

# **BIOTRANS**

Programa de Pós-Graduação em  
Biomedicina Translacional  
Mestrado e Doutorado



**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO-  
PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOMEDICINA TRANSLACIONAL**

**ANDRÉA BRAGA MOLERI**

**Análise da Expressão de microRNAs relacionados com a via  
Sonic Hedgehog em Carcinoma de Células Escamosas Oral**

**Duque de Caxias**

**2019**

**Andréa Braga Moleri**

**Análise da Expressão de microRNAs relacionados com a via  
Sonic Hedgehog em Carcinoma de Células Escamosas Oral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio- Professor José de Souza Herdy, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomédicas.

**Orientadores:** Professora Claudia Maria Pereira

Professor Vivaldo Moura Neto

Duque de Caxias

2019

## ANDRÉA BRAGA MOLERI

### **Análise da Expressão de microRNAs relacionados com a via Sonic Hedgehog em Carcinoma de Células Escamosas Oral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio-Professor José de Souza Herdy, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomédicas.

Aprovado em 11 /02/2019  
Banca Examinadora

---

Dra Claudia Maria Pereira (Universidade do Grande Rio)  
Orientadora

---

Dr Vivaldo Moura Neto (Universidade do Grande Rio)  
Orientador

---

Dr. Geraldo Brasileiro Filho (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Banca

---

Dra. Michelle Agostini (Universidade Federal do Rio de Janeiro)  
Banca

---

Dr. Plinio Mendes Senna (Universidade do Grande Rio)  
Banca

---

Dr. Paulo Andre da Silva (Universidade do Grande Rio)  
Banca

---

Dr. Rômulo Sperduto Dezone (Universidade do Grande Rio)  
Revisor

---

Dr. Edson Jorge Lima Moreira (Universidade do Grande Rio)  
Suplente Interno

---

Dra Valeria Pereira Ferrer (Instituto Estadual do Cérebro)  
Suplente Externo

Duque de Caxias  
2019

# BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em  
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Às nove horas do dia onze de fevereiro do ano de 2019, no Anfiteatro do Bloco D – no Campus I - Duque de Caxias da Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy - Urigranrio, realizou-se a Defesa da Tese de Doutorado intitulada "Análise da expressão de microRNAs relacionados com a via Sonic Hedgehog em carcinoma de células escamosas oral", de autoria de **Andréa Braga Moleri**, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação da Professora Dra. Claudia Maria Pereira e Professor Dr. Vivaldo Moura Neto. A sessão foi aberta pelo Prof. Dr. Paulo André da Silva, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Profa. Dra. Claudia Maria Pereira, Prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho, Profa. Dra. Michelle Agostini e Prof. Dr. Plínio Mendes Senna. Em seguida passou a palavra à candidata para apresentação de sua tese. Após apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

O presidente declarou a doutoranda **Andréa Braga Moleri**, APROVADA, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – Biotrans. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 11 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Claudia Maria Pereira  
Universidade do Grande Rio  
Orientadora.

Prof. Dr. Paulo André da Silva  
Universidade do Grande Rio  
Presidente

Prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Membro Examinador

Profa. Dra. Michelle Agostini  
Universidade Federal do Rio Janeiro  
Membro Examinador

Prof. Dr. Plínio Mendes Senna  
Universidade do Grande Rio  
Membro Examinador

Coordenadora Geral do Programa  
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

## AGRADECIMENTOS

Neste momento importante de minha vida, dirijo meu maior agradecimento a quem me deu a luz e correu os riscos de uma gravidez tardia para que eu viesse ao mundo. Hoje em dia, recebo a maravilhosa bênção de poder cuidar de minha querida Anezinha nos seus 94 anos de idade. Os seus exemplos foram os mais importantes na forja do meu caráter dentro da ética e da moral.

Ao dedicar os meus trabalhos de doutorado, relembro do início da estrada, há 28 anos, quando tive a oportunidade de conhecer o Professor Arody Cordeiro Herdy e, sem dúvida alguma, me enche de orgulho ter feito a caminhada junto com ele. Sempre comprometido com a educação, fez a instituição crescer e ser modelo representativo de qualidade, hoje com o nome de Universidade do Grande Rio-Professor José de Souza Herdy em justa homenagem ao patriarca da família. Professor Arody, permita-me copiar suas palavras: “Bebi da água de Duque de Caxias e aqui estou trabalhando com denodo e prazer”.

No princípio de tudo, cruzei meu caminho nesta Universidade com o da Professora Anadir Cordeiro Herdy que abraçou-me com sua ternura e apontou-me os caminhos que eu deveria trilhar na instituição. Seu apoio e suas sábias palavras são sempre importantes nos momentos de dificuldades que a carreira docente nos apresenta. Tenho a certeza absoluta que pelos desígnios de Deus você é a irmã fraterna que a vida me proporcionou.

Agradeço de forma muito carinhosa a todos os professores que fazem parte do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional na Unigranrio com os quais tive a oportunidade de conviver nestes últimos anos. Um curso de tão grande proposta inovadora desafia seus professores, a todo instante, a instigar seus alunos em uma tarefa que requer conhecimento, sabedoria e amor. Somente as pessoas diferenciadas são capazes de aceitar tamanho desafio. Por essas e muitas razões deixo aqui o meu reconhecimento pelo esforço de todos que tanta diferença fizeram no âmago de minha vida.

Dentro do contexto do curso que realizei, prefiro não adjetivar e citar nome por nome dos professores, pois não caberia em uma folha de agradecimentos e correria o risco de cometer falhas por omissões. Porém, torna-se mandatário registrar a fundamental importância do eminente Professor Emilio Antonio Francischetti, para o qual, roubo as palavras do filósofo Aristóteles e o chamo de sábio, pois “*ordena corretamente as coisas e as governam bem*”.

Refiro-me à Professora Virginia Genelhu de Abreu Francischetti para agradecer-lhe sua presença constante recebendo-nos, dirimindo dúvidas, orientando nossas atividades discentes e incentivando, de maneira muito terna, os nossos passos rumo à caminhada final para o doutorado.

Dentro da realidade dos fatos, é fundamental que o doutorando reconheça que outras pessoas viveram, acompanharam suas agruras e o ajudaram durante o curso. São os nossos orientadores. Neste momento, registro o meu eterno agradecimento à Professora

Claudia Maria Pereira que esteve sempre presente ao meu lado, não somente nas atividades do doutorado, mas também nas salas de aula repartindo os conteúdos da disciplina de Semiologia Geral e Aplicada. Estivemos unidas e plasmadas dentro do mais elevado espírito de fraternidade onde se divide para somar e crescer.

Paciência, comprometimento, amizade e competência são alguns dos adjetivos que representam a figura do Professor Rômulo Sperduto Dezone que tive a enorme satisfação de encontrar nos caminhos do doutorado. Foram horas à fio e dias intermináveis em que seguimos juntos na rotina laboratorial. Em alguns momentos, Rômulo estava tão comprometido com os requintes técnicos de seu trabalho que não media esforços em horas extenuantes de dedicação. Não foi por acaso que Deus me premiou com o seu encontro.

É com muito orgulho e plena de felicidade que como doutoranda tive o privilégio de ser orientada também pelo Professor Vivaldo Moura Neto, que por seus conhecimentos científicos transcendeu os limites territoriais do Brasil tornando-se referência mundial. É capaz de doar seu tempo precioso lendo e relendo textos, fazendo correções, encontrando os melhores caminhos para os resultados e exercendo liderança ao aglutinar esforços de diferentes profissionais. Vivaldo é um grande “maestro”!

Quero lembrar de todos os que participaram deste processo de construção, amigos do Programa de Pós-Graduação, funcionários desta instituição e familiares que estiveram comigo nesta trajetória tornando mais fácil e agradável o caminho.

Aos meus amigos, que conheço de longas datas e me socorrem quando oro e os chamo, me passando paz e tranquilidade para ter o equilíbrio necessário e vencer os desafios que a vida nos impõem. Agradeço de forma muito carinhosa e espero que Deus lhes aumente a luz cada vez mais.

Todos os meus esforços durante o curso de doutorado foram amenizados pela participação de importantíssimas pessoas que emprestaram com brilhantismo e sabedoria suas colaborações para que eu chegasse ao final deste trabalho. Neste contexto, agradeço profundamente ao Professor Evandro da Silva Freire Coutinho, a Professora Simone de Queiroz Chaves Lourenço, a Professora Carina Maciel da Silva Boghossian, a Pesquisadora Tânia Cristina Spohr e a Ana Beatriz Lima que sempre se disponibilizou a ajudar-me nas atividades laboratoriais.

Eu poderia simplesmente exaltar seus profundos conhecimentos e o incansável comprometimento dedicado aos seus pacientes. Você desperta em mim um turbilhão de sentimentos bons que me impulsionam para sempre seguir adiante. Lá se vão muitos anos, juntos, vividos em muitas etapas. São momentos diferentes que se somam e constroem um pouquinho mais de nós a cada instante. Você esteve em todas essas fases com suas palavras, muitas vezes traduzidas de um olhar silencioso e atento, sabedor da hora certa de falar e de se calar, reflexo de sua cumplicidade e amor. Obrigado Luiz Carlos Moreira por fazer parte da minha vida! Enfim, vamos seguir nesta caminhada e que venha a próxima etapa!

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é responsável por mais de 90% dos casos de câncer diagnosticados nesta região anatômica. A via Sonic Hedgehog é uma importante via embrionária associada tanto à progressão quanto ao prognóstico de várias neoplasias malignas, mas a compreensão a respeito do papel desta via neste tumor ainda não foi estabelecido. Já foi descrito que os microRNAs (miRNAs) podem interferir na via, agindo nos oncogenes ou genes supressores de tumor. Este estudo tem por objetivo investigar a via Shh nas amostras de CCEO, por meio da detecção do seu principal efetor, a proteína Gli1, e dos miRNAs relacionados a essa via. Com a finalidade de caracterizar a população do estudo, foi realizado primeiramente um estudo retrospectivo que avaliou as características demográficas e clinicopatológicas de 315 pacientes diagnosticados com CCEO na Clínica de Estomatologia no período de 2006 a 2016. Posteriormente, em um estudo prospectivo, a análise da proteína Gli1 foi conduzida em 15 amostras de CCEO por imuno-histoquímica, e a avaliação de três miRNAs (miR-17, -214 e -324) por PCR em tempo real foi feita em 20 amostras tumorais. Mais de 75% das células tumorais positivas para Gli1 foram observadas em 73,3% das amostras analisadas. Não foi encontrada associação entre Gli1 e as características clinicopatológicas dos pacientes. Foi encontrada uma diferença significativa na expressão de miR-17-5p no CCEO comparado ao grupo controle ( $p = 0,02$ ), o mesmo não foi observado para miR-214-5p e miR-324-5p. Entretanto, foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão de miR-214-5p e miR-324-5p nas amostras de CCEO ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,914$ ). Além disso, a expressão de miR-214 ( $p = 0,04$ ) e miR-324 ( $p = 0,02$ ) foi associada com o consumo de álcool. Como conclusões, este estudo demonstrou que a via Shh está ativada no CCEO, não havendo associação com os miRNAs analisados. miR-17-5p estava superexpresso no CCEO. miR-214-5p e miR-324-5p estavam correlacionados nos tumores e associados com a exposição ao etanol. Investigações adicionais envolvendo o principal componente da via Shh, Gli1, assim como miR-17, -214 e -324 poderão fornecer uma melhor compreensão sobre os mecanismos epigenéticos relacionados a fatores etiológicos, invasão e progressão no CCEO.

**Palavras-chave:** CCEO, Shh, Gli1, miRNA

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (CCEO) is responsible for 90% of the cases of cancer diagnosed in this anatomical region. The Sonic Hedgehog pathway is an important way to progress, while progressing on malignant neoplasms, but the understanding of the role of this tumor has not yet been established. It has been described which microRNAs (miRNAs) can interfere with the pathway, acting on the oncogenes or tumor suppressor genes. This study aims to investigate Shh pathway in OSCCs, by detecting its main effect, Gli1 protein, and the miRNAs related to this pathway. In order to characterize a population of the study, a retrospective study was carried out to evaluate the demographics and clinicopathology features of 315 patients diagnosed with OSCC at the Stomatology Clinic from 2006 to 2016. Subsequently, in a prospective study, a Gli1 analysis was conducted on 15 OSCC samples by immunohistochemistry, and the evaluation of three miRNAs (miR-17, -214 and -324) by real-time PCR was performed on 20 tumor samples. More than 75% of the Gli1 positive tumor cells were observed in 73.3% of the analyzed samples. No association was found between Gli1 and the clinicopathological characteristics. There is a significant difference in the expression of miR-17-5p in OSCC compared to healthy mucosa ( $p = 0.02$ ), however, there is no significant difference for miR-214-5p and miR-324-5p. In addition, a positive correlation was found between miR-214-5p and miR-324-5p expression, in OSCC ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.914$ ). Moreover, miR-214 ( $p = 0.04$ ) and miR-324 ( $p = 0.02$ ) expression was associated with alcohol consumption. In conclusion, this study demonstrated that Shh is activated in OSCC, but no association with miRNAs was observed. miR-17-5p was overexpressed in tumor samples. miR-214-5p and miR-324-5p were correlated and associated with exposure to ethanol in OSCC. Additional investigations of Shh pathway, as well as miR-17, -214 and -324 is important for highlighting the epigenetic components related to etiological factors, invasion and progression of OSCC.

**Keywords:** OSCC, Shh, Gli1, miRNA



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspecto clínico do carcinoma de células escamosas oral	16
Figura 2. Diagrama das alterações celulares individuais encontradas na displasia epitelial	17
Figura 3. Diagrama das alterações arquiteturais do epitélio displásico	17
Figura 4. Ativação e interação da via Sonic hedgehog com outras vias de sinalização baseado nos estudos de tumores no cérebro	21
Figura 5. GSK-3 $\beta$ , uma quinase multifuncional que atua em diversas vias de sinalização que regulam o destino celular	22
Figura 6. Biogênese dos miRNAs	25
Figura 7. Controle da via Shh por miRNAs em meduloblastomas	27
Figura 8. Descrição do cluster miR-17-92	28
Figura 9. Desenho esquemático mostrando a ativação de miR-17-5p	28
Figura 10. Características histopatológicas do CCEO	44
Figura 11. Características do CCEO no paciente CCE7	45
Figura 12. Imuno-histoquímica em mucosa normal e células tumorais para a proteína Gli1 da via Shh	46
Figura 13. Expressão de Gli1 em carcinoma de células escamosas oral por imunofluorescência	47
Figura 14. Expressão dos miRNAs por qPCR com todas as amostras	50
Figura 15. Expressão dos miRNAs por qPCR sem as amostras CCE4 e CCE7	50
Figura 16. A associação entre miR-214-5p e miR-324-5p e o consumo de álcool	51
Figura 17. Correlação entre o nível de expressão de miR-214-5p e miR-324-5p	53
Figura 18. A via Sonic Hedgehog e miR-17-5p no contexto do CCEO	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sócio demográficas e clínicopatológicas dos pacientes com CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2006 a 2016	42
Tabela 2. Características demográficas e clinicopatológicas dos 20 pacientes com carcinoma de células escamosas oral	43
Tabela 3. Expressão de Gli1 por imuno-histoquímica em 15 amostras de CCEO GLI1	46
Tabela 4. Expressão dos miRNAs e imuno-histoquímica	49
Table 5. Análise da expressão de miRNAs com fatores de risco e características clinicopatológicas	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AKT:** Protein kinase B

**APC:** Adenomatous polyposis coli

**BCL-2:** B-cell lymphoma 2

**CCEO:** Carcinoma de células escamosas oral

**CCEOCP:** Carcinoma de células escamosas oral de cabeça e pescoço

**CEP:** Comitê de ética em pesquisa

**CK1:** Caseína cinase 1

**CTTs:** Células-tronco tumorais

**DSH:** Dishevelled

**EGF:** Epidermal Grow Factor

**EGFR:** Epidermal Grow Factor Receptor

**EMT:** Transição Epitélio-Mesenquimal

**ERK:** Extracellular signal-regulated kinase

**ETS1:** E26 transformation-specific 1

**FZD:** Frizzled

**GCO:** Global Cancer Observatory

**GBMs:** Glioblastomas

**GLI:** Glioma-associated oncogene

**HACC:** Hospital AC Camargo

**HCC:** Carcinoma hepatocelular

**H&E:** Hematoxilina e eosina

**HPV:** Human Papiloma Virus

**IEC:** Instituto Estadual do Cérebro

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**JAK:** Janus Kinases

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**LADO:** Laboratório de Apoio ao Diagnóstico Oral

**LABA:** Laboratório de Anatomopatologia

**LEF/TCF:** Lymphoid enhancer factor/T cell factor

**LRP:** Low density lipoprotein receptor-related protein

**MAPK:** Mitogen activated protein kinase

**miRNAs:** MicroRNAs  
**MMP:** Metaloproteinases  
**MSKCC:** Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
**mTOR:** Mammalian Target of Rapamycin  
**OMS:** Organização Mundial de Saúde  
**PI3K:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase  
**PTCH:** Protein patched homolog 1  
**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog  
**qPCR:** Reação em cadeia de polimerases quantitativa  
**SEER:** Surveillance, Epidemiology, and End Results Program  
**SFRP:** Secreted frizzled-related protein 1  
**SHH:** Sonic Hedgehog  
**SMO:** Smoothened  
**SP1:** Specificity protein 1  
**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription  
**TGF - $\beta$ :** Transforming Grow Factor- $\beta$   
**TNM:** Tamanho Nódulo Metástase  
**UICC:** União Internacional Contra o Câncer  
**UFRJ:** Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
**UNIGRANRIO:** Universidade do Grande Rio  
**WHO:** World Health Organization  
**WNT:** Wingless Homeobox Genes 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	O carcinoma de células escamosas oral	14
1.2	A via de sinalização Sonic Hedgehog	19
1.3	Interação da via Sonic Hedgehog com outras vias moleculares	20
1.3.1	Interação da via Sonic Hedgehog com a via Wnt/ $\beta$ catenina	20
1.3.2	Interação da via Sonic Hedgehog com a via EGFR	22
1.4	A importância da via Sonic Hedgehog em carcinoma de células escamosas oral	23
1.5	A via Sonic Hedgehog e os miRNAs	24
1.5.1	miRNAs, os RNAs não codificantes	24
1.5.2	miRNAs e tumores	25
1.5.3	miR-17-5p	27
1.5.4	mirR-324-5p	29
1.5.5	miR-214-5p	30
<b>2</b>	<b>Qual a importância da investigação deste tema de tese?</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1	Objetivo principal	33
3.2	Objetivos específicos	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	População de estudo	33
4.2	Análises histopatológicas	
4.2.1	Diagnóstico e histopatologia da carcinoma de células escamosas oral	35
4.2.2	Análise da expressão de Gli1 por Imuno-histoquímica	36
4.2.3	Análise da expressão de Gli1 por Imunofluorescência	37
4.2.4	Análise pelo Ácido Periódico de <i>Schiff</i>	37
4.3	Análise dos miRNAs	38
4.3.1	Seleção dos miRNAs candidatos	38

4.3.2	Avaliação do nível de expressão dos miRNAs por qPCR	38
4.4	Análises estatísticas	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
5.1	Caracterização dos pacientes atendidos na Clínica de Estomatologia da Unigranrio	41
5.2	Caracterização da amostra para estudo molecular e histopatológico	41
5.3	Análise histopatológica	44
5.4	Análise da expressão de Gli1 com Imuno-histoquímica em carcinoma de células escamosas oral	45
5.5	Análise da expressão de Gli1 com Imunofluorescência em carcinoma de células escamosas oral	47
5.6	Análise da expressão de miR-17-5p, miR-324-5p e miR-214-5p nos pacientes em CCEO	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICES</b>	
Apêndice I	Artigo: Association between miR-324-5p and miR-214-5p with alcohol consumption in oral squamous cell carcinoma	
Apêndice II	Artigo: Association between miR-324-5p and miR-214-5p with alcohol consumption in oral squamous cell carcinoma	
Apêndice III	Apresentação de pôster intitulado “miRNAs e a via Sonic Hedgehog no câncer oral” no X Congresso Franco Brasileiro de Oncologia	
Apêndice IV	Apresentação de trabalho intitulado “Evaluation of miRNAs related to the Sonic Hedgehog pathway in oral cancer” no 44º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral	
Apêndice V	Apresentação de pôster intitulado “Evaluation of miRNAs and Gli1 expression in oral cancer” no XI Simpósio Oncobiologia	

Apêndice IV Apresentação de painel intitulado “Avaliação da expressão de miRNAs e Gli1 no câncer oral” no III Simpósio Internacional de Estomatologia e Patologia Cirúrgica dos Maxilares

**ANEXOS**

- Anexo I Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo III Ficha Clínica para o Projeto de Pesquisa
- Anexo IV Sistema TNM- Classificação clínica
- Anexo V Quantificação do RNA total extraído das amostras

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer é considerado um importante problema de saúde pública devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (GUPTA *et al.*, 2016). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), subiu para 18,1 milhões o número de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes em 2018 (*International Agency for Research on Cancer*). A OMS estima para o ano 2030 um total de 27 milhões de novos casos de câncer com 17 milhões de óbitos e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer (OMS, 2016). No Brasil, de acordo com o último registro no DATASUS publicado em 2011, o câncer foi a segunda maior causa de morte por doença no país, sendo as alterações relacionadas ao aparelho circulatório a principal causa de morte no período avaliado (DATASUS - MS, 2016). Para o ano de 2018/2019 as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para a ocorrência de 600.000 novos casos de câncer e deste total, 14.700 dos casos são originários na cavidade oral (INCA, 2017).

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tumor maligno mais comum em região de cabeça e pescoço nos países em desenvolvimento e o mais estudado nas últimas décadas. A taxa de recorrência nos dois primeiros anos é de 80% (DE CECCO *et al.*, 2015) e mesmo os tumores que ainda não produziram metástases no momento do diagnóstico podem apresentar um mau prognóstico (DOSHI *et al.*, 2011). Contudo, o avanço tecnológico permitiu identificar alterações genômicas e epigenômicas relacionadas com a proliferação, apoptose e ciclo celular trazendo uma melhor compreensão sobre o comportamento clínico heterogêneo deste tumor abrindo caminho para tratamentos com drogas-alvo individualizados (DE CECCO *et al.*, 2015; WALTER *et al.*, 2013). Neste contexto, estudos recentes propõem uma classificação de subtipos de CCE de cabeça e pescoço baseada nas características biológicas principais e vias de sinalização desreguladas considerando além do subtipo clássico, a resposta imune, inflamatória, associação com papilomavírus humano (HPV), associação com hipóxia e transição epitélio-mesenquimal, sendo esses dois últimos considerados mais agressivos. (DE CECCO *et al.*, 2015).



## 1.1 O Carcinoma de Células Escamosas Oral

Dentre os tipos de câncer mais incidentes, o câncer de lábio e da cavidade oral ocuparam a 18ª posição no *ranking* mundial, totalizando 354.864 casos em 2018 (*International Agency for Research on Cancer*). Nos Estados Unidos, o Instituto Nacional do Câncer estimou 51.540 novos casos de câncer oral e de orofaringe, totalizando 10.030 mortes provocadas por este tipo câncer em 2018.

No Brasil, o câncer oral é o quinto tipo que mais afeta a população masculina, geralmente acima dos 40 anos, e o 12º mais frequente entre as mulheres, perfazendo uma proporção homem: mulher de 3,31:1 (INCA, 2017). Em 2015, foram registrados 2.945 casos de morte por câncer de cavidade oral (INCA, 2018). Porém, a estimativa do Ministério da Saúde é de 11.200 novos casos em homens e 3.500 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019.

O consumo do tabaco e álcool são os principais fatores de risco para o câncer em várias localizações, incluindo a cavidade oral. O tabaco fumado contém um grande número de compostos mutagênicos e carcinogênicos, incluindo carboidratos policíclicos, nitrosaminas e nicotina, (PAUMGARTTEN *et al.*, 2017). Embora o etanol por si só possua um fraco potencial carcinogênico, o acetaldeído, seu primeiro metabólito, é mutagênico e carcinogênico, pois forma adutos estáveis com o DNA (LOUREIRO, *et al.*, 2002). Por essa razão, o consumo concomitante do tabaco e do álcool tem um importante efeito sinérgico, ou seja, um intensifica a ação do outro. Alguns estudos realizados no Brasil confirmaram essa ação sinérgica mostrando uma forte associação entre o uso concomitante do tabaco e do álcool com o desenvolvimento do CCE de cabeça e pescoço (AKANUMA *et al.*, 1999; KOWALSKI *et al.*, 2005; SHAH *et al.*, 1995;).

Nos últimos 20 anos, cresce o interesse pelo HPV (sigla que vem do inglês, Human Papilloma Virus) por sua possível relação com a patogênese de tumores malignos. Em 1983, Syrjänsen publicou o primeiro trabalho sugerindo que o HPV pudesse estar envolvido com o desenvolvimento do CCEO devido às semelhanças morfológicas entre a mucosa oral e do colo de útero (SYRJÄNEN *et al.*, 1983). Na última década foi registrado um maior número de casos de CCE em orofaringe em homens brancos com menos de 50 anos sem histórico de consumo de álcool ou tabaco. Entretanto, este tipo de tumor está associado à infecção pelo HPV subtipo 16, o mais prevalente nesta localização. O câncer de orofaringe HPV-positivo parece responder melhor ao tratamento com quimioterapia e radioterapia do que a doença negativa ao HPV (MARUR *et al.*, 2010).

O CCEO é o tumor maligno mais frequente na cavidade oral, compreendendo aproximadamente 90% das neoplasias que incidem nesta região (AKANUMA *et al.*, 1999; SCULLY e PORTER, 2000; SHAH e LYDIATT, 1995). O tumor se origina de lesões pré-malignas como a leucoplasia, a eritroplasia ou leucoreitroplasia, as quais adquirem aspecto ulcerado, com bordas elevadas e endurecidas ou se tornam lesões vegetantes de superfície verrucosa. Inicialmente, o tumor é assintomático e em estágios avançados provoca sintomatologia intensamente dolorosa somado à linfonodomegalia cervical, dificuldade de mastigação, deglutição (disgeusia) e de fonação (disfonia) (MARKOPOULOS *et al.*, 2012). Em cerca de 50% dos casos, o CCEO se desenvolve na borda lateral da língua e no assoalho bucal, seguindo-se outros sítios anatômicos como região retromolar, gengiva, mucosa jugal e palato duro (VAN ZYL *et al.*, 2012).



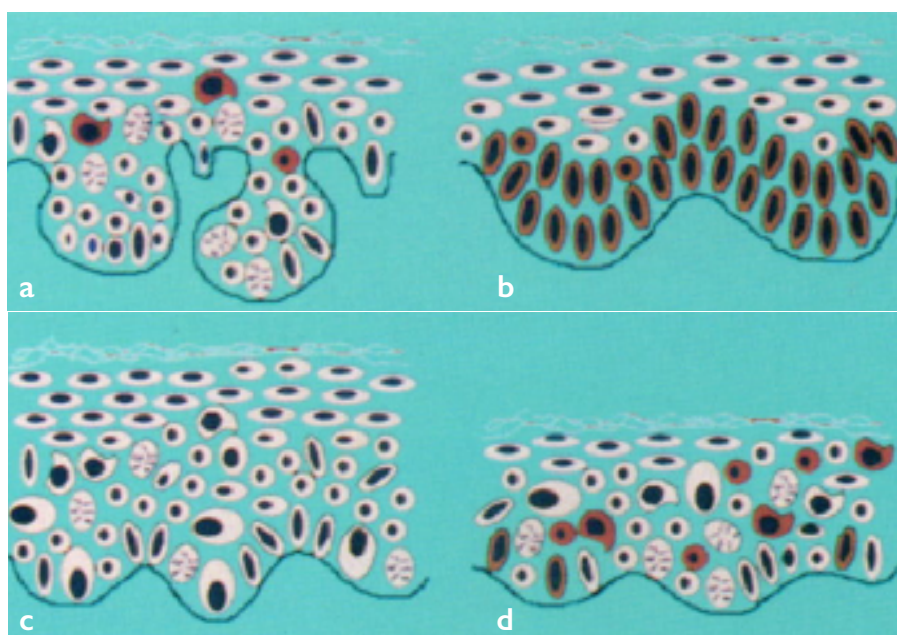
**Figura 1. Aspecto clínico do carcinoma de células escamosas oral.** O paciente apresentava uma úlcera profunda endurecida com margens irregulares em borda lateral de língua (Fotografia gentilmente cedida pelo professor Luiz Carlos Moreira).

O diagnóstico do CCEO baseia-se no exame clínico, seguido de análise histopatológica para a confirmação do diagnóstico (**Figuras 2 e 3**). Tumores que produzem quantidade de ceratina significativa e lembram o epitélio escamoso estratificado normal são considerados bem-diferenciados. Quando o tumor produz pouca ou nenhuma ceratina, mas ainda lembra o epitélio de origem, são considerados moderadamente diferenciados. Os tumores que se distanciam desses parâmetros mencionados, perdem a arquitetura epitelial normal e a coesividade entre as células, são considerados pouco-diferenciados. O exame histopatológico do CCE analisa o grau de diferenciação, o pleomorfismo celular e nuclear, o padrão de

invasão, a atividade mitótica e a resposta imunológica (BRYNE *et al*, 1989; BRYNE *et al.*, 1992; BARNES *et al.*, 2005).



**Figura 2. Diagrama das alterações celulares individuais encontradas na displasia epitelial.** A gravidade da displasia epitelial é determinada, em parte, pela freqüência e combinação dessas alterações: **a**, nucléolo proeminente; **b**, hipercromasia; **c**, pleomorfismo nuclear; **d**, relação núcleo citoplasma alterada; **e**, maior número de mitoses; **f**, mitoses atípicas; **g**, multinucleação (Diagrama adaptado de Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. St. Louis: Mosby-Year Book; 1997).



**Figura 3. Diagrama das alterações arquiteturais do epitélio displásico.** A gravidade da displasia epitelial é determinada pela extensão dessas alterações combinada às alterações celulares individuais: **a**, cristas epiteliais bulbosas; **b**, hiperplasia do estrato basal; **c**, hiperplasia celular; **d**, padrão de maturação alterado. O carcinoma de células escamosas se desenvolve a partir de um epitélio displásico exibindo graus variados de pleomorfismo celular que forma ilhas e cordões invasivos de células escamosas epiteliais malignas (Diagrama adaptado de Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. St. Louis: Mosby-Year Book; 1997).

A escolha do tratamento do CCEO depende das condições gerais do paciente e do sistema TNM, que registra o tamanho do tumor (T), em centímetros; acometimento dos linfonodos e sua extensão (N); e a presença ou ausência de metástases distantes (M). (LYDIATT *et al.*, 2017). Esse sistema foi criado na França, em 1952, por Pierre Denoix para classificar tumores malignos e passou a ser usado pela UICC (*International Union against Cancer e American Joint Committee on Cancer*) a partir de 1982, para padronizar a linguagem oncológica.

O tratamento do CCEO é geralmente multidisciplinar e inclui a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, que podem ser realizadas em combinação (LYDIATT *et al.*, 1995, MAGHAMI *et al.* 2018). O diagnóstico tardio resulta em debilitações e deformidades severas devido à realização de cirurgias mutilantes frequentemente associadas com a ressecção ampla de estruturas orais e faciais. O diagnóstico precoce e o manejo adequados do CCEO são necessários para uma melhor qualidade de vida e aumento da taxa de sobrevida (FALAKI *et al.*, 2011). Contudo, o CCEO é, na maioria das vezes, diagnosticado em fases avançadas, constituindo assim, um grande problema de saúde pública (MASSANO *et al.*, 2006). A sobrevida de cinco anos para o carcinoma de células escamosas (CCE) varia de 81% para pacientes com doença localizada na cavidade oral, a 42% para aqueles com doença presente nos linfonodos regionais, caindo para 17% quando metástases à distância estão presentes. Geralmente menos de 50% dos pacientes portadores de câncer oral e orofaringe sobrevivem por mais de cinco anos (FEDELE *et al.*, 2009).

Apesar do enorme avanço nas pesquisas nas últimas décadas que levaram ao desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e radioterápicas, além de novos agentes quimioterápicos, não se observou a longo prazo, nenhuma alteração na sobrevida dos pacientes portadores de CCEO (KALYANKRISHNA e GRANDIS, 2006).

**Vias de transdução de sinais e tumorigênese:** A identificação das vias de transdução de sinais relacionadas com o desenvolvimento dos diferentes tipos de câncer e sua interação em redes de comunicação intracelular surgem neste cenário com importantes implicações clínicas. Nas células tumorais, a ativação de produtos oncogênicos ou a perda de produtos de genes supressores tumorais provoca mudanças significativas no contexto de sinalização das redes de integração de sinal. É possível que exista uma dependência progressiva da célula tumoral frente às vias de sinalização. A caracterização dessas vias e a possibilidade de desenvolver novos medicamentos que possam interferir com a sinalização dessas vias é a base da terapia alvo-dirigida. Nesse contexto, tumores com características morfológicas muito semelhantes, em indivíduos distintos, podem depender da ativação de vias distintas de transdução de sinais. (HANAHAN *et al.*, 2011). Recentemente, uma importante via embrionária, a via *Sonic Hedgehog* (Shh), vem sendo descrita no CCEO e a expressão dos componentes desta via, principalmente o fator de

transcrição Gli1 tem sido associado com o mecanismo de invasão e metástase no CCEO (FAN *et al.*, 2014) podendo contribuir para um pior prognóstico no CCEO.

## 1.2 A via de sinalização *Sonic Hedgehog*

Shh é um morfógeno e foi inicialmente descrito em *Drosophila melanogaster*. Estudos publicados têm relatado que a via de sinalização de *hedgehog* possui um importante papel na proliferação e diferenciação de determinadas células- tronco durante o desenvolvimento embrionário. Em humanos, homólogos de *hedgehog* têm sido identificados incluindo *Sonic hedgehog*, *Indian hedgehog* e *Desert hedgehog*. Estas moléculas se ligam ao receptor de membrana *Patched* (PTCH) para promover a translocação e ativação da família de proteínas GLI (GLI1, GLI2 e GLI3), as quais facilitam a transcrição de diversos genes-alvo, incluindo aqueles que controlam o ciclo celular, migração celular, angiogênese e apoptose (RIMKUS *et al.*, 2016).

A ativação da via Shh pode ocorrer por via canônica ou por via não-canônica. A sinalização canônica intracelular de Shh em células-alvo é realizada através da ação recíproca entre duas proteínas: Patched1 (PTCH1) e Smoothened (Smo). A proteína transmembrana PTCH1 funciona como receptor para Shh, mas ela própria não ativa a sinalização intracelular. Essa função é executada por uma outra proteína transmembrana denominada Smo. Na ausência de Shh, PTCH1 suprime a atividade de Smo, porém quando Shh se liga a PTCH1, Smo deixa de ser reprimido por PTCH1 sendo capaz de ativar os mediadores intracelulares da família Gli (**Figura 4**). (CARBALLO *et al.*, 2018).

A via Sonic Hedgehog pode ser controlada pelo Supressor de Fused (SUFU). Este regulador negativo da via atua sobre os fatores de transcrição Gli. Quando o ligante Sonic não está presente, SUFU se liga diretamente às proteínas Gli1, Gli2 e Gli3 inibindo a translocação dessas proteínas para o núcleo e, evitando a ativação da via (GONNISSEN *et al.*, 2015; KOGERMAN *et al.*, 1999). A proteína Gli (Gli1, Gli2 and Gli3), atua como fator de transcrição ativando genes envolvidos no feedback da via Shh ( Gli1 e PTCH1) bem como na proliferação (Ciclina D1 e Myc), apoptose (Bcl-2) (HUI *et al.*, 2011), angiogênese (ANG1/2) (LEE *et al.*, 2007), transição epitélio mesenquimal (SNAIL) e autorenovação em células tronco (NANOG e SOX2) (Neelakantan *et al.*, 2018). A expressão da proteína Gli1 constitui um bom marcador para demonstrar a atividade desta via (DIAO *et al.*, 2014).

### 1.3 Interação da via *Sonic Hedgehog* com outras vias moleculares

#### 1.3.1 Interação da via *Sonic Hedgehog* com a via Wnt/ $\beta$ -catenina

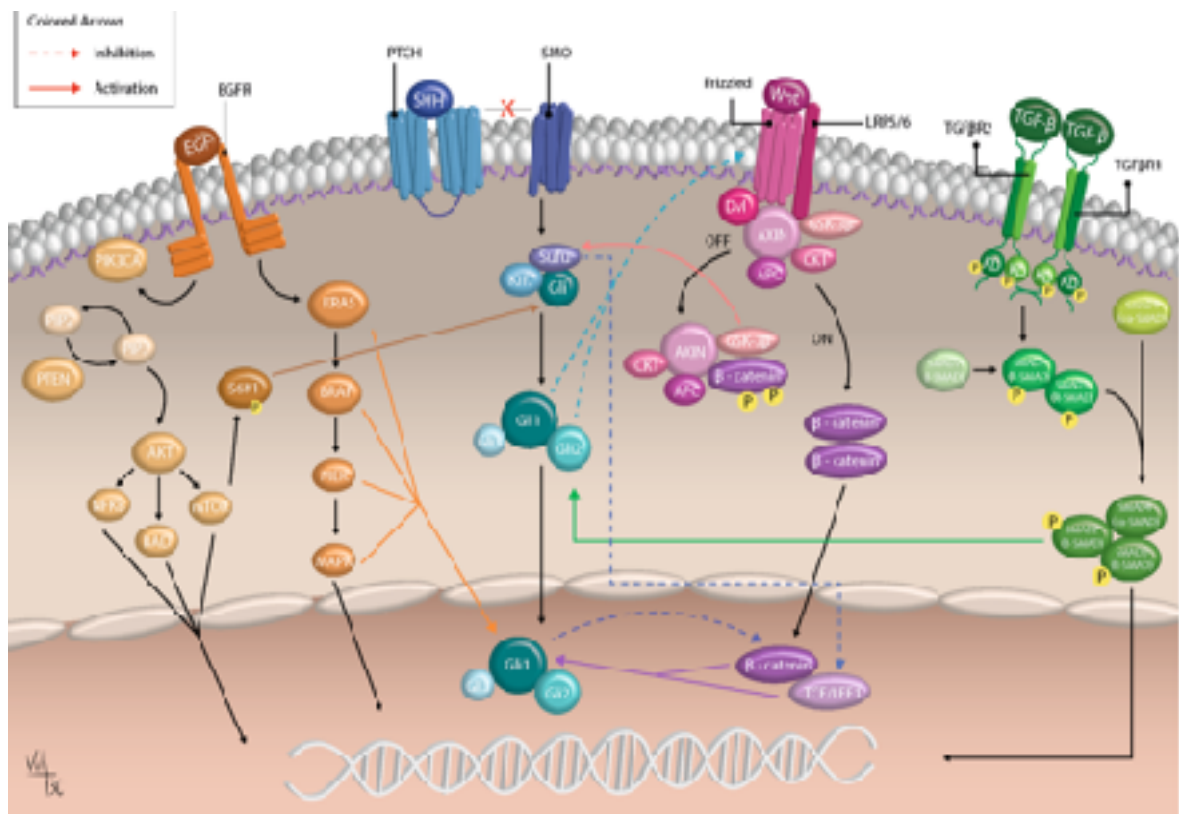
A interação da via Shh com outras vias, tais como EGFR, AKT-PI3K e Wnt é descrita em diversos estudos (CARBALLO *et al.*, 2018; MAEDA *et al.*, 2006), podendo conferir benefícios para uma célula tumoral aumentando a sua capacidade de proliferação, invasão e metástase (SANTONI *et al.*, 2013).

A sinalização Wnt controla diversos processos celulares como a proliferação, diferenciação, apoptose, invasão e transição epitélio-mesenquimal (REYA e CLEVERS, 2005; NAGINI *et al.*, 2018). Nesta via,  $\beta$ -catenina atua como co-ativador transcricional e sua atividade no citoplasma depende do *status* da ativação da via Wnt. Shh pode atuar inibindo a via Wnt através das proteínas Gli1 e Gli2 inibindo os ligantes e/ou receptores da via Wnt (HE *et al.*, 2006). Além disso, estudos *in vitro* com células de câncer de cólon mostraram que a hiperexpressão de SUFU reduziu a transcrição de genes-alvo dependentes de  $\beta$ -catenina nuclear, sugerindo que SUFU possa atuar como um regulador negativo da sinalização de Wnt (CARBALLO *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2001). Enquanto esses estudos mostram a atuação inibidora da via Shh sobre a via Wnt, outros estudos, de forma inversa, evidenciaram que a sinalização Wnt pode aumentar a atividade da via Shh através de  $\beta$ -catenina, melhorando a atividade transcricional de Gli1 de forma independente, através de TCF/LEF (CARBALLO *et al.*, 2018; MAEDA *et al.*, 2006;) (**Figura 4**).

A interação entre os componentes das duas vias de sinalização podem ter efeitos opostos ou sinérgicos dependendo do tipo celular (MAEDA *et al.*, 2006; MORRIS e HUANG, 2016). É possível que a hiperexpressão de Gli1 possa induzir o deslocamento de  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo levando à proliferação celular (LIAO *et al.*, 2009). Enquanto a perda da sinalização de  $\beta$ -catenina leva ao aumento de função na sinalização Shh em câncer de cólon (VARNAT *et al.*, 2009), a interação física entre  $\beta$  catenina com Gli1 leva à degradação do Gli1 suprimindo a sinalização Shh em meduloblastoma (ZINKE *et al.*, 2015).

No contexto da interação entre as vias Shh e Wnt, torna-se necessário mencionar a importância da proteína Glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), que foi descoberta como uma quinase relacionada com o metabolismo do glicogênio e homeostase da glicose. Estudos adicionais através da via Wnt e outras vias de sinalização (FRAME *et al.*, 2001), identificaram outras funções, tais como controlar

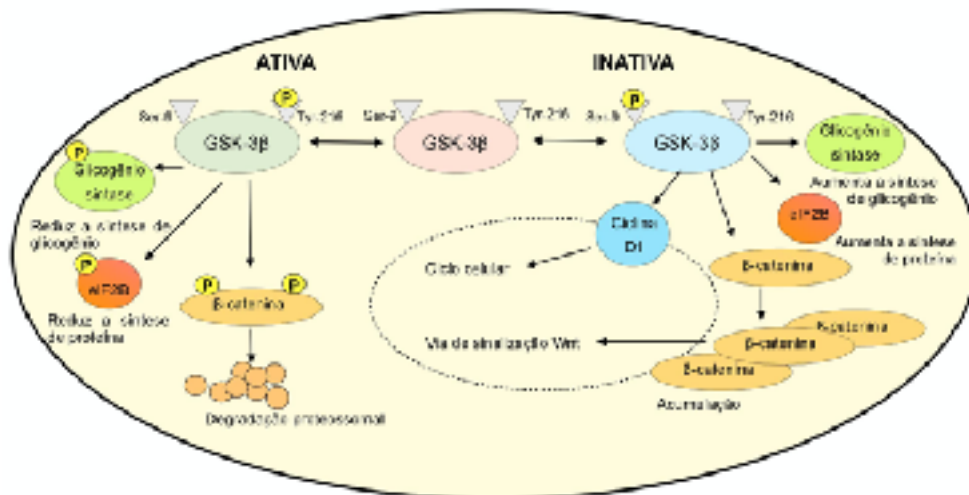
diferenciação, crescimento e proliferação celular, progressão do ciclo celular e apoptose (COHEN *et al.*, 2001; GRIMES *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 2009).



**Figura 4. Ativação e interação da via Sonic hedgehog com outras vias de sinalização baseado nos estudos de tumores no cérebro.** A ativação da via ocorre quando Shh liga-se à PTCH na membrana celular. Em resposta a esta ligação, PTCH deixa de inibir Smo, que inicia uma cascata de sinalização *downstream*. A ativação de Gli promove a sua translocação para o núcleo e, por conseguinte, a ativação de genes-alvo. A via Shh pode ser controlada negativamente por SUFU, o qual se liga diretamente à Gli inibindo sua translocação para o núcleo. A via Shh interage com outras vias especialmente EGF, Wnt e TGF- $\beta$ . Na ausência do ligante Wnt, a  $\beta$ -catenina citoplasmática é fosforilada pela glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) dentro de um complexo de destruição que também inclui a Axin, APC e CK1. Quando o ligante Wnt se liga ao seu receptor Frizzled (Fzd) e LRP, o complexo de destruição é desestabilizado. Dessa forma, a  $\beta$ -catenina acumula-se no citoplasma e transloca-se para o núcleo, onde interage com LEF/TCF para induzir a expressão de genes como c-Myc e ciclina D1 (VALENTA *et al.*, 2012; PERSAD *et al.*, 2016). A via de sinalização Shh está representada em azul, a via EGF em laranja, a via Wnt em roxo e a via TGF- $\beta$  em verde. As setas pontilhadas indicam inibição e as setas contínuas indicam ativação. (Fonte: CARBALLO *et al.* in Cell Communication and Signaling, 2018).(Adaptado de Matias *et al.*, 2017; Berg and Soreide, 2012 and <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/TGF-beta-signaling>).

A translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo estimulando a expressão de genes-alvo pode ser regulada negativamente por GSK3- $\beta$ , que a estabiliza no citoplasma e reprime a sua translocação. (KIKUCHI *et al.*, 2000). Por uma via não-canônica, a via Wnt estabelece *crosstalk* com a via *Sonic Hedgehog* e ambas podem ser moduladas negativamente por GSK3- $\beta$ . Foi demonstrado, em câncer de endométrio, que GSK3- $\beta$  regula a ligação física que  $\beta$ -catenina faz com Gli1 formando um complexo neste

tipo de tumor (LIAO *et al.*, 2009). O controle negativo da proteína GSK3 $\beta$  sobre as duas vias é através da fosforilação de Gli1 e  $\beta$ -catenina que sofrem degradação proteossomal (**Figura 5**) (NOUBISSI *et al.*, 2009; ROSSI *et al.*, 2011; ZINKE *et al.*, 2015). Por outro lado, a proteína GSK pode fosforilar SUFU, permitindo a liberação de SUFU de Gli; e conseqüentemente, levando à ativação da via Shh (CARBALLO *et al.*, 2018; TAKENAKA *et al.*, 2007).



**Figura 5. GSK-3 $\beta$ , uma quinase multifuncional que atua em diversas vias de sinalização que regulam o destino celular.** A fosforilação no sítio Tyr-216 aumenta a atividade de GSK-3 $\beta$ , que fosforila alvos como  $\beta$ -catenina, a qual é degradada pelo sistema ubiquitina-proteossomo; reduz a síntese de glicogênio inativando a enzima glicogênio sintase; reduz a síntese de proteínas inativando eIF2B. A atividade enzimática de GSK-3 $\beta$  pode ser atenuada pela fosforilação no sítio Ser-9, que estabiliza e acumula  $\beta$ -catenina citoplasmática, a qual migra para o núcleo onde regula a expressão gênica. GSK-3 $\beta$  também controla o ciclo celular pela fosforilação de ciclina D1 (Desenho esquemático de Moleri AB).

### 1.3.2 Interação da via Sonic Hedgehog com a via EGFR

Apesar do ligante Shh constituir o mecanismo básico de ativação canônica da via Shh em tecidos embrionários, já foi descrito que essa ativação pode ser mediada pela via EGFR em tumores malignos. Estudos demonstraram que em células tumorais, as proteínas AKT e MEK (componentes na via EGFR) foram capazes de influenciar a translocação de Gli1 para o núcleo, possibilitando a sua ação transcricional (RÍOBÓ *et al.*, 2006; SCHINIDAR *et al.*, 2009) (**Figura 5**). O fator de crescimento epidermal (EGF), ao se ligar ao receptor de membrana EGFR, ativa uma cascata de transdução de sinais que modela o crescimento celular (CITRI e YARDEN, 2006; YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001). Após essa ligação, o receptor sofre dimerização ativando diferentes cascatas de sinalização: Ras-Raf-MAPK,



PI3K-PTEN-AKT-mTOR e STAT. Alterações nesta via de sinalização estão associadas a potencial replicativo ilimitado, sobrevivência, angiogênese e potencial metastático (BIANCO *et al.*, 2007; BOSSI *et al.*, 2016). Vários estudos demonstram que a hiperexpressão de EGFR está correlacionada com baixa sobrevivência, maior risco de recorrência, estadiamento avançado e maior risco de metástase em diferentes tipos de câncer (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; BIANCO *et al.*, 2007; ROBERTS e DER, 2009).

#### **1.4 A importância da via *Sonic Hedgehog* em carcinoma de células escamosas oral**

Durante a embriogênese na cavidade oral, a via Shh controla a proliferação, diferenciação e polaridade das células do epitélio do órgão do esmalte, e conseqüentemente, a própria morfogênese do órgão dentário (GRITLI-LINDE *et al.*, 2001). Entretanto, a desregulação da sinalização de *hedgehog* está implicada na tumorigênese de vários tecidos, inclusive na cavidade oral. Embora os mecanismos que regulam a expressão dos genes que sinalizam Shh não estejam bem-compreendidos, os níveis de GLI-1 e PTCH-1 parecem estar aumentados no câncer.

Estudos recentes mostram a associação entre a expressão dos principais componentes da via Shh com o desenvolvimento do CCEO, enfatizando especialmente o envolvimento desta via de sinalização com a presença de metástases regionais, recidiva do tumor (FAN *et al.*, 2014, HUAITONG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2012,) e prognóstico desfavorável (WANG *et al.*, 2012). Yan *et al.*, em 2011 examinaram 136 amostras de pacientes com CCEO por imuno-histoquímica e correlacionaram a expressão de Gli1 e Gli2 com os parâmetros clinicopatológicos e desfechos clínicos dos pacientes. Foram utilizados GANT e ciclopamina, inibidores da via Shh, para testar a participação da via no desenvolvimento do tumor. O estudo mostrou que Gli2 foi expresso em 60 das 136 amostras de CCEO estando significativamente associado a resultados clínicos desfavoráveis como baixa sobrevida de 5 anos. A inibição da expressão de Gli retardou o crescimento celular, aumentou a apoptose e inibiu a migração de células malignas (YAN *et al.*, 2011).

Além dos aspectos anteriormente citados, vale ressaltar a importância da angiogênese, que representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral por fornecer aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes e estabelecer condições favoráveis à disseminação metastática (VISANI *et al.*, 2015).

Huaitong *et al.* conduziram um estudo para investigar a importância da via *Sonic Hedgehog* na angiogênese em CCEO. A análise de Shh e Gli1 foi analisada em tumores primários e linfonodos metastáticos em amostras de 80 pacientes. Os resultados mostraram que microvesículas são liberadas por células de câncer bucal aumentando a angiogênese das células endoteliais através da via de sinalização Shh. Mais uma vez, a expressão de Shh foi associada positivamente com o estágio TNM, recidiva tumoral e metástase linfonodal (HUAITONG *et al.*, 2017). Apesar da importância da via Shh na carcinogênese oral, os mecanismos moleculares envolvidos na ativação ainda não foram bem estabelecidos. Por exemplo, mutação em Patched já foi observada em linhagens de CCEO (MICHIMUKAI *et al.*, 2001) e a presença de metilação em genes inibidores de Gli1, com consequente aumento na expressão deste gene, já foi descrita em linhagens de CCE, podendo contribuir para a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e subsequente aumento na motilidade celular e invasão (PALUSZCZAK *et al.*, 2017).

No campo da epigenética, uma dezena de estudos vem descrevendo a relação dos microRNAs (miRNAs) com a via Shh em diferentes tipos de câncer como nos meduloblastomas (UZIEL *et al.*, 2009) e glioblastomas (FAREH *et al.*, 2012; FAREH *et al.*, 2017). No entanto, não existe até o momento nenhum estudo que avalie simultaneamente a expressão dos componentes da via Shh e de miRNAs no CCEO.

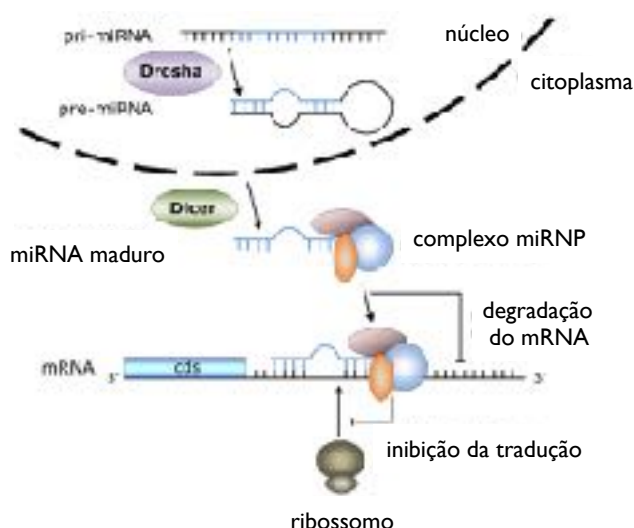
## **1.5. A via Sonic Hedgehog e os miRNAs**

### **1.5.1 miRNAs, os RNAs não codificantes**

Os miRNAs fazem parte de uma grande família de pequenos RNAs, contendo de 18-22 nucleotídeos que não codificam proteínas. Mas de fato, os miRNAs fazem parte de uma superfamília de RNAs não codificantes, alguns com mais de 1000 nucleotídeos. Este conjunto de RNAs não codificantes, incluídos os miRNAs, representam uma importante avenida de estudo do controle da expressão gênica, pois a principal função é regular os genes, silenciando-os, pela inibição do RNA mensageiro do gene-alvo e consequentemente impedindo a formação de proteína (**Figura 6**). Até o momento, mais de 38.589 sequências de miRNAs em mais de 271 diferentes organismos já foram catalogados no miRBase (<http://www.mirbase.org>).

### 1.5.2 miRNAs e tumores

Em lesões tumorais, os miRNAs podem estar envolvidos na expressão dos genes que participam no ciclo celular, no controle da proliferação celular, apoptose, angiogênese, resposta imune, invasão tumoral e metástase e instabilidade genômica de células malignas (VISANI *et al.*, 2015) podendo ser considerados como oncogênicos ou supressores tumorais. Um miRNA com atividade oncogênica promove a formação tumoral pela inibição de genes supressores de tumor e/ou genes que controlam a diferenciação celular ou apoptose. Por outro lado, os miRNAs supressores de tumor previnem a formação tumoral através da inibição de oncogenes (HAMMOND *et al.*, 2006).



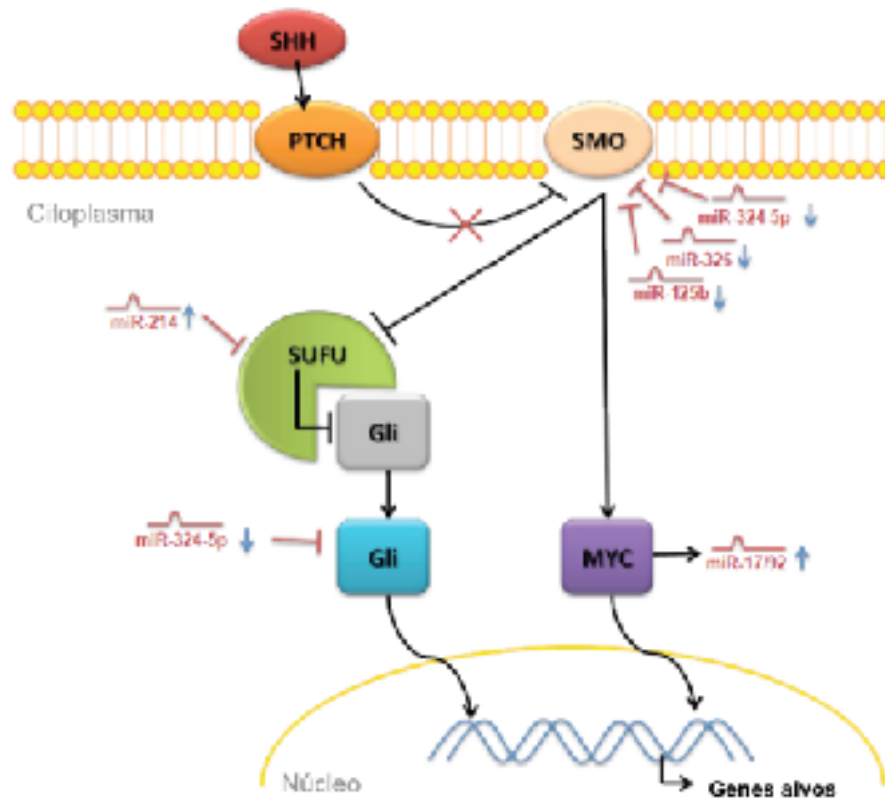
**Figura 6. Biogênese dos miRNAs.** A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II. Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias, como as regiões “stem”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “loop”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares. No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita. A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma. No citoplasma, os pre-miRNAs são processados por Dicer, que remove a alça na estrutura stem-loop, resultando na formação de um dúplice de RNA. Este dúplice de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar sofre degradação (BOBBILI *et al.*, 2017; BRZUZAN *et al.*, Discovering the Role of MiRNAs in Microcystin-Induced Toxicity in Fish By Paweł Brzuzan, Maciej Woźny, Lidia Wolińska and Michał K. Łuczyński DOI: 10.5772/52204).

Do ponto de vista terapêutico, os miRNAs se apresentam como moléculas-alvo importantes, pois nos casos em que apresentam expressão reduzida, a re-introdução através de mímicos de miRNAs pode restaurar a correta modulação de

genes-alvo e para os miRNAs cuja expressão está aumentada, a estratégia seria a inibição destas moléculas com o uso de anti-miRNAs (COURTHOD *et al.*, 2014). Inúmeros miRNAs estão em fases de ensaios pré-clínicos e clínicos, contudo, o perfil de segurança e eficácia só poderá ser definido após estudos clínicos adicionais a longo prazo, a fim de identificar eventuais efeitos adversos (YU *et al.*, 2017). Os miRNAs têm sido apontados como possíveis marcadores para o diagnóstico, preditores para resposta a terapias ou de metástases e também como marcadores de prognóstico (TEOH e DAS, 2017).

Diversos trabalhos têm associado os miRNAs com a via Shh. Para citar alguns, a atuação supressora de miR-7-5p, inibe a proliferação celular, migração e EMT em câncer de bexiga (LIU *et al.*, 2018); a baixa expressão de miR-466f-3p, um inibidor da via Shh está associada com a sustentação do fenótipo EMT em células- tronco de meduloblastoma (Besharat *et al.*, 2018); a diminuição de miR-324, um inibidor de Gli1 e SMO, está associada a um pior prognóstico levando à redução da sobrevivência e crescimento das células tumorais em mieloma (TANG *et al.*, 2018).

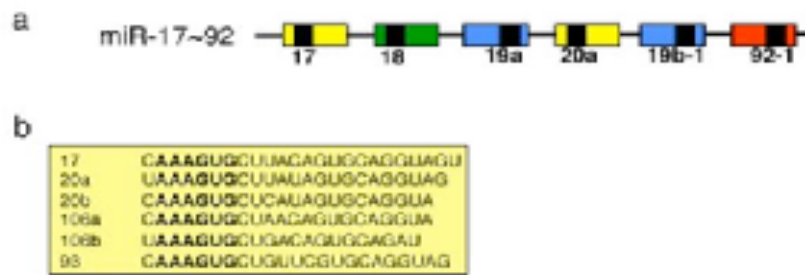
A maioria dos estudos envolvendo a via Shh e os miRNAs foi desenvolvida em meduloblastomas (VISANI *et al.*, 2015) (**Figura 7**). A expressão dos oncogenes que compõem o *cluster* miR-17/92 (miR-17, miR-19a, miR- 20 e miR-92) resulta em eventos tumorigênicos durante o desenvolvimento do meduloblastoma através da ativação da via Shh e c- Myc (UZIEL *et al.*, 2009; NORTHCOTT *et al.*, 2009). Estudos realizados por Ferreti *et al.* (2008) mostraram que a diminuição de miR-125b, miR-326 e miR-324-5p provocou estímulos proliferativos em meduloblastoma. Além desses, miR-214 está aumentado em meduloblastomas inibindo a atividade de SUFU e, portanto, ativando a via Shh (FERRETI *et al.*, 2008; FERRETI *et al.*, 2009)



**Figura 7. Controle da via Shh por miRNAs em meduloblastomas.** A desregulação de vários miRNAs em meduloblastoma suportam o status ativo desta via oncogênica. A diminuição da expressão de miR-324-5p, miR-326 e miR-125b leva ao aumento de expressão de Smo e Gli. Por outro lado, o aumento de expressão de miR-214 pode inibir SUFU, causando a liberação de Gli. O aumento na expressão de Myc está correlacionado com a superexpressão do *cluster* oncogênico miR-17/92. Shh: *Sonic Hedgehog*, PTCH: *Patched Gene Shh Receptor*, SMO: *Transmembrane Protein Smoothened*, SUFU: *Suppressor of Fused*. As setas azuis indicam o padrão de expressão de miRNAs no meduloblastoma (seta para cima = superexpresso, seta para baixo= hipoexpresso). Fonte: Visani *et al.* in *Int J Brain Disord Treat* 2015

### 1.5.3 miR-17-5p

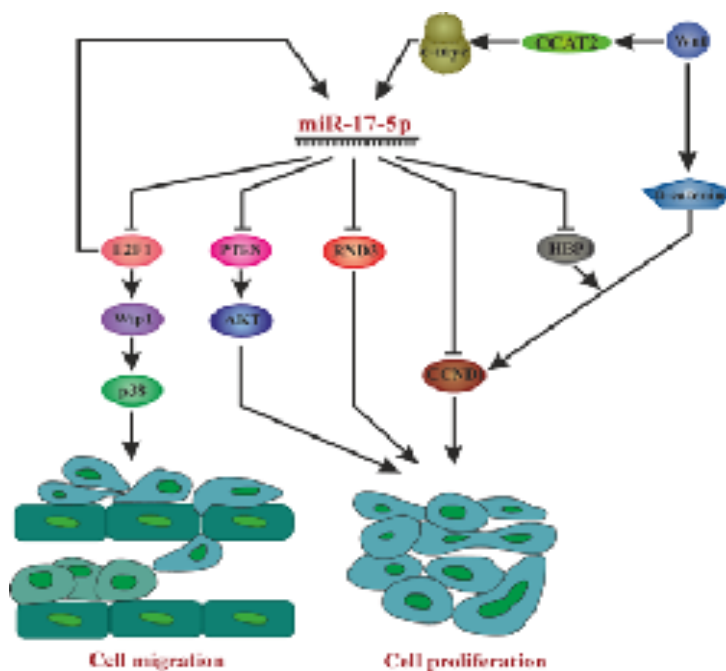
Estudos têm mostrado a atuação de alguns miRNAs como oncomiRs em casos de câncer. O *cluster* miRNA-17-92 foi o primeiro oncomiR descrito, sendo que um de seus membros, miR-17-5p, também está relacionado com o envelhecimento e sua hiperexpressão pode prolongar a vida. O locus do *cluster* miR-17-92 está localizado no cromossomo 13 no gene MIR17HG não codificador de proteínas. Os transcritos do *cluster* miR-17-92 incluem seis miRNAs: miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20 e miR-92a, sendo que miR-17 e miR-20 possuem a mesma *seed sequence* (região de ligação do miRNA ao RNA mensageiro) (CONCEPCION *et al.*, 2012) (Figura 8).



**Figura 8. Descrição do cluster miR-17-92.**a. Representação esquemática dos membros do cluster da família miR-17~92. b. Os miRNAs que compartilham as mesmas *seed sequences* estão representados em caixas da mesma cor. As *seed sequences* encontram-se em negrito. Fonte: Conception *et al.* In Cancer J. (2012) (Adaptada).

Diversos fatores de transcrição estão envolvidos na ativação transcricional do cluster miR-17-92, destacando-se MYC, MYCN e E2F. Myc é um importante proto-oncogene e regula 10-15% dos genes do genoma humano envolvidos em diversas funções, incluindo ciclo celular, apoptose, metabolismo e síntese de macromoléculas (DANG *et al.*, 1999; DANG *et al.*, 2012; O'DONNELL *et al.*, 2005).

Evidências indicam que miR-17-5p é um oncomir. A transcrição de importantes genes que participam no *checkpoint* G1/S do ciclo celular pode ser inibida por miR-17-5p aumentando a taxa de proliferação celular (CLOONAN *et al.*, 2008) (**Figura 9**). Dentre os alvos de miR-17-5p estão os inibidores de proliferação, como MAPK9 e os promotores de proliferação como MYCN. Por outro lado, em tumores de mama, miR-17-5p pode estimular células T, suprimindo o crescimento tumoral (LI *et al.*, 2014) e inibindo metástases (FAN *et al.*, 2014).



**Figura 9. Desenho esquemático mostrando a ativação de miR-17-5p.** c-Myc ativa miR-17-5p desencadeando a migração e proliferação celular. Importantes fatores de transcrição são inibidos por miR-17-5p, sendo PTEN (via p38 MAPK) e E2F1 (via PI3K-AKT) os mais estudados (BOBILLI *et al.*, 2017).

#### 1.5.4 miR-324-5p

O locus do miR-324-5p está no cromossomo 17p13.1. Os miR-324-5p e miR-324-3p são gerados a partir do mesmo RNA *hairpin*, porém com funções diferentes em relação aos genes-alvo e níveis de expressão. Frequentemente, estão hiper-expressos ou hipo-expressos dependendo do tipo de câncer (KUO *et al.*, 2016).

A sinalização Shh controla o desenvolvimento de células granulares no cerebelo e a alteração desta via leva à transformação neoplásica e desenvolvimento de meduloblastomas. Dentre os muitos estudos sobre a via Shh, que já estabeleceram claramente a associação desta via com o desenvolvimento de meduloblastomas, cresce o número de trabalhos avaliando a participação dos miRNAs neste processo de malignização. Em 2008, Ferreti *et al.* identificaram o miR-324-5p como supressor de Smo, o ativador da via Shh, e também reconheceram como alvo o fator de transcrição Gli1. Esses achados identificam um novo circuito regulatório da sinalização Shh e sugerem que a desregulação de miRNAs específicos provoca a sua ativação aberrante, sustentando o desenvolvimento do câncer (FERRETI *et al.*, 2008).

Há evidências de que miR-324-5p desempenhe um papel essencial na progressão do carcinoma hepatocelular, um tumor altamente metastático (CAO *et al.*, 2015). Em uma investigação com linhagens celulares e tecidos deste tipo de tumor, observou-se que miR-324-5p estava negativamente regulado. Neste estudo a inibição de miR-324-5p promoveu a invasão das células malignas. Além disso, verificou-se que a metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) e a MMP9, os principais reguladores da degradação da matriz extracelular, um mecanismo essencial para a invasão e metástase, estavam reguladas positivamente pelo inibidor de miR-324-5p. Como resultado, o estudo mostrou que miR-324-5p suprime a invasão de células em carcinoma hepatocelular. De forma semelhante, a hiper-expressão de miR-324-5p suprimiu o crescimento e invasão de células de câncer de mama e reduziu o crescimento e capacidade invasiva em células de câncer colorretal (KUO *et al.*, 2016)

De forma contrária, o miRNA-324-5p foi descrito como oncogene em outros tipos de câncer. Este miRNA foi associado ao consumo de álcool em pacientes com câncer colorretal (MULLANY *et al.*, 2017) Recentemente, a expressão aumentada de miR-324-5p foi detectada em exossomos isolados do plasma sanguíneo de pacientes com câncer de próstata (PANIGRAHI *et al.*, 2018).

### 1.5.5 miR-214-5p

Este miRNA com localização cromossômica 1q24.3 é extensamente estudado nos mais diferentes tipos de cânceres, mas muito pouco estudado no CCEO. O miRNA-214 está relacionado com importantes funções biológicas, tais como diferentes funções celulares, desenvolvimento tecidual, hemostase tecidual e patogênese de doenças. Especificamente, miR-214 pode mediar a miogênese de músculos esqueléticos, proliferação de células de parede vascular, migração e diferenciação. Já foi demonstrado que miR-214-5p está relacionado com estresse oxidativo induzido pelo álcool em modelos animais (DONG *et al.*, 2014). MiR-214 também modula a função de osteoblastos através de vias moleculares específicas além de vários genes relacionados com osteoblastos. A expressão desregulada de miR-214, portanto, está associada com condições ósseas patológicas diversas, inclusive malignidades e metástase óssea osteolítica do câncer de mama (SUN *et al.*, 2018). Entretanto, a função deste miRNA no desenvolvimento e tratamento do câncer de mama permanece incerto e a literatura tem mostrado a hipo-expressão de miR-214 em linhagens de células de câncer de mama, indicando uma atividade supressora tumoral (ZHANG *et al.*, 2016).

Interessados em investigar a atuação de miR-214 em células de câncer de cólon humano, Wojcicka e colaboradores realizaram uma pesquisa para avaliar proliferação celular, invasão e apoptose. Foram realizados o ensaio de viabilidade celular MTT, e o método TUNEL para detectar fragmentação de DNA resultante de cascatas de sinalização apoptóticas. A baixa expressão do miR-214 foi encontrada no câncer de cólon, indicando que o miR-214 é um supressor de câncer se opondo ao início e progressão deste tumor. Portanto, o miR-214 pode promover a apoptose das células de câncer de cólon, inibindo sua proliferação e invasão (WOJCICKA *et al.*, 2014).

A hiperexpressão de miR-214-5p foi observada em uma linhagem de CCEO resistente ao tratamento com cisplatina, quando comparada com outra linhagem de CCEO não resistente. A transfecção de anti-miR-214 nestas células de CCEO resistentes resultou em inibição do crescimento celular com reduzidas doses de cisplatina, ou seja, aumentou a sensibilidade destas células à quimioterapia. Apesar do mecanismo de quimiorresistência induzida por miR-214 ser desconhecido, este pode estar relacionado com a inibição de PTEN e ativação da via AKT (YANG *et al.*,



2008; YU *et al.*, 2010). Em outro estudo, Scapoli *et al.* (2010) demonstraram o aumento de expressão de miR-214, utilizando *microarrays* em amostras de pacientes portadores de CCEO. A hiper-expressão de miR-214-5p também foi demonstrada em meduloblastomas em trabalhos que mostraram este miRNA inibindo SUFU, um desativador da via Shh (FERRETI *et al* 2008; FERRETI *et al.*, 2009)

## 2 JUSTIFICATIVA

O CCEO é o tumor maligno mais comum da cavidade oral, com elevado índice de morbidade e mortalidade. Apesar das modalidades multiterapêuticas, a sobrevida geral do CCEO não tem melhorado muito nas últimas décadas e uma das principais causas de insucesso no tratamento é o desenvolvimento de recidivas e metástases. A maioria dos pacientes com CCEO são diagnosticados em fases tardias e apresentam metástase regional para a cadeia linfática no momento do diagnóstico, implicando em pior prognóstico com a taxa de sobrevida de 5 anos em apenas 42 % dos casos. A explicação para este fato pode estar na heterogeneidade do tumor que se desenvolve por desregulações tanto genéticas, quanto epigenéticas. A participação da via embrionária *Sonic Hedgehog* tem sido descrita no CCEO e, o principal fator de transcrição Gli1, associado ao mecanismo de invasão e metástase neste tipo de tumor (FAN *et al.*, 2014). Entretanto, a ação e influência dos miRNAs sobre a via Shh no CCEO ainda permanece por ser elucidada.

O que se pretendeu com este estudo foi avaliar o nível de expressão de Gli1 e de miRNAs que já estão envolvidos com a via Shh, como miR-17-5p, miR-324-5p e miR-214-5p e correlacionar com aspectos clinicopatológicos dos pacientes com CCEO.

O tema é de extrema relevância e novas informações podem contribuir com a identificação de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce de pacientes que sofrem com a doença em todo o mundo. A identificação de novos marcadores e vias podem acrescentar outros parâmetros para uma classificação molecular mais robusta e consistente para o uso clínico. Isso irá contribuir com a elaboração de protocolos homogêneos para o tratamento do CCEO e, portanto, melhor enfrentamento da doença ao apontar novos alvos terapêuticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo principal**

Este projeto teve por objetivo analisar o nível de expressão de Gli1 e de miRNAs relacionados com a via Shh, em pacientes diagnosticados com CCEO entre 2016 e 2017 na Clínica de Estomatologia da Unigranrio comparados com pacientes portadores de mucosa clinicamente saudável.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Fazer uma análise retrospectiva dos prontuários dos pacientes com CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2006 a 2016 com a finalidade de traçar o perfil epidemiológico desta população.
2. Realizar um estudo observacional analítico voltado para as análises histopatológicas e moleculares em amostras de CCEO dos pacientes diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2016 a 2018;
3. Avaliar por imuno-histoquímica e imunofluorescência a proteína Gli1 nas amostras de CCEO;
4. Avaliar o nível de expressão dos miR-17-5p, miR-314-5p e miR-214-5p no CCEO em comparação com a mucosa oral clinicamente saudável por PCR quantitativa (qPCR);
5. Correlacionar os aspectos clinicopatológicos dos pacientes com CCEO, com os dados histoquímicos e moleculares encontrados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 População de estudo**

Primeiramente foi realizado um estudo retrospectivo dos pacientes atendidos na Clínica de Estomatologia da Universidade do Grande Rio-Professor José de Souza Herdy- UNIGRANRIO entre janeiro de 2006 e janeiro de 2016 com revisão de prontuários a fim de se traçar o perfil de pacientes portadores de CCEO atendidos neste serviço. Dentre os 6.527 pacientes com lesões orais examinados, 2.429 foram biopsiados. Foram diagnosticados 315 pacientes com CCEO, representando 4,8% de todos os indivíduos examinados no período. Os prontuários dos pacientes com laudo histopatológico conclusivo de carcinoma de células escamosas oral foram revisados.

As variáveis analisadas neste estudo referem-se aos dados sócio-demográficos dos pacientes como gênero, idade, etnia e estado civil. Os demais dados coletados incluíram os hábitos viciosos do uso do tabaco e do álcool. Em relação aos dados clínicos, foram avaliadas as características dos tumores quanto à localização anatômica, tamanho, presença de metástases para linfonodos regionais e, em relação aos dados patológicos, foi considerada a diferenciação dos tumores nos laudos anexados às fichas clínicas.

Na segunda etapa do estudo, para a realização dos estudos moleculares foram coletadas 20 amostras teciduais dos pacientes atendidos na Clínica de Estomatologia da Unigranrio com diagnóstico clínico de CCEO no período de 2016 a 2018. O espécime tecidual, contendo parte de mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral foi removido por biópsia incisional com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e seccionado em dois fragmentos. Um fragmento com aproximadamente 1,0 cm foi acondicionado em formaldeído tamponado a 10% e encaminhado para exame histopatológico para confirmação diagnóstica. O fragmento restante, somente com tecido tumoral, foi acondicionado em tubo de microcentrífuga contendo RNA Later® (ThermoFisher Scientific- Waltham, Massachusetts, E.U.A.) e armazenado em freezer a – 80°C para as análises moleculares. De acordo com os critérios de exclusão estabelecidos, foram desprezadas as amostras de pacientes com lesões localizadas no vermelhão do lábio e com diagnóstico prévio de CCEO, lesões metastáticas, carcinomas verrucoso e de glândulas salivares e pacientes com história prévia de quimioterapia e radioterapia. Para compor o grupo de pacientes normais foram obtidas 20 amostras de mucosa clinicamente saudável de pessoas

sem história de consumo de álcool e tabaco, na Clínica de Periodontia durante cirurgias pré-protéticas. Seguiu-se o mesmo protocolo das amostras de CCEO com acondicionamento em RNA Later e estocagem a -80°C.

As variáveis analisadas nas 20 amostras que foram submetidas à avaliação molecular e histopatológica incluíram os dados demográficos dos pacientes (gênero, idade e etnia), presença de hábitos viciosos, (uso do tabaco e do álcool), localização anatômica, estadiamento tumoral I a IV realizados de acordo com o sistema TNM (Anexo IV) e tempo de sobrevida de 2 anos (INCA, 2004) que foi obtido mediante contatos dos pesquisadores com o paciente por telefone e grau de diferenciação histopatológica segundo o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BARNES *et al.*, 2005).

A utilização das amostras foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio e recebeu aprovação (nº do parecer 1.753.632) (ANEXO I). Os dados da população foram levantados através de questionários aplicados e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi devidamente assinado por todos os pacientes (ANEXO II)

## **4.2 Análises histopatológicas**

### **4.2.1 Diagnóstico e histopatologia do carcinoma de células escamosas oral**

As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LABA) da Universidade Federal Fluminense (UFF). Todo o material coletado foi imediatamente fixado, bloqueando os sistemas enzimáticos capazes de provocar a destruição do tecido. Uma vez fixado, o fragmento de tecido foi submetido ao processamento histológico, que compreende as etapas de desidratação, diafanização e impregnação. Nessas etapas, toda a água do tecido é retirada deixando espaços vazios que devem, na seqüência, ser preenchidos pela parafina. Seguiu-se o acondicionamento do material em blocos de parafina que os mantiveram conservados permitindo a execução de cortes histológicos. Estes cortes são corados com H&E e montados em lâminas histológicas para a observação ao microscópio óptico. A análise histopatológica dos tumores foi realizada individualmente por dois examinadores, utilizando-se um microscópio de luz, sendo os pontos de discordância entre estes reavaliados e estabelecidos por um consenso.

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BARNES *et al.*, 2005) foi utilizada para analisar a

diferenciação histológica dos tumores. As lesões foram divididas em três categorias de acordo com o grau de diferenciação celular. Os CCEs com arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso de recobrimento da cavidade oral foram considerados **bem-diferenciados**. No grupo de tumores **pouco diferenciados** foi considerado o predomínio de células imaturas, numerosas figuras de mitoses típicas e atípicas com ceratinização mínima. De forma intermediária, no padrão **moderadamente diferenciado**, foram incluídos os tumores com menor ceratinização em relação ao padrão bem-diferenciado e o grau de pleomorfismo nuclear com atividades de mitose menos freqüentes do que no padrão pouco diferenciado.

#### **4.2.2 Análise de Gli1 por imuno-histoquímica**

A análise imuno-histoquímica foi realizada em 15 amostras de CCEO, que ainda estavam disponíveis no arquivo do laboratório de histopatologia e em mucosa normal adjacente ao tumor para a proteína Gli1. A técnica de Imuno-Histoquímica (IHQ) foi realizada em dois dias consecutivos. As lâminas comerciais, previamente tratadas com cargas (ImmunoSlide- Easy Path Diagnósticos - Indaiatuba, São Paulo, Brasil) contendo cortes de três micrômetros foram imersas em 3 banhos de cinco minutos em xilol, seguidos de banhos rápidos em álcool 100%, 90%, 80% e 70%. O excesso de álcool foi retirado em água corrente por três minutos. A recuperação antigênica foi realizada em Tampão Trilogy (Cell Marque - Rocklin, Califórnia, EUA), à temperatura de 98°C, utilizando-se o processo à vapor, por 30 minutos. O bloqueio de peroxidase e o bloqueio de proteína foram feitos utilizando o kit NovoLink Max Polymer Detection, (Leica Microsystems - Wetzlar, Alemanha), por 5 minutos cada. A incubação com o anticorpo primário policlonal de coelho, anti-Gli-1, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, E.U.A.), à diluição de 1:50, foi realizada overnight na geladeira. Utilizou-se também controle positivo (côlon) para validar a reação. No segundo dia de técnica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo pós-primário e com o polímero (Novolink), ambos por 30 minutos. Para a revelação da reação foi utilizado o cromógeno 3'-diaminobenzidina (DAB), por 5 minutos. A contra-coloração foi feita com a hematoxilina, por 30 segundos. Utilizou-se o DAB e o kit Novolink e a Hematoxilina de Harris. Após a remoção do excesso de hematoxilina em água corrente, as lâminas foram imersas em banhos de 70%, 80%, 90%, 100% e xilol. A montagem das lâminas com as lamínulas foi realizada com bálsamo do Canadá.

Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio de luz por dois patologistas independentes. A presença de áreas acastanhadas nas células tumorais em locais de alvo antigênico, nuclear e/ou citoplasmática, foi considerada imunorreatividade positiva. O controle positivo foi realizado em carcinoma de cólon. Como as amostras foram obtidas de fragmentos de biópsia realizadas em períodos diferentes, e, portanto, sujeitas a inúmeras variações entre si, a intensidade da coloração não foi considerada neste estudo. Uma abordagem semi-quantitativa para a avaliação dos cortes histológicos foi estabelecida utilizando escores com base na proporção de células tumorais coradas da seguinte forma: 0 quando negativo, 1 se <25%, 2 se 25%-50%, 3 se 50%-75%, 4 se >75%.

#### **4.2.3 Análise da expressão de Gli1 por Imunofluorescência**

Os componentes da via SHH foram avaliados por imunofluorescência em três amostras de CCEO. As amostras foram processadas de acordo com o método *standard* para imunofluorescência, seguindo os protocolos de reações utilizados no Instituto Estadual do Cérebro (IEC) para os anticorpos GLI e Citoqueratina. A recuperação antigênica para marcação imuno-histoquímica dos anticorpos foi realizada por meio de incubação dos espécimes em solução tampão citrato 10mM pH6,0 usando uma panela de pressão como fonte geradora de calor úmido. Os espécimes foram incubados com os anticorpos primários policlonais de coelho e camundongo GLI1 (cat#AB3444) (Millipore - Burlington, Massachusetts, USA and Cytokeratin) e Citoqueratina Cocktail (AE1 & AE3) (Abcam - Cambridge, MA, USA) na diluição de 1:500 para GLI e 1:50 para Citoqueratina. Após a reação com anticorpos primários, as células foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários: Alexa Flúor 488 ou 546 (Molecular Probes, 1:1000, 488; 1:500, 546). Os núcleos foram corados com 4',6-Diamidino- 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, cat# 28718-90-3) (Sigma-Germany). As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro em meio de montagem (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako Corporation) e a observação foi realizada no microscópio confocal invertido DMI8- Leica®.

#### **4.2.4 Análise pelo Ácido Periódico de Schiff**

Os cortes tratados pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) foram inicialmente desparafinados e hidratados. Em seguida a oxidação em ácido periódico a 0,5% foi

feita por 15 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos, enxaguados em água destilada por 3 vezes e corados em Reativo de Schiff por 30 minutos. Após a coloração, permaneceram em água corrente por 5 minutos e foram contra-corados com Hematoxilina de Harris por 5 segundos. Por fim, após uma nova lavagem por 5 minutos em água corrente, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados em Bálsamo do Canadá.

### **4.3 Análise dos miRNAs**

#### **4.3.1 Seleção dos miRNAs candidatos**

O principal critério para seleção dos miRNAs candidatos foi buscar aqueles já descritos na literatura associados com a via Shh (Ferreti *et al.*, 2008; Ferreti *et al.*, 2009; Visani *et al.*, 2015). Para a confirmação da escolha dos melhores candidatos foi realizada uma pesquisa nos bancos de dados de miRNAs (MicroRNA.org, Diana Tools e miRBase) para a confirmação dos genes –alvo e vias moleculares envolvidas. Considerando os critérios estabelecidos, foram selecionados os miRNAs: miR-17-5p, miR-324-5p e miR-214- 5p. Os sites pesquisados são relacionados a seguir:

- a. MicroRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>);
- b. DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>);
- c. miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

#### **4.3.2 Avaliação do nível de expressão dos miRNAs por qPCR**

##### Extração do RNA das amostras

A extração dos RNAs das amostras de tecido foi realizada pelo método do Trizol (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA), segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas com 800µL de trizol e 1,0µL de glicogênio (20µg/µL) e em seguida, incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Após esta incubação adicionou-se 160µL de clorofórmio e logo após as amostras foram centrifugadas por 5 min para separar as fases. Foi realizada a transferência da fase superior para um novo tubo. Os RNAs foram então



precipitados através da adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado seguido de incubação à 20°C, overnight. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 min a 4°C à 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 500µl de etanol a 70%. O pellet secou em temperatura ambiente por 30 minutos e foi ressuscitado em 15µl de água livre de RNAase. Após a extração, todos os RNAs obtidos foram quantificados no espectrofotômetro (Denovix DS-11, Wilmington, E.U.A.).

### Síntese de cDNAs

A primeira etapa das análises de expressão dos miRNAs envolveu a confecção dos cDNAs das amostras para os miR-324-5p, miR-214-5p e miR-17-5p e o endógeno RNU48. Para isto utilizamos o kit MicroRNA Reverse Transcription (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA) e ensaios de miRNAs baseados no sistema Taqman. Para a confecção dos cDNAs dos miRNAs foram necessários 0.15µL de dNTPs, 1µL de Multiscribe™ RT enzyme (50 U/ µL), 1.5µL de Buffer 10X, 0.19µL de RNase inhibitor (20U/ µL), 4.6µL de água, 3µL de primer (hsa-miR-324-5p cat# 00539, hsa-miR-214-5p cat# 02293, hsa-miR-17-5p cat#02308 e RNU48 cat#001006) e 150 ng de amostra total. As condições para a amplificação foram: 16°C por 30min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min.

### Reação de qPCR

Para a avaliação da expressão dos miRNAs utilizamos o Sistema Taqman que consiste na utilização de 1 par de primers e uma sonda específica para cada miRNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata, com a presença de um controle negativo. O volume total foi de 20 µL para cada replicata, e consistiu na aplicação de 1,33 µL de produto de cDNA (amostras), 10µL de TaqMan® Master Mix II (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA) e 1 µL de TaqMan® Small RNA Assay e 7.67 µL de água. As reações foram realizadas no aparelho QuantStudio 7 (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA) e as condições para a amplificação foram: 50°C por 2min, 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. A análise da expressão dos miRNAs obedeceu ao método do  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (Livak e Schmittgen, 2001). O método do  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  ou método comparativo de  $Cq$  é uma equação matemática onde as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras (normais) e as experimentais (tumoriais), normalizadas por uma referência. Vale destacar que o

valor inferido à  $\Delta Cq$  equivale à diferença entre o valor da média dos Cqs do gene de interesse e a média dos Cqs do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula  $\Delta\Delta Cq$  envolve a subtração entre o valor de  $\Delta Cq$  para cada amostra experimental e o valor de  $\Delta Cq$  para as amostras calibradoras. Para se considerar um miRNA hiper ou hipoexpresso nas amostras foi adotado um valor arbitrário de *fold change* de  $\pm 2$ .

#### **4.4 Análises estatísticas**

Nas análises retrospectivas as variáveis categóricas foram expressas como percentagens. Para avaliar a diferença de expressão dos miRNAs por qPCR entre as amostras tumorais e as amostras de mucosa oral clinicamente saudável foi utilizado o teste não paramétrico U de *Mann Whitney*. A fim de avaliar a associação entre a expressão de miRNAs com a idade, localização anatômica, consumo de tabaco, consumo de álcool e a presença de linfonodos cervicais positivos foram utilizados os testes U de *Mann Whitney* e *Kruskal-Wallis*. Para avaliar a correlação entre o perfil de expressão entre os miRNAs foi utilizada o Coeficiente de Correlação de *Pearson*. As análises estatísticas foram realizadas com o software IBM SPSS Statistics versão 22.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos pacientes na Clínica de Estomatologia da Unigranrio

No estudo retrospectivo de câncer oral e orofaringe, foram coletados os dados clínico-patológicos e demográficos dos pacientes atendidos na Clínica de Estomatologia entre os anos 2006 e 2016 com CCEO, os quais estão decritos na **Tabela 1**. Em relação ao gênero, a população diagnosticada com o CCEO consistiu em 223 (70,79%) homens e 92 (29,21%) mulheres. A idade dos pacientes variou entre 23 e 90 anos, sendo o grupo de pacientes com mais de 60 anos de idade o de maior prevalência com 168 casos (54,02%). O grupo étnico de pardos, que representa a miscigenação entre brancos e negros, foi o mais envolvido com 124 (39,74%) pacientes com CCEO, seguindo-se 118 (37,82%) brancos e 70 (22,44%) negros. Em relação aos hábitos viciosos, um total de 239 (75,87%) se declararam usuários de tabaco e o consumo diário do álcool relatado em 44,90% dos casos.

Quanto à localização anatômica, a língua foi a região mais comumente afetada pelo CCEO com 34,60% (n=109) dos casos, seguida do assoalho de boca, 24,44% (n=77), rebordo alveolar, 12,38% (n=39) e orofaringe, 15,87% (n=50). Os tumores moderadamente diferenciados, 69,21% (n=218) constituíram o tipo histológico mais comum, seguidos do subtipo bem-diferenciado, 17,46% (n=55) e pouco diferenciado, 11,11% (n=35). Apenas sete pacientes (2,22%) apresentaram o CCEO em estágio inicial no momento do diagnóstico.

### 5.2 Caracterização da amostra para estudo molecular e histopatológico.

As 20 amostras de carcinoma de células escamosas em cavidade oral coletadas para as análises moleculares e histopatológicas apresentaram características semelhantes àquelas da população examinada na Clínica de Estomatologia no estudo retrospectivo (**Tabela 2**). Considerando as características clínicas e patológicas, 80% dos homens e mulheres são tabagistas, 75% declararam fazer consumo de álcool e 80% encontram-se na faixa etária acima de 60 anos de idade. Em relação à localização, mais uma vez, a língua e assoalho de boca foram os sítios anatômicos mais acometidos, representando 80% da amostra. Quanto à diferenciação histológica, na maioria dos casos (85%) os tumores apresentaram diferenciação moderada. Em relação ao estadiamento clínico, 11 pacientes foram diagnosticados nos estágios iniciais (estágios I e II) e os demais pacientes nos estágios avançados (estágios III e IV). (**ANEXO IV**)

**Tabela 1.** Características sócio demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2006 a 2016

Variáveis	Pacientes diagnosticados com	%
<b>Gênero</b>		
Homens	223	70.79
Mulheres	92	29.21
<b>Idade</b>		
≤ 40 anos	4	1.29
41-59 anos	139	44.69
≥ 60 anos	168	54.02
nd	4	
<b>Etnia</b>		
Pardos	124	39.74
Branços	118	37.82
Negros	70	22.44
nd	3	
<b>Estado civil</b>		
Casado	145	47.39
Separado/Solteiro	114	37.25
Viúvo	47	15.36
nd	9	
<b>Hábitos</b>		
Alcoolismo	141	44.90
Tabagismo	239	75.87
<b>Tamanho do tumor</b>		
CA in situ	7	2.24
< 2cm	45	14.42
2-4 cm	98	31.41
4-6 cm	110	35.26
> 6 cm	52	16.67
nd	3	
<b>Linfonodos</b>		
Positivos	89	29.08
Negativos	217	70.92
nd	9	
<b>Localização anatômica</b>		
Língua móvel	109	34.60
Assoalho de boca	77	24.44
Rebordo alveolar	39	12.38
Orofaringe	50	15.87
Mucosa jugal	21	6.67
Fundo de vestíbulo	6	1.90
Palato duro	10	3.17
Gengiva	3	0.95
<b>Grau de diferenciação histopatológica</b>		
CA in situ	7	2.22
Bem-diferenciado	55	17.46
Moderadamente-diferenciado	218	69.21
Pouco diferenciado	35	11.11

\*nd=Informação não disponível

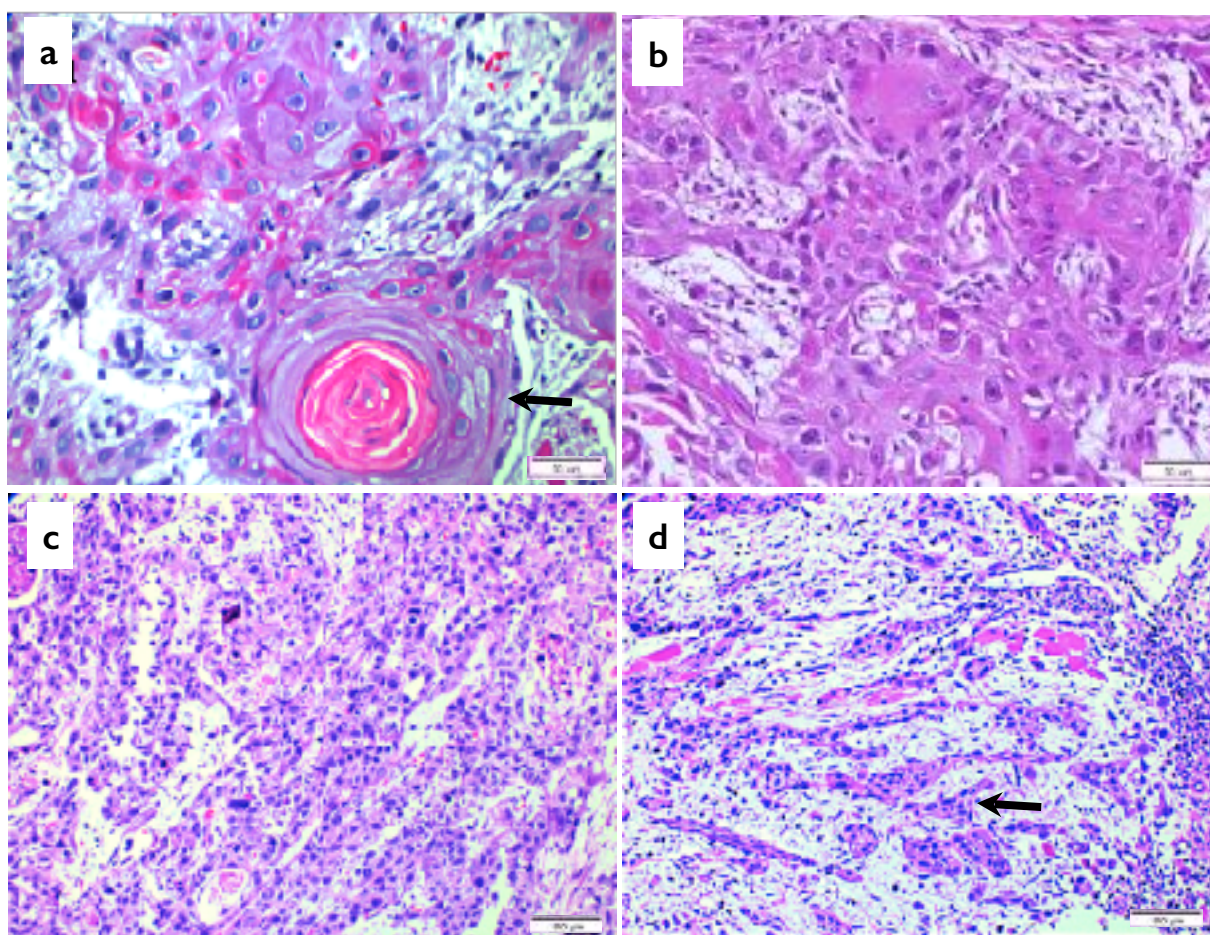
Apenas uma paciente já apresentava metástase distante e, em seis pacientes, linfonodos palpáveis, endurecidos e fixados aos planos profundos puderam ser detectados ao exame físico. Dois tumores estavam em estágio inicial com tamanho inferior a 2cm, 12 tumores entre 2 e 4 cm e 6 tumores apresentavam mais de 4 cm de diâmetro. Em relação à sobrevida de 2 anos, 6 pacientes estavam vivos, 4 pacientes foram ao óbito no intervalo de 2 anos e 10 pacientes não puderam ser localizados.

**Tabela 2. Características demográficas e clinicopatológicas dos 20 pacientes com carcinoma de células escamosas oral**

<b>Características demográficas e clinicopatológicas</b>	<b>n(%)</b>
Sexo	
Homens	14(80%)
Mulheres	6(20%)
Idade (anos)	
35-60	4(20%)
>60	16(80%)
Tabaco	
Sim	16(80%)
Não	4(20%)
Álcool	
Sim	15(75%)
Não	5(25%)
Tamanho	
T1/T2	14(70%)
T3/T4	6(30%)
Estágio Clínico	
I/II	11(55%)
III/IV	9(45%)
Linfonodos	
N0	14(70%)
N1-N3	6(30%)
Grau Histológico	
Bem-diferenciado	1(5%)
Moderadamente diferenciado	17(85%)
Pouco diferenciado	2(10%)
Localização anatômica	
Língua móvel	9 (45%)
Assoalho de boca	7(35%)
Rebordo alveolar	2(10%)
Fundo de vestíbulo	2(10%)

### 5.3 Análise histopatológica

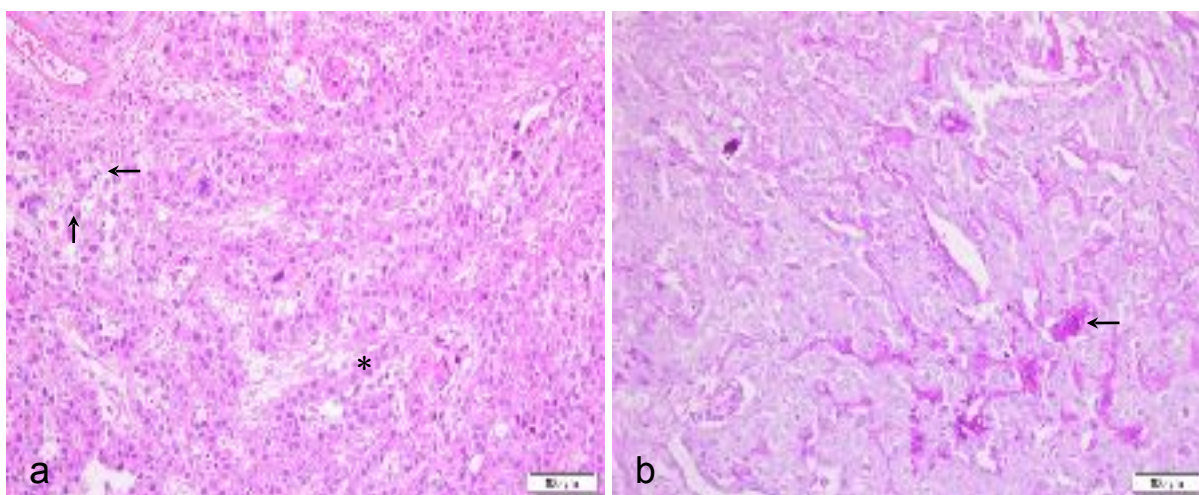
Nas 15 amostras analisadas, apenas o paciente CCE4 apresentou o padrão bem-diferenciado, sendo observados ninhos de células hipercromáticas invadindo o tecido conjuntivo subjacente e a formação de pérolas de ceratina (**Figura 10a**). Figuras mitóticas típicas e atípicas, pleomorfismo nuclear e a quantidade de ceratinização são características que sofreram considerável variação entre os tumores. No padrão moderadamente diferenciado, com maior número de casos, as amostras exibiram menor quantidade de ceratinização e, por outro lado, o pleomorfismo nuclear foi mais evidente em relação ao padrão anterior (**Figura 10b**).



**Figura 10. Características histopatológicas do CCEO.** (a) CCEO bem-diferenciado. Observa-se células epiteliais no interior do tecido conjuntivo subjacente. Camadas concêntricas de células ceratinizadas formam pérolas de ceratina (seta) (Barra de 50  $\mu$ m). (b) CCEO moderadamente diferenciado. Ilhas de células escamosas epiteliais malignas sofrendo ceratinização invadem o tecido conjuntivo e são observadas por todo o campo histológico. Pleomorfismo nuclear mais evidente em relação ao padrão bem-diferenciado (Barra de 50  $\mu$ m). (c e d) CCEO pouco diferenciado. Cordões de células epiteliais malignas exibindo hiperchromasia nuclear no tecido conjuntivo (c e d: barra de 100  $\mu$ m).

Nos pacientes CCE7 e CCE24 as lesões exibiram um padrão pouco diferenciado, não sendo possível observar ceratinização. O infiltrado inflamatório circundando ninhos de células tumorais invasoras foi observado nessas amostras. (**Figura 10cd**).

No CCE7 foram observados cordões de células epiteliais tumorais invadindo o tecido conjuntivo em profundidade. As células exibiram acentuado pleomorfismo nuclear e, em algumas áreas do campo, circundavam ninhos de células com aparência clara, citoplasma abundante e núcleo redondo centralizado ou deslocado excentricamente (**Figura 11a**). A coloração positiva com ácido periódico de Schiff (PAS) revelou a presença de glicogênio (**Figura 11b**).

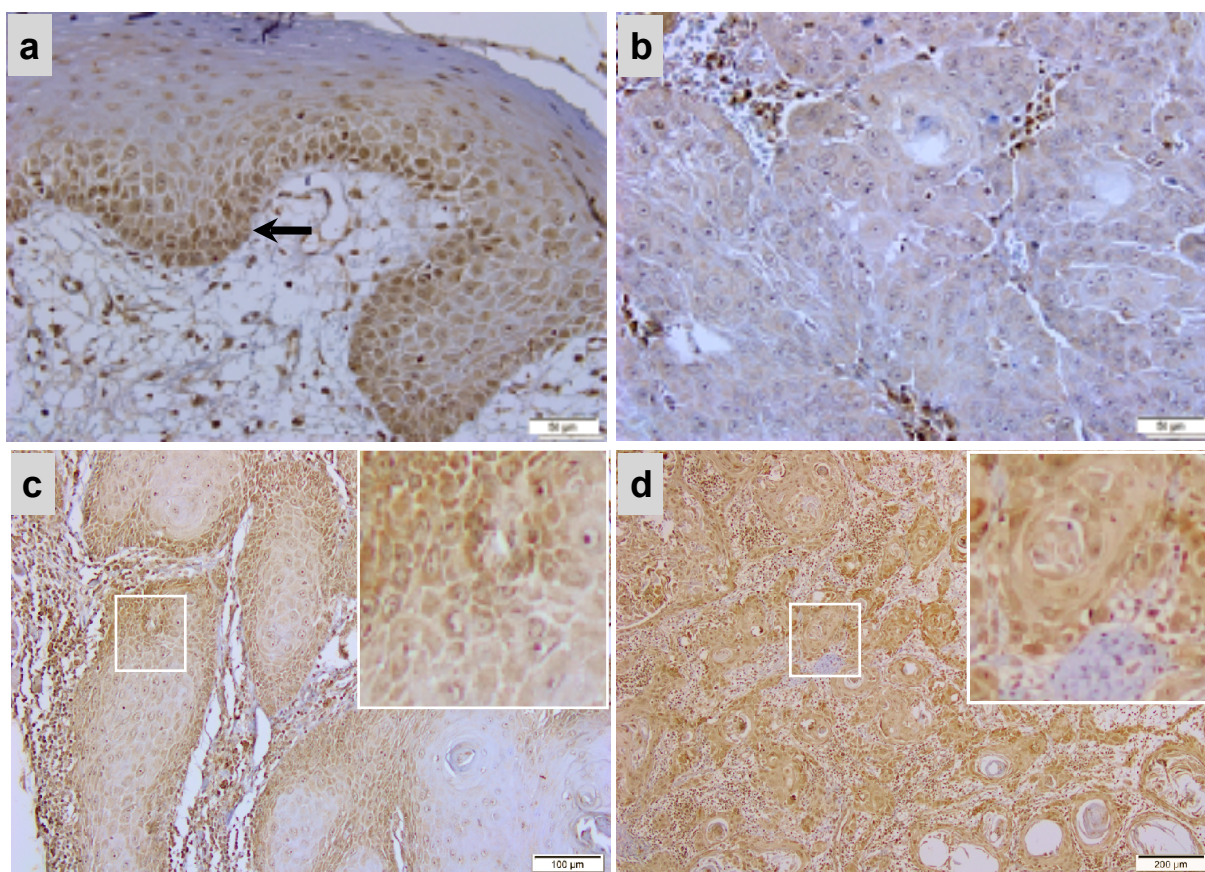


**Figura 11. Características do CCEO no paciente CCE7. (a)** A coloração com H&E mostra um tumor pouco diferenciado formado por ilhas e cordões celulares (asterisco). Células com citoplasma claro podem ser observadas em algumas áreas do campo (setas); **(b)** A coloração com PAS é positiva revelando a presença de glicogênio (seta). (Coloração com H&E, microscópio de luz, barra de 100 µm).

#### **5.4 Análise da expressão de Gli1 com Imuno-histoquímica em carcinoma de células escamosas oral**

Com a finalidade de avaliar se a via *Sonic hedgehog* estava ativada nas amostras de OSCC utilizamos a marcação por imuno-histoquímica para a proteína Gli1, o principal efetor da via, em 15 dos 20 cortes de tecidos emblocados em parafina que ainda estavam disponíveis para este estudo. A reação mostrou positividade nuclear e citoplasmática difusa em todas as lâminas de CCEO, não sendo possível observar predominância por uma ou outra localização. No epitélio de recobrimento da mucosa normal adjacente ao tumor foi observada marcação nuclear e citoplasmática no estrato basal. A marcação nuclear também foi encontrada nos demais estratos,

enquanto a citoplasmática foi diminuindo de forma gradativa em direção às células superficiais (**Figura 12a**). Considerando a positividade para as células tumorais, no paciente CCE2 foi observada marcação positiva em menos de 50% (*score* 2), sendo predominantemente nuclear e ausente nas áreas de ceratinização. Nos pacientes CCE4 , CCE7 e CCE23 houve marcação entre 50% a 75% (*score* 3) e nos demais pacientes a marcação foi positiva em mais de 75% dessas células (*score* 4). (**Figura 12b, 12c e 12d**) (**Tabela 3**).



**Figura 12. Imuno-histoquímica em mucosa normal e células tumorais para a proteína Gli1 da via Shh.** A presença de áreas acastanhadas nas células tumorais em locais de alvo antigênico foi considerada imunorreatividade positiva. Foi avaliada a expressão semiquantitativa da proteína Gli1. Em geral, o núcleo e o citoplasma foram positivos para Gli1 na maioria das células do tumor. **(a)** a expressão positiva foi observada especialmente no estrato basal germinativo na mucosa normal adjacente ao tumor (seta), barra de 50  $\mu\text{m}$ ; **(b)** em apenas uma amostra de CCEO houve marcação de 25-50% das células tumorais (*escore* 2, barra de 50  $\mu\text{m}$ ); **(c)** em três amostras houve marcação de 50-75% das células tumorais (*escore* 3, barra de 100  $\mu\text{m}$ ); **(d)** em 11 amostras a expressão de Gli1 foi observada em mais de 75% das células tumorais (*escore* 4, barra de 200  $\mu\text{m}$ ) (Microscópio de luz).

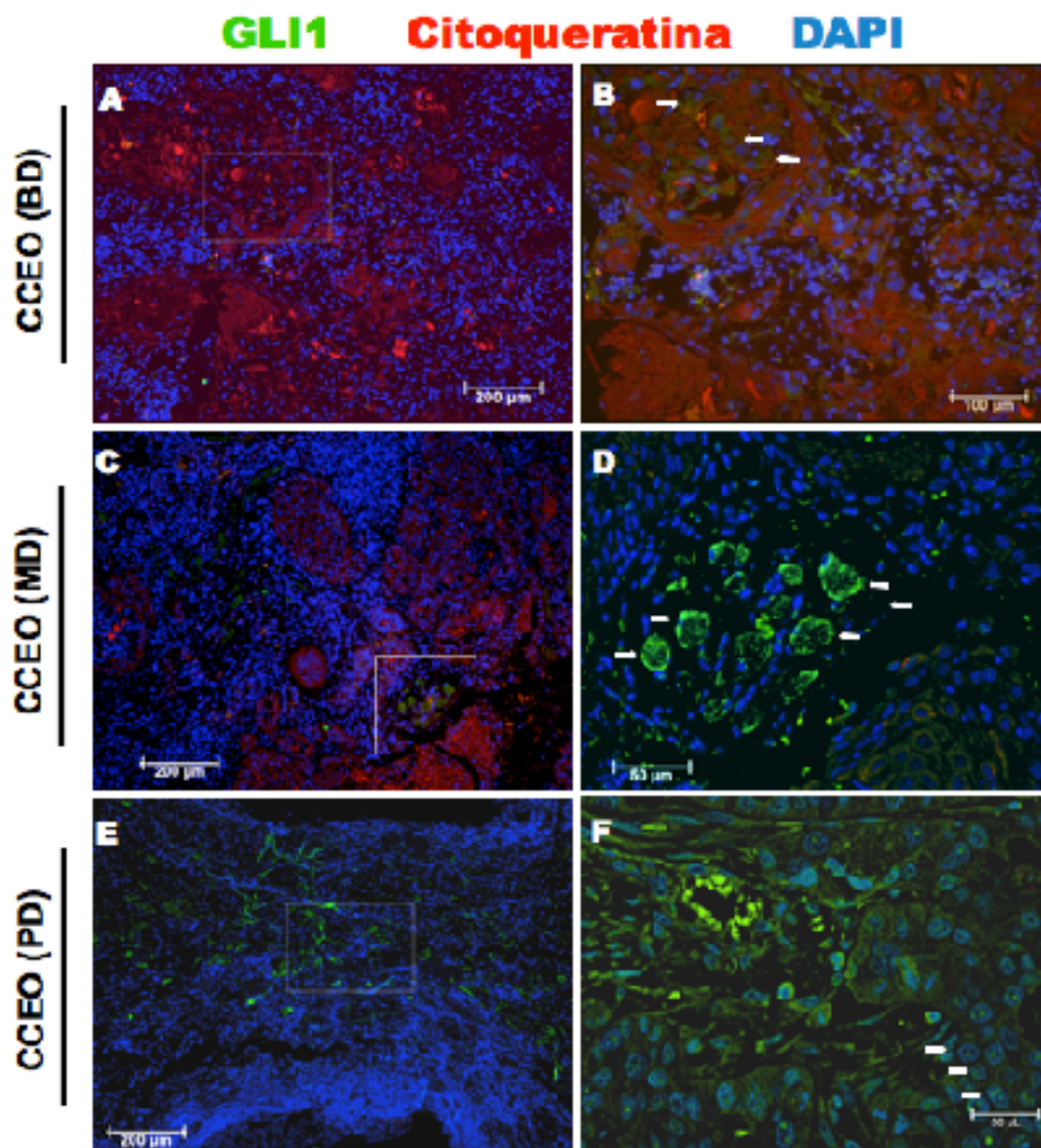
**Tabela 3. Expressão de Gli1 por imuno-histoquímica em 15 amostras de CCEO GLI1**

<i>Percentual de células (%)</i>	<i>Score</i>	<i>Número de casos (n=15)</i>	<i>%</i>
<5%	0	0	0%
5% - 25%	1	0	0%
25% - 50%	2	1	6.7%
50% - 75%	3	3	20.0%
>75%	4	11	73.3%



## 5.5 Análise da expressão de Gli1 com Imunofluorescência em carcinoma de células escamosas oral

Com a finalidade de avaliar se a via *Sonic hedgehog* estava ativada nas amostras de CCEO utilizamos a marcação por imuno-histoquímica para a proteína Gli1, o principal efetor da via, em 15 dos 20 cortes de tecidos emblocados em parafina que ainda estavam disponíveis para este estudo (**Figura 13**). A marcação dupla com *pool* de citoqueratina foi utilizada com o objetivo de caracterizar a origem epitelial do tumor.



**Figura 13. Expressão de Gli1 em carcinoma de células escamosas oral por imunofluorescência.** (A) A ceratinização por citoqueratina (vermelho) pode ser facilmente observada no tumor bem-diferenciado (Barra de 200 µm); (B) A presença de Gli1(verde) foi observada principalmente na área central das pérolas de ceratina composta de camadas concêntricas de células escamosas (Barra de 100 µm); (C) No tumor moderadamente diferenciado, Gli1 foi marcado também na células não-ceratinizadas dentro do tecido conjuntivo subjacente (Barra de 200 µm); (D) Gli1 foi observado no citoplasma das células (setas brancas)(Barra de 50 µm); (E) O tumor pouco diferenciado não apresenta ceratinização (200 µm), e (F) A translocação de Gli1 para dentro do núcleo foi observada pela localização nuclear de sinal tanto de Gli1 (verde) quanto de DAPI (azul) em carcinoma de células escamosas oral. As setas brancas indicam a marcação de Gli1 (50 µm).

## 5.6 Análise da expressão de miR-17-5p, miR-324-5p e miR-214-5p nos pacientes com carcinoma de células escamosas oral

Estudos diversos, especialmente em meduloblastomas, mostram que a interação da via Shh com outras vias de sinalização é regulada por diferentes miRNAs, dos quais miR-17-5p, miR-324-5p e miR-214-5p desempenham funções oncogênicas e supressoras de tumor. Há poucas investigações sobre a participação desses miRNAs na carcinogênese oral e as que já foram realizadas ainda deixaram muitas perguntas sem respostas sinalizando para a necessidade de novos estudos. Além disso, esses miRNAs estão relacionados com outras vias muito investigadas em CCEO e que também se comunicam com a via Shh.

Em nosso estudo utilizamos a técnica de qPCR com o objetivo de avaliar a expressão desses miRNAs nas 20 amostras de CCEO e compará-la com 16 amostras de mucosa oral saudável. Após a extração do RNA total foi avaliada a concentração dos RNAs nas amostras (ANEXO V) para seguir com as análises por qPCR. Os valores de *fold-change* (quantificação relativa) estão disponibilizados na **Tabela 4**. Foi estabelecido o valor arbitrário de  $\pm 2$  para considerar a diferença de expressão relativa entre os dois grupos.

A análise dos dados mostra que miR17-5p apresentou um aumento de expressão em 50% da amostra, ou seja, em dez pacientes o valor da expressão deste miRNA ficou acima do *fold-change* estabelecido inicialmente. O gráfico de quantificação relativa mostra a expressão reduzida em três pacientes (CCE 2, CCE12 e CCE15- **Tabela 4**).

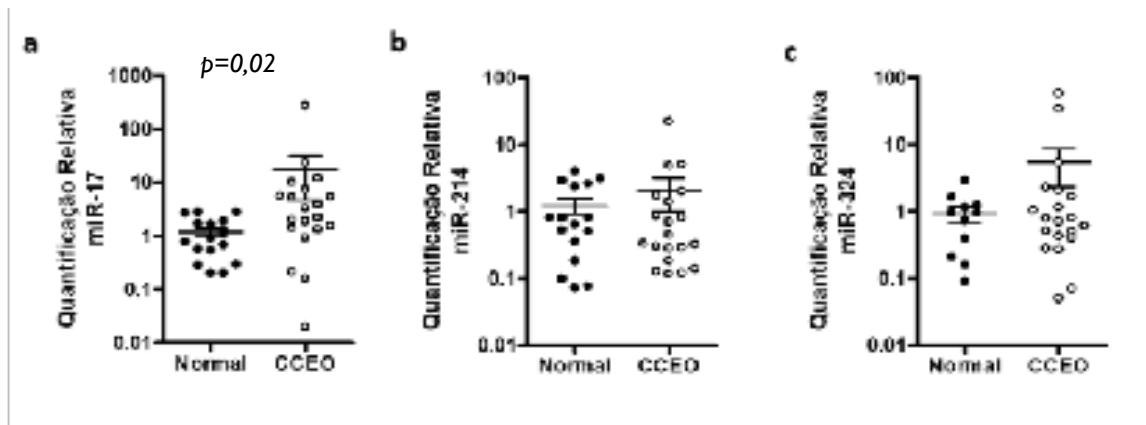
**Tabela 4. Expressão dos miRNAs e imuno-histoquímica.** Os valores de Cq foram transformados em valores fold change (FC), indicando os diferentes níveis de expressão entre os tecidos tumorais e os controles normais.

Amostra	Marcação para Gli1 (scores)*	miR-17-5p RQ**	miR-214-5p RQ	miR-324-5p RQ
CCE1	-	1,24	0,11	0,76
CCE2	2	0,19	0,82	0,8
CCE3	-	0,88	0,30	0,40
CCE4	3	1,73	21,95	58,36
CCE5	4	21,61	0,69	0,72
CCE7	3	251,61	4,82	34,73
CCE11	4	4,89	0,18	2,21
CCE12	4	0,15	0,32	0,26
CCE13	-	2,06	0,45	0,51
CCE14	4	0,73	0,14	0,28
CCE15	-	0,38	0,13	0,07
CCE16	4	3,09	5,01	0,52
CCE17	4	1,25	0,28	1,08
CCE18	4	11,13	0,86	1,2
CCE19	4	5,16	1,39	2
CCE20	4	1,84	2,00	4,72
CCE21	-	6,50	1,71	1,56
CCE22	4	3,53	0,12	0,43
CCE23	3	1,46	0,33	0,71
CCE24	4	4,81	0,29	0,06

\* percentual de células positivas para Gli: score 1 se <25%, score 2 se 25%-50%, score 3 se 50%-75%, score 4 se >75%. RQ\*\*= Quantificação Relativa (*fold change*) em vermelho os valores hiperexpressos e em azul os valores hipoexpressos.

Quando fizemos a comparação entre as amostras de tecido tumoral e as amostras de mucosa saudável foi observada a hiperexpressão significativa de miR-17-5p ( $p = 0,02$ ) (**Figura 14-a**).

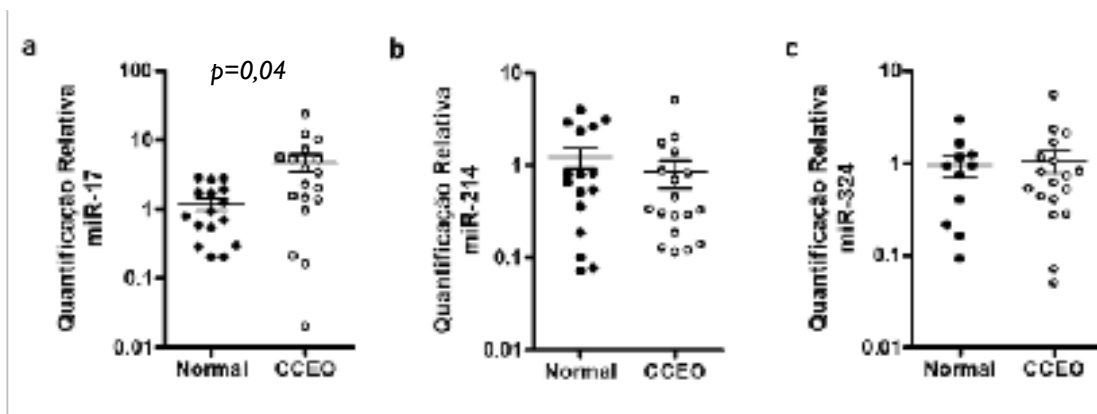
Em relação ao miR-214-5p, uma hipoexpressão foi observada em 11 pacientes com câncer (55% da amostra) e o aumento de expressão em quatro pacientes (8% da amostra). Entretanto, quando comparados o grupo de pacientes com mucosa normal e o grupo de pacientes com CCEO, não houve diferença de expressão significativa ( $p=0,77$ ) (**Figura 14-b**). Por fim, as análises com miR-314-5p mostraram hiperexpressão em 6 pacientes com câncer (30% da amostra) e hipoexpressão em cinco pacientes (25% da amostra). Porém, mais uma vez, não houve diferença significativa ( $p= 0,74$ ) quando os dois grupos foram comparados (**Figura 14-c**).



**Figura 14 - Expressão dos miRNAs por qPCR com todas as amostras.** Perfil de expressão de miR-17-5p (a), miR-214-5p (b) e miR-324-5p (c) no CCEO comparado com a mucosa oral normal. Valores de *fold-change* expressos em escala log2 .  $p < 0,05$ .

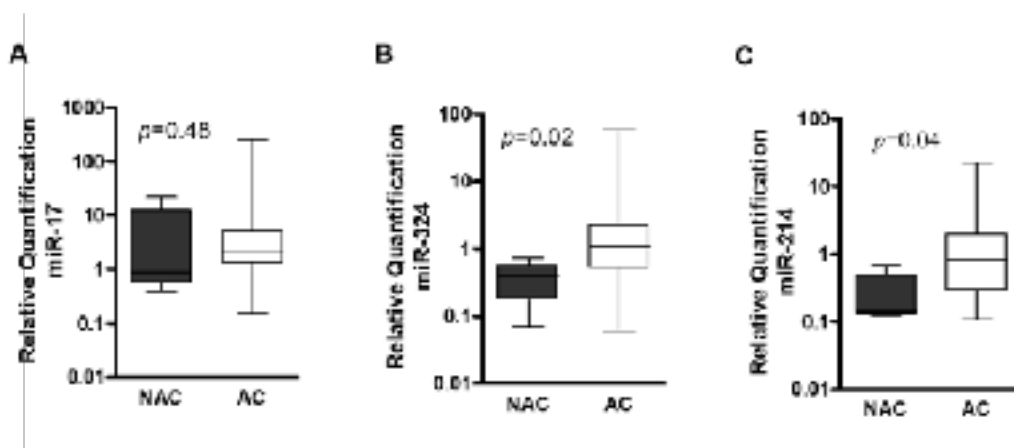
Chama a atenção o valor *fold-change* muito elevado para miR-17-5p ( $\uparrow 251,61x$ ), miR-214-5p ( $\uparrow 4,82x$ ) e miR-324-5p ( $\uparrow 34,73x$ ) observado na amostra do paciente CCE7. Além dele, a amostra do paciente CCE4 também expressou valores muito elevados para miR-214-5p ( $\uparrow 21,95x$ ) e miR-324-5p ( $\uparrow 58,36x$ ). A fim de determinar se essas amostras poderiam estar interferindo no resultado das análises comparativas, foi realizado um novo cálculo sem as amostras desses pacientes.

Nesta nova análise, também foi notada a diferença de expressão significativa de miR-17-5p no CCEO comparado com a mucosa normal ( $p=0,04$ ). Mais uma vez, não foi observada diferença de expressão estatisticamente significativa para miR-214-5p ( $p = 0,38$ ) e miR-324-5p ( $p= 0,89$ ) no CCEO comparado com a mucosa normal (Figura 15).



**Figura 15 - Expressão dos miRNAs por qPCR sem as amostras CCE4 e CCE7.** Novo cálculo para o perfil de expressão de miR-17-5p (a), miR-214-5p (b) e miR-324-5p (c) no CCEO comparado com a mucosa oral normal. Valores de *fold-change* expressos em escala log2 .  $p < 0,05$ .

Foi encontrada uma associação entre consumo de álcool e miR-214-5p ( $p=0,04$ ) e miR-324-5p ( $p=0,02$ ), mas não para miR-17-5p (**Figura 16 e Tabela 5**).



**Figura 16. A associação entre miR-214-5p e miR-324-5p e o consumo de álcool.** Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre miR-214-5p (A) e miR-324-5p (B) em pacientes que consumiam álcool diariamente (AC) em relação aos que não consumiam álcool. Não foi encontrada associação com miR-17-5p. Os valores de fold change estão expressos em escala log<sub>2</sub>;  $p < 0,05$  foi considerado para diferenças estatisticamente significativas.

Não houve nenhuma associação significativa entre a expressão de miR-17-5p, miR-214-5p e miR-324-5p com a idade, gênero, consumo de tabaco, tamanho do tumor, localização anatômica e estadiamento clínico (**Tabela 5**). Tanto o paciente CCE5, o único da amostra com metástase pulmonar, quanto o paciente CCE7 que apresentava metástase para linfonodo regional, não chegaram a receber qualquer tratamento pelo curso rápido da doença que os levou rapidamente ao óbito logo após o diagnóstico.

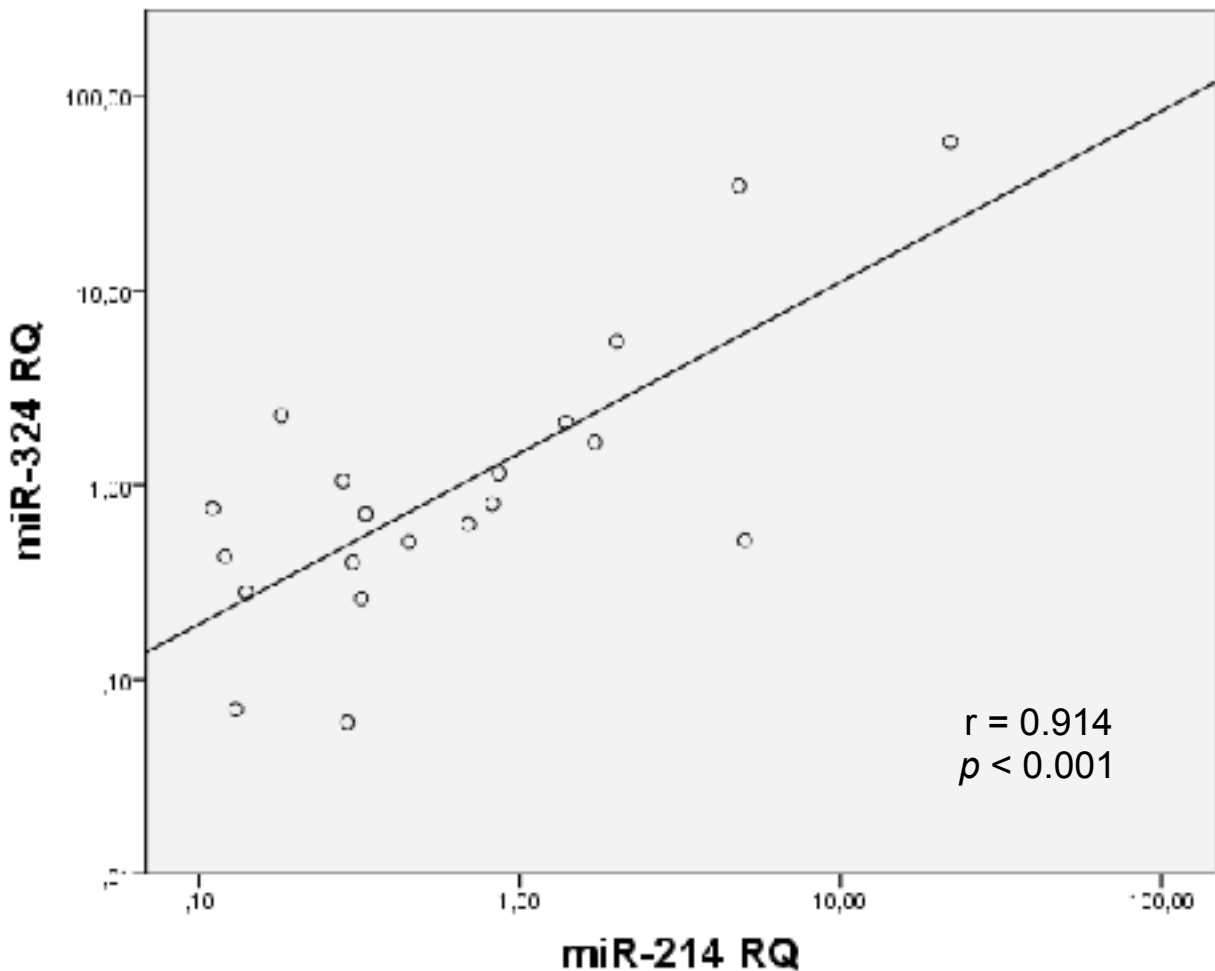
**Table 5 Análise da expressão de miRNAs com fatores de risco e características clinicopatológicas**

	n (%)	miR-17-5p RQ <sup>a</sup>		miR-214-5p RQ		miR-324-5p RQ	
		Média (DP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	Média (DP)	<i>p</i>	Média (DP)	<i>p</i>
<b>Gênero</b>							
Mulher	6(20%)	5.92(7.95)	0.56	4.15(8.73)	0.93	10.34(23.52)	0.93
Homem	14(80%)	20.62(66.54)		1.21(1.65)		3.51(9.06)	
<b>Idade</b>							
<60 anos	4(20%)	5.33(4.49)	0.45	0.68(0.55)	0.92	1.40(0.59)	0.45
≥ 60 anos	16(80%)	18.93(62.26)		2.44(5.43)		6.60(16.21)	
<b>Tabaco</b>							
Tabagista	16(80%)	19.50(62.13)	1.00	1.12(1.56)	0.92	3.18(8.48)	0.92
Não tabagista	4 (20%)	3.03(2.64)		5.91(10.67)		15.10(28.84)	
<b>Álcool</b>							
Consome álcool	15 (75%)	19.80(64.19)	0.45	2.70( 5.55)	0.04	7.29(16.58)	0.02
Não consome álcool	5(25%)	5.42(9.13)		0.27(0.24)		0.38(0.23)	
<b>Localização do tumor</b>							
Língua	9 (45%)	4.71(7.15)	0.41	3.50(7.08)	0.28	7.49(19.12)	0.16
Assoalho de boca	7 (35%)	39.20(93.69)		1.33(1.65)		6.01(12.68)	
Outras regiões	4 (20%)	1.85(1.31)		0.25(0.16)		0.43(0.26)	
<b>Tamanho do tumor</b>							
T1/T2	14(70%)	3.05(3.15)	0.18	2.04(5.75)	0.09	4.93(15.39)	0.32
T3/T4	6 (30%)	46.91(100.58)		2.20(2.18)		7.04(13.66)	
<b>Estágio</b>							
Inicial (I/II)	11(55%)	2.37(2.25)	0.11	2.48(6.67)	0.30	6.14(7.33)	0.97
Avançado (III/IV)	9 (45%)	33.12(82.20)		1.61(1.95)		4.86(11.28)	
<b>Linfonodo</b>							
Positivo	5(25%)	3.49(2.02)	0.57	4.82(9.58)	0.82	12.60(25.59)	0.52
Negativo	15 (75%)	20.45(64.19)		1.18(1.61)		3.21(8.78)	

<sup>a</sup> RQ – Quantificação Relativa - valores obtidos usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para comparação entre CCEO e mucosa oral saudável.

<sup>b</sup> DP-Desvio Padrão

Pelo fato de todos os casos terem sido considerados positivos para Gli1 e a maioria das células apresentarem mais de 75% de positividade para esta proteína, não foi possível estabelecer uma associação entre a presença de Gli1 e o grau de expressão dos miRNAs avaliados. Entretanto, uma análise comparativa entre a expressão destes três miRNAs demonstrou que existe uma correlação positiva entre a expressão de miR-214-5p e miR-324-5p no CCEO ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,914$ ).



**Figura 17. Correlação entre o nível de expressão de miR-214-5p e miR-324-5p.** Foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão de miR-214-5p e miR-324-5p em 20 amostras de CCEO. *r* de Pearson (*r*) e *p*-valor (*p*).  $p < 0,05$  foi considerado para diferenças estatisticamente significativas.

## 6 DISCUSSÃO

O câncer bucal representa um sério problema de saúde em quase todos os países do mundo e também no Brasil, principalmente pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade (GUPTA *et al.*, 2016). Estabelecer o perfil epidemiológico dos pacientes acometidos por esta doença é fundamental para o planejamento e execução de programas de saúde. A importância de estudos epidemiológicos é reconhecida pela Lei dentro do Sistema Único de Saúde (Lei 8080, de 19 de Setembro 1990), com o objetivo de planejar e executar programas de saúde para a população. Os estudos devem ser desenvolvidos nas diversas regiões do Brasil, pois as diferenças socioeconômicas, culturais e climáticas podem gerar diferentes resultados (VOLKWEIS *et al.*, 2010). Neste contexto, foi traçado o perfil epidemiológico dos pacientes com CCEO atendidos na Clínica de Estomatologia da Unigranrio, procedentes de diferentes municípios do Rio de Janeiro, porém, em sua maioria, residentes na Grande Baixada Fluminense. A análise retrospectiva dos prontuários no período avaliado demonstrou que dentre os 2.429 pacientes biopsiados na Clínica de Estomatologia, 315 (4,8% da amostra total) apresentavam este tipo de tumor, justificando a investigação realizada.

No presente estudo, 54,02% dos pacientes foram diagnosticados com CCEO com mais de 60 anos de idade, um resultado semelhante a outros estudos (MAROCCHIO *et al.*, 2010; ZINI *et al.*, 2010; NCI, 2018), parecendo indicar que a idade é um provável fator de risco para o CCEO. Em relação ao gênero, o CCEO foi mais freqüente nos homens (70,79%) corroborando com a literatura global (JOHNSON *et al.*, 2000, ZINI *et al.*, 2010). A relação entre os sexos é de aproximadamente 2:1, uma disparidade observada mundialmente (TORRE *et al.*, 2016). Entretanto, há estudos mostrando que a incidência entre mulheres brancas com menos de 50 anos de idade está aumentando, podendo estar surgindo uma nova população acometida pelo CCEO (PATEL *et al.*, 2011).

Na última década estudos epidemiológicos investigando o perfil do paciente com câncer oral em diferentes regiões do Brasil foram conduzidos, em sua maioria, por grupos de pesquisa em instituições de ensino. Pires e colaboradores (2013) fizeram uma análise retrospectiva de 346 casos de CCEO diagnosticados no Serviço de Patologia Oral da Universidade Estadual do Rio de Janeiro no período de 8 anos (2005 a 2012). O gênero masculino representou 2/3 dos pacientes com 232 casos (67%), sendo a razão homem:mulher de 2:1. A idade média dos pacientes foi de



62.3 anos. Em um estudo retrospectivo mais recente, realizado (ALVES *et al.*, 2017) na Faculdade de Odontologia de Pelotas-RS, foram revisados os prontuários de 806 pacientes com CCEO no período de 1959 a 2012. Mais uma vez, a maioria dos pacientes era homem (76,6%), branco (92,2%) com idade média de 57,7 anos. Em São Paulo, Marocchio *et al.*, (2010) examinaram 1.564 casos de CCEO atendidos em hospitais e instituições de ensino, no período de 1960 a 2008, e concluíram que os homens (74,0%), com idade entre 50 a 60 anos e brancos (74.1%) foram os que mais desenvolveram o CCEO.

O estudo retrospectivo de Souza- Cruz e colaboradores (2014) avaliando o perfil de pacientes com CCEO diagnosticados na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) entre 2000 e 2010 mostrou que houve predominância do gênero masculino e idade entre 50 e 60 anos. De forma semelhante aos dados coletados no presente estudo, a maioria dos pacientes da UNIFAL se declarou solteira. Ainda em relação ao estado civil, no estudo retrospectivo realizado por Ozasuwa-Peters *et al.* (2017), dentre os 463 pacientes diagnosticados com CCEO, 49.6%(228) eram casados. Os autores ressaltam em suas análises que a presença de um companheiro pode conferir benefícios para os pacientes, pois o consumo de tabaco e a taxa de mortalidade foi maior em indivíduos que não eram casados. No nosso estudo com a população da Baixada Fluminense, um elemento de análise importante é a classe social, ou sócio econômica do paciente, pois, isso retrata o grau de instrução, acesso ao conhecimento, acesso a atendimento de saúde. Este ponto merecerá um outro estudo do ponto de vista do alcance social do atendimento do Centro de Estomatologia, uma Universidade privada, a UNIGRANRIO, mas com um trabalho de saúde de alcance importante.

A vascularização sanguínea e linfática, que variam de acordo com a localização na cavidade oral, influenciam a evolução do tumor e a sobrevida dos pacientes (CARLI *et al.*, 2009). Tumores localizados na língua e assoalho bucal podem se disseminar mais facilmente em relação aos outros sítios anatômicos e, conseqüentemente, o tratamento se torna mais difícil e o prognóstico menos favorável (TEIXEIRA *et al.*, 2009). As localizações mais acometidas pelo CCEO do presente estudo foram a língua e assoalho de boca somando 64,04 % dos casos. Esse resultado coincide com os estudos de Coaracy *et al.* (2008), Santos *et al.* (2010) e Losi-Guembarovski *et al.* (2009), onde essas também foram as localizações mais comuns.

O fumo do cigarro é a forma mais comum de uso do tabaco na maior parte do mundo (OMS, 2002). Dos 315 indivíduos com CCEO no presente estudo, 239 (75,87%) usavam tabaco e muitos pacientes associaram cigarros a outras formas de uso de tabaco como cachimbo, charuto e tabaco de mascar. É interessante ressaltar que muitos deles relataram o uso de drogas ilícitas, como maconha, cocaína e crack. Há evidências que sugerem que o fumo de maconha pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer do trato aerodigestivo (HASHIBE *et al.*, 2005). SOUZA-CRUZ *et al.*, (2017) demonstram uma associação estatisticamente significativa entre o fumo ( $p=0,021$ ) e o consumo de bebidas alcólicas (0,047) e a taxa de letalidade no CCEO. Pires *et al.* (2013) descreveram que nos 281 pacientes com CCEO analisados 225 (80%) eram tabagistas ou foram usuários de tabaco no passado.

O uso do tabaco em qualquer de suas formas se expandiu em todo o mundo. Os jovens geralmente iniciam a prática entre seus pares (KIRK *et al.*, 2012). O hábito do tabaco geralmente começa através de contatos sociais, mas é reforçado pelo desenvolvimento da dependência fisiológica, derivada da nicotina encontrada no tabaco (FU *et al.*, 2012).

O tabaco pode ser fumado, mastigado e usado de várias formas. Também é consumido frequentemente como uma mistura com outras substâncias. No subcontinente indiano e em partes da Ásia central, o tabaco é comumente misturado com noz de bétel e limão, e retido na boca por um longo período (WHO, 2007). No Brasil, o tabaco de mascar é comum (industrializado ou picado), bem como o consumo de cigarros enrolados à mão em palha de milho. É uma prática cultural que começou nas áreas rurais e migrou para regiões urbanas. O tabaco em pó, conhecido como rapé, pode ser inalado e é outra forma de consumo de tabaco no Brasil. O uso de rapé também está associado ao CCE das cavidades nasais (FENG *et al.*, 2009).

O consumo concomitante do tabaco e do álcool está associado à 90% dos casos de CCE de cabeça e pescoço (AKANUMA *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 1995; KOWALSKI *et al.*, 2005). O hábito de ingestão de bebidas alcoólicas foi relatado em aproximadamente 50% dos pacientes, sendo a cachaça e a cerveja as bebidas mais comumente citadas. A combinação de cachaça com desnutrição pode diminuir a imunidade e também pode gerar risco de desenvolvimento do câncer bucal (BAGNARDI *et al.*, 2015). Um estudo realizado no Rio de Janeiro relatou consumo de álcool entre 59,3% dos pacientes com câncer oral, sendo as bebidas destiladas

preferidas por 61% dos pacientes (LEITE e KOIFMAN, 1998). A relação entre consumo de álcool e câncer bucal foi estudada também em São Paulo, Curitiba e Goiânia e revelou-se um forte fator de risco entre os que ingerem grandes doses diárias de cachaça, uma relação que também foi estabelecida em outros estudos que investigaram a associação entre o CCEO e o consumo frequente de bebidas alcoólicas (FRANCO *et al.*, 1989; FRIEMEL *et al.*, 2016). Todos estes dados, comparativamente obtidos neste nosso estudo, abrem de fato uma avenida de investigação do alcance social da nossa tese.

O papel relativo do consumo de álcool per se sobre o desenvolvimento do câncer bucal é difícil de avaliar devido a uma possível sobreposição com outros possíveis agentes etiológicos, especialmente o tabaco (FRANCO *et al.*, 1989). O sinergismo produzido por essa combinação produz um risco maior para o câncer bucal do que os efeitos aditivos de cada agente (PAI e WESTRA, 2009; BROSS e COOMBS, 1976). Fumar aumenta a carga de acetaldeído após o consumo de álcool, e o consumo de álcool aumenta a ativação de pró-carcinógenos no tabaco (SCULLY e BAGAN, 2009). Acredita-se também que o álcool possa predispor ao carcinoma através de seu efeito no fígado e estudos relatam uma correlação entre câncer oral e cirrose (KELLER *et al.*, 1969).

A influência da comorbidade nos resultados do tratamento do CCE foi extensamente relatada e representa um fator relacionado ao paciente de significância prognóstica considerável (PICCIRILLO e VLAHIOTIS, 2002). Como a maioria dos pacientes com CEC incluídos no estudo atual são usuários de álcool e tabaco, eles também podem experimentar uma elevada taxa de outras condições médicas de alto risco associadas a esses agentes, incluindo doença pulmonar crônica, cirrose e doença cardiovascular.

O estadiamento clínico foi realizado a partir dos registros dos pacientes obtidos pela revisão dos prontuários. O que se observou foi que a maioria dos tumores (51,93%) apresentava mais de 4 cm em seu maior diâmetro e metástases regionais foram clinicamente detectadas em aproximadamente 30% dos pacientes. Na amostra de 20 pacientes para estudos moleculares, tumores com mais de 4 cm foram encontrados em 25% dos casos. Em 60% da amostra os tumores apresentaram dimensões menores, de 2cm a 4cm e, portanto, considerados tumores em estágios iniciais (I e II). Em estudo realizado na Argentina, foram avaliados 274 pacientes com CCEO em uma amostra representativa da população naquele país. A maioria dos pacientes (65%) foi diagnosticada com tumores em estágios avançados

(III e IV) e estes exibiram as mais baixas taxas de sobrevida (BRANDIZZI *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, as metástases são consideradas um evento tardio na progressão do tumor, embora possa ocorrer em seu curso inicial. O status nodal tem um impacto no estadiamento e no prognóstico, mas infelizmente, nenhum método clínico é adequado o suficiente para permitir um diagnóstico confiável do status nodal (SCHAUER *et al.*, 2005). Apesar de ser a classificação TNM usada universalmente para o estadiamento do câncer, essa prática está baseada quase exclusivamente na extensão do tumor. O significado prognóstico de outros fatores além do estágio do tumor e tratamento também incluem o equilíbrio tumor-hospedeiro (WATANABE *et al.*, 2010), comorbidades (PICCIRILLO *et al.*, 2004; TEPPPO e ALHO, 2009), gênero (KOKOSKA *et al.*, 1995), etnia (MOLINA *et al.*, 2008), sintomas (DHANAPAL *et al.*, 2011), histopatologia relacionada com o tumor (SEKI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011), fatores moleculares (CHANG e CALIFANO, 2008) e status sócio-econômico.

O diagnóstico precoce do CCE é crucial em termos de qualidade de vida e expectativa de sobrevida do paciente. Dados sobre a sobrevida de pacientes com câncer oral são muito restritos no Brasil, mas alguns estudos podem levar à conclusão de que a maioria dos diagnósticos está atrasada, possivelmente resultando na baixa taxa de sobrevida em 5 anos (WUNSCH-FILHO *et al.*, 2002). Um estudo brasileiro sobre câncer bucal em estágio avançado ao diagnóstico mostrou uma diferença estatisticamente significativa no prognóstico em comparação com aqueles achados de estudos envolvendo pacientes de uma instituição nos Estados Unidos (CARVALHO *et al.*, 2004). Diversas diferenças nas características populacionais foram observadas entre os pacientes do HACC (Hospital AC Camargo) no Brasil e os do MSKCC (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) nos Estados Unidos. No Brasil, observou-se que a duração dos sintomas antes da primeira avaliação médica (5,9 meses vs 4,0 meses) foi significativamente maior nos pacientes atendidos no HCACC ( $p= 0,01$ ). Além disso, mais pacientes com câncer em estágio avançado na apresentação foram observados no HCACC (73,4% VS 37,4%.  $P < 0,001$ ). Em nosso estudo retrospectivo, o percentual de pacientes com câncer em estágio avançado foi de 61,93%, um resultado que se assemelha ao hospital HCACC no estado de São Paulo.

Lesões clínicas brancas e vermelhas da mucosa oral foram reconhecidas pela OMS como características clínicas de lesões potencialmente malignas, se

qualquer outro diagnóstico possível for descartado. A discrepância entre a apresentação clínica e o diagnóstico histológico foi observada em um quarto das amostras em estudo realizado por Onofre *et al.* em 1997. A acurácia de encontrar características malignas pode variar com base no número de cortes histológicos usados para detecção de células neoplásicas. Um exame realizado com múltiplas seções semi-seriadas é ocasionalmente necessário para detectar características do CCE. É especialmente valioso em um tumor microinvasivo.

Com base na informação dos dados clínicos no estudo retrospectivo, foi observado que os profissionais de saúde negligenciam no encaminhamento dos pacientes para os serviços especializados. Apenas sete pacientes com lesões iniciais leucoeritoplásticas com características histopatológicas de CCEO foram encaminhados para a Clínica de Estomatologia e na amostra para estudos moleculares, somente dois pacientes. Infelizmente, a apresentação clínica de uma lesão pode ser erroneamente diagnosticada como um processo inflamatório benigno, o que é relativamente comum na população em geral, atrasando o diagnóstico definitivo (EPSTEIN *et al.*, 2013). Essa conclusão é suportada pelo grande número de pacientes que chegam na clínica já tendo sido tratados com anti-inflamatórios prescritos por outros profissionais de saúde.

O diagnóstico de CCE moderadamente diferenciado foi o tipo histológico mais comum (69,21%) dos 315 casos avaliados no período de dez anos neste estudo; e também em 17 pacientes das 20 amostras utilizadas para as análises moleculares, representando quase a totalidade dos casos. Em estudo conduzido no hospital-escola University College London Hospitals (UCLH) entre 1992 e 2001 avaliando os casos de pacientes com CCEO em estágio inicial (T1/T2), os autores observaram que 50% dos tumores eram moderadamente diferenciados, 25% eram bem-diferenciados e os demais eram tumores pouco-diferenciados (JERJES *et al.*, 2010). Há também relatos que apontam o CCEO bem-diferenciado como o tipo mais comum (ANDISHEH *et al.*, 2008). A classificação histológica representa um critério subjetivo e o significado prognóstico do sistema de gradação histológica é incerto.

Caracteristicamente, as células tumorais mostram o citoplasma eosinofílico com núcleos grandes e coloração intensa com diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear. A avaliação histopatológica do tumor estabelece uma gradação considerando a semelhança com o epitélio de origem e, quando isso acontece, é considerado bem-diferenciado. Tumores com pouca ou nenhuma produção de ceratina, apresentando pleomorfismo celular e nuclear que guardam pouca

semelhança com o tecido de origem, sendo então considerados pouco diferenciados.

A diferenciação celular constitui um parâmetro amplamente utilizado para classificar o CCEO. Muitos investigadores tentaram correlacionar a gradação histológica com os parâmetros clínicos, como a classificação de Broders (1941), com poucos critérios de avaliação, até as classificações subsequentes que passaram a valorizar um maior número de indicadores, tais como grau de ceratinização, estrutura, diferenciação, pleomorfismo nuclear, mitoses, padrão de invasão, invasão perineural, estágio de invasão e infiltrado inflamatório (ANNEROTH *et al.*, 1987; BRYNE *et al.*, 1992; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005). A mais recente edição da *American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging Manual (Head and Neck Section)* disponibilizada em 2017, introduz significativas modificações em relação à edição anterior. A categoria T para CCEO reconhece um comportamento biológico diferente de tumores pequenos profundamente invasivos e incorpora a profundidade de invasão (DOI) como um importante parâmetro nesta categoria. Há décadas tem sido reconhecido que o prognóstico do CCEO piora quando o tumor invade em maior profundidade (LYDIATT *et al.*, 2017).

Na avaliação histopatológica dos tumores examinados, o CCE7, um tumor pouco diferenciado, apresentou um componente de células claras com citoplasma claro abundante se interpondo entre as células tumorais (**Figura 6**). Há poucos casos descritos na literatura quanto à presença de células claras no CCEO, sendo este achado considerado raro e incompletamente compreendido (DEVI *et al.*, 2017; FRAZIER *et al.*, 2012; KHOURY *et al.*, 2017; ROMANACH *et al.*, 2015).

Os tumores de células claras constituem um grupo heterogêneo de lesões, sendo que tumores de glândulas salivares, metástases de tumores renais e tumores odontogênicos devem ser considerados no diagnóstico diferencial quando ocorrem na cavidade oral (DEVI *et al.*, 2017). As doenças metastáticas devem fazer parte do diagnóstico diferencial principalmente quando os tumores se desenvolvem nos ossos gnáticos e, nesses casos, considerar a hipótese de carcinomas renais que apresentam células claras, mas possuem um característico componente vascular sinusoidal com áreas hemorrágicas (FRAZIER *et al.*, 2012, EVERSOLE 1993). Nesse contexto, os tumores odontogênicos, que raramente se desenvolvem periféricamente, também merecem ser lembrados. Em relação aos tumores de origem glandular, essas lesões apresentam pelo menos algumas células com mucina intracelular e se coram com mucicarmim (FRAZIER *et al.*, 2012). O

diagnóstico final se baseia nos achados histopatológicos e nas características clínicas, tais como os locais de desenvolvimento dessas lesões (EVERSOLE, 1993).

As células claras podem caracterizar carcinomas de diferentes sítios anatômicos como os rins, ou constituir variantes histológicas incomuns como no câncer hepático e de mama (BANNASCH *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2018). A vacuolização citoplasmática nos tumores de células claras, independentemente de sua origem, pode ser atribuída ao acúmulo de glicogênio. A descrição como “células claras” resulta de seu aspecto histológico observado na coloração convencional com hematoxilina-eosina que mostra células com aparência clara parecendo estar “vazias”, “vacuoladas”, “espumosas” ou mesmo “inchadas”. Os núcleos frequentemente mostram localização central, mas também podem estar deslocados para a periferia celular (BANNASCH *et al.*, 2017). A presença de glicogênio dentro da célula é bem evidenciada pela microscopia eletrônica, por ser uma excelente técnica para revelar em detalhes os compartimentos celulares. Entretanto, por diversos fatores, incluindo a necessidade de profissional altamente capacitado e custo-benefício, essa técnica não se aplica ao uso rotineiro. A técnica de rotina mais difundida para esse fim é a histoquímica, que utiliza o ácido periódico de Schiff (PAS) em material fixado em formalina e embebido em parafina (Mc MJ, 1948). Mais de 70% do glicogênio pode ser perdido por essa técnica devido à natureza da forma predominante de glicogênio no citoplasma que é solubilizado pelo xileno durante o processamento histopatológico do material (Zois & Harris, 2016). Além disso, para essa proposta, é melhor usar agentes fixadores contendo álcool ou ácido pícrico ao invés de solução com formalina (BANCROFT e STEVEN, 1977).

O epitélio oral paraceratinizado normal contém grande quantidade de glicogênio. A presença de glicogênio no tecido epitelial de recobrimento da cavidade oral há muito vem despertando o interesse dos patologistas que buscam a sua correlação com alterações displásicas nessa região (SILVERMAN *et al.*, 1971; SHEAR *et al.*, 1972). Estudos realizados no passado já encontraram uma redução significativa na quantidade de glicogênio no epitélio displásico em relação ao tecido normal (ISACSSON & SHEAR, 1981). Em investigações posteriores os resultados foram semelhantes mostrando a reduzida quantidade de glicogênio com coloração negativa ao PAS no epitélio com alto potencial de transformação maligna (CHISHOLM *et al.*, 1992; EPSTEIN *et al.*, 1992; XIAO *et al.*, 2013). Acredita-se que o glicogênio seja, na verdade é, “uma reserva de glicose” que também pode ser usado. O metabolismo do glicogênio (síntese de glicogênio e glicólise) no tecido

epitelial displásico/ maligno é um processo pouco conhecido (OHTA *et al.*, 2010, XIAO *et al.*, 2013). A glicogênese, assim como a glicogenólise ocorrem no citoplasma celular. Possivelmente a glicogenólise está ativada nas células epiteliais pré-malignas e malignas que consomem maior quantidade de energia devido ao aumento da proliferação e, portanto, esgotam seus estoques de glicogênio (AIZAWA *et al.*, 2017). As células tumorais geram energia pelo aumento da glicólise, como descrito por Warburg nos anos de 1920 (GATENBY e GILLIES, 2004).

Ogawa *et al.*, em 2014, analisando o metabolismo da glicose e glutamina em CCEO detectaram um maior consumo de glicose e maior concentração de lactato quando comparado com os tecidos normais. A combinação de consumo exagerado de glicose e acúmulo de lactato levou os autores a concluir que o efeito Warburg é observado no CCEO. Uma correlação entre o “Efeito Warburg”, é feita por Baggeto (1992) com o grau de diferenciação celular. Segundo esse autor, as células cancerosas que ainda conservam semelhanças com as células normais apresentam glicólise anaeróbia normal e baixa taxa de crescimento, enquanto as células altamente indiferenciadas apresentam elevada glicólise anaeróbia e rápida velocidade de crescimento (BAGGETTO *et al.*, 1992). Há mais de 30 anos as alterações no metabolismo do glicogênio vêm sendo associadas à reprogramação metabólica em muitos tipos de câncer (ROUSSET *et al.*, 1981). Embora inicialmente essa correlação tenha sido estabelecida para determinados tipos histológicos, estudos mais recentes consideram um fenômeno geral (WITNEY *et al.*, 2014).

Vias catabólicas compensatórias são ativadas devido à diminuição de energia ativa, obrigando as células cancerosas a oxidar outras moléculas além da glicose, como a glutamina. Esse metabolismo alterado confere diversas vantagens para as células cancerosas como suprimento energético adequado, biossíntese de moléculas necessárias, invasividade devido à elevada produção de lactato e proteção contra estímulos apoptóticos (KAELIN *et al.*, 2010). Hakimi *et al.*, investigaram essa alteração metabólica e observaram que os tumores em estágio inicial apresentam um perfil metabólico que se inverte em uma fase mais avançada (HAKIMI *et al.*, 2016). Hakimi enfatiza a tendência atual de valorizar a importância das alterações das vias metabólicas e de considerar que a reprogramação metabólica abre novas perspectivas para o diagnóstico e opções terapêuticas.

A expressão desregulada de GSK-3 $\beta$  está associada ao desenvolvimento de muitas condições patológicas, incluindo o câncer. A proteína GSK-3 $\beta$  tem sido considerada supressora de tumor devido à sua capacidade de fosforilar moléculas



pró-oncogênicas, tais como c-Myc, ciclina D1 e  $\beta$ -catenina, visando a degradação proteossômica (**Figura 12**). No entanto, um grande e crescente número de trabalhos publicados demonstrou que GSK-3 $\beta$  regula positivamente a proliferação celular e a sobrevida no câncer avançado (NISHIMURA *et al.*, 2016, KUBIC *et al.*, 2012, CAO *et al.*, 2006).

Há diversos relatos na literatura sugerindo que a interação entre Gli1 e  $\beta$ -catenina ativa a transcrição de genes que promovem o crescimento e desenvolvimento celular (ROSSI *et al.*, 2011, NOUBISSI *et al.*, 2009). Estudos recentes com imunofluorescência mostraram que a ativação de GSK3- $\beta$  desestabiliza a interação entre Gli1 e  $\beta$ -catenina por fosforilação levando à hiporegulação da cascata de sinalização de WNT- $\beta$  catenina e Shh-Gli desencadeando apoptose em células-tronco de câncer oral (NAYAK *et al.*, 2017). Outros estudos sugerem ainda que a inativação de GSK  $\alpha/\beta$ , especialmente GSK-3 $\beta$  pode estar relacionada com a progressão do CCEO e estimular a transcrição de ciclina D1. É provável que a expressão de GSK-3  $\alpha/\beta$  no citoplasma contribua para a progressão do tumor e a forma inativa de GSK-3  $\alpha/\beta$  no núcleo esteja relacionado com as formas mais graves de CCEO. Assim sendo, a forma inativa de GSK  $\alpha/\beta$  teria um papel ativo na progressão do CCE de língua (MISHRA *et al.*, 2015).

As características clínicas e histopatológicas do CCEO são decorrentes de alterações moleculares que se devem a uma série de desregulações genéticas e epigenéticas em importantes vias de sinalização, sendo algumas delas embrionárias como a via Shh. A expressão dos componentes dessa via, principalmente a proteína Gli1, tem sido associada com mecanismos de invasão, metástase e com o prognóstico do CCEO. (FAN *et al.*, 2014).

Aqui nesse trabalho em estudos com imuno-histoquímica a expressão de proteínas da via Shh foi observada na mucosa oral normal, o que pode ser explicado pela elevada capacidade de renovação e reparo da mucosa de recobrimento da cavidade oral (GONZALEZ *et al.*, 2016). No presente estudo, a imuno-histoquímica para Gli1 mostrou positividade nuclear e citoplasmática especialmente no estrato basal do epitélio de recobrimento da mucosa normal adjacente ao tumor. A imuno-histoquímica para Gli1 mostrou positividade nuclear e citoplasmática em todas as amostras de CCEO, não sendo possível observar predominância por uma ou outra localização (**Figura 5**). Em aproximadamente 73% dos tumores analisados houve marcação em mais de 75% das células tumorais. Como a maioria das amostras apresentou os maiores scores para marcação de Gli1, e também pelo reduzido

tamanho amostral, não foi possível estabelecer a associação deste resultado com as outras análises, como diferenciação histopatológica e estadiamento tumoral. O indicador da atividade de sinalização de *Hedgehog* é Gli1, por ser um gene-alvo da sinalização de *Hedgehog* ativa (ROSSI *et al.*, 2011) portanto, a via Shh está ativada em todas as amostras de CCEO avaliadas neste estudo.

Os resultados das análises por imuno-histoquímica em relação à positividade para Gli1 em CCEO difere entre os estudos. O percentual de positividade para Gli1 observado por Hwaitong *et al.* (2017) foi de 100% dos 90 pacientes portadores de CCEO analisados, sendo encontrada uma baixa expressão de Gli1 em 34 casos (42.5%) e uma expressão moderada a alta para Gli1 em 46 casos (57.5%). A expressão de Gli1 neste trabalho foi associada significativamente com o estadiamento clínico TNM, recidivas e metástases para os linfonodos ( $p < 0.05$ ), mas não houve correlação com gênero, idade e tamanho tumoral. Entretanto, em outros estudos, um menor quantitativo foi observado pelos autores como 47,8% (YAN *et al.*, 2011) e 54,5% (CHEN *et al.*, 2018).

A associação entre a expressão de Gli1 com o fenótipo EMT também foi observada por Fan *et al.* (2014) além daquelas anteriormente descritas como recidiva tumoral, estadiamento clínico e metástases linfonodais. No referido estudo, os autores observaram a associação entre a expressão de Gli1 com as proteínas e-caderina e MMP-9 sugerindo o envolvimento da via Shh com o processo de invasão tumoral via EMT. Essas evidências revelam a complexidade dos eventos moleculares que desencadeiam a invasão e disseminação do câncer e ressaltam a importância da interação entre a via Shh com outras vias envolvidas com a carcinogênese, como a via Wnt anteriormente mencionada (SATONI *et al.*, 2013; MAEDA *et al.*, 2006; CARBALLO *et al.*, 2018).

Além da comunicação da via Shh com diferentes vias carcinogências, deve ser ressaltada a importante interação desta via com os miRNAs. A atuação de miR17-5p, miR-214-5p e miR-324-5p com a via Shh em meduloblastomas está descrita na literatura (FERRETI *et al.*, 2008; NORTHCOTT *et al.*, 2009; UZIEL *et al.*, 2009). Entretanto, não existe até o momento nenhum estudo molecular avaliando a expressão desses miRNAs e da proteína Gli1 efetora da via Shh em CCEO.

A expressão de miR-214-5p e miR-324-5p nas amostras de CCEO comparada com as amostras normais não revelou diferença significativa, talvez devido ao reduzido tamanho amostral avaliado. Apesar de miR-214-5p ser um miRNA muito estudado em diferentes tumores malignos, não encontramos qualquer estudo avaliando a

expressão desta molécula em CCEO ou em região de cabeça e pescoço. A expressão reduzida de miR-214-5p foi observada no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular e relacionada com a progressão e metástase deste tipo de câncer (ELEMERY *et al.*, 2017). Em outro estudo, os autores analisaram a transfecção de células de carcinoma hepatocelular com mímicos e inibidores de miR-214-5p e verificaram que a superexpressão de miR-214-5p inibiu significativamente a migração e a invasão neste câncer e, de forma contrária, sua inibição promovia a migração e a invasão de células malignas (Li H *et al.*, 2018). A atividade supressora tumoral de miR-214-5p também já foi descrita no pâncreas. A superexpressão de miR-214-5p inibiu a proliferação celular, invasão e migração através do bloqueio de EMT (CAO *et al.*, 2018).

Além do miRNA-214-5p, miR-324-5p também mostrou expressão reduzida em tecidos e linhagens de carcinoma hepatocelular e, quando superexpressado foi capaz de inibir a migração e invasão das células tumorais (CAO *et al.*, 2015). Estudos realizados em gliomas mostraram a expressão reduzida de miR-324-5p, o que foi associado a um pior prognóstico para os pacientes. Este estudo mostrou que miR-324-5p também desempenha uma função supressora tumoral em glioblastomas. A superexpressão de miR-324-5p foi capaz de suprimir o crescimento e a invasão e prolongou a sobrevivência em camundongos xenotransplantados com linhagem de glioblastoma, por inibir o oncogene EZH2 responsável pela iniciação, progressão, invasão e quimiorresistência (ZHI *et al.*, 2014). Por outro lado, no câncer de pulmão miR-324-5p está hiperexpresso, sendo capaz de promover a invasão tumoral ao inibir a expressão dos genes GPX3, RCAN1 e MGAT3 (LIN *et al.*, 2018).

Apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa para miR-214-5p e miR-324-5p nas amostras de CCEO comparado às amostras de mucosa clinicamente saudável, foi encontrada uma associação entre o aumento de expressão desses miRNAs com o consumo de álcool. Essa é a primeira vez que um estudo com amostras de câncer oral encontra uma associação entre esses miRNAs com o consumo freqüente de álcool.

Na revisão sobre o assunto observamos que são poucos os autores que se propõem a analisar essa associação. Dolganiuc *et al.*, em 2009 analisaram por *microarray* amostras de fígado de camundongos submetidos à ingestão de álcool e foi observada a hipoexpressão de miR-214-5p. Em um estudo semelhante a este, porém analisando também o soro e amostras de fígado de ratos, Chen *et al.* encontraram resultados similares. Ainda considerando este miRNA, Dong *et al.*,

utilizaram modelo animal e estudos *in vitro*, por técnicas distintas, e, diferentemente, encontraram a hiperexpressão de miR-214-5p. Essa hiperexpressão foi induzida pelo etanol de uma maneira dependente da concentração e do tempo em células hepáticas. Ainda segundo esses autores, miR-214-5p promovia o estresse oxidativo induzido pelo álcool através do silenciamento da Glutathione redutase -GSR e do citocromo P450 oxidorreductase (POR), importantes antioxidantes (DONG *et al.*, 2014).

Em relação ao miR-324-5p, a hiperexpressão desse miRNA foi relacionada com o consumo prolongado de vinho em carcinoma colorretal, suportando a hipótese de que o consumo de diferentes tipos de bebidas alcoólicas são capazes de induzir alterações na expressão de miRNAs neste tipo de câncer (MULLANY *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, foi observada uma correlação positiva entre a expressão desses dois miRNAs nas amostras de CCEO ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,914$ ). Entretanto, o mesmo não se observa em meduloblastomas, onde desempenham papéis opostos. A correlação positiva encontrada para estes dois miRNAs pode indicar que, diferentemente do meduloblastoma, estes miRNAs não desempenham papéis opostos em CCEO e a expressão é tecido-específica. Como até a presente data não existe nenhum estudo que tenha realizado uma avaliação simultânea destes dois miRNAs em câncer oral, são necessárias pesquisas adicionais para o melhor entendimento a respeito desta provável co-expressão encontrada para miR-214-5p e miR-324-5p no CCEO e que função estes miRNAs podem ter neste tipo de tumor.

Em nossas análises, observamos uma diferença de expressão significativa para miR-17-5p nos CCEOs comparados com a mucosa normal saudável ( $p = 0,02$ ). Em 2016, Wu *et al.* analisaram a expressão do miR-17-5p em CCEOs, provocado pelo hábito de mascar noz de betel, também conhecida como noz de areca ou chiclete de Taiwan, um hábito comum apenas em algumas regiões da Ásia. Segundo este estudo, miR-17-5p alterou a expressão de proteínas pró-apoptóticas na amostra estudada. Em comparação, neste presente estudo, cuja população estudada relatou apenas o hábito de fumar tabaco e/ou consumir bebidas alcoólicas, foi observado o aumento da expressão do miRNA-17-5p em 75% das amostras de CCEO analisadas.

A superexpressão de miR-17-5p tem sido observada em diversos tumores e está especialmente relacionada com a migração e proliferação celular (BOBBILI *et al.*, 2017). Metástases regionais foram clinicamente detectadas em seis das nossas

20 amostras de CCEO, sendo que cinco dessas amostras apresentaram uma alta expressão de miR-17-5p. No paciente CCE7, o CCEO pouco diferenciado com células claras com metástase regional, a hiperexpressão de miR-17-5p foi extremamente elevada em relação aos demais tumores, seguindo-se o paciente CCE5, com metástase à distância. Os dois pacientes não chegaram a receber tratamento pelo curso da doença que os levou rapidamente ao óbito após a confirmação do diagnóstico.

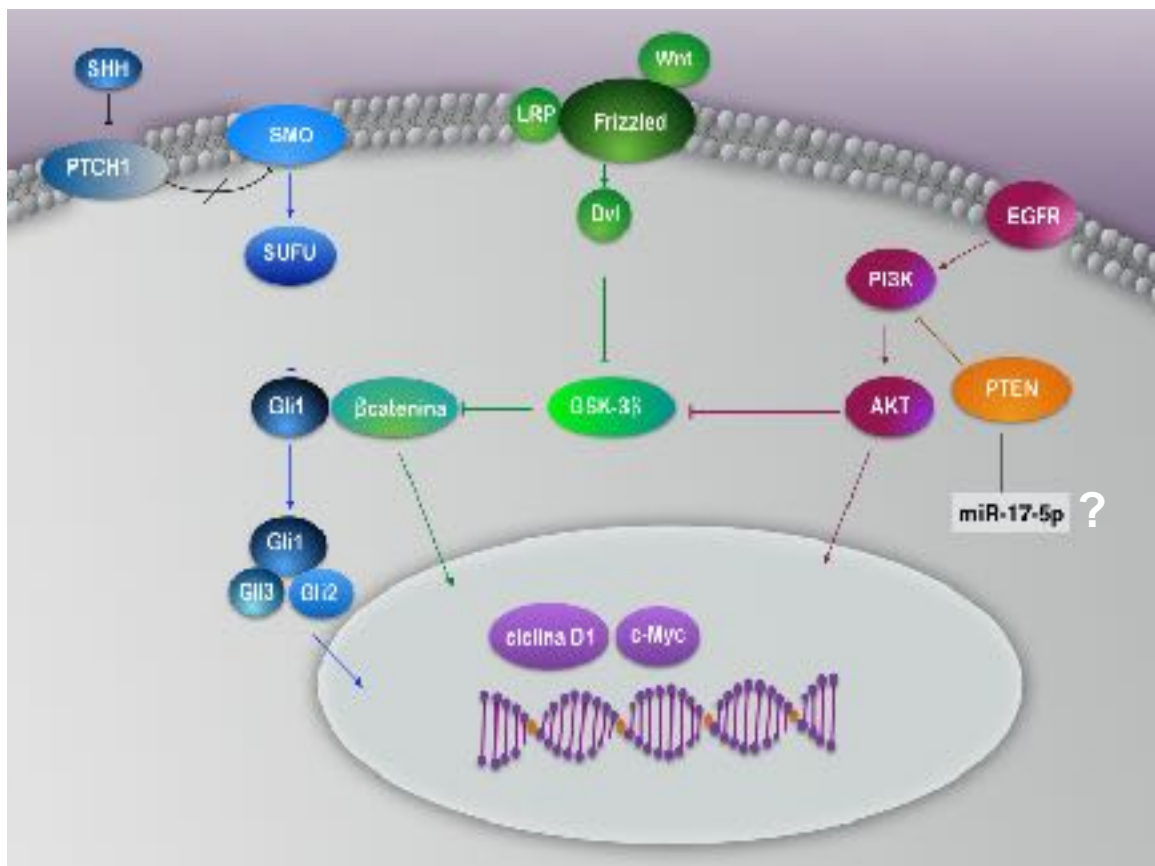
São poucos os estudos disponibilizados na literatura que analisam o papel de miR-17-5p em CCEO e de cabeça e pescoço. Uma análise por micorarray com esta proposta mostrou um aumento moderado na expressão de miR-17-3p/miR-17-5p neste tipo de tumor (SEVERINO *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão reduzida dos componentes do *cluster* 17-92 foi demonstrada em outro estudo mais recente desenvolvido por Chang *et al.* em 2013. Estes autores atribuem este resultado à perda de heterozigosidade no locus 13q31.3. Foi demonstrado ainda que miR-17 e miR-20 foram capazes de inibir ITGβ8, um oncogene responsável por aumentar a habilidade migratória de células de CCEO, conferindo a estes miRNAs uma ação supressora inibindo a migração das células malignas. Entretanto, não existe até o momento nenhum trabalho que avalie a expressão simultânea de miR-17 e da via de Shh no CCEO.

Há evidências de que miR-17-5p desempenhe uma função oncogênica no osteossarcoma, carcinoma hepatocelular, próstata, estômago e cólon por diferentes vias de sinalização e de acordo com o tipo de tumor (LI *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2017; O'DONNELL *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014 YANG *et al.*, 2010).

Em pacientes com câncer de pulmões, cujo principal agente etiológico é o hábito do tabaco, os níveis de expressão elevados de miR-17-5p estiveram inversamente relacionados com a sobrevida (CHEN *et al.*, 2013). De acordo com os estudos realizados por Matsubara e colaboradores (MATSUBARA *et al.*, 2007), a inibição de miR-17-5p pode induzir a apoptose em células de câncer de pulmões, onde este miRNA está superexpresso. Embora outros estudos tenham descrito miR-17-5p como supressor tumoral, o efeito final de miR-17-5p parece ser altamente dependente do contexto celular.

O *cluster* miR-17-92 é regulado negativamente por p53 que promove apoptose em condições de hipóxia (YAN *et al.*, 2009) e, por outro lado, é ativado pelo fator de transcrição c-Myc. O proto-oncogene c-Myc regula 10-15% do genoma humano e

controla o ciclo celular, apoptose, metabolismo de energia e síntese de macromoléculas (BOBBILI *et al.*, 2017). A expressão ou função desregulada de c-Myc é uma das alterações mais estudadas nas neoplasias malignas em humanos (COLE *et al.*, 1999). A supressão de fatores de transcrição que inibem a proliferação celular permite que miR-17-5p promova o crescimento celular através de um complexo mecanismo de interação que estabelece a intercomunicação entre diferentes vias de sinalização (**Figura 18**). Em relação à progressão do ciclo celular e apoptose, os alvos confirmados do *cluster* miR-17-92 são os fatores de transcrição PTEN e E2Fs (BOBBILI *et al.*, 2017).



**Figura 18. A via Sonic Hedgehog e miR-17-5p no contexto do CCEO.** A via de sinalização Shh (azul) pode estabelecer uma *crossstalk* com as vias Wnt (verde) e EGFR (cor-de-vinho), sendo a proteína GSK3-β a molécula-chave dessa interação. miR-17-5P atua como “oncomiR” inibindo PTEN e desencadeando uma série de sinalizações envolvendo a via PI3K / AKT em diferentes tipos de tumores. Quando essa via está ativada, no contexto do câncer oral, GSK3β é inibida deixando de evitar a interação física entre β catenina e Gli1 que se deslocam para o núcleo ativando a transcrição gênica. A hiperexpressão de miR-17-5p foi demonstrada em nossas amostras de CCEO, porém a inibição de PTEN por miR-17-5p neste tipo de tumor ainda não foi investigada. Diagrama de Moleri, AB. (O desenho esquemático foi baseado na liustração de Guo, 2011 e Spohr 2018).

Em alguns tumores, miR-17-5p pode atuar como oncogene e, em outros, atua como supressor tumoral. Existe ainda a possibilidade de divergência entre os autores. Fan *et al.*, (2014) observaram uma atividade supressora tumoral inibindo a transição epitélio-mesenquimal (EMT) pelo aumento da aderência tecidual evitando

a disseminação por metástase em câncer de mama. Outros trabalhos mostram que miR-17-5p está hiperexpresso em células de câncer de mama altamente invasivas. Os autores sugerem que miR-17-5p tenha tido um papel importante na invasão e migração celular pela supressão da proteína HBP1 e subsequente ativação da via Wnt / $\beta$ -catenina (LI *et al.*, 2011). Alguns estudos mostram ainda que c-Myc, E2Fs e ciclina D1 podem ativar a expressão do *cluster* miR-17-92 por um mecanismo de feedback autorregulador (LU *et al.*, 2007; O'DONNELL *et al.*, 2005).

A superexpressão da proteína HBP1 inibe a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (TEVOSIAN *et al.*, 1997). Pela expressão ectópica ou induzida por produtos químicos, HBP1 inibe o crescimento e regula a apoptose em linhagens de células cancerosas, incluindo o câncer oral (LEE *et al.*, 2013 YAO *et al.*, 2005). Esses achados sugerem uma atuação supressora tumoral para HBP1, hiporegulando vários genes, incluindo c-Myc e CCND1 (BERASI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2010; SHIH *et al.*, 1998; TEVOSIAN *et al.*, 1997.). Em 2017, Chan *et al.* demonstraram que HBP1 é um efetor “downstream” de EGFR/ via AKT no câncer oral. Os autores analisaram 30 amostras de tumores orais e detectaram que os níveis médios de mRNA dos fatores de transcrição HBP1 e FOXO1 estavam significativamente mais baixos do que os controles normais, o que foi associado com a invasividade dos tumores orais. Estudos em câncer de mama mostraram que miR-17-5p ativou a invasão e migração celular inibindo HBP1 (LI *et al.*, 2011), uma importante interação de miR-17-5p ainda não investigada em câncer oral.

Estudos recentes com imuno-histoquímica mostram uma diminuição na expressão de PTEN em CCEO quando comparado à mucosa normal. Os autores concluíram que PTEN é um gene supressor tumoral com extensa atividade na carcinogênese oral (JASPHIN *et al.*, 2016). PTEN é um inibidor da via PI3K, a qual pode ser ativada por estímulos extracelulares como fatores de crescimento. A ativação oncogênica desta via contribui para o efeito Warburg por aumentar, por exemplo, a ingestão de glicose, e a expressão de enzimas glicolíticas (SHANKARAI AH *et al.*, 2018). Além disso, tanto a sub-via ERK 1/2 quanto a via PI3K/AKT são ativadas por EGFR, o qual está superexpressado em diferentes modelos neoplásicos incluindo o câncer de próstata (40-80%), pulmão (40-80%), rim (50-90%), cabeça e pescoço (80-100%), gliomas (40-63%) entre outros (MITSUDOMI *et al.*, 2010).

Os mecanismos epigenéticos que controlam a via Shh ainda não estão bem compreendidos. Provavelmente, existe uma participação indireta de miR-17-5p na

regulação desta via controlando o *crosstalk* com outras vias de sinalização (**Figura 18**). Embora os principais eventos moleculares descritos neste texto já tenham sido observados em CCEO em trabalhos isolados, do nosso conhecimento, ainda não foi realizado um único estudo investigando todas essas interações de sinais. Finalizando essa discussão, podemos supor que uma investigação conjunta envolvendo os principais componentes dessas vias, sobretudo de Gli1,  $\beta$ -catenina, GSK-3 $\beta$  e PTEN e a expressão de miR-17-5p poderá trazer uma melhor compreensão sobre os intrincados mecanismos moleculares relacionados com o carcinoma de células escamosas oral.



## 7 CONCLUSÕES

A realização deste estudo nos permitiu concluir que:

Na primeira parte do estudo, a análise retrospectiva dos 315 casos de CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2006 a 2016 revelou que a população examinada foi composta predominantemente por homens pardos, com mais de 60 anos de idade, tabagistas e etilistas. A língua e o assoalho bucal foram as regiões anatômicas de maior incidência do CCEO e os tumores moderadamente diferenciados os mais prevalentes. Esses resultados indicam que a amostra estudada apresenta aspectos epidemiológicos que se coadunam com outros estudos realizados no Brasil.

Em relação aos aspectos clínicos e histopatológicos da população analisada no estudo retrospectivo, no momento do diagnóstico, os pacientes apresentaram em sua maioria, tumores T3 (acima de 4 cm de diâmetro), mostrando que a maioria dos casos é diagnosticada em fases avançadas do tumor repercutindo em maior índice de morbidade e mortalidade dos pacientes com câncer oral.

Na segunda parte do estudo, pela análise por imuno-histoquímica, pela imunofluorescência e molecular, foi observada a expressão da proteína Gli1 em todas as amostras avaliadas. Na maioria dos casos houve marcação positiva em mais de 75% do tumor indicando que a via Sonic Hedgehog estava ativada em nossas amostras;

Dos miRNAs analisados, somente miR-17-5p apresentou um aumento de expressão estatisticamente significativo nas amostras tumorais em relação às amostras normais. Provavelmente este miRNA possui uma função reguladora ativando vias de sinalização que promovem a proliferação celular em CCEO.

Foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão de miR-324-5p e miR-214-5p no CCEO e a associação desses com o consumo diário de álcool, sugerindo que o etanol pode ser um fator externo capaz de modular o maquinário epigenético envolvido com a carcinogênese oral.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aizawa H, Yamada SI, Xiao T, Shimane T, Hayashi K, Qi F, Tanaka H, Kurita H. Difference in glycogen metabolism (glycogen synthesis and glycolysis) between normal and dysplastic/malignant oral epithelium. *Arch Oral Biol*. 2017 Nov 83:340-347.

Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 1999;35:476-83.

Alves AM, Correa MB, Silva KDD, Araújo LMA, Vasconcelos ACU, Gomes APN, Etges A, Tarquinio SBC. Demographic and Clinical Profile of Oral Squamous Cell Carcinoma from a Service-Based Population. *Braz Dent J*. 2017 May-Jun;28(3):301-306.

Andisheh -Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg* 2008;19:1699-702.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95:229-49.

Baggetto, LG. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*. 74,959-974,1992.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, Pelucchi C, Galeone C, Bellocco R, Negri R, Corrao G, Boffeta P, LaVecchia C. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3;112(3):580-93.

Bannasch P, Ribback S, Su Q, Mayer D. Clear cell hepatocellular carcinoma: origin, metabolic traits and fate of glycogenotic clear and ground glass cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2017 Dec 15;16(6):570-594.

Bancroft ID, Steven, A. Theory and practice of histological techniques. London: Churchill Livingstone: 1977.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, IARC Press;2005.

Baumann M., Krause M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: Radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiotherapy & Oncology*. 2004;72(3):257-266.

Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med*. 2012 Sep;14(76):207-14.

Besharat ZM, Sabato C, Po A, Gianno F, Abballe L, Napolitano M, Miele E, Giangaspero F, Vacca A, Catanzaro G, Ferretti E. Low Expression of miR-466f-3p Sustains Epithelial to

Mesenchymal Transition in Sonic Hedgehog Medulloblastoma Stem Cells Through Vegfa-Nrp2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 12;9:1281

Bianco R, Damiano V, Gelardi T, Daniele G, Ciardiello F, Tortora G. Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des*. 2007;13(33):3358-67.

Bobbili MR, Mader RM, Grillari J, Dellago H. OncomiR-17-5p: alarm signal in cancer? *Oncotarget*. 2017 Jul 18;8(41):71206-71222.

Bossi P, Resteghini C, Paielli N, Licitra L, Pilotti S, Perrone F. Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Nov 8;7(45):74362-74379.

Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Sep 1;13(9):E544-8.

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:167–78.

Broders AC. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am* 1941;21: 947–62.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:432-7.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-81.

Bross IDJ, Coombs J, Early onset of oral cancer among women who drink and smoke. *Oncology* 1976;33:136-139.

Cao L, Xie B, Yang X, Liang H, Jiang X, Zhang D, Xue P, Chen D, Shao Z. MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0133074.

Cao TH, Ling X, Chen C, Tang W, Hu DM, Yin GJ. Role of miR-214-5p in the migration and invasion of pancreatic cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Nov;22(21):7214-7221

Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCLSE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*. 2018 Mar 20;16 (1):11.

Carli ML, Santos SL, Pereira AAC, Hanemann JAC. Características clínicas, epidemiológicas e microscópicas do câncer bucal diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2009; 55(3):205-211

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26:31-8.

- Chang SS, Califano J. Current status of biomarkers in head and neck cancer. *J Surg Oncol* 2008;97:640-3.
- Chang CC, Yang YJ, Li YJ, Chen ST, Lin BR, Wu TS, Lin SK, Kuo MY, Tan CT. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013 Sep;49(9):923-931.
- Chen Q, Si Q, Xiao S, Xie Q, Lin J, Wang C, Chen L, Chen Q, Wang L. Prognostic significance of serum miR-17-5p in lung cancer. *Med Oncol*. 2013; 30:353.
- Chen G, Yan M, Li RR, Chen WT. Sonic Hedgehog Signalling Activation Contributes to ALCAM Over-Expression and Poor Clinical Outcome in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Chin J Dent Res*. 2018;21(1):31-40.
- Chiba I. Prevention of Betel Quid Chewers' Oral Cancer in the Asian-Pacific Area. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2001;2(4):263-269.
- Citri, A. and Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:505-516.
- Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, Kolle G, Gabrielli B, Grimmond SM. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/Sphase cell cycle transition. *Genome Biol*. 2008;9(8):R127.
- Coaracy AEV et al. Correlação entre os dados clínicos e histopatológicos dos casos de carcinoma espinocelular oral do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, em São Luís, MA. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(1):31-35.
- Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Oct;2(10):769-76.
- Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2916-24.
- Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*. 2012;18:262-7.
- Dang CV. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1-11.
- Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149:22-35.
- DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade: banco de dados. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>
- De Cecco L, Nicolau M, Giannoccaro M, Daidone MG, Bossi P, Locati L, Licitra L, Canevari S. Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data. *Oncotarget*. 2015 Apr 20;6(11):9627-42.
- Denoix PF. TNM classification. *Bull Inst Nat Hyg Paris* 1994; 1:1-69 and 1944; 5:52-82.

Devi A, Kamboj M, Singh V, Singh S. Clear-cell variant of squamous cell carcinoma in maxilla as primary lesion: A rare case. *J Oral Maxillofacial Pathol.* 2017 Sep-Dec; 21(3):425-428.

Dhanapal R, Saraswathi T, Govind RN. Cancer cachexia. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011;15:257-60.

Diao Y, Rahman MF, Villegas VE, Wickström M, Johnsen JI, Zaphiropoulos PG. The impact of S6K1 kinase on neuroblastoma cell proliferation is independent of GLI1 signaling. *BMC Cancer.* 2014 Aug 18;14:600.

Dolganiuc A, Petrasek J, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Velayudham A, Szabo G. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009 Oct;33(10):1704-10.

Dong X, Liu H, Chen F, Li D, Zhao Y. MiR-214 promotes the alcohol-induced oxidative stress via down-regulation of glutathione reductase and cytochrome P450 oxidoreductase in liver cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014 Jan;38(1):68-77.

Doshi Neena P, Shah Siddharth A, Patel Keyuri B, Jhabuawala Munira F. Histological grading of oral cancer: a comparison of different systems and their relation to lymph nodes metastasis. *Nat J Comun Med.* 2011 2(1):136

Elemeery MN, Badr AN, Mohamed MA, Ghareeb DA. Validation of a serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma post-hepatitis C infection in Egyptian patients. *World J Gastroenterol.* 2017 Jun 7;23(21):3864-3875.

Epstein JB, Güneri P, Boyacioglu H, Abt E. The limitations of the clinical oral examination in detecting dysplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Tex Dent J.* 2013 May;130(5):410-24.

Eversole LR. On the differential diagnosis of clear cell tumours of the head and neck. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993 Jul; 29B(3):173-9.

Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, Pazouki M. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Jul 1;16(4):e473-7.

Fan HX, Wang S, Zhao H, Liu N, Chen D, Sun M, Zheng JH. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. *Med Oncol.* 2014 Jul;31(7):41.

Fan M, Sethuraman A, Brown M, Sun W, Pfeffer LM. Systematic analysis of metastasis-associated genes identifies 71219 miR-17-5p as a metastatic suppressor of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146:487–502.

Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debryne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, Paquis P, Preynat-Seauve O, Krause KH, Chneiweiss H, Virolle T. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ.* 2012 Feb;19(2):232-44.

Fareh M, Almairac F, Turchi L, Burel-Vandenbos F, Paquis P, Fontaine D, Lacas-Gervais S, Junier MP, Chneiweiss H, Virolle T. Cell-based therapy using miR-302-367 expressing cells represses glioblastoma growth. *Cell Death Dis.* 2017 Mar 30;8(3):2713.

Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head Neck Oncol* 2009; 30:1-5.

Feng BJ, Khyatti M, Ben-Ayoub W, Dahmoul S, Ayad M, Maachi F, et al. Cannabis, tobacco and domestic fumes intake are associated with nasopharyngeal carcinoma in North Africa. *British Journal of Cancer* 2009;101:1207-1212.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality

Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, Paganelli A, Di Marcotullio L, Caffarelli E, Screpanti I, Bozzoni I, Gulino A. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J.* 2008 Oct 8;27(19):2616-27.

Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Di Rocco C, Riccardi R, Giangaspero F, Farcomeni A, Nofroni I, Laneve P, Gioia U, Caffarelli E, Bozzoni I, Screpanti I, Gulino A. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):568-77.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 2001 Oct 1;359(1):1-16.

Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, Solnica-Krezel L, Patton JG. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):259-63.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1989;43:992-1000.

Frazier JJ, Sacks H, Freedman PD. Primary glycogen-rich clear cell squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Nov;114(5):47-51.

Friemel J, Foraita R, Günther K, Heibeck M, Günther F, Pflueger M, Pohlabein H, Behrens T, Bullerdiek J, Nimzyk R, Ahrens W. Pretreatment oral hygiene habits and survival of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. *BMC Oral Health.* 2016 Mar 11;16:33.

Fu M, Marínez –Sánchez JM, Agudo A, Pascual JA, Ariza C, Moncada A, et al. DCOT Study Investigators. Nicotine dependence and salivary cotinine concentration in daily smokers. *Eur J Cancer Prev* 2012;21:96-102.

Gao Y, Luo L, Li S, Yang C. miR-17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444:230–4.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov;4(11):891-9

Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the hedgehog signaling pathway in cancer: beyond smoothed. *Oncotarget*. 2015;6:13899–913.

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001 Nov;65(4):391-426.

Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*. 2002 Dec;129(23):5323-37.

Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8:885–92.

Hashibe M, Straif K, Tashkin DP, Morgenstern H, Greenland S, Zhang ZF. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol* 2005;35:265-5.

He J, Sheng T, Stelter AA, Li C, Zhang X, Sinha M, Luxon BA, Xie J. Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J Biol Chem*. 2006;281:35598–602.

Huaitong X, Yuanyong F, Yueqin T, Peng Z, Wei S, Kai S. Microvesicles releasing by oral cancer cells enhance endothelial cell angiogenesis via Shh/RhoA signaling pathway. *Cancer Biol Ther*. 2017 Oct 3;18(10):783-791.

Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:513-37.

IARC – International Agency for Research on Cancer – World Health Organization – Global Cancer Observatory – Disponível em <https://gco.iarc.fr/today/home> download em 21/01/2019.

INCA - Instituto Nacional do Câncer Instituto. Ministério da Saúde. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p. Tradução de: TNM: classification of malignant tumours. (6th ed.).

INCA - Instituto Nacional de Cancer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer Jose Alencar Gomes da Silva – Estatísticas do Câncer – Atlas de mortalidade por câncer. Disponível em: [www.mortalidade.inca.gov.br](http://www.mortalidade.inca.gov.br) download em 29/11/2018.

Isacson G, Shear M. Content and distribution of glycogen in oral epithelial dysplasia. *Scand J Dent Res*. 1981 Feb;89(1):79-88.

Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol*. 2010 Apr 20;2:9.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S, Hopper C. Prospective evaluation of outcome after transoral CO<sub>2</sub> laser resection of T1/T2 oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:180-7.

Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011;57:19-37.

Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 10;24(17):2666-72.

Keller A. Survivorship with mouth and pharynx cancers and their association with cirrhosis of the liver, marital status and residence. *Am J Pub Hlth* 1969;59: 1139-1153.

Keren S., Shoude Z., Lu Z., Beibei Y. Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: A meta-analysis. *Tumor Biology*. 2014;35(3):2285–2295.

Keysar SB, Le PN, Anderson RT, Morton JJ, Bowles DW, Paylor JJ, Vogler BW, Thorburn J, Fernandez P, Glogowska MJ, Takimoto SM, Sehrt DB, Gan GN, Eagles-Soukup JR, Serracino H, Hirsch FR, Lucia MS, Thorburn A, Song JI, Wang XJ, Jimeno A. Hedgehog signaling alters reliance on EGF receptor signaling and mediates anti-EGFR therapeutic resistance in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013 Jun 1;73(11):3381-92.

Kirk A. How influences on teenage smoking reflect gender and society in Mali, West Africa. *JRSM Short Rep* 2012;3:2.

Kokoska MS, Piccirillo JF, Haughey BH. Gender differences in cancer of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:419-24.

Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*. 1999;1:312–9.

Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:534-41.

Kuo WT, Yu SY, Li SC, Lam HC, Chang HT, Chen WS, Yeh CY, Hung SF, Liu TC, Wu T, Yu CC, Tsai KW. MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer. *Anticancer Res*. 2016 Oct;36(10):5189-5196.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 Oct 26;294(5543):858-62

Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20350–5.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.



Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002 Oct 26;294 (5543):862-4.

Li H, Bian C, Liao L, Li J, Zhao RC. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126:565-75.

Li H, Gupta S, Du WW, Yang BB. MicroRNA-17 inhibits tumor growth by stimulating T-cell mediated host immune response. *Oncoscience.* 2014;1:531-9.

Li J, Qiu M, An Y, Huang J, Gong C. miR-7-5p acts as a tumor suppressor in bladder cancer by regulating the hedgehog pathway factor Gli3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Sep 10;503(3):2101-2107.

Li H, Wang H, Ren Z. MicroRNA-214-5p Inhibits the Invasion and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting Wiskott-Aldrich Syndrome Like. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(2):757-764.

Liao X, Siu MK, Au CW, Chan QK, Chan HY, Wong ES, Ip PP, Ngan HY, Cheung AN. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway contributes to endometrial carcinogenesis through  $\beta$ -catenin. *Mod Pathol.* 2009 Jun;22(6):839-47

Liao X, Xiang Y, Yu C, Li J, Li H, Nie Q. STAT3 is required for MiR-17-5p-mediated sensitization to chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8:15763-15774.

Lim EL, Trinh DL, Scott DW, Chu A, Krzywinski M, Zhao Y, Robertson AG, Mungall AJ, Schein J, Boyle M, Mottok A, Ennishi D, Johnson NA, Steidl C, Connors JM, Morin RD, Gascoyne RD, Marra MA. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Genome Biol.* 2015 Jan 29;16:18.

Lin MH, Chen YZ, Lee MY, Weng KP, Chang HT, Yu SY, Dong BJ, Kuo FR, Hung LT, Liu LF, Chen WS, Tsai KW. Comprehensive identification of microRNA arm selection preference in lung cancer: miR-324-5p and -3p serve oncogenic functions in lung cancer. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):9818-9826.

Livak KJ e Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001; 25:402-8.

Losi-Guembarovski R, Menezes RP, Poliseli F et al. Oral carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2009; 25(2):393-400.

Loureiro APM, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quim. Nova.* 2002; 25(5):777-793.

Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev Biol.* 2007 Oct 15;310(2):442-53.

Luo J. Glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3  $\beta$ ) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett.* 2009 Jan 18;273(2):194-200.

Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, Loomis AM, Shah JP. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):122-137.

Maeda O, Kondo M, Fujita T, Usami N, Fukui T, Shimokata K, Ando T, Goto H, Sekido Y. Enhancement of GLI1-transcriptional activity by  $\beta$ -catenin in human cancer cells. *Oncol Rep*. 2006;16:91-6.

Maghami E, Koyfman SA, Weiss J. Personalizing Postoperative Treatment of Head and Neck Cancers. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018 May 23;(38):515-522.

Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent J*. 2012;6:126-30

Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci*. 2010 Jun;52(2):267-73.

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

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma; review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):67-76.

Matias D, Predes D, Niemeyer Filho P, Lopes MC, Abreu JG, Lima FRS, Moura Neto V. Microglia-glioblastoma interactions: New role for Wnt signaling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017 Aug;1868(1):333-340.

Miller CS, Jhnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jun;91(6):622-35.

Mc MJ (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23:99-108.

Meng X, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui CC, Alman B. Suppressor of fused negatively regulates  $\beta$ -catenin signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:40113-9.

Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol*. 2010; 46:411-413

Michimukai E, Kitamura N, Zhang Y, Wang H, Hiraishi Y, Sumi K, Hayashido Y, Toratani S, Okamoto T. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene patched in oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001 Jul-Aug;37(7):459-64.

miRBase. disponível online em: <http://www.mirbase.org> – download em 15/06/16

Molina MA, Cheung MC, Perez EA, Byrne MM, Franceschi D, Moffat FL, et al. African American and poor patients have a dramatically worse prognosis for head and neck cancer: an examination of 20,915 patients. *Cancer* 2008;113:2797-806.

Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Stevens JR, Slattery ML. Alterations in microRNA expression associated with alcohol consumption in rectal cancer subjects. *Cancer Causes Control*. 2017 Jun;28(6):545-555

Nagini S, Sophia J, Mishra R. Glycogen synthase kinases: Moonlighting proteins with theranostic potential in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018 Jan 5; S(17)30179-7.

National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program SEER Stat Database. 2011. Disponível em :[www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov) download em February 2012)

Nazir H, Salroo IN, Mahadesh J, Laxmidevi B.L, Shafi Mi, Pillai A, Ananjan, Ifzah, Pradeep L. Clear Cell Entities of the Head and Neck: A Histopathological Review. *J Dent Med Sci*. 2015 Jun; (6):125-135.

NCI– National Cancer Institute - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) – Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html> download em 29/11/2018.

Neelakantan D, Zhou H, Oliphant MUJ, Zhang X, Simon LM, Henke DM, Shaw CA, Wu MF, Hilsenbeck SG, White LD, Lewis MT, Ford HL. Publisher Correction: EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells. *Nat Commun*. 2018 Nov 12;9(1):4720.

Noubissi FK, Goswami S, Sanek NA, Kawakami K, Minamoto T, Moser A, Grinblat Y, Spiegelman VS. Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Res*. 2009 Nov 15;69(22):8572-8.

Northcott PA, Fernandez-L A, Hagan JP, Ellison DW, Grajkowska W, Gillespie Y, Grundy R, Van Meter T, Rutka JT, Croce CM, Kenney AM, Taylor MD. The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69(8):3249-55.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005; 435:839-843.

Ogawa T, Washio J, Takahashi T, Echigo S, Takahashi N. Glucose and glutamine metabolism in oral squamous cell carcinoma: insight from a quantitative metabolomic approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Aug;118(2):218-25.

Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, Takechi M, Shigeishi H, Takata T, Kamata N. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. *Oncol Rep*. 2010 Jul;24(1):9-14.

Onofre MA, Sposto MR, Navarro CM, Motta ME, Turatti E, Almeida RT. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis *Oral Dis* 1997;3:148-52.

Osazuwa-Peters N, Adjei Boakye E, Chen BY, Tobo BB, Varvares MA. Association Between Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival, Smoking at Diagnosis, and Marital Status. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018 Jan; 144(1):43–50.

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

Paluszczak J, Wiśniewska D, Kostrzewska-Poczekaj M, Kiwerska K, Grénman R, Mielcarek-Kuchta D, Jarmuż-Szymczak M. Prognostic significance of the methylation of Wnt pathway antagonists-CXXC4, DACT2, and the inhibitors of sonic hedgehog signaling-ZIC1, ZIC4, and HHIP in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1777-1788.

Panigrahi GK, Ramteke A, Birks D, Abouzeid Ali HE, Venkataraman S, Agarwal C, Vibhakar R, Miller LD, Agarwal R, Abd Elmaged ZY, Deep G. Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. *Oncotarget*. 2018 Feb 17;9(17):13894-13910.

Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al.. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol* 2011;29:1488- 1494.

Paumgarten FJR, Gomes-Carneiro MR, Oliveira ACAX. O impacto dos aditivos do tabaco na toxicidade da fumaça do cigarro: uma avaliação crítica dos estudos patrocinados pela indústria do fumo. *Cad. Saúde Pública* 2017;33 Sup 3:e00132415

Persad A, Venkateswaran G, Hao L, Garcia ME, Yoon J, Sidhu J, Persad S. Active  $\beta$ -catenin is regulated by the PTEN/PI3 kinase pathway: a role for protein phosphatase PP2A. *Genes Cancer*. 2016 Nov;7(11-12):368-382.

Piccirillo JF, Vlahiotis A. Comorbidity in patients with cancer of the head and neck: prevalence and impact on treatment and prognosis *Curr Oncol Rep* 2006;8:123-9.Coatesworth AP, Tsikoudas a, MacLennan K. The cause of death in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2002;116:167-271.

Piccirillo JF, Spitznagel EL Jr, Vermani N, Costas I, Schnitzler M. Comparison of comorbidity indices for patients with head and neck cancer. *Med Care* 2004;42:482-6

Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci*. 2013 Sep-Oct;21(5):460-7.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843-50

Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2016 Feb 15;8(2).

Riobó NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP Jr. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4505-10.

Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The hedgehog signal transduction network. *Sci Signal*. 2012;5:re6.

Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3291-310.

Romañach M, Canedo N, Cortezzi E, abrahão A, Cabral M, Agostini M. Clear cell variant of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, December 2014; vol 118 (6):195.

Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A.  $\beta$ -catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2011 Apr 15;11(8):753-61.

Rousset M, Zweibaum A, Fogh J. Presence of glycogen and growth-related variations in 58 cultured human tumor cell lines of various tissue origins. *Cancer Res*. 1981 Mar;41(3):1165-70

Santoni M, Burattini L, Nabissi M, Morelli MB, Berardi R, Santoni G, Cascinu S. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci*. 2013;14:133–40.

Santos LCO, Batista OM, Cangussu MCT. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010;76(4):416-22.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1997

Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Jun;30(6):303-12.

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

Schauer AJ, Becker W, Reiser M, Possinger K. *The Sentinel Lymph Node Concept*. Berlin: Springer -Verlag, 2005.

Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, Regl G, Kroismayr R, Moriggl R, Sibilia M, Aberger F. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1284-92.

Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *Bmj*. 2000;321(7253):9

Severino P, Brüggemann H, Andreghetto FM, Camps C, Klingbeil M de F, de Pereira WO, Soares RM, Moyses R, Wunsch-Filho V, Mathor MB, Nunes FD, Ragoussis J, Tajara EH. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. *BMC Cancer*. 2013 Nov 9;13:533.

Seki S, Fujiwara M, Matsuura M, Fujita S, Ikeda H, Asahina I, Ikeda T. Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol* 2011;47:588-93.

Shah JP e Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin* 1995;45:352-68.

Shear, M. : Erythroplakia of the mouth. *Int. Dent. J*. 1972: 22: 460-473.

Silverman S, Barbosa JR, Kearns B. Ultrastructural and histochemical localization of glycogen in human normal and hyperkeratotic epithelium. *Arch. Oral Biol.* 1971;16:423-434.

Souza-Cruz C, Pereira AAC, Franzolin SOB, Hanemann JAC Oral squamous cell carcinoma: Survival, recurrence and death. *Acta Scientiarum Health Science.* 2014 July-Dec;36(2): 273-279

Stecca B, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent regulation of the Gli code in cancer by Hedgehog and non-Hedgehog signals. *J Mol Cell Biol.* 2010 Apr;2(2):84-95.

Stanfill SB, Oliveira da Silva AL, Lisko JG, Lawler JG, Kuklennyik P, Tyx RE, Peuchen EH, Richter P, Watson CH. Comprehensive chemical characterization of Rapé tobacco products: Nicotine, un-ionized nicotine, tobacco-specific N'-nitrosamines, polycyclic aromatic hydrocarbons, and flavor constituents. *Food Chem Toxicol.* 2015 Aug;82:50-8.

Syrjänen S. Humman papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol.* 2003 Aug;192(3):123-8.

Tang B, Xu A, Xu J, Huang H, Chen L, Su Y, Zhang L, Li J, Fan F, Deng J, Tang L, Sun C, Hu Y. MicroRNA-324-5p regulates stemness, pathogenesis and sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells by targeting hedgehog signaling. *Int J Cancer.* 2018 Jan 1;142(1):109-120.

Takenaka K, Kise Y, Miki H. GSK3 $\beta$  positively regulates hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353:501–8.

Teixeira AKM et al. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2009;55(3):229-236.

Teppo H, Alho OP. Comorbidity and diagnostic delay in cancer of the larynx, tongue and pharynx. *Oral Oncol* 2009;45:692-5.

Teoh SL, Das S. The Role of MicroRNAs in Diagnosis, Prognosis, Metastasis and Resistant Cases in Breast Cancer. *Curr Pharm Des.* 2017;23(12):1845-1859.

Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25:16–27.

Uziel T, Karginov FV, Xie S, Parker JS, Wang YD, Gajjar A, He L, Ellison D, Gilbertson RJ, Hannon G, Roussel MF. The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24;106(8):2812-7.

Volkweis MR, Garcia R, Pacheco CA . Estudo retrospectivo sobre as lesões bucais na população atendida em um centro de especialidades odontológicas. *Rev Gaúcha Odontol* 2010;58(1):21-25.

Walter V, Yin X, Wilkerson MD, Cabanski CR, Zhao N, Du Y, Ang MK, Hayward MC, Salazar AH, Hoadley KA, Fritchie K, Sailey CJ, Weissler MC, et al. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PLoS One.* 2013; 8:e56823.

Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Wang C, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Pathol Med* 2011;40:545-51.

Wang YF, Chang CJ, Lin CP, Chang SY, Chu PY, Tai SK, Li WY, Chao KS, Chen YJ. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012 Nov;34(11):1556-61.

Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4 (+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:744-52.

Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, Kotlarek M, Gornicka B, Koperski L, Niewinski G, Krawczyk M, Jazdzewski K. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Aug;53:208-17. van Zyl A, Bunn BK. Clinical features of oral cancer. *SADJ*. 2012 Nov;67(10):566-9.

World Health Organization (WHO) Databank. Health statistics and information systems. Geneva, Switzerland: WHO. Available at: [http:// www.who.int/healthinfo/statistics/mortality](http://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality)

World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC), Title: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 89, Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines, Lyon, France, 2007, Historical Overview 1.1.2 Snuff taking, pp. 43–47.

Wu Q, Luo G, Yang Z, Zhu F, An Y, Shi Y, Fan D. miR-17- 5p promotes proliferation by targeting SOCS6 in gastric cancer cells. *FEBS Lett*. 2014; 588:2055–62.

Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J*. 2012 Jun 13;31(12):2714-36

van Zyl A, Bunn BK. Clinical features of oral cancer. *SADJ*. 2012 Nov;67(10):566-9

Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009 Sep;1(6-7):338-51

Visani M, Acquaviva G, Marucci G, Ragazzi M, Franceschi E, Brandes AA, Tallini G, Pession A, de Biase D. MicroRNA in brain neoplasia: a review. *Int J Brain Disord Treat*. 2015 Aug;1:002

Xia H, Ooi LL, Hui KM. MiR-214 targets  $\beta$ -catenin pathway to suppress invasion, stem-like traits and recurrence of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e44206.

Xiao T, Kurita H, Shimane T, Nakanishi Y, Koike T. Vital staining with iodine solution in oral cancer: iodine infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1. *Int J Clin Oncol*. 2013 Oct;18(5):792-800.

Yan M, Wang L, Zuo H, Zhang Z, Chen W, Mao L, Zhang P. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011 Jun;47(6):504-9.

Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):425-33.

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

Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-137.

Yu ZW, Zhong LP, Ji T, Zhang P, Chen WT, Zhang CP. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol.* 2010 Apr;46(4):317-22.

Zhao JY, Wang F, Li Y, Zhang XB, Yang L, Wang W, Xu H, Liu DZ, Zhang LY. Five miRNAs Considered as Molecular Targets for Predicting Esophageal Cancer. *Med Sci Monit.* 2015 Oct 24;21:3222-30.

Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, He B, Zhang H, Chen YQ. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. *J Hematol Oncol.* 2010 Nov 24;3:46.

Zhang J, Tian XJ, Chen YJ, Wang W, Watkins S, Xing J. Pathway crosstalk enables cells to interpret TGF- $\beta$  duration. *NPJ Syst Biol Appl.* 2018 May 28;4:18.

Zheng Z, Zhao F, Zhu D, Han J, Chen H, Cai Y, Chen Z, Xie W. Long Non-Coding RNA LUCAT1 Promotes Proliferation and Invasion in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Through AKT/GSK-3 $\beta$  Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2018;48:891-904

Zhi T, Yu T, Pan M, Nie E, Wu W, Wang X, Liu N, You Y, Wang Y, Zhang J. EZH2 alteration driven by microRNA-524-5p and microRNA-324-5p promotes cell proliferation and temozolomide resistance in glioma. *Oncotarget.* 2017 Oct 24;8(56):96239-96248

Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med* 2010;39:299-305.

Zinke J, Schneider FT, Harter PN, Thom S, Ziegler N, Toftgård R, Plate KH, Liebner S.  $\beta$ -Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma. *Mol Cancer.* 2015 Feb 3;14:17.

Zois CE, Harris AL. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med* (2016) 94:137–154



## ANEXO I

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



### PARECER DO COLEGIADO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Os miRNAs atuam na via de Sonic Hedgehog durante a carcinogênese oral?

**Pesquisador:** Cláudia Maria Pereira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 59423316.5.0000.5283

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.750.032

#### Apresentação do Projeto:

Para o ano de 2017 as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para a ocorrência de 596.070 novos casos de câncer e deste total, 15.490 dos casos são originários da cavidade oral. Menos de 50% dos pacientes portadores de câncer de boca e orofaringe sobrevivem por mais de cinco anos. O tipo histológico mais comum da cavidade oral é o carcinoma de células escamosas (CCE). Torna-se importante conhecer o perfil molecular do CCE e de suas lesões precursoras, como as leucoplasias e eritroplasias. Recentemente, os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas que interferem na expressão dos genes, têm sido estudados como potenciais biomarcadores para detecção precoce de neoplasias. Sabe-se que miRNAs interferem na via de Sonic Hedgehog (SHH) afetando a proliferação tumoral. A via SHH é uma importante via embrionária que tem sido relacionada com o processo carcinogênico. Neste projeto pretende-se avaliar a expressão dos componentes da via SHH e de miRNAs que atuam nesta via, por PCR quantitativa (qPCR) em amostras de 20 lesões cancerizáveis (leucoplasias e eritroplasias), 20 amostras de CCE e 20 amostras de mucosa oral saudável atendidas pela Faculdade de Odontologia da Unigranrio. A Unigranrio possui uma forte equipe de patologia oral e pesquisadoras com conhecimento em biologia molecular, sendo referência em câncer oral na região da Baixada Fluminense. A compreensão destes eventos moleculares poderá vislumbrar a perspectiva de desenvolver uma plataforma molecular voltada para o diagnóstico preditivo do tal

**Endereço:** Rua Prof. José de Souza Herdy, 1180

**Bairro:** 25 de Agosto

**CEP:** 25.071-202

**UF:** RJ

**Município:** DUQUE DE CAXIAS

**Telefone:** (21)2672-7733

**Fax:** (21)2672-7733

**E-mail:** cep@unigranrio.com.br

## ANEXO II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Os miRNAs podem atuar na via de Sonic Hedgehog durante a carcinogênese oral?** Você foi selecionado durante o exame clínico nas clínicas de Estomatologia e Periodontia da UNIGRANRIO e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O objetivo deste projeto é estudar a presença de moléculas que podem estar presentes em células da mucosa da boca chamados de Sonic Hedgehog e de microRNAs. Sua participação consistirá no fornecimento de fragmento de mucosa bucal que poderá ser retirada com o seu consentimento, durante o procedimento diagnóstico na Clínica de Estomatologia ou durante cirurgias pré-protéticas na Clínica de Periodontia. Os riscos relacionados com a sua participação, serão aqueles relacionados com qualquer procedimento cirúrgico odontológico. Entretanto, tais abordagens já são muito bem estabelecidos na rotina odontológica, de modo que os riscos são bastante reduzidos. O benefício relacionado com a sua participação consistirá na obtenção de um diagnóstico clínico e histopatológico que indicará a presença de normalidade ou de alterações na mucosa de sua boca. Caso estas últimas condições sejam observadas, você receberá informações sobre a sua origem, evolução e a forma de tratamento mais adequada. As informações coletadas durante esta pesquisa serão confidenciais. Os seus dados pessoais não serão divulgados sob nenhuma circunstância e serão mantidos sob sigilo pelo coordenador desta pesquisa.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o Senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sobre sua participação, agora ou em qualquer momento com os pesquisadores Cláudia Maria Pereira (coordenadora) Andréa Braga Moleri, Luiz Carlos Moreira, Carina Maciel da Silva Boghossian e dos alunos Ana Beatriz Machado Lima e Andressa Raquel Alves Pinheiro, no e-mail [claudemarie\\_br@yahoo.com.br](mailto:claudemarie_br@yahoo.com.br) ou no telefone (21)2672-7881

---

Cláudia Maria Pereira  
Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: [cep@unigranrio.com.br](mailto:cep@unigranrio.com.br)

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Sujeito da pesquisa

---

Pai / Mãe ou Responsável Legal

## ANEXO III

### FICHA CLÍNICA PARA PROJETO DE PESQUISA

Nº da ficha _____	
“Os miRNAs podem atuar na via de Sonic Hedgehog durante a carcinogênese oral?”	
Dados pessoais não identificadores do voluntário	
Sexo _____	Idade _____ Cor _____ Peso _____
Altura _____	Profissão _____ Atividade ocupacional _____
Características clínicas do tumor	
Localização _____	Tamanho _____
Linfonodos regionais _____	Metástase distante _____
Características da lesão _____	
_____	
Tempo de evolução _____ Tempo de procura por outros atendimentos _____	
Outros profissionais consultados _____	
Hábitos viciosos	
Cigarro Marca _____	Tempo de consumo _____ Frequência _____
Álcool Tipo _____	Tempo de consumo _____ Frequência _____
Outros _____	
( ) tosse ( ) rouquidão ( ) disfagia ( ) hipertensão ( ) diabetes ( ) alterações hepáticas	
Comorbidades associadas _____	
_____	
Evolução	
Encaminhamento para _____	
Início do tratamento _____	Tipos de tratamentos _____
_____	
Acompanhamento do tratamento para avaliação do prognóstico do tumor	
Após 6 meses _____	
Após 1 anos _____	
Após 2 anos _____	
Após 3 anos _____	
Após 4 anos _____	
Após 5 anos _____	
Duque de Caxias, ____ / ____ / ____	

## **ANEXO IV**

### **TNM - Classificação Clínica**

#### **T - Tumor Primário**

TX - O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

Tis - Carcinoma in situ

T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

T2 - Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão

T3 - Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão

T4a (Lábio) - Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)

T4a (Cavidade oral) - Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face

T4b (Lábio e cavidade oral) - Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna

#### **N - Linfonodos Regionais**

NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1- Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão

N2- Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

N2a - Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão

N2b- Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

N2c- Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

N3 - Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

### M - Metástase à Distância

MX - A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Metástase à distância

### Grupamento por Estádios

Estádio 0 - Tis N0 M0

Estádio I - T1 N0 M0

Estádio II - T2 N0 M0

Estádio III - T1, T2 N1 M0, T3 N0, N1 M0

Estádio IVA - T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0

Estádio IVB - Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0

Estádio IVC - Qualquer T Qualquer N M1

Resumo Esquemático

Lábio, Cavidade Oral	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 até 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	<i>Lábio:</i> invade cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, pele <i>Cavidade oral:</i> invade cortical óssea, músculos profundos extrínsecos da língua, seios maxilares, pele
T4b	Espaço mastigador, lâminas pterigóides, base do crânio, artéria carótida interna
N1	Homolateral, único, ≤ 3 cm
N2	(a) Homolateral, único, > 3 até 6 cm (b) Homolateral, múltiplo, ≤ 6 cm (c) Bilateral, contralateral, ≤ 6 cm
N3	> 6 cm

INCA - Instituto Nacional do Câncer Instituto. Ministério da Saúde. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p. Tradução de: TNM: classification of malignant tumours. (6th ed.).

## ANEXO V

Quantificação do RNA total extraídas das amostras analisadas no estudo.

<b>Amostra</b>	<b>260/280</b>	<b>Concentração (ng/ µL)</b>
<b>CCE1</b>	1,76	496,28
<b>CCE2</b>	1,8	931,9
<b>CCE3</b>	1,6	978,6
<b>CCE4</b>	1,55	994,5
<b>CCE5</b>	1,96	681,50
<b>CCE7</b>	1,77	635,7
<b>CCE10</b>	1,87	1339,2
<b>CCE11</b>	1,56	1225,3
<b>CCE12</b>	1,6	1163,0
<b>CCE13</b>	1,94	822,02
<b>CCE14</b>	1,73	491,1
<b>CCE15</b>	1,96	990,8
<b>CCE16</b>	1,97	483,8
<b>CCE17</b>	2	389,5
<b>CCE18</b>	2,34	940,3
<b>CCE19</b>	2,01	397,9
<b>CCE20</b>	2,38	569,1
<b>CCE21</b>	1,88	825,5
<b>CCE22</b>	1,71	307,2
<b>CCE23</b>	1,92	778,0
<b>CCE24</b>	1,65	1426,42
<b>N1</b>	1,71	913,2
<b>N2</b>	1,68	581,2
<b>N3</b>	1,67	688,9
<b>N4</b>	1,75	1003,6
<b>N5</b>	1,74	1247,6
<b>N7</b>	1,62	260,3
<b>N8</b>	1,69	314,7

<b>N9</b>	1,74	775,5
<b>N10</b>	2,08	648,7
<b>N11</b>	1,63	282,3
<b>N12</b>	1,91	720,3
<b>N13</b>	1,73	633,3
<b>N14</b>	1,85	693,8
<b>N15</b>	1,91	620,8
<b>N16</b>	1,96	642,5
<b>N17</b>	1,73	454,3
<b>N18</b>	1,96	663,2
<b>N19</b>	1,92	764,2
<b>N20</b>	1,86	663,7
<b>N21</b>	1,61	1260,9

CCEO = Carcinoma de Células Escamosas Oral; N = normais

## Apêndice I

### Association between miR-324-5p and miR-214-5p with alcohol consumption in oral squamous cell carcinoma

1,2,6 1 1 3 4 Moleri, A.B. ; Dezonne, R. S. ; Lima, A.B.M. ; Spohr, T.C. Coutinho, E.S.F. ;

1,2 4 2 1,3 Boghossian-Silva, C.M. ; Lourenço, S.Q.C ; Moreira, L.C .; Moura-Neto, V. ;

\* 1,2 Pereira, C.M .

1- Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)– Duque de Caxias.

2 –School of Dentistry – Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)- Duque de Caxias

3 – Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN) – Rio de Janeiro

4– Departamento de Políticas e Instituições de Saúde- Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)– Rio de Janeiro

5 – Departamento de Patologia do Hospital Universitário Antônio Pedro - Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói

6 – - Departamento de Odontoclínica da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói

\*Corresponding author:

Dr. Cláudia Maria Pereira

Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO Program of translational Biomedicine –BIOTRANS  
Rio de Janeiro, Brazil

Phone: 55-21 2672-7752

E-mail: claudemarie\_br@yahoo.com.br

22 pages

5 figures

4 Tables

3, 727 words (without references and legends)

**Running title:** Oral squamous cell carcinoma and miRNA expression

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, Shh, Gli1, miRNA



## Apêndice II

### **TITLE: ETIOPATHOLOGICAL AGENTS AND MOLECULAR MECHANISMS OF ORAL CARCINOGENESIS**

1

AUTHORS: Rômulo Sperduto Dezonne , Tania Cristina Leite de Sampaio e

2 1,3 2 2

Spohr , Andréa Braga Moleri , Manoela Heringer , Luciana Santos Pessoa , Luiz

1,4 1,2 1 Carlos Moreira , Vivaldo Moura-Neto and Cláudia Maria Pereira \*.

Address:

1 – Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO

2 – Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IEC) / Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (SEES)

3 – Universidade Federal Fluminense – UFF

4 – Stomatology Center of Universidade do Grande Rio

\*Corresponding author:

Dr. Cláudia Maria Pereira

Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO Program of translational Biomedicine –BIOTRANS  
Rio de Janeiro, Brazil

Phone: 55-21 2672-7752

E-mail: claudemarie\_br@yahoo.com.br

32 pages

3 figures

1 Table

5,961 words (without references and legends)

**Running title:** Oral squamous cell carcinoma

**Key words:** Squamous cell carcinoma, sonic hedgehog, viral infection, microRNAs

## Apêndice III

### **Apresentação de pôster intitulado “miRNAs e a via Sonic Hedgehog no câncer oral” no X Congresso Franco Brasileiro de Oncologia**

#### MIRNAS E A VIA SONIC HEDGEHOG NO CÂNCER ORAL

1 2,3 3 4 5

Lyra, S.M.C. , Moleri, A.B. , Dezone, R.S. , Spohr, T.C.L.S. , Lourenço, S.Q.C. , Moura-Neto, V.

3,4 1,2,3 , Pereira, C.M.

1- Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica e Experimental (Odontoclinex) - Universidade do Grande Rio (Unigranrio), RJ - Brasil, 2- Escola de Ciências da Saúde - Unigranrio, 3-Programa de Pós- Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans) – Unigranrio, 4- Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN) – RJ – Brasil, 5- Departamento de Patologia – Universidade Federal Fluminense (UFF) – RJ – Brasil.

O uso de microRNAs (miRNAs) como biomarcadores com aplicação clínica no carcinoma de células como oncogenes, quanto como supressores tumorais. A alteração na expressão de miR-17, miR-214 e miR-324 já foi descrita e relacionada com a via de Sonic Hedgehog (SHH) no meduloblastoma. SHH é uma importante via embrionária, cuja molécula efetora Gli1, está associada com a progressão e com o mau prognóstico do CCEO. Um conhecimento mais detalhado sobre os componentes que atuam nesta via poderá auxiliar no entendimento da carcinogênese oral. Objetivo: Avaliar a presença de Gli1 e a expressão de miR-17, miR-214 e miR-324 no CCEO. Material e métodos: Foram realizadas análises histoquímicas para detecção da proteína Gli1. As expressões de miR-17, miR-214 e miR-324 foram avaliadas por PCR em tempo real em 20 casos de CCEO comparados com 20 amostras de mucosa oral normal. Resultados: A proteína Gli1 estava presente em 100% das amostras de CCEO (20/20), com positividade citoplasmática e nuclear principalmente no tipo histológico pouco diferenciado. Detectou-se um aumento de expressão de miR-17 e redução de miR-324 e miR-214. Houve uma correlação moderada entre o aumento de expressão de miR-17 e a marcação moderada/forte para Gli1. Conclusões: Um possível perfil supressor tumoral para miR-324 e oncogênico para miR-17 foi observado no CCEO, semelhantes aos estudos prévios em meduloblastomas. Semelhante ao câncer de mama, no CCEO miR-214 apresentou-se com expressão reduzida. Provavelmente, Gli1 pode estar interferindo na expressão de miR-17. Os próximos passos consistirão em correlacionar a expressão de Gli1 e destes miRNAs com dados clínico-patológicos dos pacientes portadores de CCEO e analisar a influência de Gli1 na regulação de miR-17 em culturas de CCEO tratadas com inibidores e ativadores da via SHH.

## **Apêndice IV**

### **Apresentação de trabalho intitulado “Evaluation of miRNAs related to the Sonic Hedgehog pathway in oral cancer” no 44º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral**

#### **AN EVALUATION OF MIRNAS RELATED TO THE SONIC HEDGEHOG PATHWAY IN ORAL CANCER**

**Silvia Maria de Carvalho Lyra, Andréa Braga Moleri, Rômulo Sperduto Dezonne, Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr, Simone de Queiroz Chaves Lourenço, Vivaldo Moura-Neto, Claudia Maria Pereira**

#### **Painel de pesquisa científica (PPC)**

The microRNAs (miRNAs) as biomarkers with clinical application in OSCC has been suggested in the literature. These small non-coding RNA molecules can act as oncogenes or tumor suppressor molecules. Altered expression of miR-17, miR-214 e miR-324 was described and related to the Sonic Hedgehog (SHH) pathway in medulloblastomas. SHH is an important embryonic pathway associated with progression and poor prognosis in OSCC. A better comprehension about the miRNA activity will improve the knowledge about the SHH pathway in oral carcinogenesis. Objective: This study aims to evaluate the Gli1 (an important SHH component) and miR-17, miR-214 e miR-324 expression in OSCC. Study Design: Gli1 evaluation was performed by immunohistochemistry and miR-17, miR-214 and miR-314 expression was investigated by Real Time PCR in 20 OSCC samples. Results: Gli1 demonstrated a cytoplasmic and nuclear positivity mainly in the undifferentiated histological grade. Hypoexpression of miR-324 and miR-214 as observed in 40% and 60% of OSCC samples respectively. And a higher expression of miR-17 was identified in 60% of these samples. Conclusion: It was observed the possible tumor suppressor and oncogenic profile of miR-324 and miR-17 as mentioned in medulloblastomas. However, miR-214 did not demonstrate an oncogenic behavior on OSCC.

## Apêndice V

### Apresentação de pôster intitulado “Evaluation of miRNAs and Gli1 expression in oral cancer” no XI Simpósio Oncobiologia

#### Evaluation of miRNAs and Gli1 expression in oral cancer

#Nunes, A.R.##1#, Moleri A. #1,2#, Boghossian-Silva C.M.#1,2,3#, Dezone R.S. #2#, Spohr T.C.L.S. #4#, Moura-Neto V. #2, 4, 5#, Pereira C.M. #1, 2, 3#

#1# Escola de Ciências da Saúde - Universidade do Grande Rio (Unigranrio), #2# Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans) - Unigranrio, #3# Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica e Experimental (Odontoclinex)- Unigranrio, #4# Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN), #5# Laboratório de Morfogênese Celular (LMC) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Head and neck cancer is among the ten most common cancers worldwide, and oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for more than 90% of the diagnosed cases. The prevention of OSCC requires programs to control alcohol and tobacco consumption. Almost half of the people with cancer receive late diagnoses, making treatment less likely to succeed and reducing the survival chances. Some studies have evaluated the potential use of microRNAs as biomarkers with clinical application, in OSCC. These small non-coding RNA molecules can function as oncogenes or tumor suppressor genes. It is well known that some miRNAs interfere with the Sonic Hedgehog (SHH) pathway, affecting tumor proliferation. The SHH pathway is an important embryonic pathway associated with both the progression and the prognosis of malignant neoplasms, including oral cancer, but the comprehension of this pathway on OSCC has not been established yet. This study consisted in a retrospective phase with collection of socio-demographic and clinical-pathological data from dental records of patients with oral lesions attended at Stomatology Clinic of Unigranrio in the period from 2007 to 2016, and a prospective phase conducted from 2014 to 2016 that consisted in the collection of OSCC samples for molecular and histochemical analysis. Expression level of miR-214 and miR-314 was done using Real Time PCR evaluation. Immunofluorescence was performed for detection of Gli1 protein. This study was approved by the local ethics committee (no 1.753.632). In the period from 2007 to 2016 were diagnosed 307 patients with OSCC in the Stomatology Clinic of Unigranrio, being 72,64% males and 27,36% females. The age group of 50 to 69 years presented a higher prevalence (66,12%). The ethnic group mulattos (miscegenation between whites and blacks) was the most affected (43.32%). A total of 40.39% patients were tobacco users, with frequent alcohol and tobacco consumption reported in 42.35% of the cases. The tongue was the anatomic region most commonly affected by OSCC (34.53%). Moderately differentiated tumors were the most common histological type (70.68%). The immunohistochemical evaluation of Gli1, a Sonic pathway effector protein, demonstrated a cytoplasmic and nuclear positivity, mainly in the undifferentiated histological type. Molecular analyzes in 20 OSCC samples demonstrated a hypoexpression of miR-324 suppressor in 40% of the analyzed samples. Differently,

miR-214 with oncogenic activity was hyperexpressed in only 20% of the patients. Although these data are preliminary, we hope to find a possible association between the miRNAs involved in the SHH pathway with the patients' clinical and pathological data. This work could expand the current knowledge about the role of the miRNAs in the tumor invasion process of the OSCC.

## Apêndice VI

### **Apresentação de painel intitulado “Avaliação da expressão de miRNAs e Gli1 no câncer oral” no III Simpósio Internacional de Estomatologia e Patologia Cirúrgica dos Maxilares**

**Lyra, S.M.C. , Moleri A. , Dezone R.S ., Spohr T.C.L.S. , Lourenço**

**5 1,2.3 S.Q.C. , Pereira C.M.**

1-Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica e Experimental (Odontoclinex)-Unigranrio, 2-Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans) – Unigranrio, 3- Escola de Ciências da Saúde - Universidade do Grande Rio (Unigranrio), 4- Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN), 5-Departamento de Patologia – Universidade Federal Fluminense (UFF)

#### **Avaliação da expressão de miRNAs e Gli1 no câncer oral**

Área: Patologia Bucal

Categoria: Pesquisa

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tipo histológico mais comum dentre os cânceres que acometem a cavidade oral. O diagnóstico tardio do CCEO torna o sucesso do tratamento menos provável, aumentando a morbidade e reduzindo as chances de sobrevivência. O uso de microRNAs (miRNAs) como biomarcadores com aplicação clínica no CCEO tem sido avaliado. Essas moléculas de RNAs não-codificantes podem funcionar tanto como oncogenes, quanto como supressores tumorais. Alguns miRNAs apresentam-se desregulados na via de Sonic Hedgehog (SHH), uma importante via embrionária, associada com a progressão e com o mau prognóstico no câncer, inclusive no CCEO. Um conhecimento mais detalhado sobre os componentes que atuam nesta via poderá auxiliar no entendimento da carcinogênese oral. **Objetivo:** Avaliar a presença dos componentes da via SHH e analisar a expressão dos miRNAs, associados com essa via em amostras de CCEO. **Material e métodos:** Foi realizada uma análise retrospectiva de 307 casos de CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da UNIGRANRIO no período entre 2007 e 2016. Uma análise molecular e histoquímica foi feita prospectivamente em casos de CCEO coletados de 2014 a 2016. A expressão de miR-214 e miR-314 foi analisada por PCR em Tempo Real e a detecção da proteína Gli1 foi obtida por imunofluorescência. **Resultados:** Os dados epidemiológicos observados nos casos CCEO estão de acordo com a literatura, sendo a maioria constituída por pacientes do sexo masculino, acima dos 50 anos, pardos, tabagistas e etilistas. O tipo histológico mais comum foi o moderadamente diferenciado (70,68%). A avaliação imunohistoquímica de Gli1, proteína

efetora da via SHH, demonstrou uma positividade citoplasmática e nuclear principalmente no tipo histológico pouco diferenciado. A análise de 20 casos de CCEO demonstrou uma hipoexpressão de miR-324 e de miR-214 em 40% e 60% das amostras respectivamente. **Conclusões:** O perfil da população portadora de CCEO está de acordo com a literatura. Uma possível atividade supressora de miR-324 foi observada, entretanto, ao contrário do esperado, não foi observado um perfil oncogênico de miR-214 no CCEO. Esse estudo poderá expandir o conhecimento atual sobre a atuação dos miRNAs no processo de carcinogênese e invasão do CCEO.