

RENATA MACHADO SOARES

**AÇÃO DO MICRORNA-7 SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO
MEDIADAS POR EGF: ESTUDO FUNCIONAL EM
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ORAL E
QUERATINÓCITOS NORMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Patrícia Severino

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

RESUMO

Soares RM. Ação do microRNA-7 sobre vias de sinalização mediadas por EGF: Um estudo funcional em linhagem celular de carcinoma oral e queratinócitos. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Os miRNAs pertencem a uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes que desempenham papel significativo como moléculas reguladoras. MiRNAs podem funcionar como oncogenes ou supressores de tumor, e sabe-se que participam da regulação de processos relacionados com tumorigênese como a proliferação celular e processos apoptóticos. O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é a sexta neoplasia mais comum no mundo. Apesar dos principais fatores de risco para o CECP serem conhecidos (tabaco e álcool) e da disponibilidade de dados na literatura sobre genes com papel importante na tumorigênese de CECP, existem poucas informações disponíveis sobre mecanismos moleculares precisos, assim como não existe consenso sobre características moleculares representativas desse tipo de tumor. O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR do inglês *epidermal growth factor receptor*) pertence à família de receptores erbB e está expresso em tecidos de origem epidérmica. Este receptor desempenha um papel importante em processos celulares como proliferação e diferenciação, e tornou-se um importante alvo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos por encontrar-se muito expresso em diversos tipos de tumores sólidos e, em particular, em cerca de 80% dos casos de CECP. Já foi demonstrado que o miRNA-7 pode regular a expressão de efetores de sinalização do EGFR, bem como regular diretamente o EGFR, interferindo em ciclo celular e viabilidade de linhagens celulares. Neste trabalho apresentamos a expressão gênica de EGFR e miRNA-7 em amostras tumorais e livres de tumor, e o papel do miRNA-7 na regulação de genes da via de sinalização mediadas por EGF foi investigado através de estudo funcional por ganho de função em uma linhagem celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e em queratinócito oral normal derivado de cultura primária. Para tanto as células foram transfectadas com precursores de miRNA-7 e o resultado foi avaliado por PCR *Array* direcionado para 84 genes relacionados com sinalização mediada por EGF. Constatou-se expressão mais elevada de miRNA-7 em amostras tumorais quando comparadas com amostras livres de tumor, um indício do papel desta molécula em CECP. A super-expressão do miRNA-7 alterou a expressão de diversos genes na linhagem celular de carcinoma, em especial, na via PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1, resultando na diminuição da proliferação dessas células. O impacto na proliferação celular parece estar relacionado principalmente com a diminuição da expressão gênica e proteica de p70S6K1. Em queratinócitos orais derivados de cultura primária não houve alteração significativa na expressão dos genes avaliados. Nossos resultados indicam que miRNA-7 possa interferir na progressão do ciclo celular através da regulação de p70S6K1. Entretanto, a resposta diferente de dois tipos celulares à super-expressão do miRNA-7 mostra a complexidade de suas vias de regulação, um ponto crítico para aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: MiRNA. Neoplasia de cabeça e pescoço. Receptor de fator de crescimento epidérmico. Transfecção celular. Proliferação celular. Queratinócitos.

ABSTRACT

Soares RM. The action of microRNA-7 on signaling pathways mediated by EGF: a functional study using oral squamous cell carcinoma cell line and normal oral keratinocytes [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

MicroRNAs are small noncoding RNAs that regulate gene expression by degrading or destabilizing the RNA message or by inhibiting protein translation of specific mRNA targets. Currently, broad evidence shows that alterations in microRNA expression are involved in the initiation and progression of human cancers. MiR-7 has been shown to regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, a matter of great interest to the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) clinical setting. HNSCC is the six most common cancer in the world and, despite research efforts, there is no consensus on molecular characteristics that could be used for prognosis evaluation or early detection. EGFR is frequently overexpressed in HNSCC and is an important therapeutic target. MiR-7 targets not only EGFR but also multiple other genes involved in EGFR-related tumorigenesis. Nevertheless, this mechanism has not been addressed in HNSCC. Aiming to understand the role of miR-7 in EGFR signaling under a HNSCC background, we over-expressed this molecule in an oral squamous cell carcinoma cell line and in normal oral keratinocytes derived from primary cultures, and evaluated the expression level of 84 genes of the EGFR signaling pathway using a PCR Array. Most genes were deregulated after the interference in the cell line, in particular genes belonging to the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 pathway. This lead to cell cycle arrest, as detected by Ki67 staining, possibly due to the down-regulation of *p70S6K1* which was seen both at gene and protein levels. This deregulation was not detected, however, for normal keratinocytes, where no significant impact was observed on the gene expression regulation of genes from the EGFR signaling pathway. Our results suggest that miR-7 can interfere in the regulation of PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 through directly targeting *p70S6K1* but this action depends on assessed cell model, thus possibly varying according to the molecular background of a given pathology. The understanding of this complexity in gene regulation is critical for therapeutic application of miRNAs.

Keywords: MiRNA. Head and neck squamous cell carcinoma. EGFR. Cell transfection. Cell proliferation. Keratinocytes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) pertencem a uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que desempenham papel significativo como moléculas reguladoras pós-transcricionais (Lagos-Quintana et al., 2001). O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por Victor Ambros e suas colaboradoras Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum em um experimento de perfil genético em *Caenorhabditis elegans*, um animal com milímetros de comprimento usado como organismo modelo em pesquisa biológica (Lee et al., 1993).

O banco de dados de sequência de miRNAs miRBase tem registrados 21264 miRNAs maduros em 168 espécies (miRBase, 2012). MiRNAs são nomeados por um prefixo com 3 ou 4 letras para designar a espécie seguidos por uma sequência numérica, por exemplo, hsa-miR-10 em humanos ou mmu-miR-10 em murinos. As sequências maduras são designadas por 'Mir', enquanto que os precursores são designados por 'mir'. Sequências cujos miRNAs maduro diferem em apenas uma ou duas posições são denominadas com letras, por exemplo, mmu-miR-10a e mmu-miR-10b. *Loci* distintos que dão origem a miRNAs maduros semelhantes são acrescentados números, por exemplo, dme-mir-281-1 e dme-mir-281-2 em *Drosophila melanogaster*. MiRNAs provenientes de final 3' ou 5' são indicadas por um 3p ou 5p, por exemplo, miR-142 5p, miR-142-3p (Griffiths-Jones et al., 2006).

O efeito do miRNA depende de sua interação com mRNA codificadores em regiões de complementaridade parcial. Esse mecanismo ainda não está completamente compreendido, mas sabe-se que essa interação leva ao silenciamento gênico por meio do bloqueio da tradução da sequência codificadora alvo, sem ocorrerem efeitos no acoplamento do mRNA com os ribossomos ou no início da tradução (Kim et al., 2004). Alguns miRNAs possuem complementaridade total com as suas sequências alvo no mRNA e, nesse caso, levam à degradação da molécula de forma semelhante ao que realizam siRNAs (Yekta et al., 2004).

Existem algumas diferenças no mecanismo de ação dos miRNAs de animais e plantas, (1) os sítios de complementaridade dos miRNAs de plantas estão localizados sempre na região codificadora do mRNA alvo, enquanto que em animais podem se localizar na região codificadora ou, preferencialmente, na região 3' não traduzida, (2) em plantas existe apenas um sítio de complementaridade entre determinado miRNA e seu mRNA alvo, enquanto que

em animais podem existir sítios múltiplos de complementaridade (Reinhart et al., 2000; Rhoades et al., 2002; Slack et al., 2000), por fim, (3) os miRNAs de plantas atuam predominantemente degradando o mRNA alvo (Carrington e Ambros, 2003; Tang et al., 2003), o oposto é observado com os miRNAs de animais, que predominantemente reprimem a tradução de seus mRNAs alvos sem afetar sua estabilidade (Olsen e Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002).

A interação entre miRNAs e seus alvos constitui um sistema complexo onde um único miRNA pode interagir e regular diversos alvos e, por outro lado, diversos miRNAs podem controlar um mesmo alvo. Os miRNAs regulam uma grande fração de genes codificadores de proteínas, e estima-se que cerca de 30% dos genes humanos identificados possam ser alvos de miRNAs (Brennecke et al., 2005).

Estudos recentes mostram que as alterações na expressão de miRNAs contribuem para a patogênese de uma grande quantidade de malignidades humanas. Essas alterações decorrem de mecanismos como deleções genicas, aumento no número de cópias ou mutações envolvendo *loci* de miRNAs, ou ainda o silenciamento epigenético e desregulação na maquinaria da biogênese do miRNA (Croce, 2009). Os genes dos miRNAs estão frequentemente localizados em regiões genômicas associadas ao câncer, indicando que os miRNAs desempenham um papel importante na patogênese desta doença (Calin et al., 2004). Muitos miRNAs ligam-se a mRNAs relacionados a proliferação celular, apoptose, diferenciação e metástases em câncer (Huang et al., 2010; Lu et al., 2005; Sun et al., 2009 e Williams, 2008). MiRNAs tem sido estudados como possíveis alvos terapêuticos e o perfil de expressão destas moléculas parece ser capaz de classificar tumores (Chen et al., 2010; Childs et al., 2009; Hui et al., 2010; Scapoli et al., 2010).

1.2 MiRNA e os tumores epidermóides de cabeça e pescoço

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é a sexta causa mais comum de câncer no mundo, com cerca de 600.000 novos casos em todo mundo no ano de 2011 (Leemans et al., 2011). Ele tem início na superfície epitelial da mucosa que reveste as vias aerodigestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e a laringe). No Brasil, em 2012, estimam-se 14.170 casos novos de câncer da cavidade oral, sendo 9.990 homens e 4.180 mulheres (Brasil, 2012).

Os principais fatores de risco para o CECP são o tabaco associado ao etilismo (Zygiogianni et al., 2011) aumentando em 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo

de câncer (Brasil, 2012). Pacientes com tumores em estágios precoces geralmente exibem poucos sintomas, o que resulta em atraso no diagnóstico e diminuição de sobrevida (Wulfkuhle et al., 2003). Existe ainda pouca consistência com relação à evolução da doença, uma vez que pacientes com lesões precocemente diagnosticadas podem apresentar evolução desfavorável e pacientes com tumores extensos podem conseguir controlar a doença.

A extensão do tumor, a presença de metástase no linfonodo e a metástase a distância determinam o prognóstico dos pacientes com CECP. Estes pacientes exibem poucos sintomas nos estágios iniciais da doença, resultando em atraso no diagnóstico. Quando o paciente é diagnosticado, cerca de dois terços deles já apresentam metástases linfonodais e apenas um terço dos pacientes apresenta-se com a doença em estágio inicial resultando em uma diminuição de sobrevida (Leemans, 2011; Wulfkuhle et al., 2003)

Tumores em estágio inicial são tratados com cirurgia ou radioterapia e têm um prognóstico favorável. O tratamento para os tumores avançados normalmente são a cirurgia combinada com radioterapia pós-operatória ou quimioterapia (Conley, 2006; Wheeler, 2012). Tratamentos agressivos estão associados a impactos significativos na vidas desses pacientes, incluindo a dificuldade na deglutição e a redução da capacidade de comunicação. Mesmo com tratamento combinado, as taxas de sobrevida de 50% em 5 anos para CECP em grande parte manteve-se inalterada desde a década de 1970 (Carvalho et al., 2005; Jemal et al., 2007; Wheeler, 2012), isso se deve ao fato dos pacientes frequentemente apresentarem recidivas locais, um segundo tumor primário ou metástase à distância.

Apesar de muita informação disponível sobre os mecanismos moleculares da carcinogênese em CECP, as dificuldades encontradas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas decorrem, em grande parte, da grande heterogeneidade molecular em CECP (Leemans, 2011; Severino et al., 2008; Ziober et al., 2006). O desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço é um processo multifatorial e ocorre por mudanças genéticas e epigenéticas, como amplificação gênica, perda de heterozigotidade e inativação gênica por metilação. As alterações moleculares em CECP incluem ativação de oncogenes, como por exemplo: EGFR, ciclina D1 e COX-2; inativação de genes supressores tumorais, tais como: TP53, p16, p27 e WAF1/C1P1; e expressão de fatores angiogênicos e metastáticos; além dos polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas (Colombo e Rahal, 2009). Entretanto, ainda não existe consenso sobre características moleculares representativas do CECP. Estudos de marcadores moleculares como alvos terapêuticos tentam auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico, assim como na identificação de populações de risco (Hardisson, 2003).

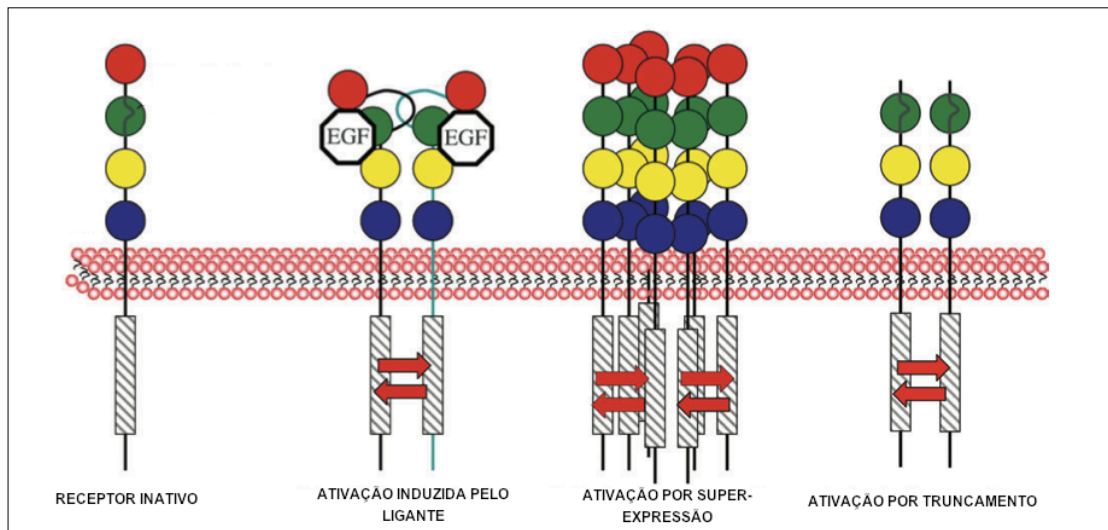
Alguns trabalhos de análise de miRNAs traçam perfis de expressão de miRNAs na tentativa utilizá-los como marcadores de diagnóstico ou prognóstico em CECP. O grupo de Avissar et al. (2010) demonstraram uma relação de expressão dos miRNAs miRNA-221 e miRNA-375 que permite distinguir um tecido livre de tumor de um tecido tumoral com precisão em CECP. Assim também, o miRNA-18 e o miRNA-221 foram encontrados super-expressos nas linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço e nas amostras de pacientes com CECP (Shiiba et al., 2010). Hui et al. (2010) fizeram uma análise da expressão global de miRNAs em amostras de CECP fixadas em formol. Entre outros miRNAs diferencialmente expressos, o miRNA-451 foi encontrado menos expresso em pacientes com recidiva quando comparado aos que não apresentaram recidiva. Este miRNA, que está associado ao um prognóstico ruim em câncer gástrico (Bandres et al., 2009), poder vir a se tornar um importante marcador de prognóstico em CECP.

Acredita-se que a compreensão do papel dos miRNAs possa representar uma nova abordagem para o entendimento desse tipo de câncer e a identificação de marcadores moleculares para o uso em diagnóstico e prognóstico, assim como novos alvos terapêuticos para CECP.

1.3 Receptor de fator de crescimento epidermal

O receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR do inglês *epidermal growth factor receptor*) pertence a família de receptores erbB e está expresso em tecidos de origem epidermal, mesenquimal e neuronal (Yano et al., 2003). A ativação propriamente dita ocorre pela homodimerização do receptor e subsequente ativação da tirosina quinase através do domínio intracelular do receptor, esta ativação resulta na autofosforilação e recrutamento de moléculas sinalizadoras intracelulares. Três mecanismos principais relacionados a expressão do EGFR foram descritos: ligação do ligante ao receptor, onde o ligante estabiliza a ligação entre os dímeros do receptor, levando a fosforilação; alterações moleculares no receptor, como truncamento e mutações pontuais levando a estabilização das estruturas oligoméricas e consequente fosforilação; e a super-expressão do EGFR, com o aumento da probabilidade de colisões espontâneas receptor-receptor (Crowe et al., 2002; Cruz et al., 2007) (Figura 1).

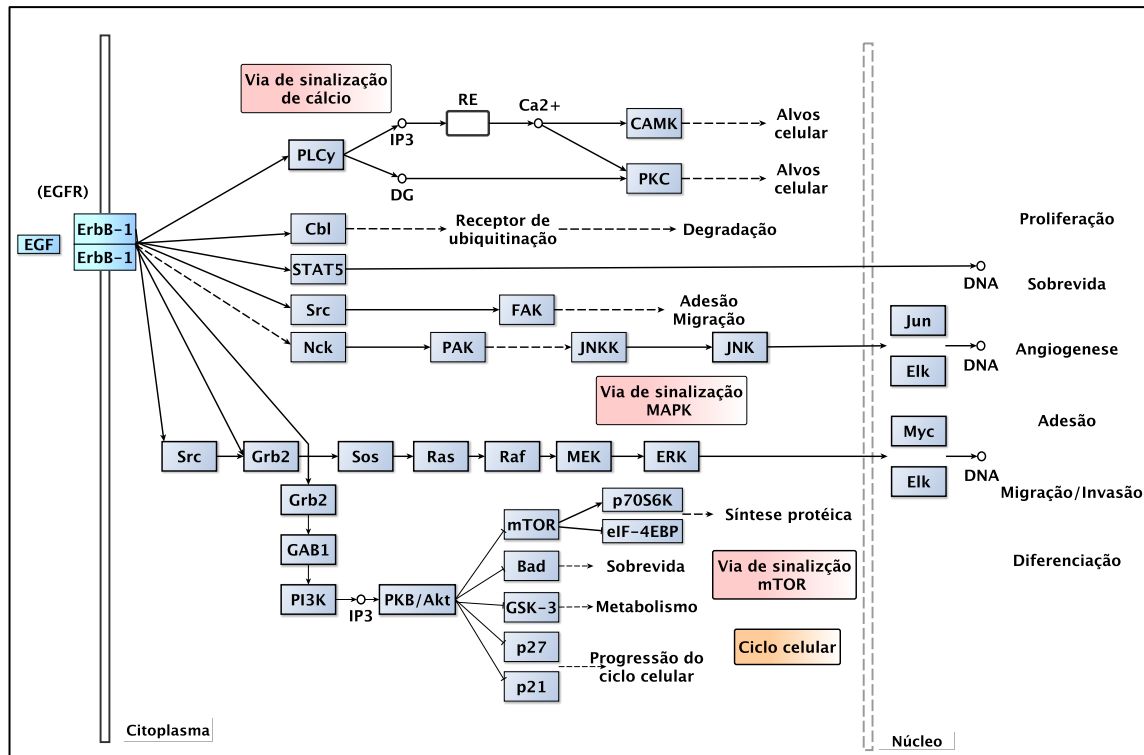
Figura 1 - Mecanismos de ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR).



Fonte: Modificado de Cruz et al. (2007). Com autorização.

Este receptor desempenha um papel importante em processos celulares como proliferação, diferenciação e desenvolvimento (Yano et al., 2003). A ativação de EGFR desencadeia uma cascata de reações que ativa principalmente as vias: RAS-RAF-MEK-MAPK, que induz proliferação, a via PI3K-PTEN-AKT e transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs), as quais desempenham um papel importante na sobrevivência das células (Figura 2). A ativação dessas vias resulta em uma série de eventos que medeiam o crescimento de células tumorais, como proliferação, adesão, invasão, inibição da apoptose, metástase, bem como a resistência à quimioterapia (da Cunha Santos et al., 2011; Yarden et al., 2001).

Figura 2 - Via de sinalização da família ErbB-1 de receptores tirosina quinase em humanos.



Ligantes extracelulares do EGFR ligam-se a ele desencadeando vias de sinalização intracelulares que regulam diversas respostas biológicas como proliferação, diferenciação, motilidade celular e sobrevivência.
Fonte: Modificado de Kegg Pathway (2012).

EGFR é um importante alvo para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos pois encontra-se super-expresso em diversos tipos de tumores sólidos e, em particular, em cerca de 40 a 90% dos casos de CECP (Kumar et al., 2003; Rabinowits et al., 2012).

Foram desenvolvidas duas estratégias terapêuticas principais que tem o EGFR como o alvo: (1) anticorpos monoclonais, onde anticorpos se ligam ao domínio de ligação extracelular do receptor impedindo sua ativação pelos ligantes endógenos por meio da ligação competitiva, e levando a internalização e degradação do complexo anticorpo-receptor e (2) inibidores de tirosina quinase que possuem como alvo o domínio intracelular do receptor, competindo com o trifosfato de adenosina (ATP) para o seu local de ligação, e assim impedindo a transdução do sinal (Wnorowski et al., 2012; Zimmermann et al., 2006). Embora a super-expressão do EGFR em muitos cânceres ocorra devido a amplificação do gene, determinados grupos de tumores não exibem amplificação do EGFR mesmo ele estando super-expresso. Como exemplo, Tripp et al. (2005) verificaram que em 20% das amostras testadas de glioblastomas que super-expressavam EGFR, a amplificação do gene EGFR

estava ausente, sugerindo a existência de outros mecanismos que promovam a expressão aberrante do EGFR em células cancerosas.

Em CECP, os tumores em estágio avançado geralmente apresentam um maior nível de EGFR, e sua expressão pode variar entre os sub-sítios deste tipo de tumor (Kalyankrishna et al., 2006). Embora EGFR e vias a ele relacionadas sejam muito estudados em tumorigênese, há pouco conhecimento sobre como os miRNAs interferem na via do EGFR de forma a modular o desenvolvimento e a progressão do câncer.

1.4 MiRNA-7 e a regulação do EGFR

O miRNA-7 apresenta aproximadamente 444 alvos preditos conservados entre as espécies (*TargetScan*, 2012). Na literatura, diversos alvos de miRNA-7 foram validados experimentalmente, como: EGFR, RAF1 (Kefas et al., 2008), IRS1, IRS2 (Webster et al., 2009), PAK1 (Reddy et al., 2008), SNCA (Junn et al., 2008), CD98 (Nguyen et al., 2010), PIK3CD e IGF1R (Jiang et al., 2010), ERF (Chou et al., 2010), RPS6KB1 (p70S6K1) e mTOR (Fang et al., 2012).

O miRNA-7 pode regular a expressão de diversos efetores da via de sinalização do *EGFR*, tendo como alvo direto o próprio *EGFR* e *Raf1*. Webster e colaboradores (2009) comprovaram por ensaio da luciferase que o miRNA-7 pode regular o mRNA de EGFR em vários tipos de células tumorais humanas (pulmão, mama e glioblastoma), induzindo a parada do ciclo celular e morte celular. E, também identificaram por análise de *microarray* e posterior validação por qRT-PCR, que outros genes poderiam ser indiretamente regulados por miRNA-7, como: MEK, PI3K, AKT, CAMK, PAK1 e ARF4. Kefas e colaboradores (2008) mostraram que o miRNA-7 é um supressor de tumor em glioblastoma, podendo inibir a expressão de EGFR e, independentemente de EGFR, pode regular a via AKT através de outros genes-alvo ainda não determinados.

Fang e colaboradores (2012) identificaram PIK3CD como um novo alvo do miRNA-7, e ao analisar a via PI3K/Akt viram também que Akt, mTOR e p70S6K tiveram sua expressão diminuída quando o miRNA-7 foi super-expresso em carcinoma hepatocelular humano. Sob um outro aspecto, Chou e colaboradores (2010) sugerem que o miRNA-7 modula a oncogênese mediada por EGFR em câncer de pulmão, onde EGFR induziria a expressão do miRNA-7 através da via Ras/ERK/Myc, promovendo a proliferação celular e a formação de tumores em pulmão. Estes dados em conjunto indicam uma forte relação de

regulação entre o miRNA-7 e o EGFR, porém ainda não existem estudos publicados sobre a regulação deste receptor e seus transdutores pelo miRNA-7 em CECP.

5 CONCLUSÕES

- A expressão de miRNA-7 estava significativamente aumentada em CECP quando comparada com tecidos livres de tumor (margens cirúrgicas) no grupo de pacientes estudados. Quanto ao gene EGFR, este não se encontrava mais expresso nos tumores, e sim nas respectivas margens cirúrgicas livres de tumor, na maioria dos casos estudados. Apesar de uma relação direta entre ambos os fatos ser tentadora, diversos fatores contribuem para a regulação de EGFR em CECP, sendo miRNA-7 uma delas.
- A super-expressão do miRNA-7 altera a expressão gênica de diversos efetores de vias associadas ao EGFR na linhagem SCC25 (82 de 84 genes representados no PCR-*Array*).
- A super-expressão do miRNA-7 não alterou de forma significativa a expressão de genes relacionados a vias de sinalização mediadas por EGF aqui estudadas em queratinócitos orais derivados de cultura primária.
- As diferenças quanto ao efeito da super-expressão de miRNA-7 em linhagem de carcinoma e em queratinócitos normais indicam que esta molécula pode possuir diferentes papéis dependendo do contexto estudado.
- O gene *P70S6K1*, um alvo validado para miRNA-7 em hepatocarcinoma, também apresentou expressão diminuída em linhagem de CECP após super-expressão de miRNA-7, mesmo em uma situação onde diversos outros membros da via mTOR/AKT/p70S6K1 apresentavam-se super-expressos. Este efeito também foi observado em seus níveis protéicos e deve estar diretamente relacionado a sua regulação pelo miRNA-7.
- Não foi constatado efeito na expressão do gene EGFR em queratinócitos orais após super-expressão do miRNA-7. Na linhagem celular de carcinoma observou-se um aumento na expressão gênica, mas uma diminuição nos níveis de proteína EGFR. A análise dos níveis protéicos por imunocitoquímica mostraram uma distribuição irregular da proteína, não permitindo uma quantificação adequada desta expressão. Este ensaio também permitiu detectar uma diminuição no número de células nos campos contento células super- expressando o miRNA-7, sugerindo impacto em proliferação celular.
- Observou-se redução na proliferação celular na linhagem de carcinoma. Esta constatação veio através do ensaio para detecção de Ki67 e através de curvas de proliferação. Estas curvas mostraram um efeito da transfecção sobre a sobrevivência das

células, mas um efeito mais importante quando as células super-expressavam o miRNA-7.

- Através do estudo de relatos da literatura sobre a ação do miRNA-7 sobre genes que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer, foi possível concluir que genes descritos como desregulados em CECP podem ser direta ou indiretamente regulados por miRNA-7. Desta forma, o miRNA-7 pode contribuir de forma significativa para a progressão do CECP, bem como interferir no resultado de terapias que tenham como alvos genes ou proteínas relacionadas a vias de sinalização mediadas por EGF.

REFERÊNCIAS

- Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 pt 1):4029-37.
- Andreghetto FM, Klingbeil MFG, Soares RM, Sitnik R, Pinto Junior DS, Mathor MB, Fabio Nunes D, Severino P. Evaluation of cãncer expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. *Einstein*. 2011;9(4 pt 1):442-8.
- Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(1):56-61.
- Array Data Analysis Web Portal. [Internet]: RT² Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 Disponível em <<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>>. [2012 Aug 27].
- Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Câncer Res*. 2009;15;15(8):2850-5.
- Bandres E, Bitarte N, Arias F, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009;15:2281–90.
- Benassi L, Marconi A, Sevignani C, Vaschieri C, Zambruno G. Metodiche di coltura di cheratinociti umani normali. In: Zambruno G, Canceda R, De Luca M, Andreassi L. Coltura di cheratinociti umani normali e loro applicazione. Workshop di biologia cellulare e immunologia della cute. Modena: Università deli Studi di Modena; 1993. P. 5-23.
- Blaimauer K, Watzinger E, Erovic BM, Martinek H, Jagersberger T, Thurnher D. Effects of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor on the growth of oropharyngeal keratinocytes in coculture with autologous fibroblasts in a three-dimensional matrix. *Cells Tissues Organs*. 2006;182(2):98-105.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.
- Bruckman KC, Schönleben F, Qiu W, Woo VL, Su GH. Mutational analyses of the BRAF, KRAS, and PIK3CA genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(5):632-7.
- Batista CM, Carvalho CMB, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *J Pharm Sci*. 2007; 43(2).

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

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.

Campos MS, Rodini CO, Pinto-Junior DS, Nunes FD. GAPD and tubulin are suitable internal controls for qPCR analysis of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 2009;45(2):121-6.

Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Moutereau S, Chimingqi M, Matar C, Revaud D, Bah M, Manivet P, Conti M, Loric S (2010a) 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer*. 2010a;102:1037-43.

Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 2003;301(5631):336-8.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005;114(5):806-16.

Chen LH, Tsai KL, Chen YW, Yu CC, Chang KW, Chiou SH, Ku HH, Chu PY, Tseng LM, Huang PI, Lo WL. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *J Oncol*. 2010;2010:135632.

Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith RV, Prystowsky MB, Belbin TJ, Schlecht NF. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2009;174(3):736-45.

Chou YT, Lin HH, Lien YC, Wang YH, Hong CF, Kao YR, Lin SC, Chang YC, Lin SY, Chen SJ, Chen HC, Yeh SD, Wu CW. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Câncer Res*. 2010;70(21):8822-31.

Coló AE, 68âncer AC, Carvalho AL, Melo CM, Fahham L, Kowalski LP, Soares FA, Neves EJ, Reis LF, Carvalho AF. Functional microarray analysis suggests repressed cell-cell signaling and cell survival-related modules inhibit progression of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2011;4-33.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Câncer Cancerol*. 2009;55:165-74.

Conley BA. Treatment of advanced head and neck cancer: what lessons have we learned? *J Clin Oncol*. 2006;24(7):1023-5.

Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):704-14.

Crowe DL, Hacia JG, Hsieh CL, Sinha UK, Rice H. Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol*. 2002;17(3):909-14.

- Cruz JJ, Ocaña A, Del Barco E, Pandiella A. Targeting receptor tyrosine kinases and their signal transduction routes in head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(3):421-30.
- Da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:49-69.
- Erkan EP, Breakefield XO, Saydam O. miRNA signature of schwannomas: possible role(s) of “tumor suppressor” miRNAs in benign tumors. *Oncotarget*. 2011;2(3):265-70.
- Fang YX, Xue JL, Shen Q, Chen J, Tian L. miR-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the PI3K/AKT pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012. Doi: 10.1002/hep.25576.
- Fitch DH, Bugaj-Gaweda B, Emmons SW. 18S ribosomal RNA gene phylogeny for some Rhabditidae related to Caenorhabditis. *Mol Biol Evol*. 1995;12(2):346-58.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
- Ganci F, Saccomi A, Mancio V, Covello R, Spriano G, Fontemaggi G, Blandino G (2012). *Molecular Genetics and Biology of Head and Neck CÂNCER*, Dr. Mark Agulnik (Ed.), ISBN: 987-953-51-0236-6, In Tech, Available from: [HTTP://intechopen.com/books/head-and-neck-cancer/molecular-genetics-and-biology-of-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma-implications-for-diagnosis-p](http://intechopen.com/books/head-and-neck-cancer/molecular-genetics-and-biology-of-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma-implications-for-diagnosis-p).
- Godlewski J, Newton HB, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):221-8.
- Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 2010;16(16):4289-97.
- Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993;53(15):3579-84.
- Grewe M, Gansauge F, Schmid RM, Adler G, Seufferlein T. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 1999;59(15):3581-7.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D140-4.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007;27(1):91-105.

Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot.* 2009;60(2):487-93.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):835-40.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003;260(9):502-8.

Heinonen H, Nieminen A, Saarela M, Kallioniemi A, Klefström J, Hautaniemi S, Monni O. Deciphering downstream gene targets of PI3K/mTOR/p70S6K pathway in breast cancer. *BMC Genomics.* 2008;9:348.

Hoa M, Davis SL, Ames SJ, Spanjaard RA. Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(24):7154-6.

Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem.* 2011;67(1):129-39.

Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordonez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1129-39. Epub 2010 Feb 9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57(1):43-66.

Jiang L, Liu X, Chen Z, Jin Y, Heidbreder CE, Kolokythas A, Wang A, Dai Y, Zhou X. MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells. *Biochem J.* 2010; 432(1):199-205.

Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):13052-7. Epub 2009 Jul 23.

Kalyankrishna S, and Grandis JR: Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol Rev.* 2006;24:2666-2672.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(10):3566-72.

Kegg Pathway Database. August 23, 2012. Available from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> [2012 Aug 27].

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

Klingbeil MF. Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primárias de queratinócitos bucais humanos. Instituto de pesquisas energéticas e moleculares. [tese (Doutorado)]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2006.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37:495–500.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Neoplasia, Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editors. *Robbins basic pathology.* 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.

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

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120: 15–20.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435(7043):834-8.

Maegawa M, Arao T, Yokote H, Matsumoto K, Kudo K, Tanaka K, Kaneda H, Fujita Y, Ito F, Nishio K. EGFR mutation up-regulates EGR1 expression through the ERK pathway. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1111-7.

Ministério da Saúde. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. [página na Internet]. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: cânc://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR [2012 ago 29].

MirBase [Internet]: miRBase: the microRNA database. Version 19 Disponível em <<http://www.mirbase.org/>>. Acesso em 20 Agosto 2012.

Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses Garça A, Raimondi AR, Jufe R, Itoiz M, Gao Y, Saranath D, Kaleebi GS, Yoo GH, Leak L, Myers EM, Shintani S, Wong D, Massey HD, Yeudall WA, Lonardo F, Ensley J, Gutkind JS. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res.* 2007;13(17):4964-73.

Nathan CO, Amirghahari N, Abreo F, Rong X, Caldito G, Jones ML, Zhou H, Smith M, Kimberly D, Glass J. Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res.* 2004;10(17):5820-7.

National Center for Biotechnology Information [Internet]: PubMed US National Library of Medicine National Institutes of Health. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

[2012 Aug 31].

Nguyen HT, Dalmaso G, Yan Y, Laroui H, Dahan S, Mayer L, Sitaraman SV, Merlin D. MicroRNA-7 modulates CD98 expression during intestinal epithelial cell differentiation. *J Biol Chem*. 2010;285(2):1479-89. Epub 2009 Nov 4.

Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999;216(2):671-80.

Rabinowits G, Haddad RI. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: A review of the literature. *Oral Oncol*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.06.016>

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*. 2008;68(20):8195-200.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002;110(4):513-20.

Saydam O, Senol O, Wurdinger T, et al. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways. *Cancer Res*. 2011;71(3): 852-61.

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

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol*. 2002;243(2):215-25.

Seufferlein, T., and Rozengurt, E. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 1996;56:3895-3897.

Severino P, Alvares AM, Michaluart P Jr, Okamoto OK, Nunes FD, Moreira-Filho CA, Tajara EH; Head and Neck Genome Project GENCAPO. Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites. *BMC Res Notes*. 2008;1:113.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.

Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N. Expression and

mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008a;99(8):1589-94.

Sheikh Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder L, Tominaga S, Onoda T, Yamanaka N, Grenman R, Shimizu K, Nagai N, Nagatsuka H. Lack of B-RAF mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*. 2008b;54(5):157-61.

Sheu JJ, Hua CH, Wan L, Lin YJ, Lai MT, Tseng HC, Jinawath N, Tsai MH, Chang NW, Lin CF, Lin CC, Hsieh LJ, Wang TL, Shih IeM, Tsai FJ. Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69(6):2568-76.

Shiiba M, Uzawa K and Tanzawa H. MicroRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). *Cancers*. 2010;2:653-69. Doi:10.3390/cancers202065.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell.* 2000;5(4):659-69.

Sun R, Fu X, Li Y, Xie Y, Mao Y Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. *BMC Genomics*. 2009;10:93.

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003;17(1):49-63.

Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q, Yin C, Zhang W. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep.* 2012;27(6):1967-75. Doi: 10.3892/or.2012.1711.

Thomas NE, Alexander A, Edmiston SN, Parrish E, Millikan RC, Berwick M, Groben P, Ollila DW, Mattingly D, Conway K. Tandem BRAF mutations in primary invasive melanomas. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1245-50.

Tripp SR, Willmore-Payne C, Layfield LJ. Relationship between EGFR overexpression and gene amplification status in central nervous system gliomas. *Anal Quant Cytol Histol.* 2005;27(2):71-8.

Wang F, Wang J, Liu D, Su Y. Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal Biochem.* 2010;399(2):211-7.

Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5731-41.

Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(4):545-62.

Wirth PS. The prognostic potential of epidermal growth factor receptor and nuclear factor kappa B pathways and associated therapeutic strategies in patients with squamous cell

- carcinoma of head and neck. [Ph. D. thesis]. Virginia: Commonwealth University. Richmond; 2010.
- Wulfkühle JD, et al. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2003;532:59-68.
- Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Haney J, Helfrich BA, Kato H, Hirsch FR, Franklin WA. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol.* 2008;19(6):1053-9.
- Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, Stenzinger A, Joos H, Landt O, Heiser V, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *J Mol Diagn.* 2010;12(1):35-42.
- Wheeler S, Siwak DR, Chai R, LaValle C, Seethala RR, Wang L, Cieply K, Sherer C, Joy C, Mills GB, Argiris A, Siegfried JM, Grandis JR, Egloff AM. Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(8):2278-89.
- Wnorowski AM, de Souza A, Chachoua A, Cohen DE. The management of EGFR inhibitor adverse events: a case series and treatment paradigm. *Int J Dermatol.* 2012;51(2):223-32. Doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05082.x.
- Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, Averbuch S, Wadsworth P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3639-50.
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004;304(5670):594-6.
- Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol.* 2006;1:11.
- Ziober AF, Patel KR, Alawi F, Gimotty P, Weber RS, Feldman MM, Chalian AA, Weinstein GS, Hunt J, Ziober BL. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5960-71.
- Zygianni A, Kyrgias G, Mystakidou K, Antypas C, Kouvaris J, Papadimitriou C, Armonis V, Alkati H, Kouloulas V. Potential role of the alcohol and smoking in the squamous cell carcinoma of the head and neck: review of the current literature and new perspectives. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(2):339-44.