-3p com valores maiores ou iguais a -0,902. Novamente reitera-se a parcimônia na interpretação desses dados, devido ao baixo número de pacientes para esse tipo de análise, entretanto fica uma possível associação desses miRNAs com o prognóstico dos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.



Figura 27 - Gráfico de Kaplan Meier demonstrando taxas semelhantes de sobrevivências globais acumuladas para os miRNAs 1-3p (61,3% x 72,9%; p=0,588 - teste de Log-Rank) e 21-5p (72,2% x 60%; p=0,435 - teste de Log-Rank), porém nota-se uma tendência a maior sobrevivência global para os pacientes com miR-133a-3p maiores ou iguais a –0,902 (53,0% x 88,9%; p=0,070 - teste de Log-Rank)



Figura 28 - Gráfico de Kaplan Meier demonstrando taxa semelhante de sobrevivência livre de doença acumulada para o miR-21-5p (85,2% x 80%; p=0,615 - teste de Log-Rank), porém nota-se uma tendência a maior sobrevivência global para os pacientes com miR-1-3p menores que 0,583 (74,9% x 100%; p=0,162 - teste de Log-Rank) e miR-133a-3p menores que - 0,902 (72% x 100%; p=0,089 - teste de Log-Rank), com nenhum caso de recidiva para estes grupos de pacientes em ambas as análises

6 DISCUSSÃO

A possibilidade de predizer o prognóstico oncológico poderia trazer grandes benefícios aos pacientes, permitindo a seleção e a estimativa da magnitude da terapêutica. Os miRNAs vem tornando real esta possibilidade, sendo promissores como biomarcadores de prognóstico e como alvos de terapias, ao passo que estão sendo demonstrados como fundamentais na progressão tumoral, sobrevivência celular, diferenciação, apoptose e migração, com vários estudos mostrando sua associação com a oncogênese e com a infiltração da neoplasia^{152,153}. A análise pormenorizada destas moléculas e sua associação com as alterações da matriz extracelular é fundamental para compreender a infiltração da neoplasia, e em especial, no CECCO, em que a espessura tumoral vem se mostrando como um dos maiores influenciadores na predição de prognóstico, com aumento das taxas de invasão angiolinfática, invasão perineural, metástases linfonodais, recidiva tumoral e queda dos índices de sobrevivência⁶⁻⁸.

O presente estudo contou com 26 espécimes de pacientes com CECCO, 12 do grupo de tumores superficiais, medindo 5 mm de espessura, e 14 do grupo de tumores espessos, medindo 15 ou 25 mm de espessura. A diferença apresentada entre os grupos nas taxas de metástases linfonodais, foi de 41,7% nos tumores superficiais e de 71,4% nos tumores espessos, está de acordo com a literatura, em especial nos estudos em que

parâmetros de medidas de espessura foram semelhantes ao nosso. No estudo retrospectivo de Loganathan *et al.*⁴¹, que contou com 81 pacientes com diagnóstico de CECCO com subsítio na língua, em estádios T1 e T2, as lesões com espessura menor ou igual a 5 mm apresentaram uma taxa de 16% de metástase linfonodal, contra 62,5% nas lesões com espessura maior que 5 mm. A diferença entre as taxas de neoplasias superficiais quando comparadas com nosso estudo, podem ter influência nas lesões com espessura maior.

A taxa de mortalidade específica entre os grupos de tumores superficiais e espessos, foi de 8,3% e 50%, respectivamente, corroborando com os estudos que mostram que a espessura é um fator significativo na piora do prognóstico dos pacientes com CECCO. O estudo de O-charoenrat *et a.I*¹⁵⁴ contou com 50 pacientes submetidos a cirurgia por CECCO, estádios I e II, e mostrou que a espessura tumoral maior que 5 mm foi um fator de desfecho desfavorável, com taxa de sobrevivência específica de 32,5% frente a 95% em lesões com espessura menores ou iguais a 5 mm.

Dois dos 14 (14,3%) pacientes do grupo de tumores espessos apresentaram metástase à distância. Conforme o estudo de Aires *et al.*¹⁵⁵ com 26 pacientes com metástase à distância, dentre 274 pacientes com diagnóstico de CECCO avaliados (9,6%), a espessura tumoral maior que 25 mm mostrou-se um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença distante, com um risco de 3,5 vezes (IC 95%: 1.362 - 8.995).

A espessura tumoral mostra-se um fator preditivo para avaliar a infiltração neoplásica e, para a sua ocorrência, a degradação da membrana

basal é fundamental. Nesse processo, ocorre também alterações da matriz extracelular tais como mudanças de expressão dos seus componentes, angiogênese e alterações em vias de sinalização, que levam a aumento da taxa de proliferação celular e inibição do apoptose, dentre outros processos. Além disso, há maior interação com células do estroma, como os fibroblastos associados ao câncer, que podem induzir a secreção de proteases pelas células neoplásicas ou secretar tais fatores^{156,157}.

Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) estão sendo altamente identificados como co-conspiradores da iniciação e progressão tumoral. Apresentam fenótipo semelhante aos miofibroblastos, células ativadas em processos cicatriciais, mas que diferem dos fibroblastos normais. Ao contrário dos miofibroblastos, que sofrem apoptose ao fim do processo cicatricial, os CAFs estão envolvidos no processo de carcinogênese e progressão, supressão imune, secreção de fatores de crescimento, angiogênese e alteração da MEC¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ O estudo de Zhou et al.¹⁵⁸ de 2014 utilizou uma linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua (SCC9), e o estroma da neoplasia e da margem da ressecção, localizadas a 2,0 cm da neoplasia, oriundas de 16 pacientes submetidos a ressecção cirúrgica da lesão, foram utilizadas para cultura dos CAFs e de fibroblastos normais, respectivamente. As SCC9 e os fibroblastos (dois grupos, os CAFs e os normais) foram mantidos em cultura juntos por duas semanas em diferentes níveis. A densidade celular e a invasão das SCC9 foram mensuradas. O RNAm das células neoplásicas e os fibroblastos foram extraídos e realizado qPCR para expressão de actina de músculo liso-a (AML-α), E-caderina, fator 1 derivado de células estromais (SDF1) proteína ativadora de fibroblastos (FAP), fibronectina e vimentina. As CAFs mostraram maior expressão de AML-α, além de SDF1, fator com alta influência na migração celular. A densidade celular e a invasão de SCC9 foram superiores no meio contendo CAFs. Além disso, as células neoplásicas no meio contendo CAFs exibiam marcadores mesenquimais como vimentina e fibronectina, aliados a queda na expressão de E-caderina, o que conclui a presença de transformação epitélio-mesenquimal.

O remodelamento da matriz extracelular é fundamental para a invasão e a migração das células neoplásicas, e os CAFs tem alta participação no processo, como por exemplo, por meio da síntese das MMPs e lamininas, conforme foi demonstrado em nosso estudo, no qual o grupo de tumores espessos apresentou maior expressão das MMPs e lamininas. As metaloproteinases, em especial as MMP-2 e MMP-9, da classe das gelatinases, degradam o colágeno tipo IV, presentes na membrana basal, cuja ruptura é um divisor de águas na transformação fenotípica para a malignidade. Com o decorrer da progressão da invasão e o desenvolvimento de um microambiente tumoral, a síntese de MMPs abre passagens através do colágeno tipo I, permitindo que o câncer ganhe território^{161,162}. Esse mecanismo foi demonstrado, pela primeira vez, em nosso estudo em pacientes com CECCO. Da mesma forma, Ba et al.¹⁶³ avaliaram a diferença no comportamento biológico de CAFs e fibroblastos peritumorais, e identificaram que a expressão de MMP-2, analisada por PCRqt e ELISA, foi superior no grupo dos CAFs em relação aos fibroblastos peritumorais.

A maior quantidade de laminina e a redução de síntese de proteínas fibrilares por parte dos fibroblastos possibilita a geração de maior sítio de ancoragem, através de receptores de integrinas, entre as células neoplásicas e a matriz extracelular pelas glicoproteínas, com consequente migração¹⁶⁴. A maior síntese de lamininas α e β por fibroblastos associados ao câncer comparativamente aos fibroblastos de áreas sadias, foi demonstrada no estudo de Fullar *et al.*¹⁶⁵ realizado *in vitro* com células provenientes de carcinoma de células escamosas de colo uterino.

O envolvimento dos miRNAs como mecanismo regulatório das alterações da MEC vem cada vez mais sendo elucidado. Uma das teorias para a interação parácrina entre o tumor e as células do microambiente tumoral, como os fibroblastos, é a de que miRNAs são enviados envelopados em vesículas de 30-100 nm, chamadas de exossomos¹⁶⁶. Baroni *et al.*¹⁶⁷ demonstraram, em tecidos de carcinoma mamário triplo negativo, menor expressão de E-caderina e maior possibilidade de migração, através da transformação de fibroblastos vizinhos e fibroblastos associados ao câncer pelo transporte de miRNAs por exossomo. O presente estudo mostrou maior taxa de expressão de mir21-5p e menores de mir1-3p, quando havia maior imunorreatividade para o MMP-2 em fibroblastos associados ao tumor, assim como maior proliferação vascular, demonstrada pela imunorreatividade ao CD34 quando maior expressão de mir133a-3p.

O achado em nosso estudo dos menores níveis de miR133a-3p nos tumores espessos, vai ao encontro da literatura. Tal miRNA tem sido demonstrado como um supressor tumoral, inibindo o crescimento da neoplasia e, assim, a presença de metástases em especial em outras neoplasias, porém ainda com poucos dados em relação ao CECCO¹⁶⁸. O trabalho de Xiao *et al.*¹⁶⁹ demonstrou, em neoplasias malignas do pulmão, que o miR133a-3p tem como alvo direto o gene FOXQ1, com importante papel na transição epitélio-mesenquimal, revertida através da reexpressão do miRNA em células pulmonares, reduzindo consequentemente a invasão pela neoplasia. A redução da expressão do mir133-3p nas células de neoplasias malignas de pulmão também demonstrou papel importante no aumento da expressão do EGFR nestes tumores, assim como na redução da inibição da apoptose, sendo essas ações, respectivamente, reduzidas e retomadas através da reexpressão em células neoplásicas isoladas da neoplasia conforme o estudo de Liu *et al.* de 2019¹⁷⁰.

O papel na carcinogênese do mir1-3p é pouco explorado na literatura, porém maiores esclarecimentos estão presentes no estudo de Koshizuka *et al.*¹⁷¹. Os autores mostraram um papel de supressão tumoral deste miRNA, demonstrado em células de CEC de cabeça e pescoço, com aumento da expressão de EGFR e do receptor de fator de crescimento hepatocitário (c-MET). Em nosso estudo, a redução da expressão do miR1-3p nos tumores espessos demonstrou seu papel no processo de invasão tumoral. Esse achado foi corroborado pelo estudo realizado por Chen *et al.*¹⁷². Em células de carcinoma da nasofaringe *in vitro*, foi identificado que o restabelecimento da expressão do mir1-3p foi o que determinou a supressão da invasão neoplásica, assim como da expressão de vimentina e de MMP-9.

A presença de maior expressão de mir21-5p na diferenciação entre o tecido neoplásico em relação ao tecido sadio e nos espécimes espessos é corroborada por seu papel bem estabelecido de um oncogene conforme demonstrado na literatura. Sua expressão encontra-se aumentada em diversas neoplasias malignas em relação ao tecido são, não sendo diferente no CECCO, no qual o mir21-5p encontra-se superexpresso já em lesões leucoplásicas. Isso mostra o seu papel precoce na progressão tumoral, e sua estabelecida importância na proliferação celular, invasão tumoral, inibição da apoptose e quimiorresistência¹⁷³⁻¹⁷⁵. Seus prováveis alvos são os genes supressores tumorais, como PTEN, TPM1, PDCD4 e maspina^{176,177}. Outro alvo do mir21-5p são os genes reguladores da TIMP3 e RECK, que possuem ação inibidora das MMPs, logo, estas tem maior atividade quando há expressão do mir21-5p¹³⁴, o que também foi demonstrado em nosso estudo in vivo. Sua expressão na literatura é detectada não somente em células neoplásicas, mas também em CAFs, como detectado no estudo de Nouraee et al.¹⁷⁸ com amostras de CEC de esôfago, mostrando maior expressão de mir21-5p no tecido tumoral em relação à mucosa normal adjacente. No mesmo estudo, foi realizada hibridização in situ com pesquisa da localização da expressão do mir21-5p na neoplasia, apresentando este, localização preferencial nos CAFs, com baixa expressão nas células tumorais.

O mir29a-3p tem seu papel na literatura, em especial em neoplasias malignas gástricas e mamárias, como um supressor tumoral, frente a maior agressividade destas lesões quando sua menor expressão, assim como em nosso trabalho, com maior taxa de extravasamento extracapsular em linfonodos metastáticos^{179,180}. No estudo de Lu *et al.*¹⁸¹ o miR-29a mostrou importante papel na regulação da MEC, graças à sua ação supressora sobre o gene da MMP-2, estando subexpresso em células do CECCO. Seu provável mecanismos de ação em carcinomas de células escamosas, foi demonstrado em células provenientes de lesões desta natureza de origem laríngea no trabalho de Urabe *et al.*¹⁸², no qual culturas de células do carcinoma em que apresentavam maior expressão do gene prominina 1, havia também menor expressão do mir29a-3p, quando comparado ao grupo controle. Porém, a literatura mostra que este mesmo miRNA também está envolvido em maior taxa de angiogênese, por supressão da prolil-hidroxilase tipos 1 e 2, ativando a expressão do fator indutor de hipóxia-1 α (HIF), por comunicação através de vesículas exossomais com as células endoteliais, aumentando assim a angiogênese e a permeabilidade vascular¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Outros estudos na literatura divergem entre si e de nossos achados sobre o perfil de miRNAs como biomarcadores de oncogênese, invasão e prognóstico do CECCO. A grande maioria destes estudos tem origem de diversas partes do mundo, em sua maioria asiática, logo, devem ser levadas em conta as diferenças de fatores de risco ambientais e étnicos que podem afetar este perfil, somando ao fato de diferentes metodologias utilizadas, como os grupos controles, em que alguns utilizaram o tecido sadio das margens cirúrgicas do paciente com CECCO e outros, utilizaram tecido de mucosa oral sadia, como por nós realizado. O estudo de Chen *et al.*¹⁸⁵ realizado na China, com amostras de CECCO e mucosas sadias da

cavidade oral de 52 pacientes, mostrou aumento da expressão de miR-10a, associado ao aumento da expressão de GLUT1, que tem correlação com maior taxa de proliferação pela melhora da performance metabólica nas células neoplásicas, nas amostras de tecido neoplásico em relação ao tecido são adjacente. O estudo indiano de Manikandan et al.¹⁸⁶ com amostras de CECCO, em comparação com mucosas sadias contralaterais a lesão dos pacientes, mostraram a subexpressão de let-7a, let-7f, let-7d e miR-16 nas amostras da neoplasia em relação ao tecido normal e superexpressão de miR-29b, miR-142-3p, miR-144, miR-203 e miR-223. Um estudo de coorte retrospectivo realizado por Jakob et al.187, na Alemanha, visou avaliar a expressão de miRNAs como marcadores prognósticos do CECCO. Foram utilizadas 36 amostras de CECCO e 17 amostras de tecidos de mucosa oral sadia de indivíduos saudáveis, mostrando o aumento da expressão de miR-99b-3p em neoplasias em estádio avançado, mas com melhores taxas de sobrevivência. O aumento da expressão de miR-100a-5p encontrava-se elevado nos pacientes com metástase linfonodais com extensão extracapsular e uma menor taxa de sobrevivência.

Os achados do presente estudo são vastos e ainda devem ser mais bem explorados, já que nenhuma pesquisa termina com o final de um projeto. A casuística utilizada foi pequena, ainda em um modelo praticamente experimental. Acreditamos que os miRNAs identificados como diferentemente expressos entre os tumores superficiais e espessos, em especial os miRs 1-3p, 21-5p e 133a-3p, devam ser validados em uma coorte com valores contínuos de espessura tumoral. A correlação entre os dados da expressão desses miRNAs com os valores de espessura tumoral podem dar uma melhor elucidação para o mecanismo *in vivo* do processo de invasão tumoral do carcinoma de células escamosas da cavidade oral em nossa população. Da mesma forma, a validação dos achados em uma outra coorte poderia estabelecer melhor o papel de biomarcador de prognóstico, especialmente em termos de recidiva e morte, destes miRNAs nestes pacientes. Ademais, a tentativa de elucidar o efeito biológico da alta ou baixa expressão de miRNAs através de marcadores imunoistoquímicos, além da interação desses com o microambiente tumoral do carcinoma de células escamosas, carece de um estudo experimental mais aprofundado.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados da presente pesquisa concluímos que:

- Foram preditores de malignidade a associação da alta expressão dos miR-21-5p e miR-106-5- e da baixa expressão de miR-320a e miR-222-3p (comparação entre os espécimes tumorais e a mucosa bucal sadia). Individualmente, a alta expressão de miR-21-5p foi a que demonstrou maior acurácia na diferenciação dos espécimes tumorais da mucosa sadia da boca. Ainda, houve uma maior expressão de p53, EGFR, MMP-2, laminina beta, ki-67 e CD34 nas células tumorais quando comparado às células epiteliais da mucosa sadia e uma maior expressão de MMP-2, MMP-9, laminina alfa e laminina beta nos fibroblastos relacionados ao tumor, quando comparados aos fibroblastos da matriz extracelular da mucosa oral sadia, além de menor continuidade de colágeno tipo IV na membrana basal nos espécimes tumorais. Esses resultados demonstram os efeitos biológicos dos microRNAs sobre o processo de carcinogênese do carcinoma de células escamosas da boca, bem como a intensa modificação do microambiente tumoral.

- Houve uma menor expressão de miR-1-3p e de miR-133a-3p, além de uma maior expressão de miR-21-5p nos espécimes espessos quando comparados aos tumores superficiais, sugerindo uma relação desses microRNAs no processo de invasão tumoral do carcinoma de células escamosas da cavidade oral, avaliado através da espessura tumoral. Ainda, houve uma maior expressão das metaloproteinases 2 e 9 pelos fibroblastos relacionados ao tumor, sugerindo uma maior degradação da matriz extracelular dos tumores espessos, que pode ser induzida pelos microRNAs diferentemente expressos. Esse fato foi especialmente demonstrado pela menor continuidade progressiva (mucosa *vs.* tumores superficiais *vs.* neoplasias espessas) de colágeno tipo IV na membrana basal.

- Pacientes com metástases linfonodais apresentarem menores índices de miR-29a-3p, aqueles com extravasamento extracapsular dos linfonodos metastáticos apresentaram maiores níveis de miR-let-7d-5p, miR-125b-5p e miR-222-3p, outros que cursaram com recidiva locorregional apresentaram valores menores de miR-99a-5p e aqueles que apresentaram qualquer tipo de recidiva de doença ao longo do acompanhamento apresentaram menores taxas de mir-99a-5p e de miR-221-3p. Ainda, notou-se uma maior expressão de MMP-2 pelos fibroblastos relacionados ao tumor quando o miR1-3p foi inferior a 0,583 e quando o miR21-5p foi maior ou igual a 0,742. Ainda, há maior expressão de CD34 quando os valores de miR-133a-3p são maiores ou iguais a –0,902. Esses dados sugerem uma interação dos microRNAs nos diversos desfechos clínicos do carcinoma de células escamosas da cavidade oral, além da influência dos miRs 1-3p e 21-5p na degradação da matriz extracelular e do miR-133a-3p no processo de neoangiogênese desses tumores, dois fatores também associados aso desfechos clínicos estudados.

 Houve melhores taxas de sobrevivência global e livre de doença nos pacientes com maior expressão de miR-133a-3p e também de maior sobrevivência livre de doença quanto maior a expressão do miR-1-3p.

8 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

	USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP
	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DA EMENDA	
Título da Pesquisa: E Pi Pesquisador: Leandro Área Temática: Versão: 2 CAAE: 59617616.4.00	XPRESSÃO DE MICRO-RNAS ASSOCIADOS A INVASÃO TUMORAL E ROGNÔSTICO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL o Luongo de Matos 00.0065 e: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principa	e: Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo II: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECEF	a de la companya de l
Número do Parecer: 3	3.763.803
Apresentação do Proj Projeto já avaliado por Objetivo da Pesquisa Objetivo Primário:	eto: esse CEP :
Relacionar o perfil de r pacientes acometidos Objetivo Secundário: Relacionar o perfil de n	nicroRNAs com variáveis demográficas, histopatológicas e imuno-histoquímicas dos por carcinoma espinocelular de cavidade oral; nicroRNAs com o prognóstico dos pacientes acometidos por carcinoma espinocelula
Avaliação dos Riscos	e Benefícios:
O presente estudo se espinocelular de cavida Medicina da Universida Portanto os autores nã Os dados histopatológ parte pequena do rem parafina.	erá constituído pela coorte retrospectiva de pacientes portadores de carcinoma ade oral operados pela Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de ade de São Paulo no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). o referem riscos nem benefícios à pacientes. icos serão também coletados do laudo histopatológico.O material utilizado será uma nanescente tumoral do exame anátomo-patológico que se encontra em blocos de
Endereço: DOUTOR ARI Bairro: PACAEMBU UF: SP Muni Telefone: (112902 4101	NALDO 251 21° andar sala 36 CEP: 01.246-903 cípio: SAO PAULO E molt: con for@usn br



	USP - FAC MEDICINA DA DE SÃO PA	ULDADE DE UNIVERSIDADE ULO - FMUSP	Platafo grazil	ດງກາ
Continuação do Parecer: 3.76	3.803			
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	isentotcle.doc	03/08/2016 12:05:17	Leandro Luongo de Matos	Aceit
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.doc	03/08/2016 12:05:04	Leandro Luongo de Matos	Aceit
Outros	cartasub.doc	03/08/2016	Leandro Luongo de Matos	Aceit
Folha de Rosto	folha.pdf	03/08/2016	Leandro Luongo de Matos	Aceit
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Assli Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira Jenador(a))	_	
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 1ado por: zevedo Koike Folgueira ienador(a))	_	
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 1ado por: zevedo Koike Folgueira ienador(a))	_	
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira Jenador(a))	_	
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Assin Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira Jenador(a))	_	
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira denador(a))		
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira denador(a))		
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Assii Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 1ado por: zevedo Koike Folgueira Jenador(a))		
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira jenador(a))		
Situação do Parece Aprovado Necessita Apreciaç Não	er: ção da CONEP: SAO PAULO, 12 Assii Maria Aparecida A (Coord	de Dezembro de 2019 nado por: zevedo Koike Folgueira Jenador(a))		

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

	TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
	Projeto de pesquisa:
	"EXPRESSÃO DE MICRO-RNAS ASSOCIADOS A INVASÃO TUMORAL E PROGNÓSTICO EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL"
	Pesquisador Responsável:
	Leandro Luongo de Matos Professor Livre Docente da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Médico Assistente – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
ļ	Pesquisador Executante:
911	Gilberto Mendes Menderico Júnior Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> (Clínica Cirúrgica) da Faculdade de Medicina da Jniversidade de São Paulo
1	Duração da pesquisa: 48 meses Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa: número de / /
1	Para obter um maior conhecimento sobre o câncer, médicos e pesquisadores deste Hospita
(desenvolvem pesquisas clínicas e científicas, para conhecer melhor os mecanismos das
(doenças, buscando assim oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento aos
ç	seus pacientes. Particularmente, o Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço está envolvido
1	no estudo do câncer da boca. O material biológico retirado do paciente é destinado para
ľ	realização de exames necessários para que um diagnóstico preciso possa ser realizado. C
ľ	restante do material é armazenado para novos exames se necessários. Caso contrário, são
1	descartados, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.
I	Estamos solicitando a sua permissão para utilizar um fragmento do tumor e do tecido não
	tumoral retirados de você ou de seu familiar que não são mais necessários para c
	diagnóstico. A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor não implicarão em
	riscos adicionais no seu tratamento ou de seu familiar, diagnóstico ou prognóstico, nem tampouco, em aumento no tempo e período para a execução dos procedimentos necessários.
F	Este material biológico será usado para atividades do projeto de pesquisa "EXPRESSÃO DE
	MICRO-RNAS ASSOCIADOS A INVASÃO TUMORAL E PROGNÓSTICO EM CARCINOMA
	ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL". A eventual inclusão do seu material ou de seu
	familiar neste projeto de pesquisa ocorre de acordo com a aprovação da Comissão de Ética
ł	em Pesquisa de nossa Instituição. Sua privacidade e identidade ou de seu familiar serão
	sempre preservadas.
	A eventual inclusão dos resultados em publicação científica ou outros meios será feita
1	sempre de modo a manter o seu anonimato ou de seu familiar, já que todo material utilizado



que minha identidade ou de meu familiar seja mantida em confidencialidade. (Escrever sim ou não) Se a resposta anterior for SIM, minha informação e amostra ou de meu familiar poderão ser usadas em teste genéticos que podem identificar riscos de doenças genéticas para meus familiares. Neste caso (escrever Sim ou Não),			
Se a resposta anterior for SIM, minha informação e amostra ou de meu familiar poderão ser usadas em teste genéticos que podem identificar riscos de doenças genéticas para meus familiares. Neste caso (escrever Sim ou Não),	que minha identidade ou de meu familiar sej ou não)	a mantida em confidencialidad	e. (Escrever sim
Decoderina: Por expressão de verdade firmo o presente Termo. São Paulo/SP, de de Paciente Nome:	Se a resposta anterior for SIM, minha informa usadas em teste genéticos que podem iden familiares. Neste caso (escrever Sim ou I descoberta	ação e amostra ou de meu fam tificar riscos de doenças gené Não),quero se	iliar poderão ser iicas para meus r informado da
São Paulo/SP, de de Paciente	Por expressão de verdade firmo o presente Te	ermo	
Nome:	São Paulo/SP, de	de	_
Data de nascimento: / / Sexo: M □ F □ RG: CPF: RH: Endereço: nº apto Cidade: CEP: Telefone: DDD ()	Paciente		
RG: CPF: RH: Endereço: nº apto Cidade: CEP: Telefone: DDD () CEP:	raciente Nome:		
RH: Endereço: Cidade: CEP: Telefone: DDD ()	Paciente Nome: / Data de nascimento: /	Sexo: M 🗆 🛛 F 🗖	
Endereço:	Paciente Nome: Data de nascimento: RG:	Sexo: M 🗆 F 🗆 CPF:	
Cidade: CEP: Telefone: DDD ()	Paciente Nome: Data de nascimento: RG: RG: RH:	Sexo: M 🗆 F 🗆 CPF:	
Telefone: DDD ()	Paciente Nome:	Sexo: M 🗆 F 🗆 CPF:	apto
	Paciente Nome: Data de nascimento: RG: RG: RH: Endereço: Cidade:	Sexo: M 🗆 F 🗆 CPF:nº CEP:	apto

Data de nascimento:///	Covo: M 🗖		
	Sex0. M L	F□	
RG:	CPF:		
RH:			
Endereço:		nº	apto
Cidade:	CEP:		
Telefone: DDD ()		T	
		_	
Assinatura do paciente ou responsável			


REFERÊNCIAS

- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Foreman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N^o. 10 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2010.
- Lambert R, Sauvaget C, De Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 23(8):633-41.
- Diaz EM, Holsinger FC, Zuniga ER, Roberts DB, Sorensen DM. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: One institution's experience with 119 previously untreated patients. *Head Neck*. 2003;25(4):267-73.
- Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ. National cancer database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*. 2009;31(6):748-58.
- Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Piccirillo JF, Haigentz M, Suárez C, van der Poorten V; Hermans R, Rodrigo JP, Devaney KO, Ferlito A. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck*. 2010;32(12):1693-711.

- Pentenero M, Gandolfo S, Carrozzo M. Importance of tumor thickness and depth of invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. *Head Neck*. 2005;27(12):1080-91.
- 7. Matos LL, Manfro G, Santos RV Dos, Stabenow E, Mello ES, Alves VAF, Pinto FR, Kulcsar MAV, Brandão LG, Cernea CR. Tumor thickness as a predictive factor of lymph node metastasis and disease recurrence in T1N0 and T2N0 squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(2):209-17.
- Pinto FR, de Matos LL, Palermo FC, Kulcsar MAV, Cavalheiro BG, De Mello ES, Alves MAV, Cernea CR, Brandão LG. Tumor thickness as an independent risk factor of early recurrence in oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(6):1747-54.
- Garnis C, Chari R, Buys TPH, Zhang L, Ng RT, Rosin MP, Lam WL. Genomic imbalances in precancerous tissues signal oral cancer risk. *Mol Cancer*. 2009;8:50.
- Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol*. 2009;1:11.
- Widodo, Djati MS, Rifa'i M. Role of MicroRNAs in carcinogenesis that potential for biomarker of endometrial cancer. *Ann Med Surg*. 2016;7:9-13.

- Moreno-Moya JM, Vilella F, Simón C. MicroRNA. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1516-23.
- 13. Cochrane DR, Spoelstra NS, Richer JK. The role of miRNAs in progesterone action. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):50-9.
- Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, Loomis AM, Shah JP. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):122-37.
- Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*. 2017;39(2):297-304.
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):212-6.
- World Health Organization. Global health observatory [internet]. 2019
 [citado: 2019 nov. 11]. Disponível em: who.int/gho/database/en/.
- Alvarenga LDM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli ÉC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(1):68-73.

- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: BI; 2015.
- Auluck A, Hislop G, Bajdik C, Poh C, Zhang L, Rosin M. Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of Human Papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: The British Columbia experience. *Cancer*. 2010;116(11):2635-44.
- Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, Haigentz Jr M, Stoeckli SJ, Shara AR, Rapidis AD, Rodrigo JP, Rinaldo A. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2010;267(7):1001-17.
- Cagle PT, Miller RA, Allen TC. Nonneuroendocrine carcinomas (excluding sarcomatoid carcinoma) and salivary gland analogue tumors of the lung. In: Practical pulmonary pathology: a diagnostic approach a volume in the pattern recognition. Series. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
- Crum CP, Peters III WA. Cervical squamous neoplasia, in diagnostic gynecologic and obstetric pathology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
- Prost-Squarcioni C. Histologie de la peau et des follicules pileux.
 Medecine/Sciences. 2006. p. 22(2):131-7.

- NYU School of Medicine. Thick skin [internet]. 2019 [citado: 2019 dez 29]; Disponível em: education.med.nyu.edu/Histology/courseware/units/ Unit17/Unit17-4-I.html%.
- De Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck*. 2010;32(3):357-67.
- 27. Radoï L, Menvielle G, Cyr D, Lapôtre-Ledoux B, Stücker I, Luce D; ICARE Study Group. Population attributable risks of oral cavity cancer to behavioral and medical risk factors in France: Results of a large population-based case-control study, the ICARE study. *BMC Cancer*. 2015;15:827.
- Travasso C. Betel quid chewing is responsible for half of oral cancer cases in India, finds study. *BMJ*. 2013;347:f7536.
- 29. Tovosia S, Chen PH, Ko AMJ, Tu HP, Tsai PC, Ko YC. Prevalence and associated factors of betel quid use in the Solomon Islands: A hyperendemic area for oral and pharyngeal cancer. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(3):586-90.
- 30. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):357-67.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2009;45(4-5):309-16.

- Desiderio V, Papagerakis P, Tirino V, Zheng L, Matossian M, Prince ME, Paino F, Mele L, Papaccio F, Motella R, Papaccio G, Papagerakis S. Increased fucosylation has a pivotal role in invasive and metastatic properties of head and neck cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015;6(1):71-84.
- Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, MacLennan K, Myers JN, Petruzzelli GJ, Shaha AR, Genden EM, Johnson JT, Carbalho MB, Meers EN. Prognostic significance of microscopic and macroscopic extracapsular spread from metastatic tumor in the cervical lymph nodes. *Oral Oncol*. 2002;38(8):747-51.
- Alvi A, Johnson JT. Extracapsular spread in the clinically negative neck (N0): Implications and outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;114(1):65-70.
- Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, Myers JN. Extent of extracapsular spread: A critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer*. 2003;97(6):1464-70.
- Woolgar JA, Vaughan ED, Scott J, Brown JS. Pathological findings in clinically false-negative and false-positive neck dissections for oral carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl.* 1994;76(4):237-44.
- Ahmed MU, Khawar A, Ahmed J, Ajmal M, Bangash WK, Akhter MR.
 Occult metastasis in carcinoma of oral cavity. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2007;17(6):313-5.

- 38. Moore C, Kuhns JG, Greenberg RA. Thickness as Prognostic Aid in Upper Aerodigestive Tract Cancer. *Arch Surg.* 1986;121(12):1410-4.
- Wang K, Veivers D. Tumour thickness as a determinant of nodal metastasis in oral tongue carcinoma. *ANZ J Surg*. 2017;87(9):720-4.
- 40. Ahmed SQ, Junaid M, Awan S, Kazi M, Khan HU, Halim S. Frequency of cervical nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the tongue. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2018;22(2):136-40.
- Loganathan P, Sayan A, Hsu DWK, Paraneetharan S, Ilankovan V. Squamous cell carcinoma of the anterior tongue: is tumour thickness an indicator for cervical metastasis? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(4):407-12.
- 42. S V, Rohan V. Cervical node metastasis in T1 squamous cell carcinoma of oral tongue- pattern and the predictive factors. *Indian J Surg Oncol.* 2014;5(2):104-8.
- Hakeem A, Pradhan S, Kannan R, Tubachi J. Clinical outcome of surgical treatment of T1-2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue with observation for the neck: Analysis of 176 cases. *Ann Maxillofac Surg*. 2016;6(2):235-40.
- Balasubramanian D, Ebrahimi A, Gupta R, Gao K, Elliott M, Palme CE, Clark JR. Tumour thickness as a predictor of nodal metastases in oral cancer: comparison between tongue and floor of mouth subsites. *Oral Oncol*. 2014;50(12):1165-8.

- Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 2006;43(2):60-6.
- Tomioka H, Morita KI, Hasegawa S, Omura K. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(4):206-11.
- 47. Willis RA. The spread of tumours in the human body. London: Butterworth; 1934.
- 48. Willis RA. Mitosis in the hepatic metastases of malignant tumours. J *Pathol Bacteriol*. 1932;35(1):11-8.
- 49. Li X, Wu Z, Fu X, Han W. A microRNA component of the neoplastic microenvironment: microregulators with far-reaching impact. *Biomed Res Int*. 2013;762183.
- 50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
- Wentz-Hunter KK, Potashkin JA. The Role of miRNAs as Key Regulators in the Neoplastic Microenvironment. *Mol Biol Int*. 2011;2011:839872.
- 52. Ham AW, Cormack DH. Histologia. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1983.

- Ross MH, Pawlina W. Histologia: texto e atlas. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
- Ovalle KW, Nahirney PC. Netter bases da histologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: Extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;4(5):608-16.
- 57. Antonopoulos A, Favetta P, Jacquinet JC, Lafosse M. Tandem mass spectrometry for the characterisation of sulphated- phosphorylated analogues of the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans J Mass Spectrom. 2005;40(12):1628-36.
- 58. Marolla APC, Waisberg J, Saba GT, Waisberg DR, Margeotto FB, Pinhal MAS. Glycomics expression analysis of sulfated glycosaminoglycans of human colorectal cancer tissues and nonneoplastic mucosa by electrospray ionization mass spectrometry. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(4):510-7.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance.
 J Cell Sci. 2010;123(24):4195-200.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J.
 Molecular cell biology. 4th edition. New Yoirk: W. H. Freeman, 2000.

- Santos AO. Papel da laminina na migração de linfócitos T em modelo murino de transplante cardíaco alogênico [dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz; 2014.
- Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1999;81(6):1071-9.
- 63. Pereira ALA, Veras SSL, Silveira ÉJD, Seabra FRG, Pereira Pinto L, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracellular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: Uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005.;71(7):81-6.
- 64. Costa LD, Dias MC, Alvarenga MA, Sequeira JL. Identificação dos colágenos I, III, IV e α-SMA e participação dos miofibroblastos no processo fibrótico das endometroses equinas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2017;69(6):1398-406.
- Hu P, Fang L, Chess EK. Source-induced fragmentation of heparin, heparan, and galactosaminoglycans and application. *Anal Chem*. 2009;81(6):2332-43.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK.
 Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2010;277(19):3904-23.

- Zhang W, Ge Y, Cheng Q, Zhang Q, Fang L, Zheng J. Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget*. 2018;9(4):5480-91.
- Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling.
 Braz J Med Biol Res. 2006;39(2):157-67.
- Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:729-77.
- Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Laryngoscope*. 2000;110(1):84-92.
- Giussani M, Merlino G, Cappelletti V, Tagliabue E, Daidone MG.
 Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:3-10.
- 72. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(17):1260-70.
- 73. Santos García A, Abad Hernández MM, Fonseca Sánchez E, Gonzalez RJ, Galindo Villardón P, Cruz Hernández JJ, Bullón-Sopelana A. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):E100-5.

- 74. Itoh Y, Nagase H, Reunanen N, Kähäri V. Matrix metalloproteinases in cancer cell invasion. *Essays Biochem*. 2002;38:21-36.
- Arvatz G, Weissmann M, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase and cancer progression: New directions, new promises. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(9):2253-6.
- 76. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962;48:1014-22.
- 77. Chen J, Khalil RA Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;148:87-165.
- 78. Saarialho-Kere UK, Chang ES, Welgus HG, Parks WC. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. J Clin Invest. 1992;90(5):1952-7.
- Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis*. 2015;2(1):25-34.
- Geurts N, Opdenakker G, Van Den Steen PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther*. 2012;133(3):257-79.
- Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases.
 Prog Histochem Cytochem. 2012;47(1):27-58.

- 82. Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 1990;9(7):2241-6.
- Sneeggen M, Schink KO, Stenmark H. Tumor suppression by control of matrix metalloproteinase ecycling. *Mol Cell Oncol*. 2019;14(6):e1646606.
- 84. Liu SC, Yang SF, Yeh KT, Yeh CM, Chiou HL, Lee CY, Chou M-C, Hsieh Y-S. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2006;371(1-2):92-6.
- 85. Bibak F, Ahmadi S, Khateri Z, Ahmadi A, Yari K. The role of matrix metalloproteinase-2 expression in gastric cancer susceptibility: A systematic review. *Int J Cancer Manag.* 2019;12(9):e94185.
- Levy-Adam F, Abboud-Jarrous G, Guerrini M, Beccati D, Vlodavsky I, Ilan N. Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20457-66.
- Klein U, von Figura K. Partial purification and characterization of a heparan sulfate specific endoglucuronidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;73(3):569-76.
- Maxhimer JB, Quiros RM, Stewart R, Dowlatshahi K, Gattuso P, Fan M,
 Prinz RA, Xu X. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery*. 2002;132(2):326-33.

- Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene*. 2000;253(2):171-8.
- Vlodavsky I, Singh P, Boyango I, Gutter-Kapon L, Elkin M, Sanderson RD, Ilan N. Heparanase: From basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation. *Drug Resist Updat*. 2016;29:54-75.
- Ramani VC, Zhan F, Barbieri P, Noseda A, Tricot G, Sanderson RD.
 Targeting heparanase to inhibit myeloma chemoresistance. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;7(2):1598-607.
- Shteingauz A, Boyango I, Naroditsky I, Hammond E, Gruber M, Doweck I, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase enhances tumor growth and chemoresistance by promoting autophagy. *Cancer Res.* 2015;75(18):3946-57.
- 93. McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, Stubberfield C, Page J, Page M. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):1170-7.
- 94. Vlodavsky I, Gross-Cohen M, Weissmann M, Ilan N, Sanderson RD. Opposing functions of heparanase-1 and heparanase-2 in cancer progression. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(1):18-31.

- 95. Gross-Cohen M, Feld S, Doweck I, Neufeld G, Hasson P, Arvatz G, Barash U, Naroditsky I, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase 2 attenuates head and neck tumor vascularity and growth. *Cancer Res.* 2016;76(9):2791-801.
- Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, Narodisky I, Ilan N, Doweck I, Vlodavsky I. Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem*. 2010;285(36):28010-9.
- 97. Fang Z, Rajewsky N. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One*. 2011;6(3):e18067.
- 98. Liz J, Portela A, Soler M, Gómez A, Ling H, Michlewski G, Calin GA, Guil S, Esteller M. Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. *Mol Cell*. 2014;55(1):138-47.
- Ibrahim SA, Hassan H, Götte M. MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer. *FEBS J*. 2014;281(22):5009-22.
- 100. Pradhan AK, Emdad L, Das SK, Sarkar D, Fisher PB. The enigma of miRNA regulation in cancer. *Adv Cancer Res*. 2017;135:25-52.
- 101. Fuziwara CS, Kimura ET. MicroRNAs in thyroid development, function and tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;456:44-50.

- 102. Sondermann A, Andreghetto FM, Moulatlet ACB, da Silva Victor E, de Castro MG, Nunes FD, Brandão LG, Saverino P. MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(6):521-30.
- 103. Chou J, Shahi P, Werb Z. MicroRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment. *Cell Cycle*. 2013;12(20):3262-71.
- 104. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2999-3004.
- 105. John K, Wu J, Lee BW, Farah CS. MicroRNAs in head and neck cancer. *Int J Dent*. 2013;2013:650218.
- 106. Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context-from basic biology to clinical utility. *J Dent Res*. 2012;91(5):440-6.
- 107. Jia LF, Wei SB, Mitchelson K, Gao Y, Zheng YF, Meng Z, Gan Y-H, Yu G-Y. MiR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14. *PLoS One*. 2014;9(9):e108435.

- 108. Li L, Lu S, Liang X, Cao B, Wang S, Jiang J, Luo H, He S, Lang J, Zhu G. γδTDEs: an efficient delivery system for miR-138 with anti-tumoral and immunostimulatory roles on oral squamous cell carcinoma. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;14:101-13.
- 109. Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a Meta-analysis of reported studies. *Cancer*. 2009;115(7):1489-97.
- 110. Bonnardot L, Bardet E, Steichen O, Cassagnau E, Piot B, Salam AP, Campion L, Ferron C, Montreuil CB, Malard O. Prognostic factors for T1-T2 squamous cell carcinomas of the mobile tongue: A retrospective cohort study. *Head Neck*. 2011;33(7):928-34.
- 111. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck*. 1997;19(3):205-10.
- 112. d'Alessandro AF, Pinto FR, Lin CS, Kulcsar MAV, Cernea CR, Brandão LG, Matos LL. Oral cavity squamous cell carcinoma: Factors related to occult lymph node metastasis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81(3):248-54.
- 113. Yamamichi N, Shimomura R, Inada KI, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichcinose M, Shiogama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4009-16.

- 114. Han HB, Gu J, Zuo HJ, Chen ZG, Zhao W, Li M, Ji D-B, Lu Y-Y, Zhang A-Q. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol*. 2012;26(3):544-55.
- 115. Valente CMD. Expressão de MicroRNAs em tecidos bucais sem câncer e suas implicações na saúde [dissertação]. Universidade Federal do Pará; 2017.
- 116. Metheetrairut C, Chotigavanich C, Amornpichetkul K, Keskool P, Ongard S, Metheetrairut C. Expression levels of miR-34-family microRNAs are associated with TP53 mutation status in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2019;276(5):521-33.
- 117. Salzman DW, Nakamura K, Nallur S, Dookwah MT, Metheetrairut C, Slack FJ, Weidhaas JB. MiR-34 activity is modulated through 5'-end phosphorylation in response to DNA damage. *Nat Commun.* 2016;7:10954.
- 118. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther*. 2011;19(6):1116-22.
- 119. Xue W, Dahlman JE, Tammela T, Khan OF, Sood S, Dave A, Cai W, Chirino LM, Yang GR, Bronson R, Crowley DG, Sahay G, Schoroeder A, Langer R, Anderson DG, Jacks T. Small RNA combination therapy for lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(34):e3553-61.

- 120. Wilkins OM, Titus AJ, Salas LA, Gui J, Eliot M, Butler RA, Sturgis EM, Li G, Kelsey KT, Cristensen BC. MicroRNA-related genetic variants associated with survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(1):127-36.
- 121. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang P, Song E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):3998-4008.
- 122. Baghaei F, Abdollahi A, Mohammadpour H, Jahanbin M, Naseri Taheri F, Aminishakib P, Ravazi AE, Kharazifard M. PTEN and miR-26b: Promising prognostic biomarkers in initiation and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(1):31-5.
- McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich
 A. Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem.* 2011;57(6):833-40.
- 124. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, O1Briant JNKC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessela RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.

- 125. Sun L, Liu L, Fu H, Wang Q, Shi Y. Association of decreased expression of serum miR-9 with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. *Med Sci Monit*. 2016;22:289-94.
- 126. Yoon AJ, Wang S, Shen J, Robine N, Philipone E, Oster MW, Nam A, Santella RM. Prognostic value of miR-375 and miR-214-3p in early stage oral squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res*. 2014;6(5):580-92.
- 127. Sun G, Cao Y, Wang P, Song H, Bie T, Li M, Huai D. miR-200b-3p in plasma is a potential diagnostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers*. 2018;23(2):137-41.
- 128. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):467-77.
- 129. Chen L, Hu J, Pan L, Yin X, Wang Q, Chen H. Diagnostic and prognostic value of serum miR-99a expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2018;23(3):333-9.
- 130. Yan Y, Wang X, Venø MT, Bakholdt V, Sørensen JA, Krogdahl A, Sun Z, Gao S, Kjems J. Circulating miRNAs as biomarkers for oral squamous cell carcinoma recurrence in operated patients. *Oncotarget*. 2017;8(5):8206-15.
- Piccinini AM, Midwood KS. Illustrating the interplay between the extracellular matrix and microRNAs. *Int J Exp Pathol.* 2014;95(3):158-80.

- 132. Rutnam ZJ, Wight TN, Yang BB. MiRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol*. 2013;32(2):74-85.
- 133. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136, 215-33.
- 134. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5369-80.
- 135. Noruzi S, Azizian M, Mohammadi R, Hosseini SA, Rashidi B, Mohamadi Y, Nesaei A, Seiri P, Sahebakar A, Salarinia R, Aghdam AM, Mirzaei H. Micro-RNAs as critical regulators of matrix metalloproteinases in cancer. *J Cell Biochem*. 2018;119(11):8694-712.
- 136. Sengupta S, Den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen C-J, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5874-8.
- 137. Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, Hui AB Sykes J, P'ng C, Miiller N,McCready D, Fyles A, Liu F-F. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(8):2926-37.

- 138. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.
- 139. Chamorro Petronacci CM, Pérez-Sayáns M, Padín Iruegas ME, Suárez Peñaranda JM, Lorenzo Pouso AI, Blanco Carrión A, García AG. miRNAs expression of oral squamous cell carcinoma patients: Validation of two putative biomarkers. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(13):e14922.
- 140. Uen YH, Wang JW, Wang CC, Jhang Y, Chung JY, Tseng TT, Sheu MJ, Lee SC. Mining of potential microRNAs with clinical correlation regulation of syndecan-1 expression by miR-122-5p altered mobility of breast cancer cells and possible correlation with liver injury. *Oncotarget*. 2018;9(46):28165-75.
- 141. Zheng Z, Kye Y, X, Kim A, Kin I. Expression of p63, bcl-2, bcl-6 and p16 in Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Korean J Pathol*. 2005;39:91-8.
- 142. Visser NCM, van der Wurff AAM, Pijnenborg JMA, Massuger LFAG, Bulten J, Nagtegaal ID. Tissue microarray is suitable for scientific biomarkers studies in endometrial cancer. *Virchows Arch*. 2018;472(3):407-13.

- 143. de Melo FLP, Lancellotti CLP, da Silva MALG. Reprodutibilidade do diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais e a influência dos marcadores imuno-histoquímicos p16 e Ki-67 como ferramentas auxiliares. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2016;38(2):82-7.
- 144. Poblete CE, Fulla J, Gallardo M, Muñoz V, Castellón EA, Gallegos I, Contreras HR. Increased SNAIL expression and low syndecan levels are associated with high Gleason grade in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2014;44(3):647-54.
- 145. Bajracharya D, Shrestha B, Kamath A, Menon A, Radhakrishnan R. Immunohistochemical correlation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinase-2 in tobacco associated epithelial dysplasia. *Dis Markers*. 2014;2014:197813.
- 146. Grewal HK, Sethi S. Immunohistochemical expression of type IV collagen and autocrine motility factor receptor in odontogenic tumours. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8(10):ZC17-21.
- 147. Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, Arnes J, Eide J, Collett K, Akslen LA. Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: A Population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. *PLoS One*. 2014;11(3):e0150979.

- 148. Nassif AE, Filho RT. Immunohistochemistry expression of tumor markers CD34 and P27 as a prognostic factor of clinically localized prostate adenocarcinoma after radical prostatectomy. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37(5):338-44.
- 149. Bufalino A, Cervigne NK, De Oliveira CE, Fonseca FP, Rodrigues PC, Macedo CCS, Sobral LM, Miguel MC, Lopes MA, Leme AFP, Lambert DW, Salo TA, Kowalski LP, Graner E, Coletta RD. Low miR-143/miR-145 cluster levels induce activin a overexpression in oral squamous cell carcinomas, which contributes to poor prognosis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136599.
- 150. Ulitsky I, Maron-Katz A, Shavit S, Sagir D, Linhart C, Elkon R, Tanay A, Sharan R, Shiloh Y, Shamir R. Expander: from expression microarrays to networks and functions. *Nat Protoc*. 2010;5(2):303-22.
- 151. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;644(15):5245-50.
- 152. Brockhoff HC, Kim RY, Braun TM, Skouteris C, Helman JI, Ward BB. Correlating the depth of invasion at specific anatomic locations with the risk for regional metastatic disease to lymph nodes in the neck for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2017;39(5):974-9.

- 153. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013. p. 153:516-9.
- 154. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2003;39(4):386-90.
- 155. Aires FT, Lin CS, Matos LL, Kulcsar MAV, Cernea CR. Risk factors for distant metastasis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma undergoing surgical treatment. *J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2017;79(6):347-55.
- 156. Aprelikova O, Green JE. MicroRNA regulation in cancer-associated fibroblasts. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(2):231-7.
- 157. Matias C, Bordieri T, Roberts D, Cheever VJ, Munk LK, Lipsky MS,fahmy MD, Gross AJ. Small molecule inhibition of matrix metalloproteinases as a potential therapeutic for metastatic activity in squamous cell carcinoma. *Oral Cancer*. 2019;3(1):1-8.
- 158. Zhou B, Chen WL, Wang YY, Lin ZY, Zhang DM, Fan S, Li J-S. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-tomesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(8):585-92.
- 159. Zhang J, Liu J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2013;137(2):200-15.

- 160. Marsh T, Pietra K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1070-8.
- 161. Ribeiro RIMDA, Borges Jr. PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. Expression of matrix metalloproteinasis and their tissue inhibitors in basal cell carcinoma. *J Bras Patol e Med Lab*. 2008;44(2):115-21.
- 162. Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, Attieh Y, Zaccarubu F, Lae M, Loew D, Dingli F, Sirven P, Schoumacher M, Gurchenkov BG, Plodenec M, Vignjevic DM. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun*. 2017;8:924.
- 163. Ba P, Zhang X, Yu M, Li L, Duan X, Wang M, Lv S, Fu G, Yang P, Yag C, Sun Q. Cancer associated fibroblasts are distinguishable from peritumor fibroblasts by biological characteristics in TSCC. *Oncol Lett.* 2019;18:2484-90.
- 164. Cress AE, Rabinovitz I, Zhu W, Nagle RB. The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14(3):219-28.
- 165. Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, Karászi K, Pakku S, Baghy K, kovalszky I. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. BMC Cancer. 2015;15:256.

- 166. Yang F, Ning Z, Ma L, Liu W, Shao C, Shu Y, Shen H. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer*. 2017;16(1):148.
- 167. Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Dugo M, D'Ippolito E, Cataldo A, Cosentino G, Angeloni V, Rossini A, Daidone MG, Iorio MV. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-Associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis*. 2016;7(7):e2312.
- 168. He B, Lin X, Tian F, Yu W, Qiao B. MiR-133a-3p Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Proliferation and Invasion by Suppressing COL1A1. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):338-46.
- 169. Xiao B, Liu H, Gu Z, Ji C. Expression of microRNA-133 inhibits epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells by directly targeting FOXQ1. *Arch Bronconeumol*. 2016;52(10):505-11.
- 170. Liu S, Chen J, Zhang T, Chen H. MicroRNA-133 inhibits the growth and metastasis of the human lung cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor. *J BUON*. 2019;24(3):929-35.
- 171. Koshizuka K, Hanazawa T, Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Mataki H, Mizuno K, Okamoto Y, Seki N. Dual-receptor (EGFR and c-MET) inhibition by tumor-suppressive miR-1 and miR-206 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*. 2017;62(1):113-21.

- 172. Chen X, Shi J, Zhong J, Huang Z, Luo X, Huang Y, Feng S, Shao J, Liu D. miR-1, regulated by LMP1, suppresses tumour growth and metastasis by targeting K-ras in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2015;96(6):427-32.
- 173. Hedbäck N, Jensen DH, Specht L, Fiehn AMK, Therkildsen MH, Friis-Hansen L, Debelsteen E, Buchwald. miR-21 expression in the tumor stroma of oral squamous cell carcinoma: an independent biomarker of disease free survival. *PLoS One*. 2014;9(4):e95193.
- 174. Brito JAR, Gomes CC, Guimarães ALS, Campos K, Gomez RS. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(3):211-6.
- 175. Min A, Zhu C, Peng S, Rajthala S, Costea DE, Sapkota D. MicroRNAs as important players and biomarkers in oral carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:186904.
- 176. Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, Bajraktari A, Bertini A, Çeka A, Rubini C, Ferrante L, Procopiio AD, Olivieri F. Expression levels and clinical significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in laryngeal squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1-9.
- 177. Liu J, Lei DP, Jin T, Zhao XN, Li G, Pan XL. Altered expression of mir-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(10):2653-7.

- 178. Nouraee N, Van Roosbroeck K, Vasei M, Semnani S, Samaei NM, Naghshvar F, Omidi AA, Calin GA, Mowla SJ. Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(9):e73009.
- 179. Rostas JW, Pruitt HC, Metge BJ, Mitra A, Bailey SK, Bae S, Singh KP, Devine DJ, Dyess DL, Richards WO, Tucker JA, Shevde LA, Samant RS. MicroRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol Cancer*. 2014;13:200.
- 180. Zhao Z, Wang L, Song W, Cui H, Chen G, Qiao F, Hu J, Zhou R, Fan H. Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World J Surg Oncol.* 2015;13:101.
- 181. Lu L, Xue X, Lan J, Gao Y, Xiong Z, Zhang H, Jiang W, Song W, Ahi Q. MicroRNA-29a upregulates MMP2 in oral squamous cell carcinoma to promote cancer invasion and anti-apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(1):13-9.
- 182. Urabe F, Kosaka N, Yoshioka Y, Egawa S, Ochiya T. The small vesicular culprits: the investigation of extracellular vesicles as new targets for cancer treatment. *Clin Transl Med*. 2017;6(1):45.
- 183. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, Wu C-Ym Kuo P-I. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal MIR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34):4929-42.

- 184. Rodriguez PL, Jiang S, Fu Y, Avraham S, Avraham HK. The proinflammatory peptide substance P promotes blood-brain barrier breaching by breast cancer cells through changes in microvascular endothelial cell tight junctions. *Int J Cancer*. 2014;134(5):1034-44.
- 185. Chen Y, Song Y, Yu Y, Cheng W, Tong X. Mirna-10a promotes cancer cell proliferation in oral squamous cell carcinoma by upregulating glut1 and promoting glucose metabolism. *Oncol Lett.* 2019;17(6):5441-6.
- 186. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Manickavasagam M, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Oral squamous cell carcinoma: MicroRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism. *Mol Cancer*. 2016;15(28).
- 187. Jakob M, Mattes LM, Küffer S, Unger K, Hess J, Bertlich M, Haubner F, Ihler F, Canis M, Weiss BG, Kitz J. MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer. *Head Neck*. 2019;41(10):1-17.