Flávio Trevisan Barbosa Sandoval

Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

Analysis of the expression of microRNAs and potential targets in head and neck squamous cell carcinoma

São Paulo

2011

Flávio Trevisan Barbosa Sandoval

Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

Analysis of the expression of microRNAs and potential targets in head and neck squamous cell carcinoma

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Biologia (Genética), na Área de Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

São Paulo

2011

[VERSÃO CORRIGIDA]

Trevisan Barbosa Sandoval, Flávio

Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

86 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. MicroRNA 2. Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Profa. Dra. Patrícia Severino

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

_____

Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Orientadora

A Deus

À minha família

À minha avó Bernadete (*in memorian*)

Se você é...

Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos
e alguns amigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir
Alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final de tudo
Será você ... e Deus.

E não você ... e as pessoas!

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eloíza Helena Tajara da Silva, orientadora desta dissertação, por todo empenho, sabedoria e compreensão. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções, revisões e sugestões que permitiram a conclusão desse trabalho com sucesso.

Aos docentes do Instituto de Biociências, Depto Genética e Biologia Evolutiva de Universidade de São Paulo, por me proporcionar uma excelente formação, e ao seu pessoal técnico, em especial Deisy Santos de Moraes, por sua competência, simpatia e eficiência.

Aos Professores Mônica Beatriz Mathor, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, Otávia Luisa Silva Damas de Caballero, Instituto Ludwig, NY, Thomas Carey, Universidade de Michigan e Márcio Mateus Beloti, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,por terem cedido alíquotas das linhagens celulares estudadas no presente trabalho.

A todos os meus amigos e amigas e companheiros do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bionformática Médica, FAMERP. Agradeço à Alessandra, Bianca, Caíque, Fernanda, Flávia, Giovana, Jacqueline, Juliana, Rodrigo, Tiago e Ulises, que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Kelson Roberto Kodama, pelo apoio na realização do presente projeto.

Aos pesquisadores Paulo Peitl Júnior, Beatriz Maria de Carvalho Paixão e José Antonio Cordeiro, pela grande contribuição na elaboração e análise dos dados estatísticos.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), por oferecer a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores do grupo GENCAPO (*Head and Neck Genome Project*), responsáveis pela coleta de dados clínicos e de amostras biológicas e pelas respectivas análises anatomopatológicas.

Aos pacientes, que voluntariamente doaram as amostras para a pesquisa científica.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro sem o qual a realização desse trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais Aluizio e Eliara e ao meu irmão Ricardo, pelo seu incondicional apoio, carinho, amor e dedicação. À minha namorada Priscilla pela cumplicidade, carinho, orientação e amor, e à toda minha família pelo apoio, amor e compreensão.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO 11

Rnas não codificadores..... 11

Biogênese de MicroRNAs..... 12

Regulação de expressão gênica por MicroRNAs..... 15

MicroRNAs e câncer..... 18

Alterações de MicroRNAs em câncer..... 21

a) Aberrações cromossômicas..... 21

b) Alteração da expressão..... 21

c) Mutações de ponto..... 22

d) Polimorfismos..... 22

e) Alterações epigenéticas..... 22

f) Alterações na maquinaria da biogênese de MicroRNAs..... 22

Características das células malignas..... 23

Câncer de cabeça e pescoço..... 25

II- OBJETIVOS 31

III- MATERIAIS E MÉTODOS..... 32

Materiais 32

Amostras de Tumores..... 32

Linhagens celulares..... 36

Controles..... 36

Métodos 37

Busca in silico..... 37

Cultura de células..... 37

Extração de RNA de Linhagens Celulares..... 38

Extração de RNA de Amostras de Tumores..... 38

Avaliação da concentração e da qualidade do RNA..... 39

Síntese de cDNA e PCR em tempo real..... 39

Análises estatísticas..... 42

IV- RESULTADOS 43

Busca in silico de RNAs reguladores..... 43
Casuística..... 44
Extração e quantificação de RNA..... 44
Curvas-padrão..... 44
Seleção de padrões internos..... 52
Avaliação da expressão de miRs em linhagens celulares e querat. normais..... 52
Avaliação da expressão de microRNAs em amostras de Tumor..... 54
V- DISCUSSÃO..... 65
Casuística..... 65
Expressão gênica..... 66
VI- CONCLUSÕES 70
VII- RESUMO..... 71
VIII- ABSTRACT 72
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

INTRODUÇÃO

RNAs não codificadores

Há alguns anos, acreditava-se que o genoma de eucariotos continha apenas uma pequena porcentagem de genes codificadores de proteínas (cerca de 3%) e alguns genes para RNA ribossômico e de transferência, e que o genoma humano possuía cerca de 25 mil "genes" (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Esse quadro mudou completamente com as tecnologias recentes de sequenciamento de DNA, que têm fornecido muitas informações sobre o genoma, o epigenoma e o transcritoma de procariotos e eucariotos. No presente, não é fácil definir "gene" e seus mecanismos de regulação e, talvez, seja necessário voltar para o conceito original abstrato de gene como um traço herdável caracterizado por um fenótipo (Sharp, 2009).

A transcrição a partir de seqüências promotoras e a identificação de promotores bidirecionais, mecanismos de *splicing* alternativo e *trans-splicing* têm revelado a versatilidade do genoma e a importância da unidade de transcrição como fonte de informação genética (Brosius e Tiedge, 2004) (Costa, 2009). A capacidade para formar estruturas secundárias e terciárias, facilitando a interação com outros componentes celulares e permitindo a criação de sítios promotores de reações catalíticas, tem revelado também a centralidade do RNA em processos celulares (Sharp, 2009).

Nos últimos anos, a análise do transcritoma tem gerado uma ampla gama de informações sobre RNAs relacionados com diferentes mecanismos de regulação gênica, incluindo mecanismos epigenéticos. Tais RNAs não codificam proteínas (*non-protein or peptide-coding* ou npcRNAs), ou seja, não contêm uma fase aberta de leitura traduzível (ORF) (Sharp, 2009) (Mercer, Dinger *et al*., 2009), embora não seja possível excluir a possibilidade de que alguns deles codifiquem pequenos peptídeos.

Os npcRNAs, também denominados de Classe I, podem ser transcritos pela RNA polimerase I, II ou III e se contrapõem aos RNAs de Classe II, tipicamente transcritos pela RNA polimerase II, que são traduzidos pela maquinaria de síntese protéica nos ribossomos (Brosius e Tiedge, 2004). Recentemente, dados gerados por sequenciamento em larga escala revelaram que os npcRNAs excedem o número de genes codificadores de proteínas, indicando que o genoma humano é transcricionalmente muito mais ativo do que foi anteriormente previsto (Affymetrix ENCODE Transcriptome Project; Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project, 2009). Entre os transcritos não traduzidos de eucariotos gerados pelas três polimerases, estão os RNAs ribossômicos, bem como o grupo heterogêneo de npcRNAs longos com cerca de 300 a milhares de nucleotídeos (muitos dos quais envolvidos em mecanismos epigenéticos, como o Xist), e os npcRNAs pequenos, com 20 a 300 nucleotídeos (Brosius e Tiedge, 2004). Esses

últimos incluem microRNAs, RNAs de interferência endógenos, RNAs associados a seqüências repetidas e pequenos RNAs citoplasmáticos (como os RNAs transportadores), nucleares, nucleolares e de organelas (Costa, 2009). Outros transcritos não traduzidos são originados a partir de regiões intrônicas, descartadas durante o mecanismo de *splicing* de RNAs nucleares heterogêneos, ou são longos RNAs anti-sense, transcritos da fita oposta de genes codificadores de proteína (Affymetrix ENCODE Transcriptome Project; Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project, 2009). Além dos npcRNAs citados acima, alguns novos tipos têm sido descritos pela literatura. Entre eles, estão os RNAs sintetizados por regiões promotoras (*promoter-associated RNAs* ou paRNAs), bem como aqueles derivados de sequências próximas ou a montante de sítios de início de transcrição (tiRNAs, TSSaRNAs, PROMPTs), incluindo o primeiro exon (PALRs e PASRs) e a extremidade 3' intergênica, ou ainda associados à RNA polimerase II (*nuclear run-on RNAs* ou NRO-RNAs). Vários exemplos de cada grupo são apresentados nas revisões de (Costa, 2009).

Das várias classes de npcRNAs, os microRNAs (miRNAs) têm sido sem dúvida os mais amplamente estudados (Griffiths-Jones, Saini *et al.*, 2008). A primeira referência a esses transcritos data de 1993, quando o grupo de Victor Ambros descobriu que o *Lin-4*, um gene importante na regulação do desenvolvimento do nematóide *C. elegans*, não codificava proteína, mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse achado permitiu a caracterização de um novo mecanismo de regulação gênica, pelo qual o transcrito de *Lin-4* regula negativamente a tradução do transcrito de *Lin-14* ao se ligar diretamente à sua região 3´UTR (Lee, Feinbaum *et al.*, 1993); (Wightman, Ha *et al.*, 1993). A partir desses trabalhos, muitos microRNAs foram descritos atuando em vários processos biológicos (He e Hannon, 2004), mas acredita-se que existam muitos outros ainda não identificados.

Biogênese de microRNAs

Os genes dos miRNAs são evolutivamente conservados e podem estar localizados em íntrons ou exons de genes codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (Rodriguez, Griffiths-Jones *et al.*, 2004). Seus transcritos são seqüências curtas de RNA de fita simples de aproximadamente 23 nucleotídeos que induzem silenciamento e, possivelmente, também a expressão de seus genes alvos, por mecanismos de complementaridade de bases (Bartel, 2009); (Vasudevan, Tong *et al.*, 2007). São formados a partir de longos precursores denominados microRNAs primários (pri-miRNAs), geralmente transcritos pela RNA polimerase II ou III, que possuem uma extremidade cap 5' 7-metil guanosina e uma cauda poli-A. Uma molécula representativa de pri-miRNA em animais exibe uma estrutura secundária complexa, muitas vezes com

vários miRNAs em forma de grampo, cada um deles com uma haste dupla fita, uma alça com bases não complementares e seqüências flanqueadoras (Bartel, 2004).

Os pri-miRNAs são inicialmente processados no núcleo da célula por um complexo nuclear formado pela ribonuclease III Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene 8*) (Lee, Ahn *et al.*, 2003); (Han, Lee *et al.*, 2004); (Zamore e Haley, 2005)). Esse processamento é flexível considerando sua atuação mesmo quando ocorrem miRNAs com seqüências e estrutura secundária aberrantes, como aqueles já detectados em tumores humanos (Diederichs e Haber, 2006).

Com a remoção de uma região da haste dupla fita e das seqüências flanqueadoras, os pri-miRNAs originam estruturas de aproximadamente 70-100 nucleotídeos também em forma de grampo, os pré-miRNAs, que são transportados para o citoplasma por meio do receptor nuclear dependente de RanGTP exportina-5 (Lund, Guttinger *et al.*, 2004); (Yi, Qin *et al.*, 2003). No citoplasma, os pré-miRNAs são liberados por hidrólise de GTP e clivados por uma segunda ribonuclease III denominada Dicer, que atua com a proteína TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) e/ou a quinase PRKRA/PACT (*interferon-inducible doublestranded RNA-dependent activator*) na formação dos miRNAs maduros (Figura 1) (Chendrimada, Gregory *et al.*, 2005); (Lee, Hur *et al.*, 2006).

Os nucleotídeos 2-7 da seqüência dos miRNAs maduros criam a região semente ou "*seed*" na extremidade 5`, que determina a qual RNA mensageiro (mRNA) o miRNA se ligará. O grau de especificidade da região semente é comparável àquela dos sítios do DNA reconhecidos por fatores de transcrição. Da mesma forma que os fatores de transcrição, múltiplos miRNAs ligam-se a sítios complementares, geralmente na região 3' não traduzida (UTR) de mRNAs alvos.

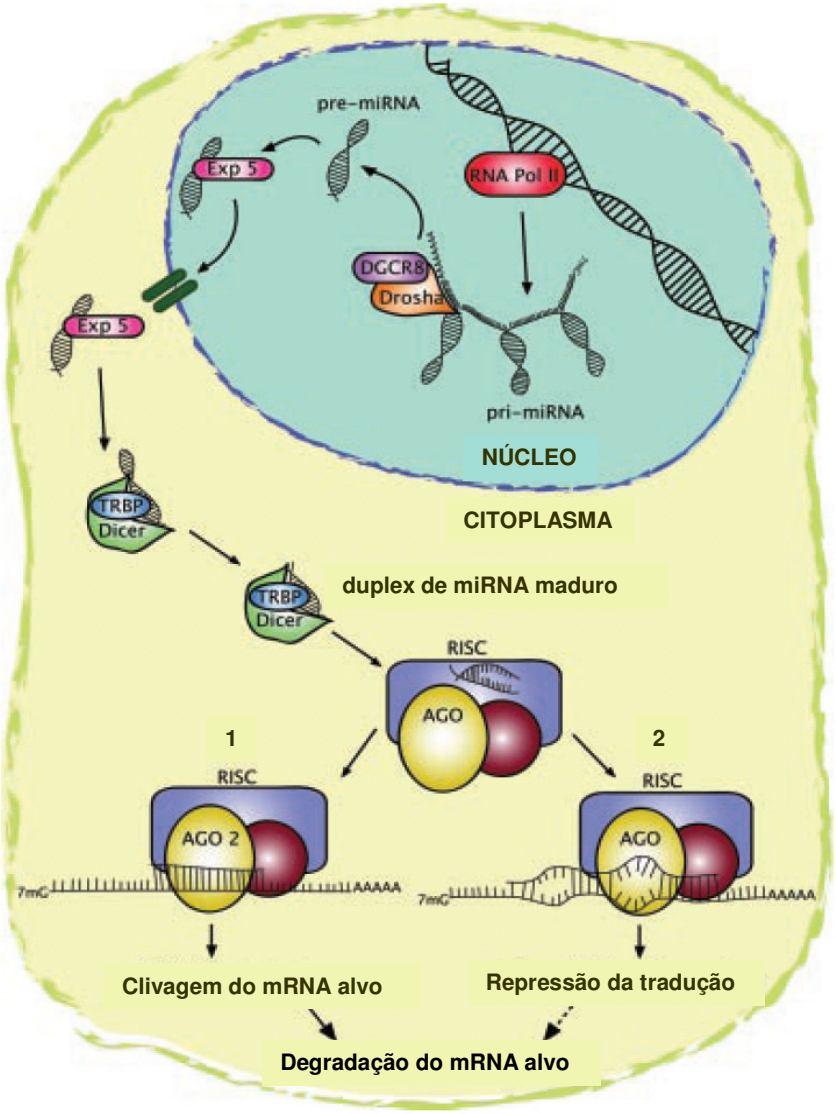


Figura 1. Biogênese do microRNA e suas vias regulatórias. (1) degradação e (2) repressão da tradução do RNAm alvo. Modificado de (Olena e Patton, 2010).

Cada fita desses microRNAs dúplex possui um monofosfato 5', um grupo hidroxila 3' e dois nucleotídeos salientes na extremidade 3'. Do dúplex, apenas uma fita será ativa e fará parte do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) maduro e a outra será degradada. A seleção da fita ativa depende da estrutura do dúplex, dos nucleotídeos na ponta 5' e da assimetria termodinâmica (revisto por (Kawamata e Tomari, 2010)). Inicialmente, o dúplex é incorporado a proteínas Ago (1-4) da subfamília Argonauta, em um processo dependente de ATP e mediado pelas chaperonas Hsc70 e Hsp90. Em seguida, ocorre o desenrolamento do dúplex sem utilização de ATP, facilitado pelos erros de pareamento da região da alça do microRNA (Kim, 2005); (Kwak, Iwasaki *et al.*, 2010) (Figura 2).

Regulação de expressão gênica por microRNAs

Os dois mecanismos pós-transcricionais pelos quais o RISC regula a expressão gênica compreendem degradação e repressão da tradução do mRNA alvo (Zhang, Dahlberg *et al.*, 2007), que são utilizados dependendo do grau de complementaridade entre as bases do miRNA e do mRNA (Sun e Tsao, 2008). Quando a complementaridade é completa ou quase completa, o mRNA é clivado (Cowland, Hother *et al.*, 2007) (Figura 2). Na espécie humana, a maioria dos mRNA é processada pela ligação com o miRNA por complementaridade imperfeita em regiões 3' não traduzidas, causando a repressão da tradução do mRNA, sem a degradação de sua fita (Zhang, Dahlberg *et al.*, 2007); (Engels e Hutvagner, 2006).

Apesar dos progressos recentes na área, os mecanismos de ação do complexo RISC provocam ainda muitos debates (Carthew e Sontheimer, 2009). Nos modelos propostos, a repressão da tradução pode ocorrer tanto durante o início desse processo como em etapas mais tardias. Quando no início da tradução, o RISC pode bloquear o recrutamento da subunidade ribossômica 60S ou a função cap 5', ou induzir a desadenilação, que afeta a circularização do RNA alvo e da qual participam várias proteínas. Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem: dissociação prematura dos ribossomos, diminuição da taxa de elongação e degradação do polipeptídeo nascente (Figura 3) (Nottrott, Simard *et al.*, 2006); (Kwak, Iwasaki *et al.*, 2010). O complexo RISC pode, ainda, induzir o recrutamento dos mRNA aos corpos de processamento no citoplasma, onde é degradado e/ou estocado em estado inativo.

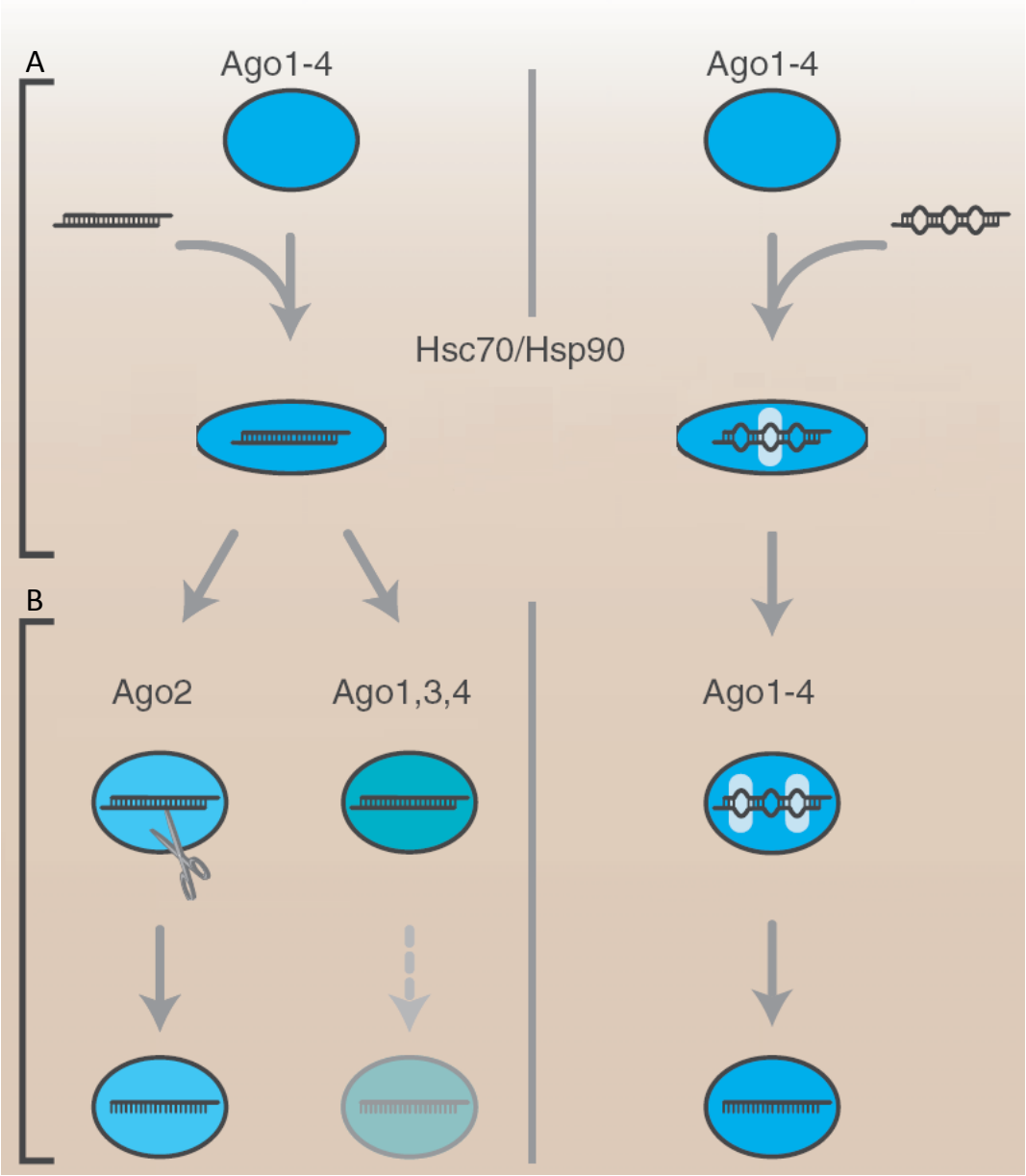


Figura 2. Formação do complexo RISC maduro: (a) incorporação do miRNA duplex às proteínas Ago 1-4 e (b) desenrolamento do dúplex e descarte de uma das fitas, na presença (à direita) ou na ausência (à esquerda) de erros de pareamento. Esse processo é facilitado pela maquinaria das chaperonas (Hsc70/Hsp90). O pareamento incorreto na região central e/ou na região 3' aumenta a eficiência das proteínas Ago na clivagem das fitas de microRNA. A proteína Ago2 pode clivar com eficiência a fita dupla que apresenta pareamento perfeito. Modificado de (Kwak, Iwasaki *et al.*)

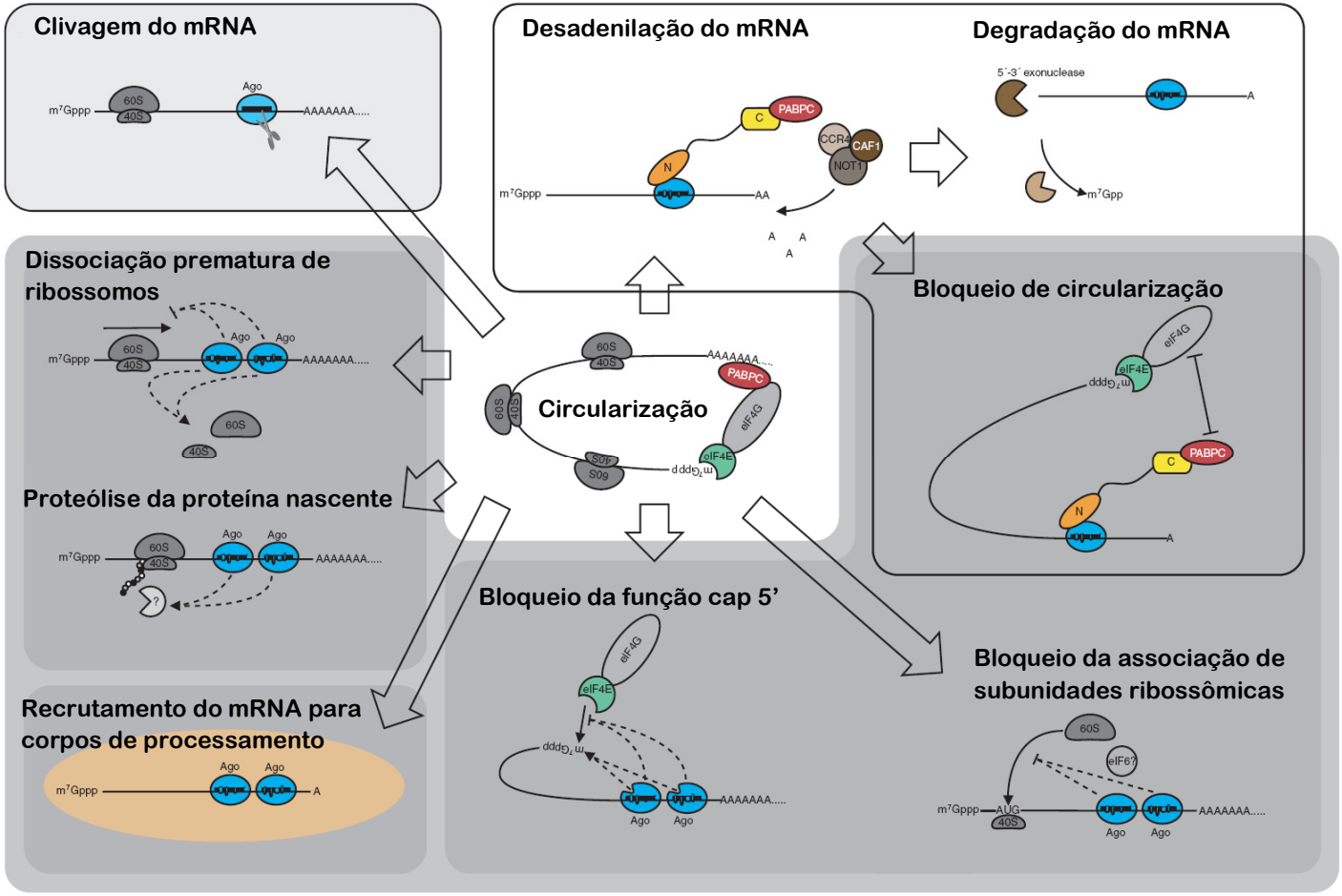


Figura 3. Mecanismos utilizados pelo RISC para regular a expressão gênica, incluindo clivagem, desadenilação e degradação do mRNA, recrutamento do mRNA para corpos de processamento, bloqueio de circularização e da função cap 5 e alteração da associação das subunidades ribossômicas ou proteólise da proteína nascente. Modificado de (Kwak, Iwasaki *et al.*)

A versão mais recente do banco de dados miIRBase (16) tem catalogado mais de 15.000 locos de microRNAs em cerca de 140 espécies, e acima de 17.000 sequências maduras distintas de microRNAs, que devem controlar a expressão de muitos genes que codificam proteínas (Kozomara, Griffiths-Jones, 2011). Por esse motivo, os miRNAs estão entre os genes regulatórios mais abundantes da espécie humana (Sassen, Miska *et al.*, 2008). Estima-se que tenham papel importante em diversas vias regulatórias, incluindo controle do desenvolvimento, diferenciação de células hematopoéticas, apoptose, proliferação celular e organogênese. Um único miRNA pode ligar-se e regular diferentes alvos ou, ao contrário, diferentes miRNAs podem ligar-se de forma cooperativa para controlar um mRNA alvo (Lewis, Shih *et al.*, 2003), o que resulta em uma complexa rede de regulação.

Os perfis de expressão de microRNAs variam entre diferentes tipos celulares. Alguns deles são expressos em somente um ou alguns tecidos, como o miR1b-2 e o miR-99b em cérebro (Liu, Calin *et al.*, 2004), outros exibem diferenças de níveis entre tecidos adultos e células embrionárias, como as famílias do miR-29 e miR-30 e o cluster policistrônico miR23-miR24-miR27, ou mostram regulação temporal, como no caso dos membros da família let-7 (Thomson, Parker *et al.*, 2004).

MicroRNAs e câncer

A literatura tem apresentado evidências do papel dos microRNAs em várias doenças humanas e processos fisiológicos normais e anormais. Entre eles, está o câncer, uma das doenças com maior impacto na saúde das populações e que se caracteriza por crescimento celular desorganizado e rápido, geralmente resultando na invasão de tecidos vizinhos e na disseminação de células neoplásicas para outros locais do organismo. Tais características são decorrentes de alterações genéticas e epigenéticas associadas com a inativação de genes supressores tumorais e com a ativação de proto-oncogenes.

O conjunto de miRNAs que atua no processo neoplásico também pode ser dividido em dois grupos, os oncomiRs e os anti-oncomiRs, que regulam negativamente os genes supressores de tumor e os oncogenes, respectivamente (Figuras 4 e 5), embora o mesmo miRNA possa apresentar as duas funções, dependendo do seu alvo e do tecido (Fabbri, Ivan *et al.*, 2007). O miR-let-7, por exemplo, é um anti-oncomiR que bloqueia a ação do oncogene *RAS* (Johnson, Grosshans *et al.*, 2005). Por outro lado, o cluster miR-17-92 mostra expressão elevada em vários tumores sólidos, o que sugere um papel oncogênico para seus membros. Entretanto, um dos miRNAs so cluster, o miR-17-5p parece atuar como supressor de tumor (para referências, (Garzon, Calin *et al.*, 2009). Além dos oncomiRs e dos anti-oncomiRs, alguns trabalhos referem os metastamiR, que

possuem efeitos pró- e anti-metastáticos e se superpõem, portanto, aos dois primeiros grupos (Hurst, Edmonds *et al*., 2009).

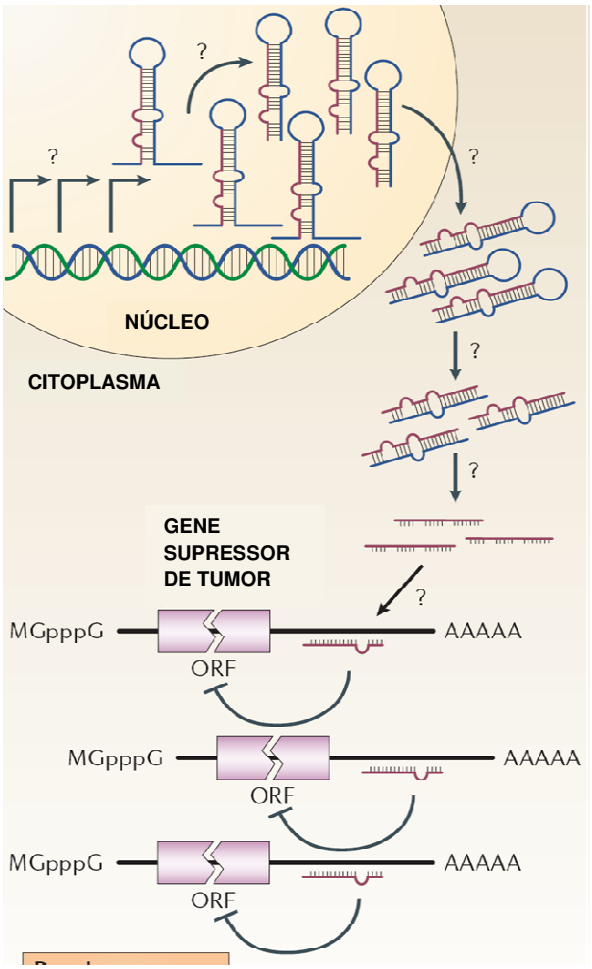


Figura 4. MicroRNA atuando como oncogene. Após mutação, ocorre aumento na expressão do microRNA, que atuará inibindo transcritos de supressores de tumor. Modificado de (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

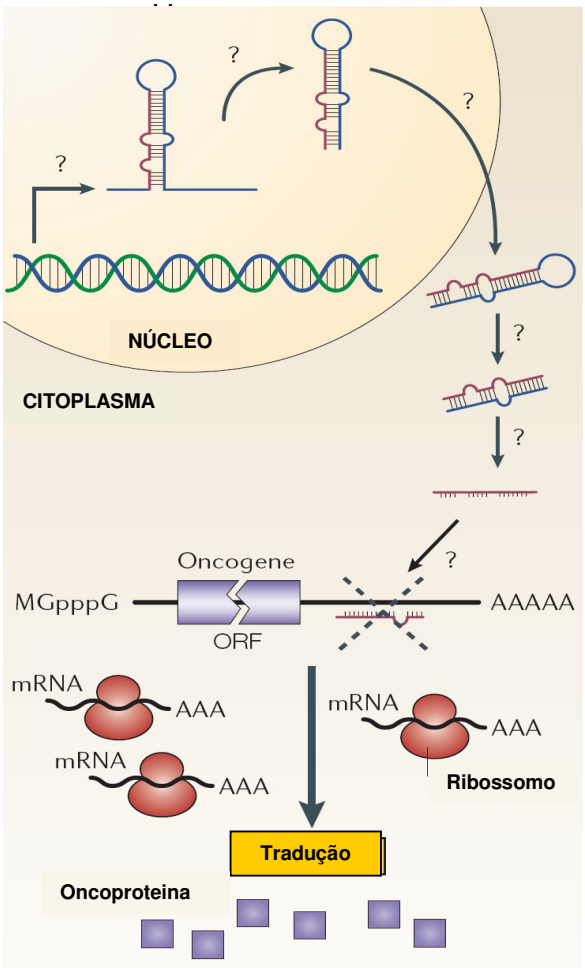


Figura 5. MicroRNA atuando como supressor de tumor. Apos mutação, ocorre diminuição da expressão do microRNA, que atua inibindo transcritos oncogênicos. Modificado de (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

Aproximadamente 50% dos miRNAs humanos estão localizados em sítios frágeis ou em regiões associadas ao câncer (Calin, Dumitru *et al.*, 2002); (Calin, Sevignani *et al.*, 2004). A análise de sua expressão tem revelado perfis característicos da célula normal e da célula neoplásica que facilitam a identificação e o monitoramento da doença (Calin e Croce, 2006). Existem evidências de que tais assinaturas podem ser utilizadas para classificação, determinação do estágio e da progressão do câncer, bem como para prognóstico e resposta a tratamento (Calin, Dumitru *et al.*, 2002); (Calin, Sevignani *et al.*, 2004). Por exemplo, a expressão reduzida do miR-let-7 já foi associada com a diminuição da sobrevida de pacientes com câncer de pulmão (Takamizawa, Konishi *et al.*, 2004), enquanto níveis elevados de miR-21, um potente oncomiR, já foram referidos em pacientes com adenocarcinoma de cólon apresentando sobrevida reduzida e resposta terapêutica pobre (Schetter, Leung *et al.*, 2008).

A primeira descrição do envolvimento dos miRNAs na tumorigênese foi a identificação de sequências que codificam o miR-15 e o miR-16 na região cromossômica 13q14, que está deletada em mais da metade dos casos de leucemia linfocítica crônica (Calin, Dumitru *et al.*, 2002). A partir desse relato, a expressão alterada de miRNAs foi observada em muitos outros tumores, como câncer de mama (Iorio, Ferracin *et al.*, 2005), colorretal (Akao, Nakagawa *et al.*, 2006) e linfomas (Eis, Tam *et al.*, 2005).

Alterações de microRNAs em câncer

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos miRNAs em câncer são similares aos que afetam a expressão dos genes que codificam proteínas, incluindo modificações epigenéticas ou mutações nas sequências de DNA, como deleções, substituições, inserções, translocações e amplificações (Cowland, Hother *et al.*, 2007).

a) Aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas podem alterar a ação do miRNA mudando sua expressão no tipo celular ou no tempo. Por exemplo, a translocação envolvendo o cluster miR-17-92 resulta em níveis elevados de miR-19a, um oncomiR que protege linfócitos de apoptose. A ocorrência desse evento em presença de um outro rearranjo que ativa o gene *Notch1* promove a leucemia linfoblástica aguda (Mavrakis, Wolfe *et al.*, 2010).

b) Alteração da expressão

A elevação de expressão de microRNAs por outras causas também já foi referida na literatura. Zhu et al. (Zhu, Yu *et al.*, 2010) mostraram que os níveis de miR-21 estão elevados em fígado de animais expostos à radiação ionizante, o que pode ter um papel na tumorigênese hepática. O trabalho de Wagner-Ecker M et al. (Wagner-Ecker, Schwager *et al.*, 2010) também revelou que o aumento ou a diminuição de expressão de

vários miRs (entre eles o miR-21), após irradiação ionizante de células endoteliais, afetam o crescimento celular e a formação de clones em ensaios funcionais e modulam a radiossensibilidade dessas células em tratamentos subseqüentes.

c) Mutações de ponto

As mutações de ponto nos sítios de ligação podem comprometer a capacidade de silenciamento do miRNA. É o caso da mutação G para A na extremidade 3' do pri-miRNA de miR-let-7e, um membro da grande família de anti-oncomiR let-7, que leva a uma redução significativa na expressão desse miRNA *in vivo*, provavelmente contribuindo para a tumorigênese (Calin, Ferracin *et al*., 2005). Tais mutações podem ter conseqüências drásticas, incluindo alterações na biogênese dos miRNAs e na repressão de um amplo espectro de genes. Por exemplo, utilizando um pré-miR-155 mutante com um erro de pareamento na extremidade 3', Lee e colaboradores (Lee *et al.,* 2010) observaram um desvio na seleção da fita do dúplex na formação do complexo RISC, resultando em um efeito *butterfly* na expressão gênica global.

d) Polimorfismos

Recentemente, Nicoloso e colaboradores (Nicoloso, Sun *et al*., 2010) observaram que polimorfismos do tipo SNPs presentes em sítios alvos de microRNAs podem contribuir para a susceptibilidade a câncer de mama. Variantes dos sítios complementares a miR-let-7 na extremidade 3' do gene *KRAS* estão igualmente associadas a risco para carcinoma de pulmão em fumantes moderados e, *in vitro*, resultam na expressão elevada desse alvo (Chin, Ratner *et al*., 2008). SNPs nos genes dos miRNAs, especialmente aqueles na região "*seed*", não são comuns, provavelmente por causa da pressão seletiva sobre eles, embora vários exemplos já tenham sido documentados (revisto por (Ryan, Robles *et al*., 2010)

e) Alterações epigenéticas

As alterações epigenéticas, tais como metilação do DNA e modificação de histonas, também afetam a expressão dos miRNAs. Vários estudos já mostraram a rápida alteração de seus níveis em resposta a tratamento de linhagens celulares com inibidores de desacetilase de histonas e de drogas desmetilantes, embora esse efeito pareça ocorrer de forma tumor- e tecido-específica (Scott, Overby *et al*., 2007) (Saito, Liang *et al*., 2006).

f) Alterações na maquinaria da biogênese de microRNAs

Além dos mecanismos citados acima envolvendo os genes reguladores e os genes alvo, as alterações quantitativas e qualitativas dos componentes protéicos da maquinaria de biogênese dos miRNAs podem desestabilizar as vias de regulação envolvidas. Por exemplo, a proteína supressora de tumor p53 exerce uma função crítica no ciclo celular e na apoptose e está inibida na maioria dos tumores. Essa proteína

interage com as helicases p68 e p72, que mostram associação com o complexo Drosha/DGCR8, facilitando a conversão de pri- a pré-miRNAs (Bates, Nicol *et al.*, 2005). Na presença de p53 mutante, essa associação é afetada, o que deve interferir na composição do pool de miRNAs maduros (Suzuki, Yamagata *et al.*, 2009). De forma similar, as proteínas R-SMADs interagem com a p68 e aumentam a conversão de pri- a pré-miRNAs (Davis, Hilyard *et al.*, 2008), entre eles o miR-21 (Krichevsky e Gabriely, 2009).

Em relação a etapas tardias da biogênese dos miRNAs, pode ser citada a alteração de fosforilação da TRBP, que atua com a Dicer no processamento de pré-miRNAs. Essa proteína é fosforilada por quinases de serina e treonina pertencentes à via de quinases ativadas por mitógeno e de quinases reguladas por sinais extracelulares (MAPK/Erk), uma cascata de sinalização indutora de mitose. A ativação da via MAPK/Erk, que é freqüente em câncer, e a conseqüente fosforilação de TRBP aumentam o processamento de pré-miRNAs e a expressão elevada de miRNAs pró-proliferação. Por outro lado, os anti-oncomiRs da família let-7 são inibidos (Paroo, Ye *et al.*, 2009) e seus alvos, como o produto dos oncogenes *RAS*, são liberados (Johnson, Grosshans *et al.*, 2005)

Características das células malignas

Independentemente dos mecanismos de alteração dos miRNAs, seus efeitos em câncer atingem as seis características das células malignas: independência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais para inibição de crescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

A divisão celular normal é regulada positiva e negativamente por sinais desencadeados por componentes da matriz extra-celular, por interação célula-célula e pela ligação de fatores de crescimento e citocinas com receptores de membrana. Alguns desses receptores mostram ativação constitutiva em vários tumores, como os receptores do fator de crescimento epidérmico (ERBB1-4), o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR), conferindo à célula independência dos sinais para proliferação. Esses receptores são alvo de vários miRNAs, como o miR-205 que inibe ERBB3 (HER3). O inverso também é verdadeiro: o receptor ERBB2 pode regular a expressão de miR-21 pela via MAPK/Erk (revisto por (Santarpia, Nicoloso *et al.*, 2010)).

A entrada no estado de quiescência ou em processos de diferenciação depende de sinais inibitórios de crescimento, também recebidos por receptores de membrana. A maioria dos sinais antiproliferativos é controlada pela proteína pRb e suas subunidades,

que seqüestram os fatores de transcrição E2F reprimindo a progressão do ciclo celular (Iaquinta e Lees, 2007). Desse processo inibitório participam vários miRNAs que são regulados ou regulam E2F e outras proteínas como MYC, TGFβ, ciclina D1, inibidores de quinases dependentes de ciclinas e p53 (revisto por (Santarpia, Nicoloso *et al.*, 2010).

A resistência à apoptose é outra característica de todos os tipos de câncer. A maquinaria de apoptose compreende duas famílias de componentes, os receptores de membrana que se ligam a fatores de morte ou de sobrevida, e os efetores de sinais apoptóticos (caspases). As vias pró- ou anti-apoptóticas, como de p53 e de STAT2, regulam microRNAs, entre eles o miR-21, ou são reguladas por eles (Raver-Shapira, Marciano *et al.*, 2007); (Loffler, Brocke-Heidrich *et al.*, 2007). O resultado é o aumento de atividades anti-apoptóticas e, consequentemente, de efeitos que favorecem o processo neoplásico.

Mesmo a célula sendo capaz de proliferar de forma independente dos fatores de crescimento, não se diferenciar e escapar da apoptose, ela não originará um tumor exceto se quebrar o limite de seu potencial de replicação, ou seja ultrapassar o número finito de divisões celulares característicos da célula normal. Alguns miRNAs alteram esse programa de senescência regulando direta ou indiretamente a telomerase, uma polimerase ribonucleoprotéica que impede a erosão dos telômeros. Entre eles, está o miR-138, que reprime a tradução do componente enzimático da telomerase, a TERT (Mitomo, Maesawa *et al.*, 2008).

Para superar a hipóxia, uma característica chave do microambiente tumoral desencadeada pela proliferação elevada, e para invadir novos locais do organismo, a célula neoplásica precisa induzir a formação de novos vasos, se destacar do sítio primário, entrar na corrente sanguínea ou linfática e sobreviver em outros tecidos, com características muitas vezes bastante distintas daquelas nas quais está adaptada. Vários trabalhos têm referido a indução de miRNAs em resposta a concentrações baixas de oxigênio, os quais podem atuar reduzindo os sinais pró-apoptóticos (Kulshreshtha, Ferracin *et al.*, 2007) ou estimulando fatores angiogênicos como VEGF e VEGFR (Mertens-Talcott, Chintharlapalli *et al.*, 2007).

Os dados da literatura também têm revelado assinaturas de miRNAs em metástases (os metastamiRs) e observado que a maioria de seus alvos são proteínas envolvidas em motilidade, adesão celular e em interação com matriz extracelular. O miR-10b, por exemplo, pode ser induzido pelo fator de transcrição metastático Twist e levar à inibição dos transcritos do gene homeobox D10. Como resultado, ocorre aumento de expressão de RhoC, uma proteína envolvida em migração celular (Ma, Teruya-Feldstein *et al.*, 2007). Efeito similar é desencadeado pelo miR-21, cujos alvos incluem a tropomiosina 1 e o produto dos genes supressores de tumor *PDCD4* e *PTEN*. A inibição

de *PTEN* favorece a via de sinalização Akt e a modulação de fosforilação da quinase FAK, encontrada em adesões focais entre células, e da expressão de metaloproteases (Meng, Henson *et al.*, 2007).

Vários miRNAs também têm sido associados com a transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo de desdiferenciação que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e a tumorigênese e resulta em um fenótipo com características invasivas (Polyak e Weinberg, 2009). É o caso dos membros da família miR-200 e do miR-205, que são capazes de regular a expressão de fatores de transcrição relacionados com invasão e metástase e estão significativamente reprimidos durante a EMT (Gregory, Bert *et al.*, 2008).

Os dados discutidos acima mostram que os miRNAs são participantes ativos do processo neoplásico. Por esse motivo, compreendem um material importante para desenvolvimento de testes diagnósticos e prognósticos. Recentemente, sua expressão tem sido avaliada em plasma e soro, que fornecem grandes vantagens em relação a tecidos de material cirúrgico ou biópsia. Os miRNAs também poderão se tornar excelentes drogas terapêuticas e alvos de agentes anti-câncer. Para isso, alguns desafios precisarão ser vencidos, como o desenvolvimento de animais modelo, a avaliação detalhada da farmacocinética e da farmacodinâmica dessas moléculas e a análise de seu papel como marcador de predição de eventos mórbidos.

Câncer de cabeça e pescoço

Dado o potencial dos microRNAs para utilização no tratamento do câncer, é importante sua análise em diferentes tipos de tumores, especialmente os mais freqüentes na população. No Brasil, destaca-se o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), cujas estimativas para 2010 são de mais de 14 mil casos novos, considerando apenas os tumores de cavidade oral (Ministério da Saúde, 2009). Mundialmente, este é o sexto tipo de câncer mais comum (Parkin, Bray *et al.*, 2005), com mais de 500.000 casos novos e cerca de 300.000 óbitos por ano (Globocan, 2002; http://www-dep.iarc.fr/).

Sob a denominação de câncer de cabeça e pescoço incluem-se as neoplasias que atingem a cavidade oral, a laringe e a faringe, sendo a exposição crônica ao tabaco seu principal fator de risco. Esses tumores podem apresentar diferentes comportamentos clínicos e respostas a tratamento. Os estudos epidemiológicos têm estimado uma taxa de sobrevida de 75% após 5 anos, nos casos em que a doença é diagnosticada precocemente. Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta metástases linfonodais no momento do diagnóstico, o que reduz a taxa de sobrevida para 35% (Chin, Boyle *et al.*, 2005). O desenvolvimento de um tumor primário de cabeça e pescoço prevê um risco maior de outros tumores no mesmo sítio e em outros locais do trato aerodigestivo

superior, como pulmão e esôfago, uma situação provavelmente relacionada com a exposição crônica de toda a mucosa a insultos carcinogênicos e explicada por (Slaughter, Southwick *et al.*, 1953), como cancerização de campo.

Apesar do consumo de cigarro ser, por si só, o fator de risco mais importante estabelecido para o desenvolvimento de CECP, também existem relatos de que o consumo de álcool contribua para o aumento de risco, especialmente em indivíduos com forte hábito tabagista. Vários estudos mostraram que o risco de desenvolver CECP aumenta de acordo com a quantidade de tabaco e álcool consumida, sendo que os efeitos deste consumo agem de maneira sinergística (Lewin, Norell *et al.*, 1998).

Outros possíveis fatores de risco compreendem má higiene bucal (Guha, Boffetta *et al.*, 2007), dieta pobre em frutas e vegetais (Freedman, Leitzmann *et al.*, 2008) e história familial (Negri, Boffetta *et al.*, 2009). Os dados da literatura também indicam o envolvimento do papilomavírus humano (HPV) na etiologia dos tumores de cabeça e pescoço, em especial os de orofaringe (IARC, 2007), e dos polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam tabaco e álcool (Hashibe, Boffetta *et al.*, 2006).

Atualmente, as variáveis clinicopatológicas utilizadas para avaliar o prognóstico de pacientes com CECP incluem o tamanho do tumor ao diagnóstico, a presença de metástases em linfonodos e o grau de diferenciação, o que é freqüentemente insuficiente para realizar tal predição (Martone, Gillio-Tos *et al.*, 2007). Apesar da importância dessas variáveis no delineamento de estratégias para tratamento do paciente, a análise molecular tem se mostrado uma nova ferramenta nesse processo, com potencial para identificar alterações tumor-específicas ou indicativas do comportamento da lesão e mesmo alvos terapêuticos.

Vários miRNAs, com expressão alterada em diferentes tumores, também mostraram níveis elevados ou reduzidos em linhagens celulares derivadas de carcinomas de laringe, faringe e cavidade oral, embora esse resultado talvez não seja o mesmo no tumor original (Tabela 1). Além dessa limitação, os resultados em linhagens sofrem da influência de variáveis de cultivo e geralmente não são comparados com os de uma linhagem normal de referência, o que dificulta muito uma conclusão definitiva sobre seu papel na célula neoplásica.

Como pode ser observado na Tabela 1, alguns microRNAs, incluindo os miRs 21, 31, 133, 155 e 200, mostram-se diferencialmente expressos em linhagens celulares ou em amostras de tecido tumoral, linfonodo, saliva e plasma. A redução de níveis por metilação do promotor também já foi citada (Kozaki, Imoto *et al.*, 2008); (Langevin, Stone *et al.*, 2010), bem como a associação da expressão com consumo de álcool (Avissar, Mcclean *et al.*, 2009), progressão de lesões pré-malignas (Cervigne, Reis *et al.*, 2009), migração/invasão (Liu, Yu *et al.*, 2009); (Jiang, Liu *et al.*, 2010) e prognóstico (Chang, Liu

et al., 2008); (Avissar, Mcclean *et al.*, 2009). Os polimorfismos em pré-miRs e em genes relacionados ou em seus alvos têm sido relacionados com sobrevida reduzida e risco de lesão pré-maligna ou de carcinoma (Christensen, Moyer *et al.*, 2009); (Clague, Lippman *et al.*, 2010); (Liu, Li *et al.*, 2010).

Assim como para outros tumores, os padrões de expressão de miRNAs em carcinomas de cabeça e pescoço poderão mostrar-se marcadores úteis para diagnóstico, prognóstico e terapia ou prevenção. Como esse grupo de neoplasias desenvolve-se em vários sub-sítios anatômicos e está relacionado com diferentes fatores etiológicos e desfechos clínicos, é importante que os estudos considerem essa variabilidade de modo a permitir a obtenção de dados sítio-específicos e, assim, contribuam para o desenvolvimento de novas abordagens no manejo dos pacientes. Tais estudos também devem buscar e identificar genes alvos e suas vias metabólicas, embora esta seja uma tarefa bastante complexa pois um único microRNA pode ter centenas de genes alvo.

Tabela 1. Alterações de microRNAs em neoplasias de cabeça e pescoço referidas pela literatura.

Estudo	Alteração
(Hebert, Norris *et al*., 2007) Perfil de cerca de 260 miRNAs 3 linhagens celulares sob hipóxia	**Induzidos por hypóxia**: miR-572, miR-214, miR-563, miR-637, miR-98, miR-628, miR-191, miR-210, miR-31, miR-498, miR-373, miR-19a, miR-148a, miR-15a, miR-200a, miR-7, miR-30b, let-7e, let-7g, let-7i
	Inibidos por hipóxia: miR-122a, miR-565, miR-195, miR-30e-5p, miR-374, miR-19a, miR-101, miR-424, miR-186, miR-29b, miR-148b, miR-141, miR-22, miR-331, miR-422b, miR-197
(Tran, Mclean *et al*., 2007) Perfil de 261 miRNAs 9 linhagens celulares	**Expressão elevada**: miR-21, miR-23a, let-7f, miR-205, miR-31, let-7d, miR-221, let-7a, miR-320, miR-23b, miR-24, let-7c, miR-29b, miR-30b, miR-15a, miR-22, miR-107, miR-200b, miR-18, miR-16, miR-15b, miR-200a, miR-27a, let-7b, miR-28, hcv-miR-US33-1, miR-100, miR-98, miR-103, miR-125b, miR-361, miR-19a
	Expressão reduzida: has-miR-345, miR-449, miR-302b, miR-382, miR-373, miR-378, miR-200c, miR-340, miR-302c, miR-154, miR-371, miR-127, miR-133a, miR-302d, miR-328, miR-212, miR-375, miR-373*, hcv-miR-US25-2-5p, miR-133b, miR-346, miR-342
(Chang, Liu *et al*., 2008) 9 amostras de lesão pré-maligna 36 amostras tumor/margem	**Expressão elevada**: miR-211
(Chang, Jiang *et al*., 2008) Perfil de 314 miRNAs 4 pares tumor/margem 4 linhagens celulares CECP 1linhagem de queratinócitos normais	**Expressão elevada**: miR-21, let-7, miR-18, miR-29c, miR-142-3p, miR-155, miR-146b
	Expressão reduzida: miR-494
(Kozaki, Imoto *et al*., 2008) Perfil de 148 miRNAs 18 linhagens celulares CECP 1linhagem de queratinócitos normais	**Expressão elevada**: miR-374, miR-340, miR-224, miR-10a, miR-140, miR-181a*, miR-146a, miR-126, miR-31, miR-9
	Expressão reduzida: miR-27a, miR-34b, miR-34c, miR-203, miR-302c*, miR-23a, miR-27b, miR-34a, miR-215, miR-299, miR-330, miR-337, miR-107, miR-133b, miR-138, miR-139, miR-223, miR-204, miR-370, let-7d, miR-95, miR-302a, miR-367, let-7g, miR-23b, miR-128a, miR-148a, miR-155, miR-200c, miR-302b, miR-368, miR-122a, miR-371, let-7a, miR-26b, miR-30e-5p, miR-96, miR-125a, miR-132, miR-200b, miR-199b, miR-296, miR-373*, miR-137, miR-197, miR-193a, let-7e, miR-30d, miR-331, miR-342, miR-338, miR-199a, miR-372, miR-184
(Wong, Liu, Chung-Wai Ho *et al*., 2008) Perfil de 156 miRNAs 3 linhagens celulares CECP 20 amostras tumor/margem 30 amostras de plasma de CECP 38 amostras de plasma controle	**Expressão elevada**: miR-184, miR-34c, miR-137, miR-372, miR-124a, miR-21**,** miR-124b, miR-31, miR-128a, miR-34b, miR-154, miR-197, miR-132, miR-147, miR-325, miR-181c, 198, miR-155, miR-30a-3p, miR-338, miR-17-5p, miR-104, miR-134, miR-213
	Expressão reduzida: miR-133a, miR-99a, miR-194, miR-133b, miR-219, miR-100, miR-125b, miR-26b**,** miR-138, miR-149, miR-195, miR-107**,** miR-139

(Wong, Liu, Wong *et al.*, 2008) Perfil de 156 miRNAs 3 linhagens celulares CECP 13 amostras tumor/margem	**Expressão reduzida**: miR-133a, miR-133b
(Avissar, Mcclean *et al.,* 2009) 169 amostras de tumor/margem	**Expressão elevada**: miR-21, miR-375
(Cervigne, Reis *et al.*, 2009) Perfil de 365 miRs 29 amostras de leucoplaquia 46 amostras de displasia 60- amostras de CECP	**Expressão elevada**: miR-21, miR-181b, miR-345
(Childs, Fazzari *et al.*, 2009) 104 amostras de CECP	**Expressão elevada**: miR-21
	Expressão reduzida: miR-1, miR-133a, miR-205, and let-7d
(Henson, Bhattacharjee *et al.*, 2009) 10 linhagens celulares de CECP 5 amostras de queratinócitos normais 9 amostras de tumor	**Expressão reduzida**: miR-125b, miR-100
(Li, Huang *et al.*, 2009) 10 amostras tumor/margem 103 amostras de tumor/margem	**Expressão elevada**: miR-21
(Liu, Yu *et al.*, 2009) Perfil de cerca de 900 miRNAs 2 linhagens celulares pareadas	**Expressão elevada**: miR-205 na linhagem celular mais agressiva
	Expressão reduzida: miR-138, miR-155, miR-221, miR-222 na linhagem celular mais agressiva
(Long, Sun *et al.*, 2009) 1 linhagem celular de CECP 48 amostras de CECP	**Expressão reduzida**: let-7a

(Park, Zhou *et al*., 2009) Perfil de 314 miRs 62 amostras de saliva controle 50 amostras de saliva de CECP	**Expressão reduzida**: miR-125a, miR-200a
(Hui, Lenarduzzi *et al*., 2010) Perfil global de microRNAs 3 linhagens celulares de CECP 51 amostras arquivadas de CECP	**Expressão elevada**: miR-21, miR-155, let-7i, miR-142-3p, miR- 423, miR-106b, miR-20a, miR-16 **Expressão reduzida**: miR-125b, miR-375, miR-10a
(Liu, Kao *et al*., 2010) 43 amostras de plasma de CECP 21 amostras controle 9 amostras de saliva de CECP	**Expressão elevada**: miR-31
(Liu, Wang *et al*., 2010) 6 amostras de tumor/margem 9 linhagens celulares de CECP 1 linhagem de queratinócitos normais	**Expressão elevada**: miR-24
(Lo, Yu *et al*., 2010) Culturas primárias de amostras de 5 pacientes 6 linhagens celulares de CECP 21 amostras de linfonodos 20 amostras de tumor/margem	**Expressão reduzida**: miR-200c
(Reis, Tomenson *et al*., 2010) 50 tumores e 25 tecidos normais	**Expressão elevada**: miR-24
(Ren, Zhu *et al*., 2010) 39 amostras de CECP	**Expressão elevada**: miR-21

OBJETIVOS

Considerando a importância dos microRNAs na regulação da expressão gênica e no processo neoplásico, é proposto o presente trabalho cujo objetivo geral é investigar microRNAs que atuam na tumorigênese de cabeça e pescoço. Os objetivos específicos compreendem:

- Investigar, *in silico*, miRNAs que regulam produtos gênicos com expressão alterada em carcinomas epidermóides de laringe e cavidade oral, descritas em trabalhos prévios do grupo. Selecionar entre esses miRNAs aqueles referidos pela literatura como tendo expressão alterada em células neoplásicas procedentes de tumores de cabeça e pescoço e em outros tumores do trato aerodigestivo superior.
- Analisar, por PCR quantitativa, o padrão de expressão dos microRNAs de interesse em linhagens celulares procedentes de tumores de cabeça e pescoço e de queratinócitos normais, e em amostras de pacientes com tumores de cabeça e pescoço apresentando características agressivas ou menos agressivas.
- Correlacionar os dados de expressão gênica dos miRNAs com os dados clínicos dos pacientes.
- Analisar, por PCR quantitativa, o padrão de expressão de alvos candidatos dos microRNAs de interesse em amostras de tumores de cabeça e pescoço.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Amostras de Tumores

Foram analisados 34 pares de tumor-margem cirúrgica derivados de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Essas amostras foram procedentes de três sub-sítios anatômicos - língua, soalho de boca e laringe - classificadas em C02, C04 e C32, respectivamente, de acordo com o Código Internacional de Doenças / CID-10. Os casos foram reunidos em dois grupos: aqueles com presença (N+) ou ausência (N0) de metástases em linfonodos regionais, segundo o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) da *Union Internationale Contre le Cancer* – UICC (http://www.uicc.org/). A classificação TNM dos tumores malignos é um sistema de estadiamento anatômico em que cada letra faz referência respectivamente a extensão do tumor primário, a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais e a presença ou ausência se metástases distantes.

O total de casos incluiu 4 pares de carcinoma de língua N0, 10 pares de carcinoma de soalho de boca, sendo 4 sem e 6 com metástases linfonodais e 20 pares de carcinoma de laringe (10 N0 e 10 N+). Na Tabela 2, estão apresentados os dados sobre idade, sexo, exposição ao fumo e ao álcool, sítio primário e outras características anatomopatológicas e clínicas.

As amostras foram obtidas após ressecção cirúrgica no Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, SP, no Hospital Heliópolis, SP, no Hospital das Clínicas, SP e em hospitais de São José dos Campos, SP, pela equipe do Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço (GENCAPO), um consórcio colaborativo com mais de 50 pesquisadores de nove instituições do Estado de São Paulo. O GENCAPO teve início no projeto temático FAPESP 04/12054-9 (“Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”), cujo objetivo foi desenvolver análises clínicas, genéticas e epidemiológicas de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

As amostras, imediatamente após sua ressecção cirúrgica, foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à macrodissecção por um médico patologista. Foram selecionadas para estudo as amostras com presença de pelo menos 70% de células neoplásicas no tecido tumoral e ausência dessas células nas margens cirúrgicas, após análise de seções coradas por azul de toluidina. Além desse critério, as amostras foram selecionadas em relação a fatores de risco e sub-sítios anatômicos homogêneos, e idade do paciente acima de 39 anos.

O projeto temático acima citado foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: parecer nº 1763/05 – processo 25000). Como novos objetivos foram

acrescentados, o presente estudo foi avaliado e recebeu aprovação como aditivo desse projeto temático.

Tabela 2. Características clinicopatológicas de 34 pacientes estudados, portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. R=recidiva; MD=metástase à distância.

Caso	Sexo	Idade	Fumo	Álcool	Sítio	TNM	Estádio	Diferenciação Histológica	Infiltração Vascular Sanguínea	Infiltração Linfática	Invasão Perineural	Infiltrado Inflamatorio Peri-tumoral	Recidiva Metástase 2º. Tumor	Óbito	Sobre-vida (anos)
CP1/0056	F	54	No passado	No passado	Laringe	T3N0M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não	Não	77
CP1/0057	M	57	Sim	No passado	Língua	T4N2BM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Outras Causas	2
CP1/0089	M	72	No passado	No passado	Soalho de Boca	T2N0M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não	Não	53
CP1/0228	M	40	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Não	Não	33
CP1/0255	M	50	No passado	Sim	Soalho de Boca	T2N0M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Não	57
CP1/0348	M	51	Sim	Sim	Laringe	T4N0M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Não	35
CP1/0357	M	76	Nunca	Nunca	Laringe	T4N0M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Não	36
CP1/0359	M	55	Sim	Sim	Laringe	T4N0M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	R	Não	26
CP1/0363	M	64	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Presente	Presente	Escasso	Não	Não	24
CP1/0366	M	49	No passado	Sim	Soalho de Boca	T4N0M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente		Não	Não	5
CP1/0370	M	55	Sim	Sim	Soalho de Boca	T4N0M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Não	15
CP1/0384	M	46	No passado	Sim	Soalho de Boca	T3N0M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não	Não	19
CP1/0385	M	39	Nunca	Nunca	Laringe	T4N0M0	IV	Bem Diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Escasso	Não	Não	26
CP2/0096	M	46	Sim	Sim	Laringe	T2N1M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Não	Não	76
CP2/0122	M	56	Sim	Sim	Soalho de Boca	T2N2BM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	MD	Pela Neoplasia	21
CP2/0168	F	70	No passado	Nunca	Soalho de Boca	T2N0M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	2º. Tumor	Outras Causas	31
CP2/1002	M	59	Sim	Sim	Língua	T2N2CM0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	R	Pela Neoplasia	10
CP3/0018	M	61	Sim	No passado	Laringe	T4N2BM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	MD	Pela Neoplasia	17
CP3/0019	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4N0M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não	Não	90
CP3/0031	M	54	Sim	Sim	Laringe	T4N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não	Pela Neoplasia	30
CP3/0050	F	44	Sim	No passado	Língua	T2N1M0	III	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	R	Pela Neoplasia	20
CP3/0096	M	54	Sim	Nunca	Laringe	T4N0M0	IV		Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não	Não	57
CP3/0102	M	49	Sim	Sim	Laringe	T2N1M0	III	Bem	Presente	Ausente	Ausente	Escasso	Não	Pela	54

								diferenciado						Neoplasia	
CP3/0105	M	67	No passado	Sim	Laringe	T4N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente	Moderado	Não	Pela Neoplasia	1
CP3/0118	M	45	Sim	Sim	Língua	T4N3M0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	R	Pela Neoplasia	13
CP3/0124	M	68	Sim	Sim	Laring	T4N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente		Escasso	R	Pela Neoplasia	18
CP3/0125	M	63	No passado	No passado	Laringe	T4N3M0	IV	Pouco diferenciado	Presente	Presente	Presente	Moderado	R	Não	9
CP3/0136	M	65	Sim	Sim	Laringe	T4N2BM0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Escasso	Não	Pela Neoplasia	9
CP3/0153	M	49	Sim	No passado	Laringe	T3N3M0	IV	Moderadamente	Presente	Presente	Presente	Moderado	2º. Tumor	Pela Neoplasia	35
CP3/0155	M	59	No passado	Sim	Laringe	T3N0M0	III	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Não	Não	64
CP3/0199	M	74	Sim	Nunca	Laringe	T4N0M0	IV	Bem diferenciado	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Não	Não	33
CP3/0249	M	61	Sim	Sim	Laringe	T2N0M0	II	Moderadamente	Ausente	Ausente	Ausente		Não	Não	64
CP3/0280	M	52	Sim	Sim	Soalho de Boca	T1N2BM0	IV	Moderadamente	Ausente	Ausente	Presente		2º. Tumor	Não	44
CP4/0001	M	52	No passado	No passado	Laringe	T3N2CM0	IV	Moderadamente	Ausente	Presente	Ausente	Moderado	R 2º. Tumor	Não	19

Linhagens celulares

No presente estudo, foram também analisadas as linhagens celulares Hep-2 (uma linhagem originalmente descrita como sendo de laringe), FaDu (procedente de carcinoma de orofaringe), UM-SCC-38 (procedente de carcinoma de tonsila pilar) e SCC9 (procedente de carcinoma de língua). As linhagens Hep-2 e FaDu foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Otávia Luisa Silva Damas de Caballero, Instituto Ludwig, NY. A linhagem UM-SCC-38 foi cedida pelo Prof. Dr. Thomas Carey da Universidade de Michigan e a linhagem SCC9 foi cedida pelo Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As características dessas linhagens e os dados dos pacientes das quais derivaram são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Características das linhagens utilizadas e dados de pacientes. M=masculino

Linhagem	Característica	Paciente	
		Idade	Sexo
Hep-2	Carcinoma epidermóide de laringe, com contaminação por células HeLa (ATCC: CCL23)	Não consta	Não consta
FaDu	Carcinoma epidermóide de células escamosas de faringe (ATCC: HTB-43)	56	M
SCC-9	Carcinoma epidermóide de língua (ATCC: CRL-1629)	25	M
UM-SCC-38	Carcinoma epidermóide de tonsila T2N2aM0, estágio IV, moderadamente diferenciado, sem terapia prévia	60	M

Controles

Como controles nas análises de expressão gênica, foram utilizados cDNAs de queratinócitos bucais humanos normais após cultura primária, cedidos pela Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

Para padronização do protocolo destinado à análise de expressão de miRNAs e para construção de curvas padrão nos ensaios de PCR em tempo real, também foram utilizados RNAs que fazem parte do banco de amostras do laboratório e que foram previamente extraídos de tecidos de pulmão, cérebro, pele, pâncreas e faringe obtidos de autópsia de indivíduos sem câncer. Os dois primeiros, segundo os dados da literatura, expressam os miRNAs de interesse.

MÉTODOS

Busca *in silico* de microRNAs e de seus alvos

Um dos sub-projetos do nosso grupo analisou bibliotecas SAGE derivadas de carcinomas e tecidos normais de laringe (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008). Os resultados mostraram produtos gênicos com expressão alterada tanto na comparação de tumor com margem cirúrgica como na comparação de carcinomas metastáticos e não metastáticos. Os microRNAs potencialmente reguladores de 240 genes que mostraram alteração de expressão mais consistentes nessa análise foram selecionados utilizando dados da literatura sobre microRNAs com expressão alterada em linhagens e tumores de cabeça e pescoço e do trato aerodigestivo.

Para busca de genes alvo, foram utilizados os algoritmos disponibilizados por TargetScan (http://www.targetscan.org/), Meta MiR:Target Inference (http://mami.med.harvard.edu/), microRNA.org / Miranda (http://www.microrna.org/microrna/home.do), miRbase-Targets (http://www.mirbase.org/), PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/).

Cultura de células

As quatro linhagens celulares (FaDu, Hep-2, UM-SCC-38 e SCC-9) foram cultivadas em três réplicas para posterior extração de RNA. Para o cultivo, uma alíquota de cada uma das linhagens celulares foi descongelada e colocada em garrafa de cultura de 75mL contendo meio de cultura MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) no caso de Hep-2 e FaDu, e meio *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) no caso de UM-SCC-38. Tanto o MEM como o DMEM foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), aminoácidos não essenciais 10mM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), fungizone 0,3µg/mL (Invitrogen), gentamicina 50µg/mL, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100µg/mL (Cultilab). Foi também adicionado piruvato de sódio 1mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ao meio MEM e L-glutamina 2mM (Gibco) ao meio DMEM.

No caso da linhagem SCC-9, foi utilizado o meio DMEM F12 (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino, vancomicina 50µg/mL (Acros Organics, NJ, EUA), hidrocortisona 0,4µg/mL (Sigma, São Paulo, SP, Brasil), gentamicina 50µg/mL e fungizone 0,3µg/mL (Cultilab).

As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2, sendo o meio de cultura substituído a cada três dias e o crescimento e a morfologia celular avaliados diariamente em microscópio invertido. Quando as células exibiram confluência de aproximadamente 70%, o material foi lavado com 10 mL de solução salina tamponada

com fosfato pH 7,4 (PBS) e tripsinizado com solução de tripsina/EDTA (Cultilab). Após alguns minutos, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino. Foi feita a contagem de células em câmara de Neubauer e um novo cultivo foi iniciado com 1 x 10^6 células/mL/frasco de 75cm^2. Após 24h, o meio foi substituído por meio sem soro, para indução de estado de quiescência celular. Após outro período de 24h, o meio foi substituído por meio completo, o que libera as células da fase G0. O material dos frascos foi tripsinizado depois de 24h, 48h ou 72h de cultura (réplicas 1 a 3, respectivamente).

Com base na análise realizada pelo programa Ingenuity sobre as vias metabólicas nas quais atuam os microRNAs de interesse, foi investigado o efeito de estrógeno sobre a expressão desses microRNAs. Para isso, células Hep-2 foram cultivadas por 12 e 72 horas em presença de B- estradiol, na concentração de 300ng/mL de meio de cultura.

Extração de RNA de Linhagens Celulares

Aproximadamente 1mL do meio de cultura com células de cada linhagem foi colocado em tubos com trizol (Gibco), que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. Em seguida, foram acrescentados 200µL de clorofórmio gelado por tubo e o material foi centrifugado a 14.000 g / 20min / 4°C. O sedimento com as células foi colocado em tubos com 400µL de isopropanol gelado e 2µL de glicogênio, e novamente centrifugado a 14.000 g / 20min / 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o sedimento recebeu 1 mL de etanol 75% gelado. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 7.500 g / 7min / 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido com 30µL de água Depc e armazenado a –80°C até sua utilização para síntese de cDNA.

Extração de RNA de Amostras de Tumores

Para extração de RNA das amostras de tumores, foi utilizado o protocolo de extração seqüencial, previamente padronizado no laboratório, que permite não apenas a extração de RNA, mas também de DNA e proteínas.

As amostras foram pulverizadas em cadinhos com nitrogênio líquido e, em seguida, receberam 3 mL de trizol. O material foi, então, distribuído em três tubos de 1,5mL e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 200µL de clorofórmio gelado por mL de amostra em trizol e o material foi homogeneizado por 30 segundos, mantido por 3 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, acondicionado em gelo. Os tubos foram centrifugados a 12.000g / 20 minutos / 4ºC para separação da fase aquosa (com RNA), da interfase branca e leitosa (com DNA)

e da fase orgânica (com proteína). A fase aquosa foi transferida para um tubo com 400µL de isopropanol gelado e 10µg de glicogênio e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000g / 15 minutos / 4ºC e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1mL de etanol 75% gelado, agitado para que se soltasse do tubo e centrifugado a 7.500g / 5 minutos / 4ºC. O material foi seco à temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em 20-50µL (dependendo do tamanho do sedimento) de água livre de nucleases. As amostras foram colocadas em banho seco a 500g por 10 minutos a 57ºC. Previamente ao armazenamento a -80ºC, a qualidade e a concentração do RNA foram avaliadas conforme descrito a seguir.

A fase orgânica e a interfase leitosa obtidas durante a extração do RNA foram submetidas posteriormente a protocolo para extração de DNA e proteínas, para utilização em outros projetos do grupo.

Avaliação da concentração e da qualidade do RNA

A concentração dos RNAs extraídos de linhagens celulares e de amostras de pulmão e cérebro obtidas de autópsia foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop (ND – 1000, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). O mesmo processo foi repetido para o RNA de queratinócitos normais.

Após a quantificação, a qualidade do RNA foi avaliada pela presença das duas bandas ribossômicas 18S e 28S em gel de agarose 1% com brometo de etídio.

Síntese de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real

Para síntese de cDNA e para análise da expressão de miRNAs maduros por PCR em tempo real, foi utilizado o kit *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo do kit requer transcrição reversa com um oligonucleotídeo específico em alça, seguida de PCR em tempo real com oligonucleotídeos sense e anti-sense e sonda TaqMan, também específicos para o miRNA de interesse e seus genes alvo. As sondas foram desenhadas pela própria empresa (Appied Biosystems) e marcadas com o fluoróforo FAM na extremidade 5'. Na extremidade 3', está ligada a molécula chamada *quencher* (supressor), que produz a transferência de energia ressonante fluorescente, reduzindo assim a fluorescência do repórter quando a sonda está intacta.

Durante a PCR em tempo real, a sonda hibridiza especificamente com uma seqüência do miRNA dupla fita, entre os sítios dos oligonucleotídeos sense e anti-sense (Figura 6). Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter ao *quencher* resulta na supressão da fluorescência do repórter. Com a elongação da fita durante a

PCR, a enzima DNA polimerase atinge o sítio da sonda e, por meio de sua atividade 5'-3' exonucleásica, cliva a sequência do *quencher*, o que resulta na elevação da fluorescência do repórter.

Os valores de emissão de fluorescência, captados pelo equipamento durante a amplificação do molde na reação de PCR, são diretamente proporcionais à quantidade de cDNA da amostra. Esses valores são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência versus o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos necessários para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significante. Esse ponto é definido como limiar ou C_t (c*ycle threshold*) e ocorre durante a fase exponencial de amplificação. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico

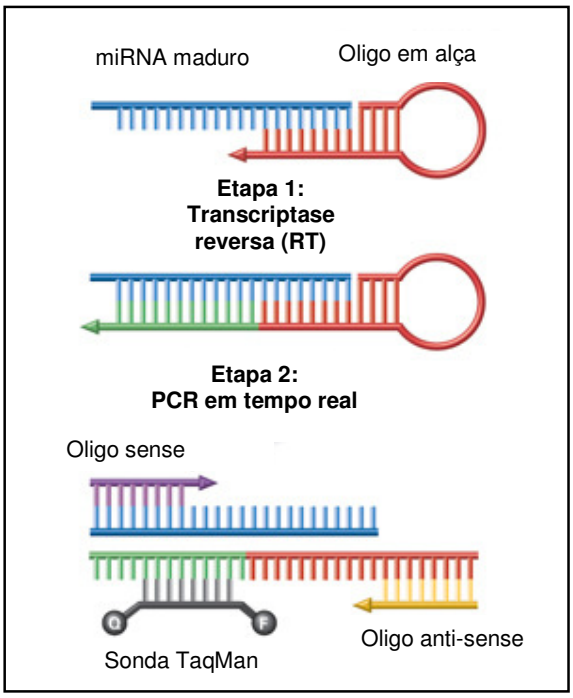


Figura 6. Ensaio TaqMan para microRNA (segundo Applied Biosystems). F – corante repórter (FAM); Q – *quencher* não fluorescente (NFQ).

Os RNAs procedentes de tumor, linhagens celulares e queratinócitos normais foram diluídos (1 a 10 ng) e empregados para síntese oligonucleotídeo-específica de cDNAs dos microRNAs interesse. No caso das linhagens celulares, foram utilizados

apenas os RNAs de culturas celulares de 48h, em função dos custos do ensaio. Os RNAs dos tempos de 24 e 72h foram arquivados.

As reações para confecção de cDNA foram realizadas no equipamento *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems), em volume final de 15µL [0,15µL de dNTPs 100mM, 1µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50U/µL), 1,5µL de 10X *Reverse Transcription Buffer*, 0,19µL de *RNase Inhibitor* (20U/µL) e 4,16µL de água *nuclease-free*], além de 3µL de oligonucleotídeo e 5µL da amostra de RNA. As condições da reação compreenderam as etapas de 30minutos a 16°C, 30minutos a 42°C e 5minutos a 85°C.

Na etapa de PCR em tempo real, foi desenvolvida uma curva padrão para avaliação da eficiência dos oligonucleotídeos sense e anti-sense complementares aos genes de interesse e aos genes que serviram como controles internos (*GAPDH, ACTB, HPRT1* e *BCR*). Para esses experimentos foram realizadas diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA (20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng, 1,25ng, 0,625 ng, 0,312ng) de células Hep-2 e FaDU e de amostras de pulmão, cérebro, pele, pâncreas e faringe, obtidas de autópsia. As reações para construção da curva padrão foram realizadas em triplicatas, em volume final de 10µL, contendo 5µL de Master Mix, 0,5µL de sonda (20X), 3,5µL de água Milli-Q e 1µL de amostra. As condições da reação compreenderam: 2min a 50°C, 10min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C.

A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, permitindo a obtenção do valor de *slope*. O *slope* corresponde à inclinação da reta quando é analisada a variação do Ct dos transcritos de interesse e do padrão interno em função do log de diferentes quantidades de cDNA. O cálculo da eficiência foi realizado segundo a fórmula: $E=10^{(-1/slope)}$. O valor 2 para E equivale a uma eficiência de 100%.

Após o cálculo de eficiência dos oligonucleotídeos, foi realizada a análise de expressão dos genes de interesse nas amostras de linhagens e tumores primários por PCR em tempo real em triplicatas com volume final de 10µL, contendo 5µL de Master Mix, 0,5µL de sonda (20X), 3,5µL de água Milli-Q e 1µL de amostra. As condições da reação compreenderam: 20s a 95°C, 40 ciclos de 3s a 95°C e 30s a 60°C.

Os valores C_t obtidos para os genes de interesse nas linhagens celulares foram normalizados por um fator de normalização calculado para cada amostra pelo programa geNorm (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/) com base na média geométrica dos dados obtidos para os padrões internos *GAPDH, ACTB, HPRT1* e *BCR*. O cDNA de queratinócitos bucais foi utilizado como calibrador para todas as linhagens.

Para as amostras de tumores primários, o programa geNorm calculou a estabilidade dos padrões internos *GAPDH, ACTB, HPRT1* e *BCR*, comparando os valores de sua expressão em amostras de margem cirúrgica (calibrador) com os valores dos

respectivos tumores. Para essa análise, as amostras de margens cirúrgicas foram combinadas em quatro pools específicos para os sítios anatômicos laringe e cavidade oral (língua e soalho de boca) e para os grupos N+ e N0. As amostras de tumores não foram combinadas em pools.

Não foi possível a obtenção de um fator de normalização para os tumores primários porque o programa geNorm, para cálculo de média geométrica, necessita de várias amostras para cada controle. Entretanto, o estudo faz a comparação do tecido tumoral com um único tecido controle do mesmo paciente, ou seja, a margem cirúrgica.

Para análise da expressão dos genes de interesse, foi calculado o ΔC_t a partir da diferença entre a média aritmética obtida para o transcrito de interesse nas triplicatas e a média calculada para o padrão interno.

O Δ-ΔC_t foi obtido utilizando-se a amostra de cDNA de queratinócitos normais como calibrador para as linhagens e as margens cirúrgicas para os tumores primários, e atribuindo o valor zero para o calibrador como resultado da diferença entre os valores de seu próprio ΔC_t. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 3 (Log_3).

Foi considerado aumento ou diminuição significativa da expressão de um microRNA quando o valor apresentado na forma de Log_3 esteve acima ou abaixo de um.

Análises estatísticas

Para avaliação da relação de expressão de microRNAs de interesse entre si e com dados clinicopatológicos, foram realizadas análises de associação por concatenação de variáveis e qui-quadrado de Pearson.

Para análise de correlação da expressão dos microRNAs com a de genes alvo candidatos, foi empregada a correlação não-paramétrica de Spearman, com intervalo de confiança de 95%, utilizando os programas GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

RESULTADOS

Busca *in silico* de RNAs reguladores e seus alvos

Considerando os microRNAs potencialmente reguladores de 240 genes que mostraram alteração de expressão mais consistentes na análise realizada por (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008) e os dados da literatura (Tran, Mclean *et al.*, 2007); (Feber, Xi *et al.*, 2008); (Guo, Chen *et al.*, 2008); (Volinia, Calin *et al.*, 2006), foram selecionados para estudo os miRs -21, 205, 342 e –let-7a.

Para escolha dos genes alvo, foram utilizados algoritmos disponíveis em bancos de dados públicos, cada um com algumas vantagens e desvantagens. O TargetScan, por exemplo, busca pareamentos filogeneticamente conservados entre microRNAs e a região 3'UTR e classifica a interação pelo número de sítios presentes em cada 3'UTR. Possui bom suporte estatístico e é disponível para vários organismos. Entretanto, não identifica alvos sem pareamento perfeito. A ferramenta MAMI (Meta MiR:Target Inference) utiliza as predições de cinco diferentes algoritmos (TargetScanS, miRanda, microT, miRtarget e picTar) e apresenta as concordâncias e discordâncias entre eles. Além disso, permite o ajuste de sensibilidade e especificidade mas está disponível apenas para microRNAs humanos. O algoritmo miRanda está baseado no alinhamento entre miRNAs e alvos candidatos e na energia de ligação entre eles, enquanto as predições do miRbase-Targets fornecem valores p para cada interação de acordo com os princípios de hibridação, mas não considera alvos sem pareamento perfeito. O algoritmo Microrna, ao contrário, detecta sítios sem pareamento perfeito. De forma similar ao miRanda, o PicTar avalia a energia de hibridação e permite também o cálculo da probabilidade de um transcrito ser regulado por dois ou mais microRNAs, embora exija pareamento perfeito (Lindow, 2011).

Utilizando a ferramenta MAMI e definindo sensibilidade e especificidade em 0.82 e 0.4, respectivamente, foi realizada uma busca de alvos candidatos dos microRNAs-21, 205, 342 e –let-7a entre os 240 genes identificados por (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008) com alteração de expressão em bibliotecas SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) de carcinomas de laringe. O resultado está apresentado na Tabela 7. A esses, foram acrescentados outros alvos selecionados pelo TargetScan, considerando sítios de interação conservados e pobremente conservados: *KIAA1467 PCBP2, ZFP36L2* (miR-21), *GBP6, HBB, HOPX, LYZ, RPS6KA3, SH3BGRL, TOLLIP* (miR-205), *GOSR1 LAMC2, OLFML2A, PTRF, RBM17, RPS6KA1, SPRR3, TAPBP* (miR-342), *COL1A1, CRCT1, SPON2, SULF2, TNFSF10* (let-7a).

Casuística

Além das linhagens celulares Hep-2, FaDu, UM-SCC-38 e SCC9, foram analisadas 68 amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e suas margens cirúrgicas, que incluíram 34 pares de tumor-margem cirúrgica derivados de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sendo 4 pares de carcinoma de língua N+, 10 de soalho de boca (6 N0 e 4 N+) e 20 pares de carcinoma de laringe (10 N0 e 10 N+). Dezoito casos, portanto, exibiram metástases linfonodais e 16 não apresentaram linfonodos comprometidos ao diagnóstico. Três pacientes eram do sexo feminino e 31 do sexo masculino, com idades variando de 39 a 76 anos (média = 56,2 anos); 32 referiram exposição ao tabaco (dez deles ex-fumantes) e 28 eram etilistas. Apenas dois pacientes negaram abuso de fumo ou álcool. A classe TNM mais representada no grupo foi a T4N0M0 (Tabela 4).

Extração e quantificação de RNA

O RNA obtido a partir de amostras de tumor e suas respectivas margens mostrou grande variabilidade na concentração (108,1ng/μL a 3575,7ng/μL), como pode ser observado na Tabela 5. A concentração média nas amostras de tumor foi de 1562,7ng/μL enquanto nas amostras de margem foi de 981,2ng/μL.

O RNA obtido de linhagens celulares, ao contrário, mostrou concentração elevada na maioria dos casos, com médias acima de 3200ng/μL, exceto para a linhagem UM-SCC-38 cuja concentração média ficou próxima de 1600 ng/μL (Tabela 6). A Figura 7 apresenta as fotografias de géis de agarose exibindo as bandas ribossômicas 18S e 28S após eletroforese dos RNAs de linhagens em gel de agarose.

Curvas-padrão

As curvas-padrão para os microRNAs de interesse foram realizadas utilizando diluições de cDNA da linhagem celular FaDU e de amostras de pele, faringe e pâncreas, respectivamente (Figura 8). Para os padrões internos *BCR, β-actina, GAPDH* e *HPRT1*, as curvas-padrão foram realizadas utilizando diluições de cDNA da linhagem celular Hep-2 (Figura 9). Para os genes *SPRR3*, *LYZ* e *MGLL* as curvas-padrão foram realizadas utilizando diluições de cDNA de amostras de laringe (Figura 10). Os valores de *slope* (coeficiente angular da reta) e da eficiência dos iniciadores, segundo a fórmula: $E=10^{(-1/slope)}$, estão apresentados na Tabela 8.

Foi verificada uma baixa variação dos valores de eficiência das sondas utilizadas. Todos os valores foram próximos de 100% (o valor 2 equivale a uma eficiência de 100%), o que indica uma ótima qualidade das sondas.

Tabela 4. Distribuição dos 34 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço estudados segundo sexo, idade, exposição a fumo e álcool, sítio do tumor e classificação das lesões segundo tamanho (T), comprometimento de linfonodos (N1-3) ou não (N0) e ausência (M0) ou presença de metástases à distância (M1-X).

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	31 (91%)
	Feminino	3 (9%)
Idade*	≥ 40	33 (97%)
	< 40	1 (3%)
Fumante	Sim	22 (65%)
	No passado	10 (29%)
	Não	2 (6%)
Etilista	Sim	20 (59%)
	No Passado	8 (23%)
	Não	6 (18%)
Sítio Primário	Língua (C02)	4 (12%)
	Soalho de boca (C04)	10 (29%)
	Laringe (C32)	20 (59%)
Classificação	T1	1 (3%)
	T2	10 (29%)
	T3	5 (15%)
	T4	18 (53%)
	N0	16 (47%)
	N1	3 (9%)
	N2	12 (35%)
	N3	3 (9%)
	M0	31 (91%)
	M1-X	3 (9%)

* Idade média do grupo = 56 anos

Tabela 5. Concentração de RNA (ng/µl) das amostras de tumor e margem.

Amostras de Tumor	Concentração (ng/µL)
CP1/0056T	1001,54
CP3/0280T	1061,73
CP1/0357T	1086,80
CP3/0050T	1173,55
CP2/0096T	1406,50
CP1/0348T	1407,37
CP3/0102T	1465,31
CP3/0105T	1469,30
CP3/0125T	1569,61
CP1/0359T	1621,80
CP1/0228T	1634,10
CP1/0089T	1704,83
CP3/0096T	1710,37
CP1/0384T	1782,74
CP3/0018T	1782,74
CP1/0370T	1815,12
CP2/1002T	192,52
CP3/0153T	1954,60
CP1/0363T	1991,99
CP3/0136T	2292,30
CP3/0031T	2352,96
CP4/0001T	2516,34
CP1/0255T	2593,36
CP3/0199T	2747,37
CP2/0122T	3422,64
CP3/0019T	3575,67
CP3/0249T	437,53
CP3/0155T	476,36
CP1/0057T	550,88
CP2/0168T	819,43
CP3/0124T	834,05
CP1/0366T	836,99
CP3/0118T	889,08
CP1/0385T	954,61

Amostras de Margem	Concentração (ng/µL)
CP1/0056M	108,10
CP3/0280M	502,26
CP1/0357M	569,85
CP3/0050M	196,92
CP2/0096M	248,46
CP1/0348M	403,79
CP3/0102M	545,82
CP3/0105M	905,59
CP3/0125M	1345,95
CP1/0359M	1109,25
CP1/0228M	343,85
CP1/0089M	290,86
CP3/0096M	813,89
CP1/0384M	461,55
CP3/0018M	473,13
CP1/0370M	225,17
CP2/1002M	952,42
CP3/0153M	456,45
CP1/0363M	570,78
CP3/0136M	807,98
CP3/0031M	854,24
CP4/0001M	307,29
CP1/0255M	157,70
CP3/0199M	1262,04
CP2/0122M	301,13
CP3/0019M	807,27
CP3/0249M	627,01
CP3/0155M	306,63
CP1/0057M	571,56
CP2/0168M	318,64
CP3/0124M	454,61
CP1/0366M	830,28
CP3/0118M	124,01
CP1/0385M	981,21

Tabela 6. Concentração de RNA (ng/µl) das linhagens FaDu, Hep2, UM-SCC-38, SCC-9 em três tempos de cultivo diferentes (24h, 48h e 72h), e em queratinócitos normais.

Linhagem	Concentração de RNA (ng/µL)		
	24h	48h	72h
Hep-2	4269,67	4252,37	4254,38
FaDu	4165,61	4214,58	4227,48
UM-SCC-38	1749,06	1530,74	1448,39
SCC-9	3507,69	2866,08	3228,63
Queratinócitos normais	2565,51		

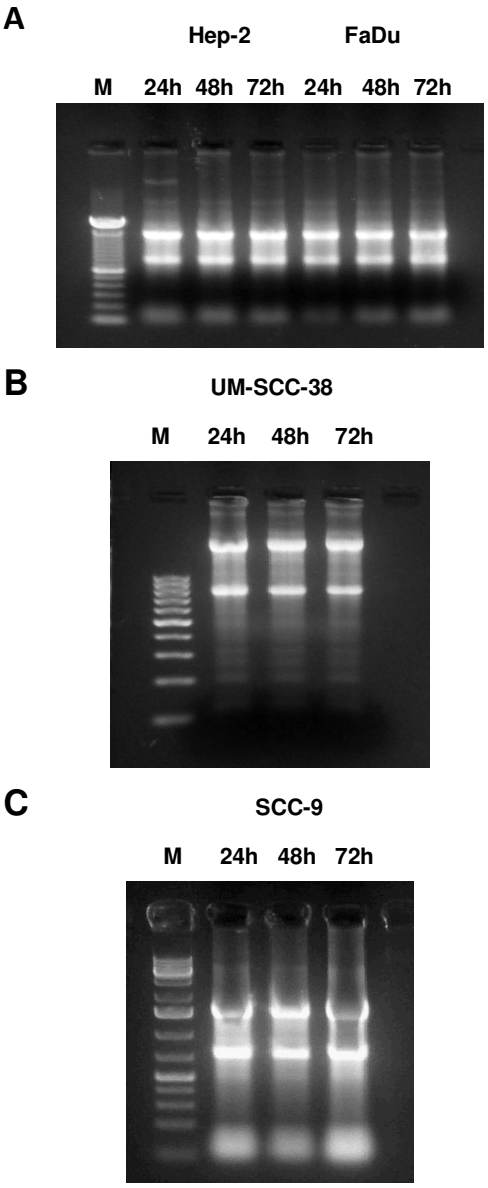


Figura 7. Gel de agarose com resultado de eletroforese de RNA extraído das linhagens celulares (A) Hep-2 e FaDu, (B) UM-SCC-38 e (C) SCC-9, nos três tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas. M = marcador de peso molecular 100pb.

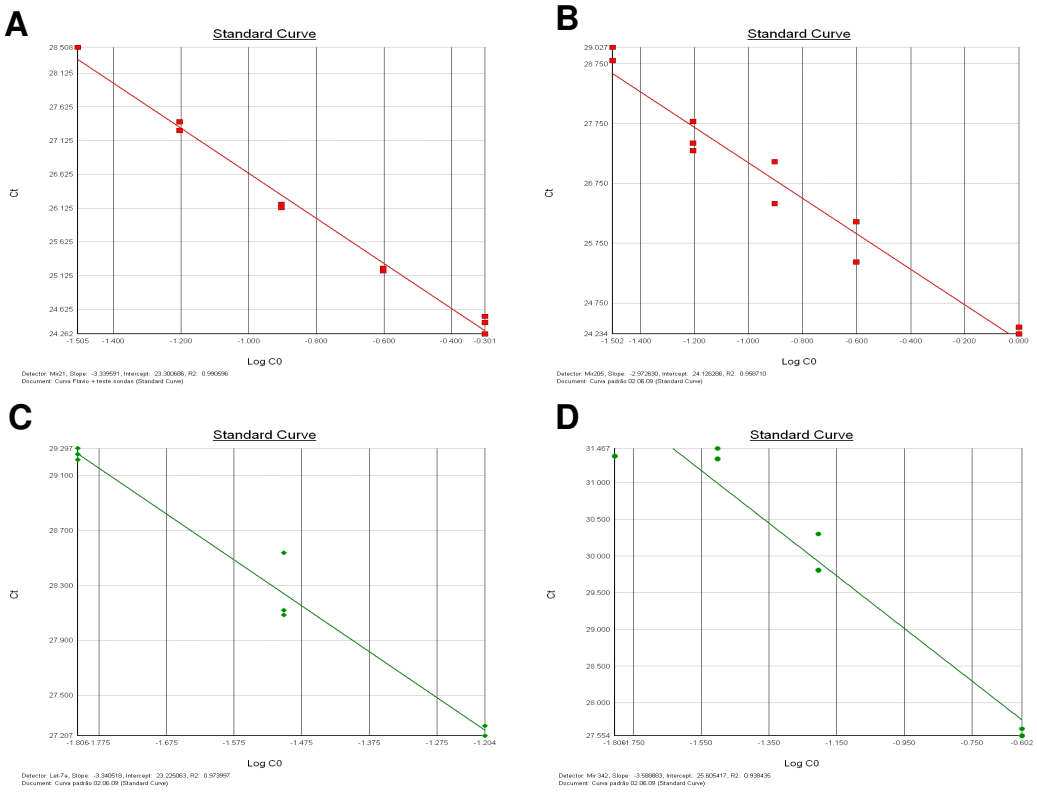


Figura 8. Curvas-padrão dos genes (A) *miR-21*, (B) *miR-205*, (C) *let-7a* e (D) *miR-342* utilizando cDNA da linhagem celular FaDU e de amostras de pele, faringe e pâncreas, respectivamente.

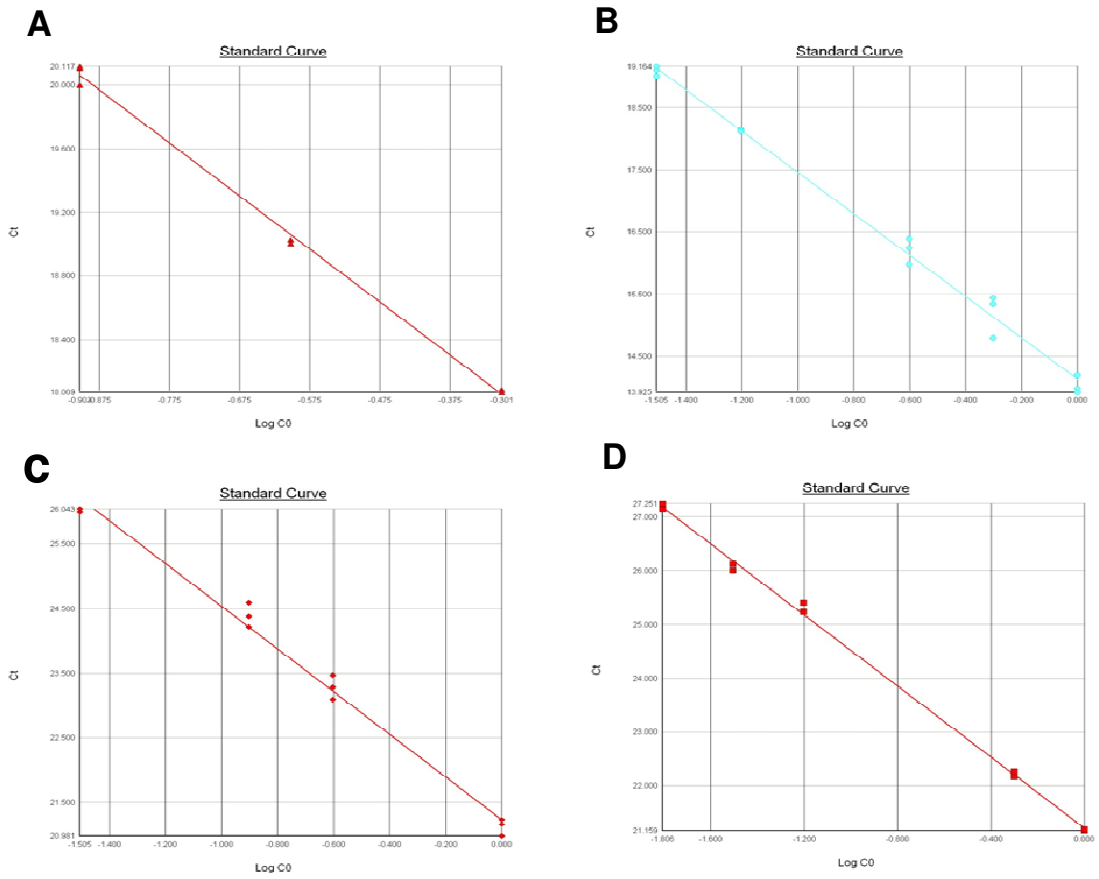


Figura 9. Curvas-padrão dos genes *GAPDH* (A), *β-actina* (B), *HPRT1* (C) e *BCR* (D) utilizando diluições de cDNA da linhagem celular Hep-2.

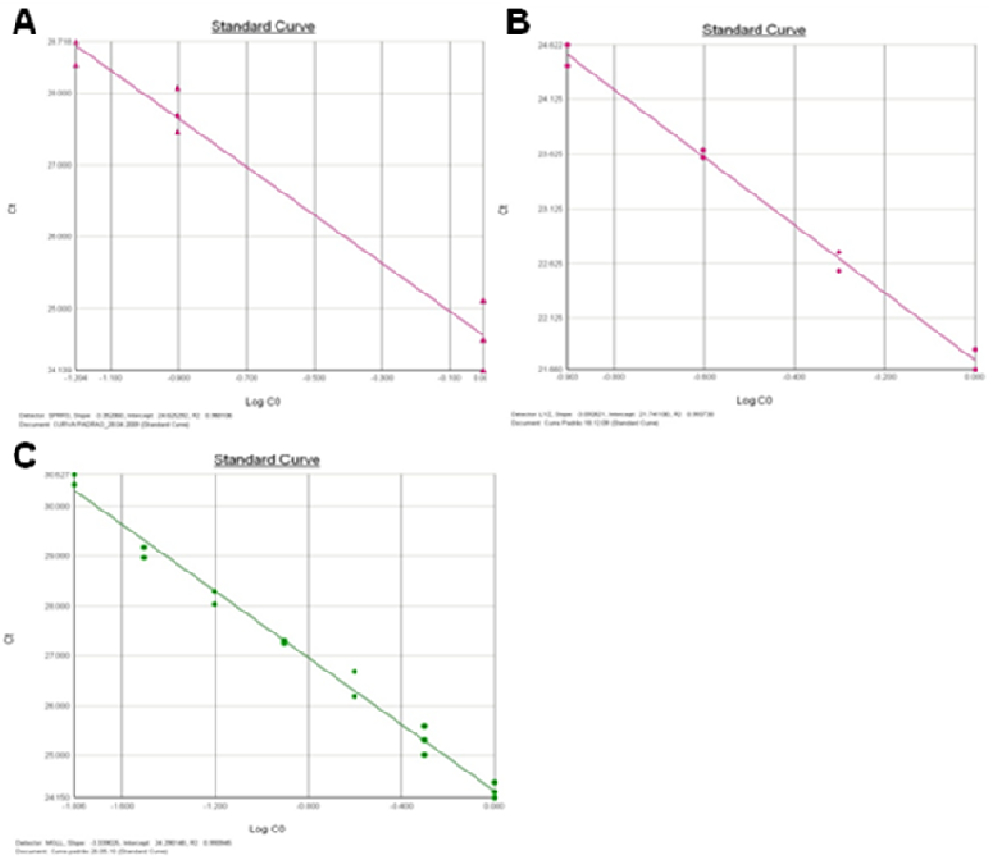


Figura 10. Curvas-padrão dos genes *SPRR3* (A), *LYZ* (B), *MGLL* (C) utilizando diluições de cDNA de amostras de laringe.

Tabela 7. Análise realizada pela ferramenta MAMI (sensibilidade 0.82, especificidade 0.4), que utiliza as predições de cinco diferentes algoritmos (TargetScanS, miRanda, microT, miRtarget e picTar), para busca de alvos dos microRNAs-21, 205, 342 e –let-7a entre os 240 genes identificados por (Silveira, Varuzza *et al*., 2008) com alteração de expressão em bibliotecas SAGE de carcinomas de laringe. As células em cinza indicam interação positiva entre o miR e o mRNA.

miRNA	RNA Alvo	MAMI_score	TargetScan	miRanda	microT	miRtarget	PicTar
hsa-let-7a	A2ML1	0.09432	-2	0.28263	-2	-2	-2
hsa-let-7a	CCND1	0.11277	0.931	-1	-2	-2	-2
hsa-let-7a	LTB4DH	0.09432	-2	0.8245	-2	-2	-2
hsa-let-7a	MGLL	0.11277	0.986	-1	-2	-2	-2
hsa-let-7a	NRG1	0.09432	-2	0.07778	-2	-2	-1
hsa-miR-205	CAT	0.09432	-2	0.83368	-2	-2	-2
hsa-miR-205	GPX2	0.09432	-2	0.66844	-2	-2	-2
hsa-miR-205	INCA1	0.09432	-2	0.38316	-2	-2	-2
hsa-miR-205	LMNA	0.11277	0.57	-2	-2	-1	-2
hsa-miR-205	NDUFA4	0.11277	0.6	-2	-2	-2	-2
hsa-miR-205	SELT	0.11277	0.73	-1	-2	-2	-2
hsa-miR-21	CSTB	0.09432	-2	0.67092	-2	-2	-2
hsa-miR-21	PLLP	0.09432	-2	0.34704	-2	-2	-2
hsa-miR-342	ARHGAP27	0.09432	-2	0.29887	-2	-2	-1
hsa-miR-342	PLK1	0.09432	-2	0.96713	-2	-2	-2
hsa-miR-342	ZC3H7B	0.09432	-2	0.46615	-2	-2	-1

Tabela 8 Valores do coeficiente angular da reta (*slope*) e da eficiência ($10^{-1/slope}$) dos iniciadores para os genes *miR-21, miR-205, miR-342 e Let-7a* e para os padrões internos (*GAPDH*, *β-actina*, *HPRT1*, *BCR*).

Gene	*Slope*	-1/*slope*	10^-1/*slope*
miR-21	-3,339591	0,299	1,99
miR-205	-2,972630	0,336	2,10
miR-342	-3,588883	0,278	1,90
Let-7a	-3,340518	0,299	1,99
GAPDH	-3,328197	0,300	1,99
β-actina	-3,326278	0,300	1,99
HPRT1	-3,310846	0,302	2,00
BCR	-3,308262	0,302	2,00
SPRR3	-3.352060	0,298	1,98
LYZ	-3.092621	0,323	2,10
MGLL	-3.339025	0,299	1,99

Seleção de padrões internos

O controle interno selecionado para as linhagens celulares foi o gene *ACTB*, de acordo com os dados obtidos pelo programa GeNorm (Vandesompele, De Preter *et al*., 2002) em relação a quatro genes constitutivos (*ACTB*, *GAPDH*, *BCR*, *HPRT1*). Para as amostras de tumor e margem o programa geNorm selecionou, entre os padrões internos *GAPDH, ACTB, HPRT1* e *BCR*, dois genes com estabilidade adequada para normalização dos valores de expressão de genes de interesse em tumores primários. Como esses dois genes eram diferentes para cada sítio anatômico, exceto o *GAPDH*, esse gene foi utilizado no cálculo da expressão relativa para o grupo todo (Tabela 9).

Tabela 9. Genes selecionados pelo programa geNorm como mais estáveis para utilização na normalização da expressão gênica.

Sítio anatômico	Genes Selecionados
Língua/Soalho de boca N0	*GAPDH e β-actina*
Língua/Soalho de boca N+	*GAPDH e HPRT1*
Laringe N0	*GAPDH e β-actina*
Laringe N+	*GAPDH e β-actina*

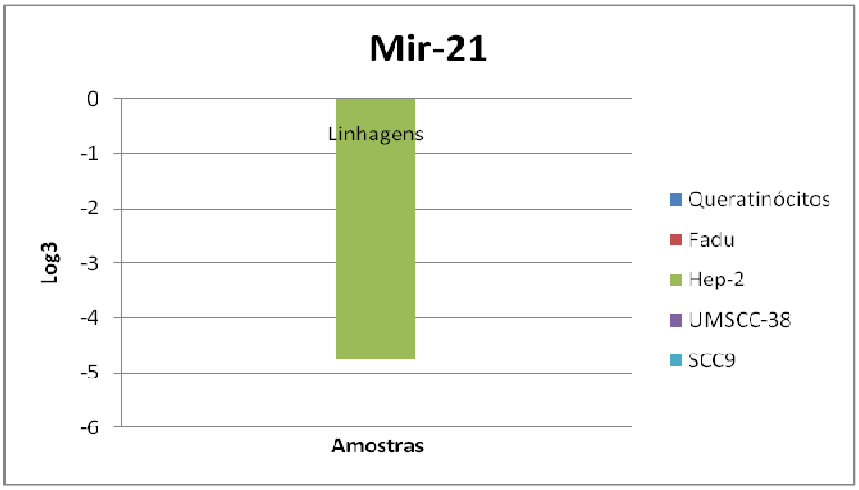
Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares e queratinócitos normais

Os resultados obtidos por PCR em tempo real da expressão dos miRs -21, -205, -342 e let-7a mostraram, nas linhagens celulares cultivadas por 48h, níveis geralmente iguais ou inferiores aos observados em queratinócitos normais, ou não se expressaram nas condições do estudo. Apenas o miR-342 mostrou níveis elevados em FaDu. O miR-205 não foi detectado nas linhagens celulares, ao contrário dos queratinócitos normais (Tabela 10 e Figura 11).

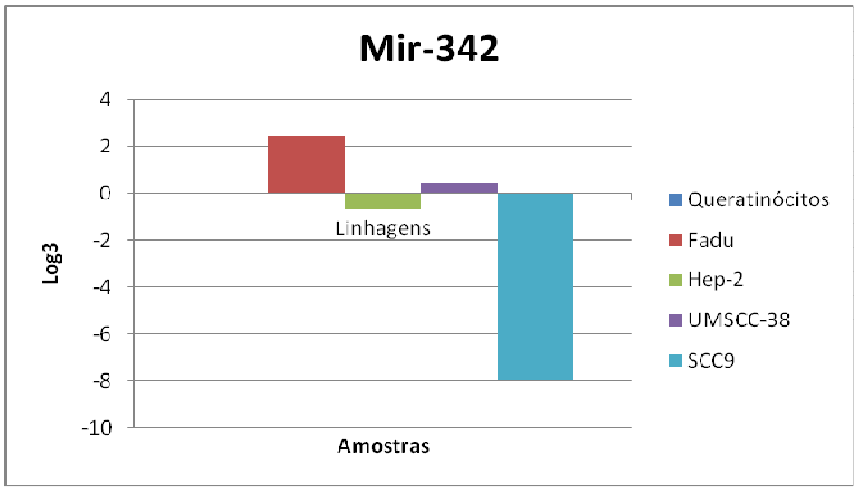
Tabela 10. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos genes *miR-21, miR-342, Let-7a* e *miR-205* nas linhagens celulares FaDu, Hep-2, SCC9 e UM-SCC-38 utilizando queratinócitos bucais normais como controle.

Linhagens	*miR-21*	*miR-342*	*Let-7a*	*miR-205*
Hep-2	-4,76222	-0,71595	0,85011	Não expressa
FaDU	Não expressa	2,46176	-1,61115	Não expressa
SCC9	Não expressa	-8,00741	-0,27870	Não expressa
UM-SCC-38	Não expressa	0,43197	-1,17161	Não expressa

A



B



C

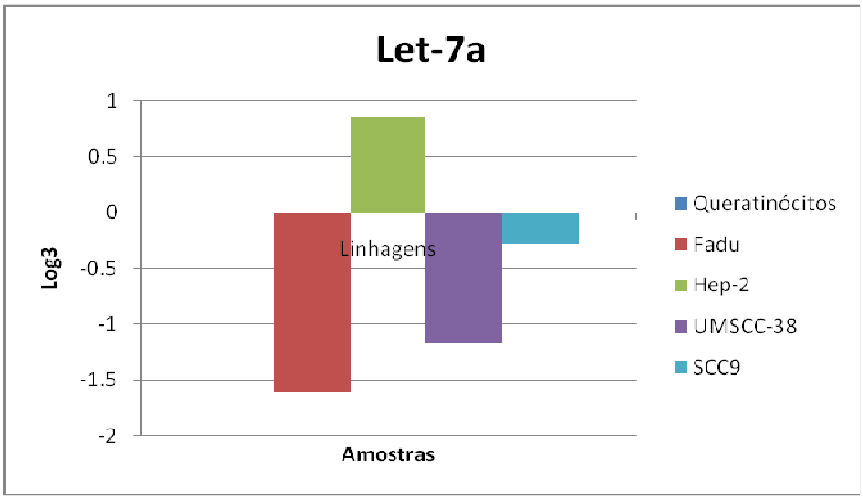


Figura 11. Avaliação da expressão por PCR em tempo real de (A) miR-21, (B) miR-342 e (C) let-7a nas linhagens celulares FaDu, Hep-2, UM-SCC-38 e SCC-9, utilizando como normalizador o gene *ACTB* e como controle queratinócitos normais Os valores estão apresentados em log3.

Avaliação da expressão de microRNAs em amostras de Tumor

Para análise de expressão de microRNAs de interesse em tumores primários, foram utilizados 34 pares de tumor-margem cirúrgica, sendo 4 pares de carcinoma de língua N+, 10 de soalho de boca (6 N0 e 4 N+) e 20 pares de carcinoma de laringe (10 N0 e 10 N+). Como o número de amostras com e sem metástase foi pequeno, esses grupos não foram avaliados separadamente.

Os dados da expressão relativa em log_3 obtidos estão representados na Figura 12 e na Tabela 11 e mostram tendência para redução de let-7a nas amostras estudadas. Os demais mostraram resultados heterogêneos.

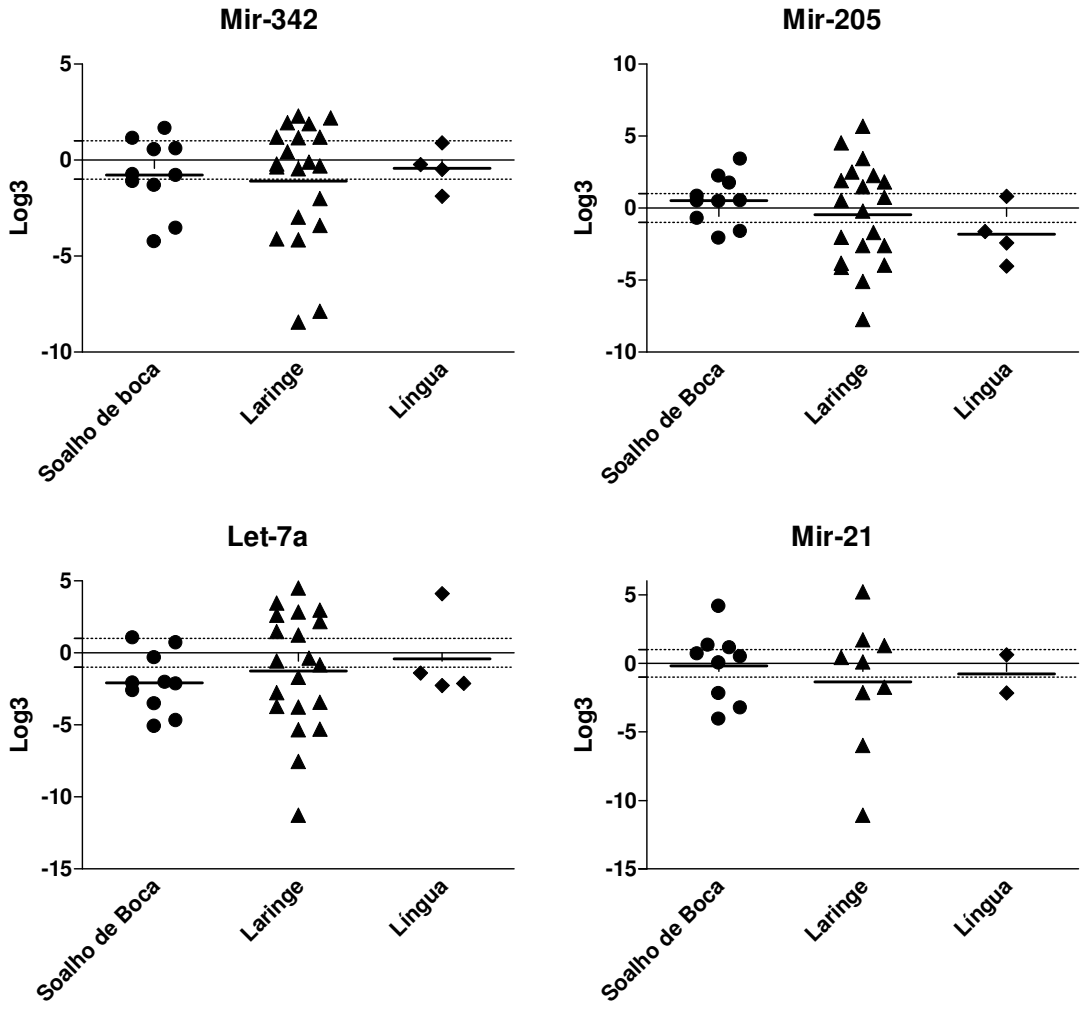


Figura 12. Valores de expressão relativa apresentados em log_3, referentes à análise do microRNA 342, 205, 21 e let-7a em amostras de soalho de boca, língua e laringe.

Tabela 11. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos microRNAs miR-21, -205, -let-7a e -342 em amostras de carcinoma de soalho de boca, laringe e língua e dados relacionados à presença/ausência de metástases linfonodais. NE=não expresso.

soalho de boca	miR-21	miR-205	let-7a	miR-342	N0 / N+
CP1/0089	-3,249309	2,0822154	-5,087292	-4,241846	N0
CP1/0228	1,3110615	0,5105694	-0,318767	0,5491192	N+
CP1/0255	-4,075091	0,4673717	-2,042972	-3,547508	N0
CP1/0363	1,1258205	2,2185593	-2,606034	0,5946934	N+
CP1/0366	0,0306842	0,523861	-3,518106	-0,7890828	N0
CP1/0370	4,1577009	3,4077883	1,0649463	1,660418	N0
CP1/0384	0,683213	-1,60304529	-2,13944	-0,7513532	N0
CP2/0122	NE	1,7417342	-2,093541	-1,313585	N+
CP2/0168	-2,190125	0,8235526	-4,690342	1,137461	N0
CP3/0280	0,4802217	0,7163156	0,7120568	-1,119785	N+
laringe	**miR-21**	**miR-205**	**let-7a**	**miR-342**	**N0 / N+**
CP1/0056	NE	3,460470935	2,98598	2,308572	N0
CP1/0348	NE	1,914251388	4,530959	0,429558	N0
CP1/0357	NE	0,754024148	2,192481	1,1717	N0
CP1/0359	NE	1,819380584	-3,41398	-0,1915292	N0
CP1/0385	NE	-1,68335213	-0,36011	-1,996009	N0
CP2/0096	NE	0,548950948	-5,28554	-0,354572	N+
CP3/0018	NE	5,697663717	2,861351	1,952938	N+
CP3/0019	NE	-4,10073845	-3,74299	-2,971427	N0
CP3/0031	0,418759	2,504738544	2,628716	1,894703	N+
CP3/0096	NE	-2,01371746	-2,74685	-0,459075	N0
CP3/0102	-1,73724	-3,82010089	1,239093	-0,2979461	N+
CP3/0105	1,696507	2,282314775	3,469903	-4,158616	N+
CP3/0124	1,308803	-0,19419829	-0,53579	1,190598	N+
CP3/0125	0,102694	4,540212569	-0,81841	1,202237	N+
CP3/0136	-11,0686	-7,72243297	-11,2514	-8,425825	N+
CP3/0153	-2,14357	-2,58353115	-5,32328	-0,1087723	N+
CP3/0155	-5,99078	-3,93710682	-7,51668	-3,40354	N0
CP3/0199	5,203088	1,489404323	1,48625	2,20287	N0
CP3/0249	NE	-2,59927285	-3,70309	-4,112379	N0
CP4/0001	NE	-5,07464162	-1,67228	-7,869871	N+
língua	**miR-21**	**miR-205**	**let-7a**	**miR-342**	**N0 / N+**
CP1/0057	-2,15814	0,829231	4,118878	-0,22852	N+
CP2/1002	NE	-4,02781	-2,25624	-0,48226	N+
CP3/0050	NE	-2,41082	-2,1145	-1,88329	N+
CP3/0118	0,621865	-1,62727	-1,38643	0,89143	N+

A avaliação da associação de expressão dos miR-21, -205, -342 e let-7a entre si por concatenação dos genes concluiu que não há evidência de que eles tenham tendência a terem frequências iguais (p=0,12).

A análise estatística (qui-quadrado de Pearson) também não mostrou associação de expressão dos miRs com diferentes parâmetros clinopatológicos (sub-sítio anatômico, etilismo, TNM, estádio, diferenciação histológica, infiltração vascular sanguínea, infiltração linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório peri-tumoral, recidiva, metástase ou segundo tumor) (p>0,050).

A expressão de três genes alvos candidatos (*LYZ*, *MGLL* e *SPRR3*) foi analisada e confrontada com os valores obtidos para os microRNAs previstos. Os dois primeiros genes foram selecionados pelo fato de atuarem em inflamação, uma condição freqüentemente observada em carcinomas de cabeça e pescoço. O gene *SPRR3* está relacionado com a diferenciação de queratinócitos. O miR-205 e o miR-342 são reguladores potenciais de *LYZ* e *SPRR3* pela interação em sítios pobremente conservados e o miR-let-7a pela interação em sítios conservados do *MGLL*.

A análise de correlação não-paramétrica de Spearman com 95% de intervalo de confiança mostrou correlação estatisticamente significante entre o miR-let-7a e seu respectivo alvo candidato *MGLL*, reunindo ou mantendo separados os grupos de soalho de boca e laringe (Figura 13).

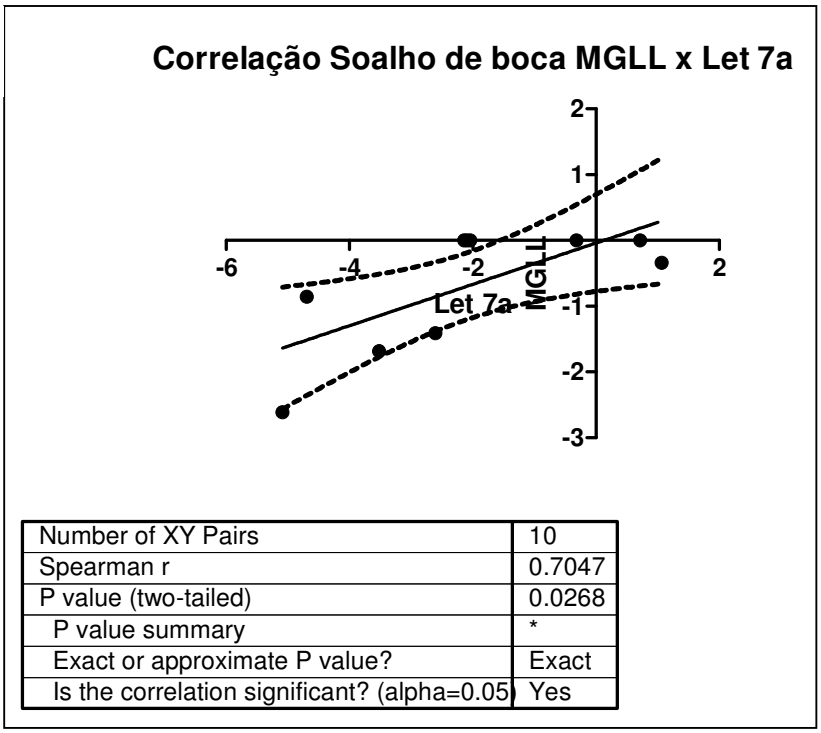
Na análise pelo programa Ingenuity dos microRNAs de interesse e dos genes alvo citados na Tabela 7 e no item “Busca *in silico* de RNAs reguladores”, alguns dados interessantes foram obtidos. Dez moléculas estão envolvidas diretamente com o câncer, cinco com ciclo celular e nove com morte celular (Sumário 1) e merecem, portanto, ser estudadas. O programa identificou dois *networks* principais (1 e 2) (Figuras 14 e 15). Como pode ser observado nesses *networks*, alguns genes (como o *LYZ* e o *MGLL*) estão relacionados com a tumorigênese oral ou de outros sítios do trato aerodigestivo superior. Tais resultados estimularam uma avaliação preliminar do inibidor *NFKBia*, cuja proteína atua sobre o produto de um gene do *network* 1, o *NFKB*. Os resultados estão apresentados na Tabela 13. Não foi observada correlação da expressão desse gene com os microRNAs estudados.

Considerando a relação direta ou indireta do receptor de estrógeno com o miR-21 ou com o miR-let-7a, respectivamente, apontada pela análise do programa Ingenuity, foram avaliadas as expressões dos microRNAs de interesse em células Hep-2 cultivadas após 12 ou 72h na presença de estrógeno (Tabela 14). Os dados mostraram diminuição de expressão de let-7a na primeira condição de cultura (tempo 12h).

Tabela 12. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos genes alvo candidatos *LYZ, MGLL* e *SPRR3* e de seus regulares potenciais miR-205, miR-let-7a, miR-342, respectivamente, em carcinomas de soalho de boca, laringe e língua. NE=não expresso.

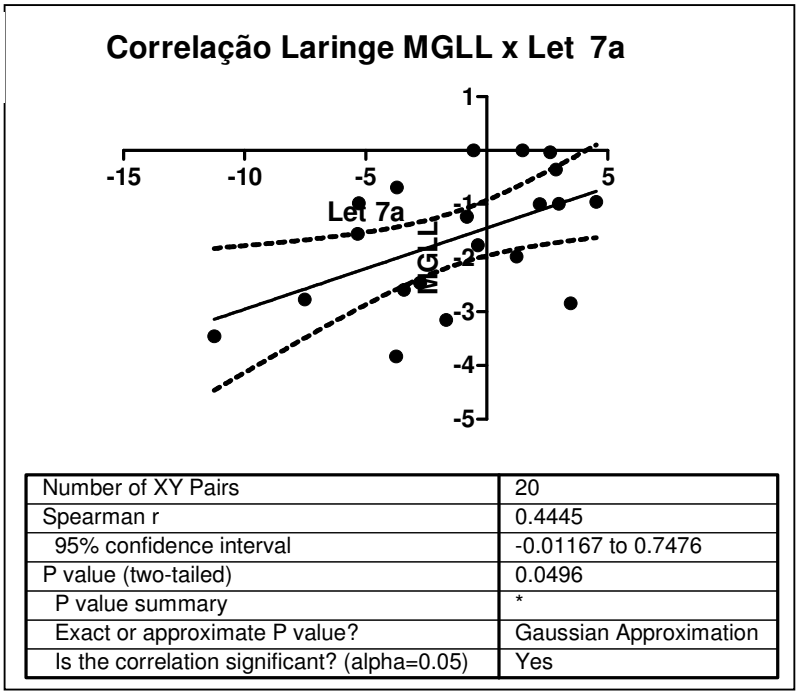
soalho	***miR-205***	***LYZ***	***Let-7a***	***MGLL***	***miR-342***	***SPRR3***
CP1/0089	2,082215	-0,857938	-5,087292	-2,614825	-4,241846	-4,6821
CP1/0228	0,5105694	NE	-0,318767	NE	0,5491192	NE
CP1/0255	0,4673717	NE	-2,042972	NE	-3,547508	-5,061066
CP1/0363	2,218559	-0,491873	-2,606034	-1,411653	0,5946934	-1,709567
CP1/0366	0,523861	NE	-3,518106	-1,683436	-0,7890828	NE
CP1/0370	3,407788	0,865026	1,0649463	-0,33864	1,660418	0,428012
CP1/0384	-1,6030452	NE	-2,13944	NE	-0,7513532	NE
CP2/0122	-1,7417342	NE	-2,093541	NE	-1,313585	1,9852940
CP2/0168	0,8235526	NE	-4,690342	-0,857970	1,137461	-1,3232910
CP3/0280	0,7163156	NE	0,7120568	NE	-1,119785	-3,9699046
laringe	***miR-205***	***LYZ***	***Let-7a***	***MGLL***	***miR-342***	***SPRR3***
CP1/0056	3,460471	-0,933114	2,98598	-0,99127	2,308572	-3,1917158
CP1/0348	1,91425138	NE	4,530959	-0,95868	0,429558	NE
CP1/0357	0,75402414	NE	2,192481	-0,99980	1,1717	-3,559579
CP1/0359	1,81938058	NE	-3,41398	-2,59234	-0,1915292	-4,435036
CP1/0385	-1,6833521	NE	-0,36011	-1,76212	-1,996009	-1,501928
CP2/0096	0,54895094	NE	-5,28554	-0,980928	-0,354572	3,022616
CP3/0018	5,697664	-8,566365	2,861351	-0,357842	1,952938	-1,0850835
CP3/0019	-4,100738	-3,612935	-3,74299	-3,83298	-2,971427	-3,6039338
CP3/0031	2,504739	-6,301463	2,628716	-0,032850	1,894703	-1,981540
CP3/0096	-2,013717	5,067638	-2,74685	-2,46235	-0,459075	NE
CP3/0102	-3,820101	-6,445305	1,239093	-1,9717	-0,2979461	-5,753942
CP3/0105	2,282315	3,674062	3,469903	-2,842570	-4,158616	NE
CP3/0124	-0,1941982	NE	-0,53579	NE	1,190598	NE
CP3/0125	4,540213	-0,299492	-0,81841	-1,23063	1,202237	NE
CP3/0136	-7,722433	-1,596095	-11,2514	-3,456864	-8,425825	-2,881014
CP3/0153	-2,583531	-3,729584	-5,32328	-1,553686	-0,1087723	-4,732688
CP3/0155	-3,937107	-2,684280	-7,51668	-2,77320	-3,40354	NE
CP3/0199	1,48940432	NE	1,48625	NE	2,20287	NE
CP3/0249	-2,599273	-6,215994	-3,70309	-0,6892	-4,112379	NE
CP4/0001	-5,074642	-2,669558	-1,67228	-3,15324	-7,869871	-2,53062
língua	***miR-205***	***LYZ***	***Let-7a***	***MGLL***	***miR-342***	***SPRR3***
CP1/0057	0,829231	-2,699191	4,118878	-2,005957	-0,22852	NE
CP2/1002	-4,02781	-4,405152	-2,25624	-1,970204	-0,48226	-3,629454
CP3/0050	-2,41082	1,045114	-2,1145	-0,259333	-1,88329	NE
CP3/0118	-1,62727	NE	-1,38643	-1,11874	0,89143	-10,165981

A



Number of XY Pairs	10
Spearman r	0.7047
P value (two-tailed)	0.0268
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

B



Number of XY Pairs	20
Spearman r	0.4445
95% confidence interval	-0.01167 to 0.7476
P value (two-tailed)	0.0496
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

Figura 13. Resultados da análise da correlação de Spearman com 95% de intervalo de confiança referente ao miR-let-7a e o alvo candidato *MGLL* em amostras de (A) soalho de boca e (B) laringe.

Sumário 1. Sumário da análise do programa Ingenuity em relação aos microRNAs miR-205, miR-let-7a, miR-342 e seus genes alvo potenciais *LYZ, MGLL* e *SPRR3.*

IPA® Summary of Analysis

INGENUITY® SYSTEMS

Analysis Name: Genes - 2010-12-20 07:18 PM
Analysis Creation Date: 2010-12-20
IPA version: 8.8 (Release Date: 2010-11-13)
Content version: 3204 (Release Date: 2010-10-27)

Analysis settings

View

Reference set: Ingenuity Knowledge Base (Genes Only)
Relationship to include: Direct and Indirect
Includes Endogenous Chemicals
Optional Analyses: My Pathways My List

Filter Summary:
Consider all molecules and/or relationships

Top Networks

ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell Cycle, Cellular Growth and Proliferation, Hair and Skin Development and Function	19
2	Cancer, Genetic Disorder, Reproductive System Disease	13
3	Molecular Transport	3
4	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell Death	3

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY® SYSTEMS

5	Cell Cycle, Connective Tissue Development and Function, Reproductive System Development and Function	3

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY® SYSTEMS

Continuação

Summary of Analysis - Genes - 2010-12-20 07:18 PM

Top Bio Functions

Diseases and Disorders

Name	p-value	# Molecules
Cancer	6,43E-05 - 2,84E-02	10
Genetic Disorder	6,43E-05 - 2,72E-02	9
Reproductive System Disease	6,43E-05 - 1,90E-02	6
Gastrointestinal Disease	6,18E-04 - 2,84E-02	8
Metabolic Disease	8,83E-04 - 2,37E-02	3

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cell Cycle	1,42E-06 - 2,84E-02	5
Cell Death	6,68E-06 - 2,95E-02	9
Cellular Development	3,79E-05 - 2,84E-02	5
Cellular Growth and Proliferation	3,79E-05 - 2,84E-02	7
DNA Replication, Recombination, and Repair	1,09E-03 - 2,61E-02	5

Physiological System Development and Function

Name	p-value	# Molecules
Nervous System Development and Function	8,90E-05 - 2,49E-02	4
Hair and Skin Development and Function	1,04E-04 - 2,02E-02	4
Embryonic Development	4,34E-04 - 2,96E-02	5
Connective Tissue Development and Function	5,04E-04 - 2,72E-02	3
Tissue Development	7,45E-04 - 2,96E-02	5

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY SYSTEMS

Summary of Analysis - Genes - 2010-12-20 07:18 PM

Top Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	2,01E-03	2/61 (0,033)
HER-2 Signaling in Breast Cancer	3,96E-03	2/83 (0,024)
Glycerolipid Metabolism	7,68E-03	2/162 (0,012)
Mitochondrial Dysfunction	1,01E-02	2/169 (0,012)
Methane Metabolism	1,67E-02	1/65 (0,015)

Top Molecules

This analysis has no expression values.

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY SYSTEMS

Continuação

Summary of Analysis - Genes - 2010-12-20 07:18 PM

Top My Lists

Name	p-value	Ratio

Top My Pathways

Name	p-value	Ratio

Top Tox Lists

Name	p-value	Ratio
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	1,55E-03	2/49 (0,041)
Oxidative Stress	2,09E-03	2/57 (0,035)
Mitochondrial Dysfunction	9,65E-03	2/125 (0,016)
Decreases Depolarization of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	1,07E-02	1/9 (0,111)
Cardiac Necrosis/Cell Death	1,23E-02	2/142 (0,014)

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY

Summary of Analysis - Genes - 2010-12-20 07:18 PM

Top Tox Functions

Cardiotoxicity

Name	p-value	# Molecules
Cardiac Necrosis/Cell Death	1,41E-04 - 1,41E-04	2
Cardiac Dilation	4,23E-02 - 4,23E-02	1
Cardiac Arteriopathy	4,87E-01 - 4,87E-01	2

Hepatotoxicity

Name	p-value	# Molecules
Liver Steatosis	3,39E-03 - 3,39E-03	2
Liver Dysplasia	4,79E-03 - 4,79E-03	1
Liver Cholestasis	6,96E-02 - 6,96E-02	1
Liver Necrosis/Cell Death	9,40E-02 - 9,40E-02	1
Liver Proliferation	9,61E-02 - 9,61E-02	1

Nephrotoxicity

Name	p-value	# Molecules
Renal Damage	1,20E-03 - 1,20E-03	1
Renal Tubule Injury	1,20E-03 - 1,06E-01	2
Renal Necrosis/Cell Death	9,56E-03 - 9,56E-03	1

(c) 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

INGENUITY SYSTEMS

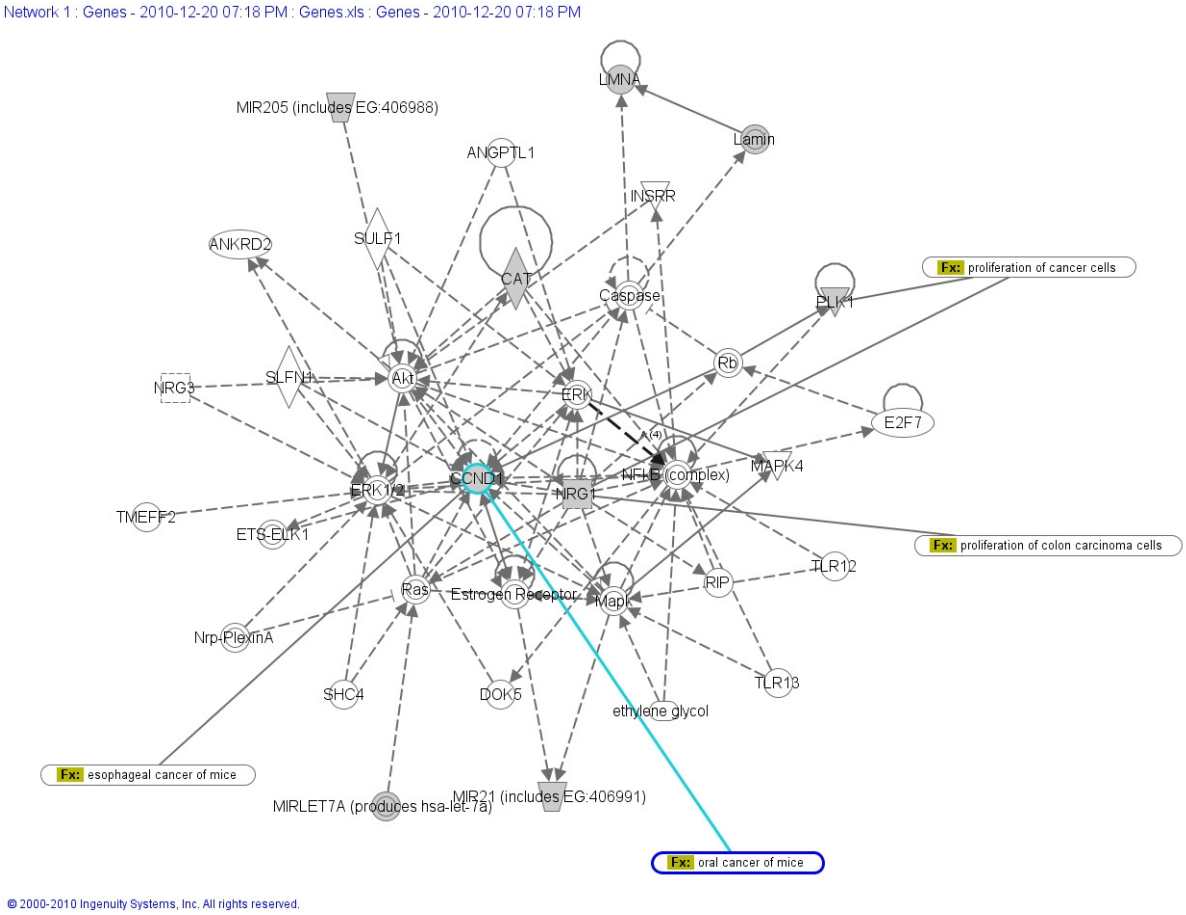


Figura 14. *Network* 1 criado pelo programa Ingenuity na análise dos microRNAs miR-205, miR-let-7a, miR-342 e de seus genes alvo potenciais *LYZ, MGLL* e *SPRR3.*

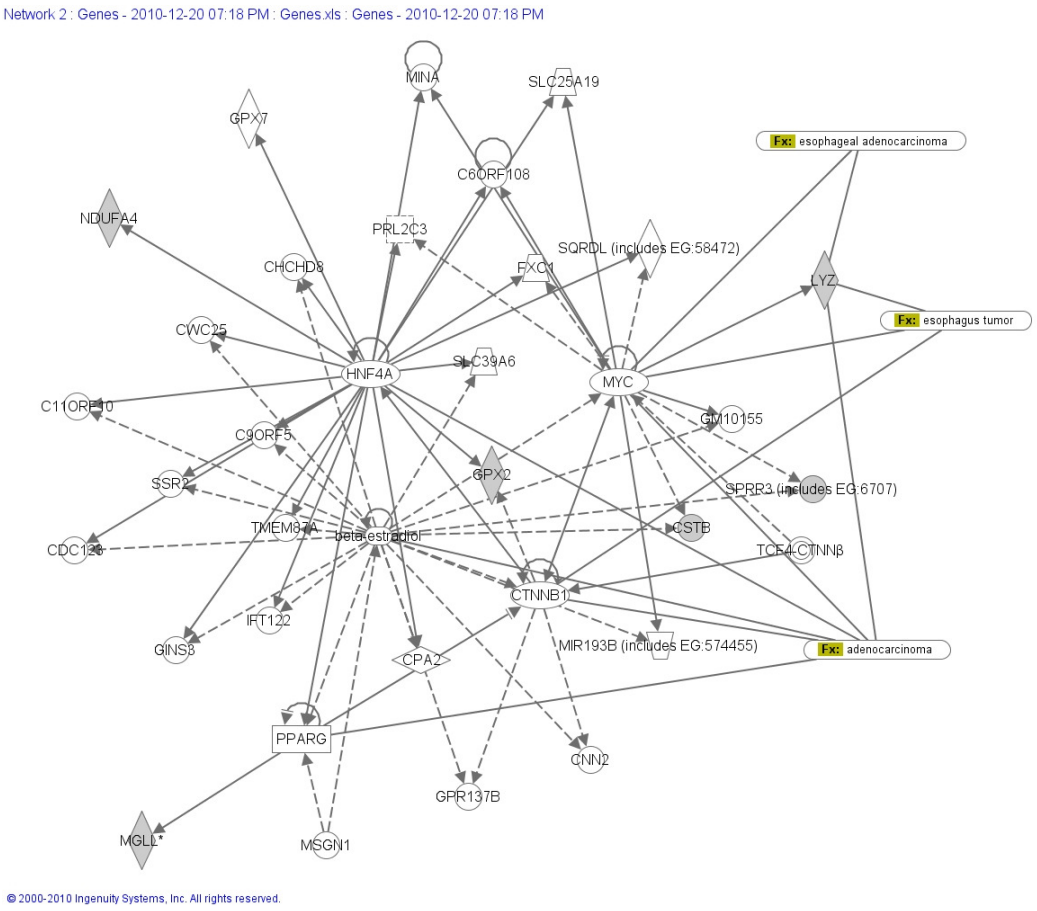


Figura 15. *Network* 2 criado pelo programa Ingenuity na análise dos microRNAs miR-205, miR-let-7a, miR-342 e de seus genes alvo potenciais *LYZ, MGLL* e *SPRR3.*

Tabela 13. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 do gene inibidor *NFKBia*, que atua sobre o produto de outro gene do *network* 1, o *NFKB*.

Amostras	*NFKBia*
CP1/0348	-1.716276147
CP1/0366	0.024963787
CP1/0385	2.404483806
CP2/0096	-0.11577561
CP3/0019	-3.646952739
CP3/0096	-1.40865583
CP3/0102	-1.147556067
CP3/0118	0.6360508
CP3/0125	1.228325591
CP3/0249	2.122468722
CP3/0357	-0.650614762
CP3/0370	1.38386029
CP4/0001	-2.401129363

Tabela 14. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 3 dos microRNAs miR-21, miR-205, miR-342 e miR-let-7a nas células Hep-2 cultivadas por 12 ou 72h em presença de estrógeno. E= expresso; NE= não expresso

MicroRNA	Condições de cultivo	Valores de expressão relativa	
		Tratado	Controle
miR-21	estrógeno por 12h	NE	NE
miR-21	estrógeno por 72h	NE	NE
miR-205	estrógeno por 12h	NE	NE
miR-205	estrógeno por 72h	NE	E
miR-342	estrógeno por 12h	-0.79912511	E
miR-342	estrógeno por 72h	0.622023129	E
let-7a	estrógeno por 12h	-1.545273152	E
let-7a	estrógeno por 72h	0.465846984	E

DISCUSSÃO

O presente trabalho foi proposto com o objetivo de investigar a expressão dos microRNAs miR-21, -205, -342 e let-7a em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, em linhagens celulares derivadas desses tumores e em queratinócitos bucais normais. Também foi proposto analisar o efeito desses microRNAs na expressão de alguns alvos selecionados e, assim, avaliar seu papel em redes de interações gênicas associadas à tumorigênese desse sítio anatômico.

Casuística

Em relação à casuística estudada, foi observado que mais de 90% dos pacientes são do sexo masculino, com idades superiores a 40 anos. Essa tendência é comumente encontrada para esse grupo de doenças e tem sido confirmada por muitos estudos e nas estatísticas disponíveis envolvendo um grande número de casos (Parkin, Bray *et al.*, 2005); (Argiris, Karamouzis *et al.*, 2008); (Ministério da Saúde, 2009), especialmente em portadores de carcinomas de laringe. Uma possível explicação para esse achado é o fato do sexo masculino estar mais sujeito, ou ser mais sensível, aos principais fatores etiológicos, entre eles o fumo e o álcool.

O consumo de fumo e álcool foi observado em 94% e 82% dos pacientes, respectivamente. Esses dados também estão de acordo com os dados da literatura, que mostram uma relação consistente desses fatores com a doença. A utilização de tabaco ou álcool isoladamente pode aumentar de duas a três vezes o risco para este tipo doença, mas esse risco é aumentado muitas vezes quando o consumo de álcool e cigarro está combinado (Hashibe, Brennan *et al.*, 2009). Esses dados reforçam o fato bem conhecido de que o estilo de vida é extremamente importante para o risco de desenvolver CECP.

Outro fator associado ao aparecimento do câncer é a idade. Um aumento de mutações somáticas ocorre com o envelhecimento, resultado da exposição cumulativa a agentes endógenos e exógenos que lesam o DNA. Os dados de (Parkin, Bray *et al.*, 2005) revelam que o CECP ocorre geralmente em pessoas com idade em torno de 60 anos, valor muito próximo ao verificado neste estudo (idade média dos pacientes = 56 anos). Entre as amostras utilizadas, apenas uma foi procedente de um paciente com 39 anos. Um fato interessante é que esse paciente não apresentou histórico de utilização de tabaco ou álcool e seu tumor ao diagnóstico foi classificado como sendo estádio IV e T4N0M0. Lajer e Buchwald (Lajer e Von Buchwald, 2010) relatam que carcinomas de cabeça e pescoço associados à infecção por HPV tendem a ocorrer na orofaringe, em pacientes mais jovens, sem histórico de consumo de tabaco e álcool, frequentemente com tumores em estádios mais elevados, grandes linfonodos metastáticos, mas melhor

prognóstico. Essa associação entre HPV e CECP explica a incidência em adultos jovens, considerando que a transmissão do vírus é realizada principalmente por práticas sexuais, o que abre possibilidades para medidas de prevenção.

Outros fatores que estão sendo estudados e que devem ser levados em consideração para o aparecimento de CECP são o histórico familial (Negri, Boffetta *et al.*, 2009), a má higiene oral (Guha, Boffetta *et al.*, 2007) e a dieta, pois as deficiências de micronutrientes parecem estar associadas com um risco aumentado deste tipo de neoplasia (Freedman, Leitzmann *et al.*, 2008).

O número de casos com tumores metastáticos e não metastáticos no presente estudo foi aproximadamente o mesmo (18 e 16, respectivamente). Esse total foi conseqüência de uma seleção intencional com o objetivo de representação equitativa dos dois grupos, que exibem características clínicas e prognósticos distintos. A presença de metástases em linfonodos regionais é um dos mais importantes fatores prognósticos e representa um achado crítico para o delineamento do tratamento dos pacientes com CECP (Pantel e Brakenhoff, 2004). Tal tratamento inclui esvaziamento cervical nos casos com linfonodos positivos que, dependendo da extensão, possui implicações sobre a qualidade de vida e sobre a morbi-mortalidade, geralmente elevada nesse grupo (Steeg e Theodorescu, 2008).

Expressão gênica

O RNA extraído das amostras de tecido tumoral e margem cirúrgica utilizadas nos experimentos apresentou boa qualidade e quantidade satisfatória, o que é fundamental para análises de expressão gênica. Essas características do RNA são dependentes de um processo adequado de coleta e armazenamento de amostras. O presente estudo utilizou material obtido com protocolo otimizado pelo consórcio colaborativo do projeto temático FAPESP “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”. Nesse projeto, o tempo entre a retirada do espécime cirúrgico e seu armazenamento inicial em nitrogênio líquido foi de poucos minutos. Embora o procedimento cirúrgico envolva etapas não controláveis nas quais a peça perde oxigenação por causa do pinçamento de artérias durante sua retirada, a maioria das amostras do projeto exibe boa qualidade. Além desse cuidado com o processamento e o armazenamento do material, cada caso esteve ligado a um grande número de informações clínicas, anatomopatológicas e de seguimento, que são de grande importância para análises de correlação com os achados experimentais.

Um dos sub-projetos do grupo desenvolveu bibliotecas SAGE derivadas de carcinomas e tecidos normais de laringe (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008). Os resultados mostraram produtos gênicos com expressão alterada tanto na comparação de tumor com

margem cirúrgica como na comparação de carcinomas metastáticos e não metastáticos. A análise por ferramentas de bioinformática disponíveis publicamente revelou vários miRNAs reguladores preditos para os produtos gênicos com expressão alterada. Alguns desses miRNAs são citados por estudos sobre miRNAs em carcinomas de cabeça e pescoço (resumidos na Tabela 1 da Introdução), mas também em outros tipos de tumores. A análise detalhada desses dados permitiu a seleção de quatro microRNAs para estudo (miR-21, miR-205, miR-342 e let-7a).

De modo geral, a amplificação desses microRNAs teve sucesso, exceto o miR-21 que, mesmo após várias repetições dos experimentos de PCR em tempo real, foi detectado em poucas amostras ou as triplicatas apresentaram alto desvio padrão.

Nas linhagens celulares, foi observada redução dos microRNAs de interesse, bem como ausência de expressão ou níveis similares ao de queratinócitos normais, exceto do miR-342, que mostrou níveis elevados em células FaDu. Esses resultados concordam com dados da literatura no caso do miR-342 (Tran, Mclean *et al.*, 2007); (Kozaki, Imoto *et al.*, 2008) e let-7a (Kozaki, Imoto *et al.*, 2008) mas diferem para o miR-205 (Tran, Mclean *et al.*, 2007); (Liu, Wang *et al.*, 2010), embora a metodologia utilizada para avaliação de expressão e as linhagens nem sempre foram as mesmas do presente trabalho.

Em tumores primários, foram observadas tanto a redução como a elevação de níveis do miR-342. Na literatura, são escassos os dados sobre esse microRNA em CECP, exceto em linhagens celulares. Em tumores de mama, sua redução foi associada com resistência ao tratamento com tamoxifeno (Cittelly, Das *et al.*, 2010). Lowery e colaboradores (Lowery, Miller *et al.*, 2009) também observaram níveis mais baixos nos tumores de mama negativos para os receptores de estrógeno, HER2 e de progesterona, e níveis mais altos nos positivos para os dois primeiros. Em adenocarcinoma de pulmão, que possui o tabaco como um de seus fatores etiológicos, o miR-342 foi observado com níveis reduzidos (Dacic, Kelly *et al.*, 2010), de forma similar ao detectado pelo presente trabalho em boa parte das amostras. É possível que essa expressão diminuída seja decorrente de silenciamento epigenético em alguns pacientes, como já descrito para carcinoma colorretal (Grady, Parkin *et al.*, 2008).

Em relação ao miR-205, 13 dos casos estudados apresentaram redução e 12 aumento de níveis de transcritos. De acordo com Fletcher et al. (2008), esse miR exibe elevada expressão em uma ampla gama de tecidos contendo epitélio epidermóide, especialmente em pele, esôfago e traquéia. Utilizando um modelo *in vitro*, esses autores foram capazes de detectar uma célula escamosa em um total de um milhão de linfócitos, confirmando seu potencial como marcador de epitélio epidermóide (Fletcher, Heaford *et al.*, 2008) .

Childs e colaboradores observaram baixos níveis de miR-205 em carcinomas de cabeça e pescoço e sua associação com recorrência local; quando na presença de expressão reduzida de let-7d, também foi associado com sobrevida diminuída (Childs, Fazzari *et al.*, 2009). De forma similar, esse miR mostra níveis baixos em outros tumores, como câncer de mama e próstata (Gandellini, Folini *et al.*, 2009); (Iorio, Casalini *et al.*, 2009); (Wu, Zhu *et al.*, 2009). Aparentemente, inibe a proliferação de células neoplásicas de mama, regulando negativamente o receptor HER3 (Iorio, Casalini *et al.*, 2009).

No caso do miR-21, embora o número de amostras com sucesso de amplificação tenha sido pequeno, foram observados tanto aumento como diminuição de sua expressão. Na maioria dos estudos da literatura, esse microRNA exibe níveis elevados em tumores primários de CECP (referências na Tabela 1 da Introdução). O mesmo tem sido observado para câncer de pulmão, tiróide e cólon e correlacionado com transformação neoplásica, estadiamento e prognóstico (Frezzetti, Menna *et al.*, 2011); (Allgayer, 2010). Por esse motivo, é classificado como um potente oncomiR regulado pelo oncogene *RAS*. Provavelmente esse papel é resultado de sua atuação sobre genes supressores de tumor, como *PDCD4* e *PTEN*, o que deve favorecer invasão e metástase (Meng, Henson *et al.*, 2007); (Allgayer, 2010).

No presente trabalho, foi detectada tendência de redução da expressão do miR-let-7a, principalmente em amostras de carcinoma de soalho de boca e língua. Resultado similar foi observado por Long e colaboradores (2009) em CECP de laringe. Níveis reduzidos desse miR também têm sido referidos em outros tumores, como câncer gástrico (Li, Zhang *et al.*, 2010), de pulmão (Takamizawa, Konishi *et al.*, 2004); (He, Duan *et al.*, 2009) e também no sangue de pacientes com câncer de mama (Heneghan, Miller *et al.*, 2010). Os dados da literatura sugerem que esse miR induz a elevação dos níveis da proteína supressora de tumor $p21^{WAF1}$ e a redução de expressão dos oncogenes *MYC* e *RAS*, participando dessa forma do controle do ciclo celular e da tumorigênese (Johnson, Grosshans *et al.*, 2005); (Sampson, Rong *et al.*, 2007); (He, Duan *et al.*, 2009).

Os resultados também mostraram correlação estatisticamente significante entre o miR-let-7a e seu respectivo alvo candidato *MGLL*, reunindo ou mantendo separados os grupos de soalho de boca e laringe. Os tumores de língua, em função do pequeno número de casos, não foram considerados.

O gene *MGLL* codifica a enzima monoacilglicerol lípase (MAGL), que é um modulador do sistema de canabinóides, responsável por vários processos fisiológicos, incluindo dor, apetite, função imune e estado emocional. O sistema de canabinóides desencadeia respostas aos ligantes naturais via receptores de canabinóides (CB) e canais de íons TRP (*transient receptor potential channels*). Os níveis de CB são controlados firmemente por degradação e biossíntese enzimática. Os lipídeos

anandamida ou N-aracdoniletanolamina (AEA) e 2-aracdonoglicerol (2-AG) são os componentes centrais desse sistema. O primeiro é modulado pela amida-hidrolase de ácido graxo (FAAH) e o segundo é hidrolizado pela MAGL em ácido aracdônico e glicerol. A 2-AG é um forte agonista dos receptores CB1 e 2, enquanto a AEA é um agonista parcial desses receptores (para referências, ver Chanda *et al*., 2010).

O processo neoplásico desencadeia uma reprogramação dos padrões metabólicos, que incluem aqueles responsáveis pela regulação da glicólise e pela produção de lipídeos. O desenvolvimento de um fenótipo lipogênico parece ter um papel muito importante em câncer e muitos exemplos estão disponíveis na literatura mostrando alteração de enzimas envolvidas na biossíntese de lipídeos e, conseqüentemente, na geração de combustível para a produção de energia para a célula neoplásica (Menendez, Lupu, 2007).

Recentemente, Nomura *et al*. (2010) mostraram que a enzima lipolítica MAGL, observada em níveis elevados em tumores de mama mais agressivos (Gjerstorff *et al*., 2006), controla os níveis de ácidos graxos livres em células neoplásicas, que são direcionados para aprodução de mensageiros lipídicos oncogênicos (Guzmán, 2010).

Este é o primeiro trabalho mostrando associação da expressão de *MGLL* e um microRNA, um processo previsto pelas evidências da literatura sobre mecanismos pós-transcricionais afetando sua expressão (Chon *et al*., 2007). O significado dessa associação não pode ser deduzida dos experimentos realizados pelo presente trabalho.

Embora muitos estudos já tenham sido realizados sobre microRNAs em câncer, entre eles o de cabeça e pescoço, existe ainda muito a ser descoberto sobre esses pequenos reguladores e das redes de interação das quais participam. As variações nos perfis de expressão têm dificultado a definição de seu papel na tumorigênese. Atualmente, as metodologias empregadas (Northern blot, PCR em tempo real, microarranjos de cDNA, por exemplo) são capazes de avaliar sua relação com o aparecimento do câncer, mas não permitem determinar se constituem a causa do desenvolvimento neoplásico (Zhang, Dahlberg *et al*., 2007).

Um outro grande desafio nessa área é, sem dúvida, a identificação dos genes alvo ou de vias de sinalização das quais participam. Apesar do desenvolvimento de algoritmos de predição, a tarefa é complexa principalmente porque um único microRNA pode ter centenas de genes alvo em potencial. Além disso, o seu efeito pode variar no tempo e no espaço ou ser restrito a grupos de células em um tecido, seja ele normal ou tumoral.

A importância de vencer esses desafios está no potencial dos microRNAs como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico em câncer e outras doenças e como alvos para novas terapias.

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho são:

1- Os microRNAs miR-21, -205, -342 e let-7a apresentam níveis geralmente iguais ou inferiores aos observados em queratinócitos bucais normais, ou não se expressam nas condições do estudo. Apenas o miR-342 mostra níveis elevados em células FaDu.

2- O microR-let-7a exibe redução de expressão nas células Hep-2 em presença de estrógeno.

3- O miR-let-7a exibe expressão reduzida em carcinomas de soalho de boca e laringe. Os miR-21 e -342 possuem níveis baixos em carcinomas de laringe. A expressão dos microRNAs de interesse mostra grande variabilidade entre as amostras.

4- Os níveis dos microRNAs miR-21, -205, -342 e let-7a não estão associados aos parâmetros clinopatológicos: sub-sítio anatômico, etilismo, TNM, estádio, diferenciação histológica, infiltração vascular sanguínea, infiltração linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório peri-tumoral, recidiva, metástase ou segundo tumor.

5- Os níveis dos microRNAs miR-21, -205, -342 e let-7a não estão associados entre si.

6- A expressão do miR-let-7a está positivamente correlacionada com a de seu respectivo alvo candidato *MGLL* em carcinomas de soalho de boca e laringe. O significado dessa associação não pode ser deduzida dos experimentos realizados pelo presente trabalho.

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs, miRs) são pequenos RNAs não codificadores presentes em diferentes organismos. Esses RNAs regulam a tradução de genes alvos por meio de ligação seqüência-específica a RNAs mensageiros (mRNAs). Dependendo do grau de complementaridade, podem inibir a tradução e/ou induzir a degradação desses mRNAs.

No presente estudo, foi investigado por PCR em tempo real o padrão de expressão de quatro microRNAs (miR-21, -205, -342 e let-7a) em quatro linhagens celulares derivadas de tumores da cavidade oral e da faringe (FaDu, Hep-2, SCC9 e UM-SCC-38), em queratinócitos orais normais e em amostras de tumor e margens cirúrgicas pareadas de 34 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP). Foi também investigada a correlação da expressão dos MiRs de interesse com as características clinicopatológicas de pacientes com CECP.

Nas linhagens celulares, os níveis dos miRs foram similares ou mais baixos que os de queratinócitos normais, ou os miRs não se expressaram. Somente o miR-342 mostrou níveis elevados na linhagem FaDu. Em células Hep-2 tratadas com estradiol, a expressão de miR-let-7a mostrou-se reduzida.

Em tumores primários, níveis baixos de miR-let-7a foram observados em carcinomas de soalho de boca e laringe. A expressão de miR-21, -205 e -342 mostrou grande variabilidade entre as amostras e foi reduzida em um dos sítios anatômicos. Não foi observada correlação entre a expressão dos miRs e as características clinicopatológicas dos pacientes com CECP.

A análise de três genes alvo candidatos (*LYZ*, *MGLL* e *SPRR3*) mostrou, em carcinomas de soalho de boca e laringe, associação positiva entre a expressão de miR-let-7a e de seu alvo predito *MGLL*, uma lipase que pode favorecer o fenótipo maligno aumentando os níveis de ácidos graxos livres e sinais lipídicos oncogênicos. O significado dessa associação não pode ser deduzida dos experimentos realizados pelo presente trabalho.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs, miRs) are small, non-coding RNAs present in different organisms. They regulate the translation of target genes through sequence specific binding to mRNA. Depending on the degree of sequence complimentary, they can inhibit translation and/or degradation of target mRNAs

In the present study, we used real time PCR to investigate the expression pattern of four microRNAs (miR-21, -205, -342 e let-7a) in four cell lines derived from tumors of oral cavity and pharinx (FaDu, Hep-2, SCC9 e UM-SCC-38), in normal oral keratinocytes and in matched tumor / surgical margin samples from 34 patients with head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). We also aimed to correlate the miR expression with the clinicopathological features in HNSCC.

In cell lines, the miR levels were similar or lower than those in normal keratinocytes, or even absent. Only miR-342 showed high levels in FaDu cell line. In Hep-2 cells treated with estradiol, miR-let-7a expression was reduced.

In primary tumors, low miR-let-7a levels were observed in floor of the mouth and larynx carcinomas. The expression of miR-21, -205 and -342 showed high variability between samples and was reduced in one anatomical site. No correlation was observed between miR expression and clinopathological features of head and neck cancer patients.

The analysis of three potential target genes (*LYZ*, *MGLL* e *SPRR3*) showed, in floor of the mouth and larynx carcinomas, a positive correlation between the expression of miR-let-7a and its predicted target gene *MGLL*, a lipase that may support the malignant phenotype by increasing levels of free fatty acids and oncogenic lipid signals. The meaning of such association was not clear from our data.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akao, Y., Y. Nakagawa*, et al.* MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. Oncol Rep, v.16, n.4, Oct, p.845-50. 2006.

Affymetrix ENCODE Transcriptome Project; Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. Nature, v.457, n.7232, Feb 19, p.1028-32. 2009.

Allgayer, H. Pdcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA. Crit Rev Oncol Hematol, v.73, n.3, Mar, p.185-91. 2010.

Argiris, A., M. V. Karamouzis*, et al.* Head and neck cancer. Lancet, v.371, n.9625, May 17, p.1695-709. 2008.

Avissar, M., M. D. Mcclean*, et al.* MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. Carcinogenesis, v.30, n.12, Dec, p.2059-63. 2009.

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.281-97. 2004.

Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, v.136, n.2, Jan 23, p.215-33. 2009.

Bates, G. J., S. M. Nicol*, et al.* The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. EMBO J, v.24, n.3, Feb 9, p.543-53. 2005.

Brosius, J. e H. Tiedge. RNomenclature. RNA Biol, v.1, n.2, Jul, p.81-3. 2004.

Calin, G. A. e C. M. Croce. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer, v.6, n.11, Nov, p.857-66. 2006.

Calin, G. A., C. D. Dumitru*, et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.24, Nov 26, p.15524-9. 2002.

Calin, G. A., M. Ferracin*, et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, v.353, n.17, Oct 27, p.1793-801. 2005.

Calin, G. A., C. Sevignani*, et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.9, Mar 2, p.2999-3004. 2004.

Carthew, R. W. e E. J. Sontheimer. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell, v.136, n.4, Feb 20, p.642-55. 2009.

Cervigne, N. K., P. P. Reis*, et al.* Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. Hum Mol Genet, v.18, n.24, Dec 15, p.4818-29. 2009.

Chanda P. K., Y. Gao, *et al*. Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. Mol Pharmacol, v.78, n.6, Dec, p.996-1003. 2010.

Chang, K. W., C. J. Liu*, et al.* Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. J Dent Res, v.87, n.11, Nov, p.1063-8. 2008.

Chang, S. S., W. W. Jiang*, et al.* MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer, v.123, n.12, Dec 15, p.2791-7. 2008.

Chendrimada, T. P., R. I. Gregory*, et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature, v.436, n.7051, Aug 4, p.740-4. 2005.

Childs, G., M. Fazzari*, et al.* Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. Am J Pathol, v.174, n.3, Mar, p.736-45. 2009.

Chin, D., G. M. Boyle*, et al.* Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. Int J Cancer, v.113, n.5, Feb 20, p.789-97. 2005.

Chin, L. J., E. Ratner*, et al.* A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. Cancer Res, v.68, n.20, Oct 15, p.8535-40. 2008.

Chon, S. H., Y. X. Zhou, *et al*. Intestinal monoacylglycerol metabolism: developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. J Biol Chem, v.282, n.46, Nov 16, p.33346-57. 2007.

Christensen, B. C., B. J. Moyer*, et al.* A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. Carcinogenesis, v.30, n.6, Jun, p.1003-7. 2009.

Cittelly, D. M., P. M. Das*, et al.* Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. Mol Cancer, v.9, p.317. 2010.

Clague, J., S. M. Lippman*, et al.* Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. Mol Carcinog, v.49, n.2, Feb, p.183-9. 2010.

Costa, F. F. Non-coding RNAs: Meet thy masters. Bioessays, v.32, n.7, Jul, p.599-608. 2010.

Cowland, J. B., C. Hother*, et al.* MicroRNAs and cancer. APMIS, v.115, n.10, Oct, p.1090-106. 2007.

Dacic, S., L. Kelly*, et al.* miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. Mod Pathol, v.23, n.12, Dec, p.1577-82. 2010.

Davis, B. N., A. C. Hilyard*, et al.* SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. Nature, v.454, n.7200, Jul 3, p.56-61. 2008.

Diederichs, S. e D. A. Haber. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. Cancer Res, v.66, n.12, Jun 15, p.6097-104. 2006.

Eis, P. S., W. Tam*, et al.* Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.10, Mar 8, p.3627-32. 2005.

Engels, B. M. e G. Hutvagner. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. Oncogene, v.25, n.46, Oct 9, p.6163-9. 2006.

Esquela-Kerscher, A. e F. J. Slack. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.4, Apr, p.259-69. 2006.

Fabbri, M., M. Ivan*, et al.* Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. Expert Opin Biol Ther, v.7, n.7, Jul, p.1009-19. 2007.

Feber, A., L. Xi*, et al.* MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. J Thorac Cardiovasc Surg, v.135, n.2, Feb, p.255-60; discussion 260. 2008.

Fletcher, A. M., A. C. Heaford*, et al.* Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205. Transl Oncol, v.1, n.4, Dec, p.202-8. 2008.

Freedman, N. D., M. F. Leitzmann*, et al.* Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. Lancet Oncol, v.9, n.7, Jul, p.649-56. 2008.

Frezzetti, D., M. D. Menna*, et al.* Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. Oncogene, v.30, n.3, Jan 20, p.275-86. 2011.

Gandellini, P., M. Folini*, et al.* miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. Cancer Res, v.69, n.6, Mar 15, p.2287-95. 2009.

Garzon, R., G. A. Calin*, et al.* MicroRNAs in Cancer. Annu Rev Med, v.60, p.167-79. 2009.

Gjerstorff, M. F., V. M. Benoit, *et al*. Identification of genes with altered expression in medullary breast cancer vs. ductal breast cancer and normal breast epithelia. Int J Oncol, v. 28, n.6, Jun, p.1327-35. 2006.

Grady, W. M., R. K. Parkin*, et al.* Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. Oncogene, v.27, n.27, Jun 19, p.3880-8. 2008.

Gregory, P. A., A. G. Bert*, et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol, v.10, n.5, May, p.593-601. 2008.

Griffiths-Jones, S., H. K. Saini*, et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res, v.36, n.Database issue, Jan, p.D154-8. 2008.

Guha, N., P. Boffetta*, et al.* Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. Am J Epidemiol, v.166, n.10, Nov 15, p.1159-73. 2007.

Guo, Y., Z. Chen*, et al.* Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res, v.68, n.1, Jan 1, p.26-33. 2008.

Guzmán, M. A new age for MAGL. Chem Biol, v.17, n.1, Jan 29, p.4-6. 2010.

Han, J., Y. Lee*, et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev, v.18, n.24, Dec 15, p.3016-27. 2004.

Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.

Hashibe, M., P. Boffetta*, et al.* Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.15, n.4, Apr, p.696-703. 2006.

Hashibe, M., P. Brennan*, et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.18, n.2, Feb, p.541-50. 2009.

He, L. e G. J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet, v.5, n.7, Jul, p.522-31. 2004.

He, X., C. Duan*, et al.* Let-7a elevates p21(WAF1) levels by targeting of NIRF and suppresses the growth of A549 lung cancer cells. FEBS Lett, v.583, n.21, Nov 3, p.3501-7. 2009.

Hebert, C., K. Norris*, et al.* High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. Mol Cancer, v.6, p.5. 2007.

Heneghan, H. M., N. Miller*, et al.* Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. Ann Surg, v.251, n.3, Mar, p.499-505. 2010.

Henson, B. J., S. Bhattacharjee*, et al.* Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. Genes Chromosomes Cancer, v.48, n.7, Jul, p.569-82. 2009.

Hui, A. B., M. Lenarduzzi*, et al.* Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res, v.16, n.4, Feb 15, p.1129-39. 2010.

Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, v.90, p.1-636. 2007.

Hurst, D. R., M. D. Edmonds*, et al.* Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. Cancer Res, v.69, n.19, Oct 1, p.7495-8. 2009.

Iaquinta, P. J. e J. A. Lees. Life and death decisions by the E2F transcription factors. Curr Opin Cell Biol, v.19, n.6, Dec, p.649-57. 2007.

IARC Monographs. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses, v.90, p.1-636. 2007.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature, v.431, n.7011, Oct 21, p.931-45. 2004.

Iorio, M. V., P. Casalini*, et al.* microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. Cancer Res, v.69, n.6, Mar 15, p.2195-200. 2009.

Iorio, M. V., M. Ferracin*, et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res, v.65, n.16, Aug 15, p.7065-70. 2005.

Jiang, L., X. Liu*, et al.* Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. Int J Cancer, v.127, n.3, Aug 1, p.505-12. 2010.

Johnson, S. M., H. Grosshans*, et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell, v.120, n.5, Mar 11, p.635-47. 2005.

Kawamata, T. e Y. Tomari. Making RISC. Trends Biochem Sci, v.35, n.7, Jul, p.368-76. 2010.

Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.5, May, p.376-85. 2005.

Kozaki, K., I. Imoto*, et al.* Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res, v.68, n.7, Apr 1, p.2094-105. 2008.

Kozomara, A., S. Griffiths-Jones. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Res, 39 (Database issue):D152-7. 2011.

Krichevsky, A. M. e G. Gabriely. miR-21: a small multi-faceted RNA. J Cell Mol Med, v.13, n.1, Jan, p.39-53. 2009.

Kulshreshtha, R., M. Ferracin*, et al.* A microRNA signature of hypoxia. Mol Cell Biol, v.27, n.5, Mar, p.1859-67. 2007.

Kwak, P. B., S. Iwasaki*, et al.* The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci, v.101, n.11, Nov, p.2309-15. 2010.

Lajer, C. B. e C. Von Buchwald. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. APMIS, v.118, n.6-7, Jun, p.510-9. 2010.

Langevin, S. M., R. A. Stone*, et al.* MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, Nov 8. 2010.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum*, et al.* The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.843-54. 1993.

Lee, Y., C. Ahn*, et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, v.425, n.6956, Sep 25, p.415-9. 2003.

Lee, Y., I. Hur*, et al.* The role of PACT in the RNA silencing pathway. EMBO J, v.25, n.3, Feb 8, p.522-32. 2006.

Lee, T. C., Y. L. Lin, *et al.* Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon. Biochem Biophys Res Commun. v.396, n.3, Jun 4; p.596-601. 2010.

Lewin, F., S. E. Norell*, et al.* Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. Cancer, v.82, n.7, Apr 1, p.1367-75. 1998.

Lewis, B. P., I. H. Shih*, et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. Cell, v.115, n.7, Dec 26, p.787-98. 2003.

Li, J., H. Huang*, et al.* MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. Clin Cancer Res, v.15, n.12, Jun 15, p.3998-4008. 2009.

Li, X., Y. Zhang*, et al.* Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. Gut, v.59, n.5, May, p.579-85. 2010.

Lindow, M. Prediction of targets for microRNAs. Methods Mol Biol, v.703, p.311-7. 2011.

Liu, C. G., G. A. Calin*, et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.26, Jun 29, p.9740-4. 2004. 2010.

Liu, C. J., S. Y. Kao*, et al.* Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. Oral Dis, v.16, n.4, May, p.360-4. 2010.

Liu, X., A. Wang*, et al.* MicroRNA-24 targeting RNA-binding protein DND1 in tongue squamous cell carcinoma. FEBS Lett, v.584, n.18, Sep 24, p.4115-20. 2010.

Liu, X., J. Yu*, et al.* MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Genomics Proteomics, v.6, n.3, May-Jun, p.131-9. 2009.

Liu, Z., G. Li*, et al.* Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, v.116, n.20, Oct 15, p.4753-60. 2010.

Lo, W. L., C. C. Yu*, et al.* MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. J Pathol, Nov 23. 2010.

Loffler, D., K. Brocke-Heidrich*, et al.* Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. Blood, v.110, n.4, Aug 15, p.1330-3. 2007.

Long, X. B., G. B. Sun*, et al.* Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. Oncol Rep, v.22, n.5, Nov, p.1189-95. 2009.

Lowery, A. J., N. Miller*, et al.* MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. Breast Cancer Res, v.11, n.3, p.R27. 2009.

Lund, E., S. Guttinger*, et al.* Nuclear export of microRNA precursors. Science, v.303, n.5654, Jan 2, p.95-8. 2004.

Ma, L., J. Teruya-Feldstein*, et al.* Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature, v.449, n.7163, Oct 11, p.682-8. 2007.

Martone, T., A. Gillio-Tos*, et al.* Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res, v.13, n.17, Sep 1, p.5089-94. 2007.

Mavrakis, K. J., A. L. Wolfe*, et al.* Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Cell Biol, v.12, n.4, Apr, p.372-9. 2010.

Menendez, J. A. e R. Lupu. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer, v.7, n.10, Oct, p.763-77. 2007.

Meng, F., R. Henson*, et al.* MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology, v.133, n.2, Aug, p.647-58. 2007.

Mercer, T. R., M. E. Dinger*, et al.* Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet, v.10, n.3, Mar, p.155-9. 2009.

Mertens-Talcott, S. U., S. Chintharlapalli*, et al.* The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. Cancer Res, v.67, n.22, Nov 15, p.11001-11. 2007.

Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer; 2009.

Mitomo, S., C. Maesawa*, et al.* Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. Cancer Sci, v.99, n.2, Feb, p.280-6. 2008.

Negri, E., P. Boffetta*, et al.* Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Int J Cancer, v.124, n.2, Jan 15, p.394-401. 2009.

Nicoloso, M. S., H. Sun*, et al.* Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. Cancer Res, v.70, n.7, Apr 1, p.2789-98. 2010.

Nomura, D. K., J. Z. Long, *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. Cell, v.140, n.1, Jan 8, p.49-61. 2010.

Nottrott, S., M. J. Simard*, et al.* Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. Nat Struct Mol Biol, v.13, n.12, Dec, p.1108-14. 2006.

Olena, A. F. e J. G. Patton. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol, v.222, n.3, Mar, p.540-5. 2010.

Pantel, K. e R. H. Brakenhoff. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer, v.4, n.6, Jun, p.448-56. 2004.

Park, N. J., H. Zhou*, et al.* Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. Clin Cancer Res, v.15, n.17, Sep 1, p.5473-7. 2009.

Parkin, D. M., F. Bray*, et al.* Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, v.55, n.2, Mar-Apr, p.74-108. 2005.

Paroo, Z., X. Ye*, et al.* Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. Cell, v.139, n.1, Oct 2, p.112-22. 2009.

Polyak, K. e R. A. Weinberg. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer, v.9, n.4, Apr, p.265-73. 2009.

Raver-Shapira, N., E. Marciano*, et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. Mol Cell, v.26, n.5, Jun 8, p.731-43. 2007.

Reis, P. P., M. Tomenson*, et al.* Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. Mol Cancer, v.9, p.238. 2010.

Ren, J., D. Zhu*, et al.* Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. Eur J Cancer, v.46, n.18, Dec, p.3409-16. 2010.

Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones*, et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res, v.14, n.10A, Oct, p.1902-10. 2004.

Ryan, B. M., A. I. Robles*, et al.* Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer, v.10, n.6, Jun, p.389-402. 2010.

Saito, Y., G. Liang*, et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell, v.9, n.6, Jun, p.435-43. 2006.

Sampson, V. B., N. H. Rong*, et al.* MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. Cancer Res, v.67, n.20, Oct 15, p.9762-70. 2007.

Santarpia, L., M. Nicoloso*, et al.* MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. Endocr Relat Cancer, v.17, n.1, Mar, p.F51-75. 2010.

Sassen, S., E. A. Miska*, et al.* MicroRNA: implications for cancer. Virchows Arch, v.452, n.1, Jan, p.1-10. 2008.

Schetter, A. J., S. Y. Leung*, et al.* MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. JAMA, v.299, n.4, Jan 30, p.425-36. 2008.

Scott, P. A., D. R. Overby*, et al.* Comparative studies between species that do and do not exhibit the washout effect. Exp Eye Res, v.84, n.3, Mar, p.435-43. 2007.

Sharp, P. A. The centrality of RNA. Cell, v.136, n.4, Feb 20, p.577-80. 2009.

Silveira, N. J., L. Varuzza*, et al.* Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. BMC Med Genomics, v.1, p.56. 2008.

Slaughter, D. P., H. W. Southwick*, et al.* Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer, v.6, n.5, Sep, p.963-8. 1953.

Steeg, P. S. e D. Theodorescu. Metastasis: a therapeutic target for cancer. Nat Clin Pract Oncol, v.5, n.4, Apr, p.206-19. 2008.

Sun, B. K. e H. Tsao. Small RNAs in development and disease. J Am Acad Dermatol, v.59, n.5, Nov, p.725-37; quiz 738-40. 2008.

Suzuki, H. I., K. Yamagata*, et al.* Modulation of microRNA processing by p53. Nature, v.460, n.7254, Jul 23, p.529-33. 2009.

Takamizawa, J., H. Konishi*, et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res, v.64, n.11, Jun 1, p.3753-6. 2004.

Thomson, J. M., J. Parker*, et al.* A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nat Methods, v.1, n.1, Oct, p.47-53. 2004.

Tran, N., T. Mclean*, et al.* MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun, v.358, n.1, Jun 22, p.12-7. 2007.

Vandesompele, J., K. De Preter*, et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, v.3, n.7, Jun 18, p.RESEARCH0034. 2002.

Vasudevan, S., Y. Tong*, et al.* Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science, v.318, n.5858, Dec 21, p.1931-4. 2007.

Volinia, S., G. A. Calin*, et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.7, Feb 14, p.2257-61. 2006.

Wagner-Ecker, M., C. Schwager*, et al.* MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. Radiat Oncol, v.5, p.25. 2010.

Wightman, B., I. Ha*, et al.* Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.855-62. 1993.

Wong, T. S., X. B. Liu*, et al.* Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. Int J Cancer, v.123, n.2, Jul 15, p.251-7. 2008.

Wong, T. S., X. B. Liu*, et al.* Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. Clin Cancer Res, v.14, n.9, May 1, p.2588-92. 2008.

Wu, H., S. Zhu*, et al.* Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. Cell Res, v.19, n.4, Apr, p.439-48. 2009.

Yi, R., Y. Qin*, et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev, v.17, n.24, Dec 15, p.3011-6. 2003.

Zamore, P. D. e B. Haley. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. Science, v.309, n.5740, Sep 2, p.1519-24. 2005.

Zhang, W., J. E. Dahlberg*, et al.* MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. Am J Pathol, v.171, n.3, Sep, p.728-38. 2007.

Zhu, Y., X. Yu*, et al.* MicroRNA-21 is involved in ionizing radiation-promoted liver carcinogenesis. Int J Clin Exp Med, v.3, n.3, p.211-22. 2010.