

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Ana Beatriz Machado Lima

**Análise do perfil de expressão de *MGMT* e da família
miR-181 no câncer oral**

Duque de Caxias

2017

Ana Beatriz Machado Lima

**Análise do perfil de expressão de *MGMT* e da família miR-181 no
câncer oral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biomedicina translacional (BIOTRANS) Da Unigranrio, INMETRO e UEZO para a obtenção de título de Mestre em Biomedicina translacional.

Orientadores: Prof. Dra. Cláudia Maria Pereira
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Duque de Caxias

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

L732a Lima, Ana Beatriz Machado.

Análise do perfil de expressão de MGMT e da família miR-181 no câncer oral / Ana Beatriz Machado Lima. - Duque de Caxias, 2017.
85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2017.

“Orientadora: Profa. Cláudia Maria Pereira”.

“Orientador: Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto”.

Bibliografia: f. 42-54

1. Ciências Biomédicas. 2. Neoplasias bucais. 3. Carcinoma de células escamosas orais . 4. Câncer oral. 5. O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase. I. Pereira, Cláudia Maria. II. Moura Neto, Vivaldo. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

A minha mãe, Mirtis, presenças
sempre constantes, amorosas e virtuosas a
quem devo mais do que sou capaz de
agradecer.

Ao meu saudoso tio Ailton, que
cumpru sua missão, e me ensinou
coisas que jamais aprenderei em
nenhum artigo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas Odontológicas (LAMP), e no Laboratório de Genética (LabGen), ambos da Universidade do Grande Rio, sob a orientação da professora Claudia Maria Pereira e do professor Vivaldo Moura Neto. Contou com apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento sempre será para Deus! Por todas as coisas maravilhosas com que ele me abençoa diariamente e todos os males que desvia do meu caminho. Depois meu agradecimento vai para minha inspiração, para a mulher mais guerreira e pulso forte que eu tenho a honra de conviver há mais de três décadas, minha mãe Mirtis Nascimento Machado. Esta, que não serviu apenas de inspiração para mim, como para todos de nossa família. A primeira de uma geração a entrar em uma universidade, UERJ, a conseguir o diploma. Agora chegou a minha vez de representar, mãe! Que como você, que eu seja a primeira da família, mas não a única! Quero poder ver muitos “Machado”, “Lima” mestres e doutores. Obrigada, é muito pouco para tudo que minha mãe representa, tudo que ela já fez e faz por mim, e quanto que ela torce... Então um “eu só cheguei até aqui com você.” É a frase que eu tenho para agradecer tanto carinho e dedicação.

Agradeço à minha bonequinha Manuela Machado, presente maior que recebi da vida e com quem aprendo todos os dias. Uma coisinha pequenina que desconhece ser força motriz que me impulsiona toda vez que esmoreço. É quem me faz ter vontade de buscar o infinito.

Ao meu marido Eric de Menezes, a pessoa mais amável do mundo, mais parceira e compreensível, que me ajudou a segurar a peteca durante essa jornada, dando-me mão, o colo, os ouvidos. Foram dias ouvindo minhas apresentações (todas elas!), noites baixando programas, formatando o computador, salvando aquele arquivo perdido... Enfrentou amorosamente todas as dificuldades causadas pela minha ausência, e tampou meus buracos. Amor, sem você seria impossível!!

Gostaria de Agradecer à instituição na qual eu trabalho, e onde tive a oportunidade de desenvolver esse projeto. A Unigranrio participou ativamente do meu desenvolvimento acadêmico profissional. Muito Obrigada, por esta oportunidade!!

Gostaria de agradecer aos meus incentivadores Prof.^a. Vivianne Galante, o Prof. Pedro Cabelo e a preceptora Danielle Voigt. Lembro-me como se fosse hoje, eles me apoiando a entrar para o Biotrans, a buscar pela Prof.^a. Cláudia. Agradeço por plantarem essa ideia em mim, e me fazerem estar aqui hoje. Aproveito para agradecer-los também por me acolher no LabGen.

Agradeço ao meu chefe Prof. Edson Jorge, a oportunidade ímpar de crescimento profissional. Poucos são os gestores que apoiam a capacitação de seus colaboradores. Não poderia esquecer da Prof.^a Thais Accorsi e todos os professores que desenvolvem trabalhos no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Odontológica (LAMP), pelo apoio, carinho, ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Luiz Carlos, à Prof.^a Vania Do Carmo, e Prof.^a Andrea Moleri, por serem esses anjos na Terra. Não por apenas colaborarem (muito) para meu trabalho, mas por serem verdadeiramente humanos, por se preocuparem com o bem estar de cada paciente, com carinho, atenção e respeito. Esse agradecimento acaba não sendo apenas meu, mas de todos que tiveram a oportunidade de serem tratados e orientados por vocês e toda equipe de Estomatologia.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica (ICs) Andressa Pinheiro, e Carlos dos Santos que muito aprenderam no decorrer do trabalho e muito me ensinaram. Agradeço também a todos os outros alunos que desenvolvem seus projetos no LAMP. É uma constante troca de aprendizado.

Gostaria de agradecer às Prof.^a Carina Boghossian e Prof.^a Denise Silva, e sua equipe da clínica de Periodontia por cederem as amostras normais, e dessa forma viabilizar a realização do projeto.

Agradeço à Prof.^a Flávia Lima pela honra de me aceitar neste projeto, e por toda contribuição, aproveito para agradecer ao Dr. Luiz e todos do Laboratório de Morfologia Celular (LMC /UFRJ) que colaboraram para a realização do trabalho.

Só tenho a agradecer a minha banca de qualificação pela presença e contribuições feitas, enquanto o trabalho ainda ganhava forma.

Gostaria de agradecer à Prof.^a Marlene Benchimol, que leciona de forma diferenciada. Num primeiro momento nos faz temê-la, mas no decorrer da disciplina, me fez admirá-la. É uma professora que cobra, porém dá os subsídios para chegarmos lá. Muito obrigada por dividir suas experiências e me fazer aprender com seus ensinamentos. Aproveito para agradecer a todos os professores do programa, que tive a oportunidade de conhecer e absorver um pouco de seus conhecimentos, com certeza, todos tiveram sua parcela de contribuição durante essa empreitada.

Agradeço aos colegas que estiveram comigo durante esses dois anos, fazendo disciplinas, trabalhos em grupo, lendo ou escrevendo artigos, dividindo as incertezas e aflições, compartilhando esse cotidiano de Mestrandos e Doutorandos. Somos fortes, conseguimos!

Agradeço ao revisor desse trabalho Prof. Plinio Senna, pelo tempo disponibilizado para enriquecer o trabalho, e pelas contribuições.

Agradeço à FAPERJ, por financiar e viabilizar a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao braço direito da Prof.^a Cláudia, e órgão vital pra mim o Dr. Rômulo, cujo exemplo de sabedoria, envolvimento, disponibilidade, carinho e amizade foram imprescindíveis na elaboração deste trabalho. Torço por vôos ainda mais altos!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Vivaldo Moura Neto, por tanto saber e tão simples ser. Muito obrigada por junto com a Prof.^a Claudia e todos os colaboradores, tornar possível a realização do projeto.

Super agradeço à Prof.^a Claudia Maria Pereira, minha mais que orientadora, presença constante, que me conduziu durante esse processo com muito comprometimento, determinação, sabedoria e paciência. Uma orientadora excepcional que me ensinou exatamente tudo, se preocupando com os mínimos detalhes. Ela treina apresentação com você, fica nervosa com você, perde fins de semana corrigindo trabalhos, te defende quando for preciso, mas também não se importa se precisar puxar a orelha, compra reagente, leva aluno em congresso. Foram dois anos de convivência diária, extraíndo seus ensinamentos. Muito obrigada!! Que sua estrela brilhe no *hall* dos grandes pesquisadores brasileiros.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre
ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Lima ABM. **Análise do perfil de expressão de *MGMT* e da família miR-181 no câncer oral.** Duque de Caxias; 2017. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio]

O câncer oral é o sétimo tipo de câncer mais incidente na população brasileira e um problema de saúde pública, por ser invasivo, com altas taxas de metástase e recidivas. Os principais fatores envolvidos em sua gênese são o tabagismo, o etilismo e a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas orais (CCEOs). Dentre as alterações moleculares descritas no CCEO, destacam-se a diminuição dos níveis de *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase* (*MGMT*) e de alguns membros da família miR-181. Estudos reportam o *MGMT* e miR-181 como importantes biomarcadores para o prognóstico e sobrevida em glioblastoma multiforme. Porém, não existe até o momento nenhuma avaliação do nível de expressão dessas moléculas no CCEO, nem sua relação com os dados clinico-patológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de *MGMT* e de miR-181 em portadores de CCEO atendidos na clínica de Estomatologia da Unigranrio. Para estas análises foram cultivadas três linhagens de CCEO, e coletadas 21 amostras de CCEO e 20 amostras de mucosa oral saudável. A expressão de *MGMT* e de miR-181a/b/c foi obtida pelo método da PCR quantitativo (qPCR). Para a correlação entre o nível de expressão dessas moléculas com os dados clinico-patológico aplicou-se o teste estatístico do Qui-quadrado. Observamos a hipoexpressão de *MGMT* em 58,3% das amostras, e uma correlação entre a expressão desse gene com a prática de sexo oral ($p=0,03$). Verificamos que miR-181a e miR-181c estão hipoexpressos em 30% e 35% das amostras, respectivamente. Entretanto, miR-181b demonstrou uma hiperexpressão em 41% das amostras. Encontramos uma correlação, ainda não descrita na literatura entre o etilismo e miR-181c em CCEO. Não encontramos correlação entre *MGMT* e os miRNAs analisados. Os resultados explicitam uma importante relação de *MGMT* e miR-181 com fatores etiológicos e comportamentais associados à carcinogênese oral. Porém, novos estudos que incluam a detecção do HPV são necessários para explicitarmos a importância destes biomarcadores na diagnose e prognóstico no CCEO.

Palavras-chave: Câncer oral, microRNAs, *MGMT*, miR-181.

ABSTRACT

Lima ABM. **Analysis of MGMT and miR181 family expression in oral cancer.** Duque de Caxias; 2017. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio]

Oral cancer is the seventh most frequent type of cancer in the Brazilian population and it is considered a public health problem, with high invasiveness, rates of metastasis and recurrence. The main factors involved in its genesis are Consumption of tobacco, alcoholism and Human Papillomavirus (HPV) infection. The most frequent histological type is oral squamous cell carcinoma (OSCC). Among the molecular alterations described in the OSCC, *MGMT* levels and members of the miR-181 family stand out. Studies report *MGMT* and miR-181 as important biomarkers for the prognosis and survival during glioblastoma multiforme pathogenesis. However, there is no evaluation of their expression in the OSCC, nor their relation with clinical-pathological data. The main objective of the present study was to evaluate the *MGMT* and miR-181 expression in patients with OSCC treated in the Stomatology Clinic of Unigranrio. For these purpose, we cultured three OSCC cell lines and collected 21 OSCC and 20 health oral mucosa samples. *MGMT* and miR-181a / b / c expression were evaluated by quantitative PCR (qPCR). The correlation between these molecules expression and the clinic-pathological data were given by chi-square statistical test. We observed a down regulation of *MGMT* in 58.3% of the samples and a positive correlation with the practice of oral sex ($p = 0.03$). We also found a miR-181a and miR-181c down regulation in 30% and 35% of the samples, respectively. However, miR-181b presented a high expression in 41% of the cases. We observed a correlation between alcoholism and miR-181c in OSCC, not yet described in the literature. Nonetheless, we found no significant correlation between *MGMT* and the levels of the analyzed miRNAs. The results reveal an important relationship between *MGMT* and miR-181 family with the etiological and behavioral factors associated with oral carcinogenesis. However, new studies that include HPV detection are necessary to make explicit the importance of these biomarkers in diagnosis and prognosis of OSCC.

Keywords: Oral cancer, microRNA, *MGMT*, miR-181.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspecto clínico de um CCEO em estágio avançado.	4
Figura 2.	Biogênese dos miRNAs.	9
Figura 3.	Membros da família miR-181.	10
Figura 4.	Distribuição entre dos membros da família miR-181 entre diferentes espécies de organismo.	10
Figura 5.	Representação esquemática do plano de trabalho.	16
Figura 6.	Eletroforese dos cDNAs confeccionados.	19
Figura 7.	Diagrama representando a exposição dos pacientes portadores de CCEO.	23
Figura 8.	Avaliação relativa da expressão de <i>MGMT</i> .	27
Figura 9.	Perfil de expressão de miR-181 em linhagens de CCEO.	28
Figura 10.	Perfil de expressão de miR-181a em amostras de CCEO.	29
Figura 11.	Perfil de expressão de miR-181b em amostras de CCEO.	30
Figura 12.	Perfil de expressão de miR-181c em amostras de CCEO.	31
Figura 13.	Avaliação da expressão dos membros da família miR-181 no CCEO.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos pacientes CCEO.	22
Tabela 2.	Descrição dos hábitos associados aos pacientes CCEO.	23
Tabela 3.	Distribuição anatômica do CCEO.	24
Tabela 4.	Gradação histológica do CCEO.	24
Tabela 5.	Quantificação das amostras tumorais.	25
Tabela 6.	Quantificação das amostras normais.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	<i>Homo sapiens actin, beta</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCEB	Carcinoma de células escamosas basaloide
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
cDNA	DNA complementar
CpG	Bases citosina e guanina adjacentes
Ct	<i>threshold cycle</i>
°C	Graus celsius
DTT	<i>DL-Dithiothreitol</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTPs	deoxinucleotídeos fosfato
F	<i>Forward</i>
FA	Frequência Absoluta
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio De Janeiro
FR	Frequência Relativa
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Human</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
GST	Genes supressores tumorais
HPV	Papiloma vírus humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K-ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
K562	Linhagem de medula óssea humana com leucemia mieloide

	crônica
KCL22	Linhagem de Leucemia mielóide crônica
KU812	Linhagem de basófilo humano com leucemia mieloide crônica
L	Litro
M	molar
µg	micrograma
µM	micromolar
µL	microlitro
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
<i>MGMT</i>	Metilguanina O-6-metiltransferase
miRNA	Micro RNA
n	Número amostral
NIC	<i>National Institute of Cancer</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
P16	<i>Gene cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
P15	<i>Gene Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>pmol</i>	Picomoles

R	<i>Reverse</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
qPCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SCC-4	Linhagem humana com CCEO de lingua
SCC-9	Linhagem humana com CCEO de lingua
SCC-25	Linhagem humana com CCEO de lingua
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais, do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TMZ	<i>Temozolamida</i>
TNFα	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
U	Unidade
UFF	Universidade Federal Fluminense
UNIGRANRIO	Universidade do Grande Rio

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O CCEO.....	2
1.1.1. Epidemiologia e etiopatogênese do CCEO.....	2
1.1.2. Aspectos clínicos e histopatológicos do CCEO.....	4
1.1.3. Tratamento e prognóstico do CCEO.....	5
1.2. Genes supressores tumorais no câncer.....	6
1.2.1. Importância da expressão de MGMT no câncer.....	7
1.2.2. <i>MGMT</i> e o CCEO.....	7
1.3. A família miR-181.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo principal.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1. Plano de trabalho.....	16
4.2. Casuística.....	17
4.3. Cultura de células.....	17
4.4. Avaliação do nível de expressão de MGMT.....	18
4.4.1. Extração de RNA das amostras.....	18
4.4.2. Confecção dos cDNAs.....	18
4.4.3. Análise de MGMT por qPCR.....	19
4.5. Análise de expressão da Família mir-181.....	20
4.5.1. Confecção de cDNAs.....	20
4.5.2. Análise por qPCR.....	21
4.6. Análises Estatísticas.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Caracterização das amostras.....	22

5.2.	Análises de expressão de MGMT e de miRNAs.....	25
5.2.1.	Avaliação do perfil de expressão de MGMT no CCEO.....	26
5.2.2.	Avaliação do perfil de expressão da família miR-181 em CCEO.....	27
6.	DISCUSSÃO	33
7.	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXO I	55
	ANEXO II	59
	ANEXO III	60

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), o câncer oral está entre os quinze cânceres mais incidentes na população mundial (IARC, 2012). Nos Estados Unidos, conforme dados do Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER- *Surveillance, Epidemiology and End Results*) são estimados 49.670 novos casos de câncer oral e orofaringe para o ano de 2017, de acordo com o *National Institute of Cancer - NCI* (NCI, 2017). Já no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer – INCA, o câncer oral é o sétimo câncer mais incidente, e a estimativa prevista para o período de 2016/2017 é que sejam registrados 15.490 novos casos desta doença (INCA, 2016).

O câncer oral é considerado uma doença de grande relevância por se tratar de uma ameaça significativa para a saúde pública mundial, devido ao impacto negativo no prognóstico do paciente provocado pelo seu tratamento. Algumas sequelas observadas no pós-tratamento incluem disfunções na fala, na mastigação, na deglutição, na saúde dental, além de problemas psicossociais (RYZEK et al., 2014). A longa exposição a hábitos como o tabagismo e etilismo e à infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV), contraído pela prática do sexo oral, pode aumentar dramaticamente o risco de patologias na mucosa oral, como o aparecimento do carcinoma de células escamosas oral (CCEO) (PARSHAD et al., 2015; ZHOU et al., 2015). O prognóstico do CCEO depende do estilo de vida, da presença de comorbidades, do estadiamento tumoral, da idade do paciente e da presença do HPV (JADHAV; GUPTA, 2013). Nos últimos 35 anos houve um aumento de 2,5 vezes na taxa de mortalidade por câncer oral no Brasil, apesar dos enormes avanços observados na cirurgia e na radioterapia que constituem estratégias terapêuticas padrão-ouro no tratamento desta doença (INCA, 2017).

O processo de carcinogênese oral, ou seja, a transição observada na mucosa oral saudável para o carcinoma *in situ* apresenta uma série de fenótipos histopatológicos, como hiperplasia, acantose, displasia e pleomorfismo celular. Tais alterações são precedidas por eventos genéticos e epigenéticos.

Alterações no DNA de células malignas podem levar à amplificação de oncogenes e ao silenciamento de genes supressores tumorais, como é o caso do gene supressor *metilguanina O-6-metiltransferase (MGMT)*. Pesquisas recentes no

campo da biologia molecular voltadas para a identificação de biomarcadores no CCEO demonstram que mecanismos genéticos (ex: mutações e perda de heterozigosidade) e epigenéticos (ex: metilações e miRNAs) e constituem-se ferramentas promissoras e importantes para a o manejo do câncer oral (HATZIAPOSTOULOU et al. 2013).

Os miRNAs são moléculas que atuam na regulação de genes que participam de importantes processos biológicos (BARTEL, 2004; GARTEL; KANDEL, 2006; ZHANG et al., 2007) . Desde a sua descoberta na última década, os miRNAs têm ganhado um grande espaço nas pesquisas relacionadas às mais diversas áreas da saúde, como doenças parasitárias, carcinogênese, medicina forense e doenças cardíacas (MALLICK et al., 2008; GASCHÉ; GOEL, 2012; ELZENAAR et al., 2013; WANG et al., 2013). A expressão destas moléculas já foi relacionada com a progressão, invasão e metástase em diferentes tipos de cânceres. A família miR-181 é uma importante família de miRNAs relacionada com diversos processos fisiológicos, principalmente com o processo inflamatório, e tem sido descrita alterada em diversos tipos de cânceres (PENG et al., 2015; STEINHILBER et al., 2015; WENG et al., 2015).

A busca por novos marcadores genéticos e epigenéticos poderá auxiliar no conhecimento sobre a capacidade microinvasiva e recidivante do CCEO. Além disso, a determinação da existência de uma associação entre o nível de expressão destas moléculas no CCEO com os dados clínico-patológicos dos pacientes poderá servir de ferramenta na detecção precoce de lesões pré-cancerosas com potencial maligno, impedindo sua progressão e levando a abordagens terapêuticas mais conservadoras (SHRIDHAR et al., 2016).

1.1. O CCEO

1.1.1 Epidemiologia e etiopatogênese do CCEO

Para o período de 2016/2017 as estimativas do INCA apontam para a ocorrência de 596.070 novos casos de câncer; e deste total, 15.490 dos casos, originários na cavidade oral. Só para o Estado do Rio de Janeiro, foram estimados 1.980 novos casos de câncer oral, como esta população composta por 1.430 homens e 550 mulheres (2,6 homem:1mulher), representa o 4º tipo de câncer mais incidente em homens no Rio de Janeiro e o 10º que mais incidente em mulheres

(INCA, 2016).

Os principais fatores etiológicos envolvidos com o CCEO são o tabagismo e o etilismo (SHAH; COOPER, 1995), seguido da infecção pelo HPV, mais especificamente os subtipos HPV16 e HPV18 (ALBERS et al., 2010). A exposição ao tabaco aumenta a probabilidade de incidência do CCEO, podendo ser responsável por 50 a 90% dos casos de câncer oral em todo o mundo. O consumo direto ou indireto de cigarros é um fator de risco importante para muitos tipos de câncer (câncer de pulmão, câncer oral e orofaringe, câncer de esôfago, entre outros)(HECHT, 2003). Só o tabaco possui cerca de 4700 substâncias tóxicas (LEONE, 2015), onde 60 são classificadas como carcinogênicas (ZYCZKOWSKI et al., 2014). Dentre os carcinógenos presentes no tabaco, podemos destacar as nitrosaminas, que são consideradas os principais agentes etiológicos para o desenvolvimento do câncer no pulmão. Estudos demonstram que as nitrosaminas podem causar danos no DNA (HECHT, 1996) através da indução de mutações pontuais em oncogenes como o *k-ras* (BELINSKY et al., 1990), ou a alquilação de supressores tumorais como o *MGMT*. O uso concomitante do tabaco com o álcool está associado a um aumento na incidência do CCEO (BLOT et al., 1988).

A presença do HPV em amostras de CCEO tem sido descrita na literatura. Autores descrevem um percentual de infecção pelo HPV em 20 a 50% nas amostras de CCEO analisadas (CHOCOLATEWALA; CHATURVEDI, 2009). O HPV possui um genoma de cadeia dupla e circular que codifica oito genes, dos quais, dois genes (E6 e E7) possuem propriedades transformantes (FAUQUET, 2005). Atribui-se a presença do HPV na cavidade oral a prática do sexo oral. Dado a sua significância prognóstica, a rotina de detecção da presença do HPV é preconizada pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), um programa dos Estados Unidos destinado a desenvolver *guidelines* que auxiliam os clínicos no manejo de pacientes com câncer. Segundo o NCCN, a detecção do HPV em amostras de pacientes deve se tornar um padrão em todas as malignidades que acometem a cavidade oral e orofaringe (FAKHRY; D'SOUZA, 2013).

1.1.2. Aspectos clínicos e histopatológicos do CCEO

O CCEO origina-se na cavidade oral a partir de lesões pré-existentes, como as leucoplasias e eritroplasias, ou *de novo*. Seus aspectos clínicos são variados, compreendendo desde úlceras irregulares, com bordas elevadas e endurecidas, até massas exofíticas com superfície verrucosa e áreas de necrose (Figura 1). Nos estágios iniciais, o CCEO apresenta-se com uma úlcera indolor. Nos estágios mais avançados, ele se apresenta sintomáticos, vegetantes e invasivos (FELLER; LEMMER, 2012; GORENCHTEIN ET AL., 2012).



Figura 1. Aspecto clínico de um CCEO em estágio avançado. Lesão exofítica, apresentando superfície verrucosa e áreas de necrose em borda lateral de língua (imagem gentilmente cedida pelo Prof. Luiz Carlos Moreira).

As regiões anatômicas mais afetadas pelo CCEO são a língua (principalmente a borda lateral) e o assoalho bucal, porém esta neoplasia pode também ocorrer em outros sítios anatômicos, como trígono retromolar, palato duro, gengivas e mucosa labial (SHAH; LYDIATT, 1995; AKANUMA et al., 1999; SCULLY; PORTER, 2000).

O CCEO é o tipo histológico mais comum na cavidade oral e representa 90% de todas as neoplasias malignas que acometem esta região anatômica (BARASCH et al., 1998). O CCEO origina-se do epitélio estratificado escamoso oral. Histologicamente o CCEO apresentar alterações no epitélio que vão desde hiperqueratose, acantose, hiperplasia e graus variados de displasia (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Apresenta um padrão de invasão para o tecido conjuntivo, com formação de cordões e ninhos de células epiteliais e de pérolas de queratina. Em relação ao grau de diferenciação histológica, proposto pela Classificação Internacional de Tumores (*International Classification of Tumors*) proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o CCEO pode ser classificado

como bem, moderadamente ou pouco diferenciado (RIVERA; VENEGAS, 2014). O CCEO bem diferenciado assemelha-se ao epitélio escamosos normal, com a presença de pérolas de queratina no conjuntivo. Já o moderadamente diferenciado apresenta pleomorfismo nuclear, presença de mitoses atípicas e menos queratinização. Já o pouco diferenciado as células imaturas predominam com um número aumentado de mitoses atípicas e pouco grau de queratinização (PINDBORG et al., 1977).

Outro dado importante é que o CCEO pode apresentar variantes histológicas, como o carcinoma de células escamosas basalóide (CCEB) (RIVERA; VENEGAS, 2014). O CCEB é uma variante rara do CCEO que apresenta um comportamento mais agressivo. O CCEB tem uma incidência epidemiológica semelhante ao CCEO, ou seja, grande maioria de homens acima dos 60 anos com o histórico de tabagismo e etilismo. Histologicamente esta variante apresenta ninhos de células basalóides e escamosas invadindo o conjuntivo com hialinização pericelular proeminentes, podendo apresentar pequenas áreas císticas (ERENO et al., 2008).

1.1.3. Tratamento e prognóstico do CCEO

A cirurgia é considerada a principal forma de tratamento do CCEO, podendo ser associada à radioterapia e/ou quimioterapia. O prognóstico do CCEO é incerto, apesar dos progressos observados no campo da quimioterapia e radioterapia, nas últimas três décadas. Este fato deve-se à natureza agressiva e metastática deste tumor, levando ao aparecimento de recidivas (WANG et al., 2013). Em lesões iniciais (restritas ao seu local de origem sem comprometimento de gânglios linfáticos regionais e/ou outros órgãos) o tratamento precoce, pode promover a cura em 80% dos casos.

A sobrevida de cinco anos para o CCEO 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 de boca e orofaringe sobrevivem por mais de cinco anos (FEDELE, 2009). Além disso, deve-se mencionar que os pacientes portadores de CCEO que são HPV+ apresentam um melhor prognóstico, devido à sensibilidade aumentada destes tumores a radio e a quimioterapia (MARUR et al., 2010; FAKHRY; D'SOUZA, 2013). Um fato relevante

demonstrado por Bavle e colaboradores, é que 35% dos CCEOs classificados como iniciais (T1-T2) de acordo com o sistema de classificação TNM (T = tamanho do tumor, N = comprometimento de linfonodos regionais e M = metástase à distância) apresentaram um pior prognóstico, apesar do tamanho reduzido do tumor e da ausência de metástase. A resposta para este comportamento um tanto quanto enigmático, pode estar relacionada à heterogeneidade tumoral observada no CCEO, produto do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (BAVLE, et al., 2016).

1.2. Genes supressores tumorais no câncer

A exposição dos queratinócitos orais aos fatores de risco, pode induzir nestas células alterações em vias moleculares importantes, que resultarão no aumento/redução na produção de determinadas proteínas. Isso porque durante o processo de carcinogênese haverá um aumento na expressão de proteínas reguladoras positivas do ciclo celular produzidas pelos oncogênes e a diminuição da expressão de proteínas reguladoras negativas do ciclo expressas pelos genes supressores tumorais (SCULLY; PORTER, 2000). Para que o processo de carcinogênese ocorra é necessário que estes eventos ocorram simultaneamente.

O silenciamento ou inativação dos genes supressores tumorais (GST) é considerado como o evento determinante na transformação de uma célula pré-maligna numa célula maligna (WILLIAMS, 2000). Mecanismos genéticos (ex: mutações e deleções) e epigenéticos (metilação e ação de miRNAs) são implicados no silenciamento dos GSTs. O silenciamento de importantes GSTs como *p16*, *p15*, *MLH1*, *MGMT* e *E-caderina* são descritos em pacientes portadores de CCEO e associada ao risco aumentado desta doença. Uma associação positiva entre o tabagismo e o silenciamento do gene *MGMT* foi descrita no CCE de cabeça e pescoço, e já foi descrito como um marcador bastante útil para a detecção e o monitoramento de recidivas nesta doença (ROSAS et al., 2001; VISWANATHAN et al., 2003).

1.2.1. Importância da expressão de MGMT no câncer

O gene *MGMT* é um importante supressor tumoral responsável por codificar

uma proteína de reparo do DNA. *MGMT* defende o organismo contra a toxicidade e a capacidade mutagênica de agentes alquilantes (metilantes), como por exemplo, as nitrosaminas presentes no tabaco (KAINA et al., 1993). A proteína *MGMT* é capaz de remover grupos alquila inseridos durante a exposição aos carcinógenos, principalmente oriundos do tabaco, da posição O6 da guanina, um importante local de alquilação do DNA (ESTELLER et al., 1999; KATO et al., 2006; HUANG et al., 2010). Esta desalquilação da base guanina, provocada pela exposição a agentes alquilantes, constitui a primeira linha de defesa celular para a remoção desses danos ao DNA (ESTELLER et al., 1999; KATO et al., 2006; HUANG et al., 2010).

A expressão de *MGMT* está relacionada com o desenvolvimento de quimioresistência em pacientes portadores de neoplasias malignas. Por exemplo, a temozolomida (TMZ) é um quimioterápico utilizado no tratamento para o glioblastoma multiforme (GBM), uma neoplasia maligna cerebral bastante agressiva. A TMZ se constitui um agente com ação alquilante que induzirá a citotoxicidade nas células malignas. Após o tratamento com o TMZ as células tumorais de GBM iniciarão o processo de morte programada (CARMO et al., 2011). No entanto, a ação de *MGMT* no GBM pode ser um fator de resistência ao tratamento com TMZ em virtude de seu mecanismo de reparo ao DNA (BARCISZEWSKA et al., 2015). Sendo assim, pacientes portadores destes tumores cerebrais e que expressam *MGMT* não são elegíveis para a terapia com TMZ, pois esta medicação passa a ser ineficaz (WICKSTROM et al., 2015).

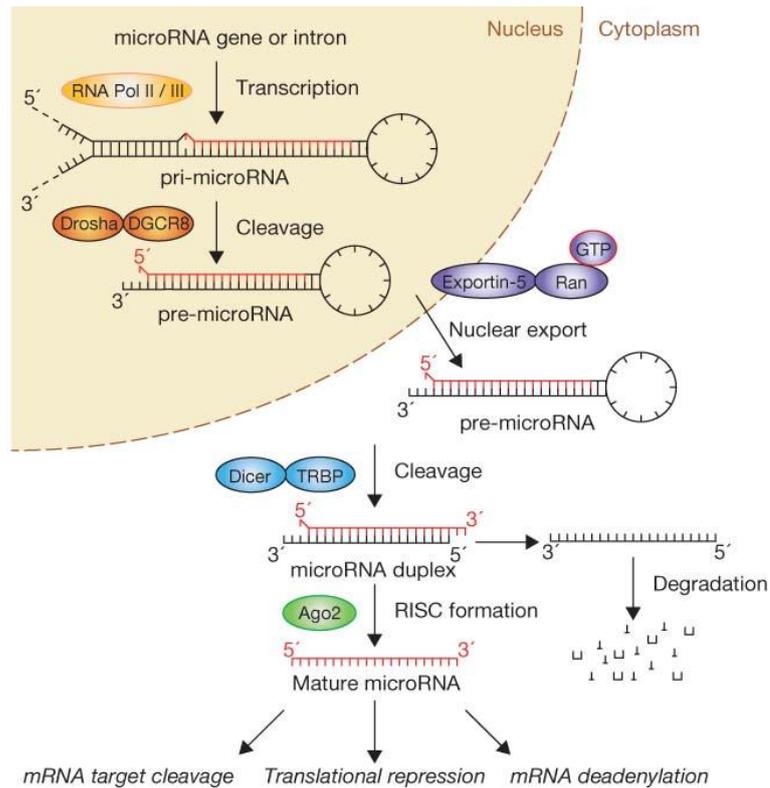
1.2.2 MGMT e o CCEO

A baixa expressão de *MGMT* é descrita em diversos tipos de cânceres (SCESNAITE et al., 2014). Em neoplasias malignas de glândulas salivares, a perda de expressão do gene *MGMT* está correlacionada com a diminuição da sobrevida (Scesnaite, Jarmalaite et al. 2014). No câncer oral, o silenciamento desse gene foi associado à exposição a fatores etiológicos como o tabagismo e a mastigação de betel (agentes alquilantes) (SAWHNEY et al., 2007; HUANG et al., 2010). Análises dos níveis da proteína *MGMT* por imunohistoquímica apontaram para uma significativa correlação entre a perda de expressão de *MGMT* com metástase linfonodal, comportamento tumoral agressivo e com a progressão do câncer oral. Neste mesmo estudo foi demonstrado uma significativa associação ($p= 0.046$) entre o tabagismo e a ausência de expressão de *MGMT* em lesões orais pré-malignas

(SAWHNEY et al., 2007).

O mecanismo de silenciamento de *MGMT* mais frequentemente relatado é a metilação aberrante da ilha CpG localizada na região promotora deste gene que leva ao silenciamento transcricional (Esteller 2006; Kato, Hara et al. 2006). A detecção precoce de CCEO, através da investigação de hipermetilação de *MGMT* é objetivo de uma série de estudos (NAGATA et al., 2012).

Além da hipermetilação, outros elementos da maquinaria epigenética já foram descritos como capazes de regular a expressão de *MGMT*: os miRNAs. Os miRNAs são pequenas moléculas (18-24 nucleotídeos) de RNA que não codificam proteínas e são capazes de interferir na expressão gênica, através do mecanismo de degradação ou inibição de um RNA mensageiro (mRNA) alvo (Figura 2) (ZHANG et al., 2007). Estima-se que um terço dos genes de mamíferos, incluindo um grande número de oncogenes, supressores tumorais e genes associados à invasão, disseminação e quimioresistência de tumores sejam regulados pelos miRNAs (ZHANG; FARWELI, 2008). Os miRNAs como miR-221, miR-222 (QUINTAVALLE et al., 2013) e miR-181d (ZHANG et al., 2012) já foram descritos como capazes de inibir a expressão de *MGMT*. Estudos demonstram que a expressão de miRNAs da família miR-181 juntamente com o perfil de expressão de *MGMT* podem ser utilizados como bons biomarcadores para o prognóstico em GBMs (LAKOMY et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Até o momento não existe nenhum estudo sobre a relação entre os miRNAs e o gene *MGMT* no câncer oral.

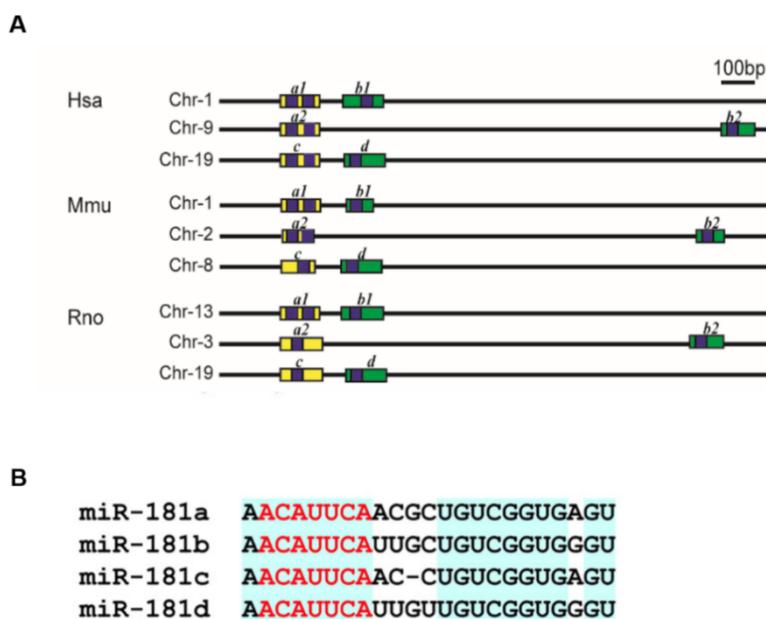


Fonte: Winter et al., 2009 *in* Nature Cell Biology (2009)

Figura 2. Biogênese dos miRNAs. Explicitando a origem dos miRNAs no núcleo das células, em formato de grampo de cabelo ainda como pri-miRNA, até ser clivado pela enzima Drosha, transformando-se no pre-miRNA, quando é transportado para o citoplasma, onde sofre a ação da Dicer. Transformando-se em única fita, miRNA maduro, com capacidade de se unir com o complexo argonauta.

1.3. A família miR-181

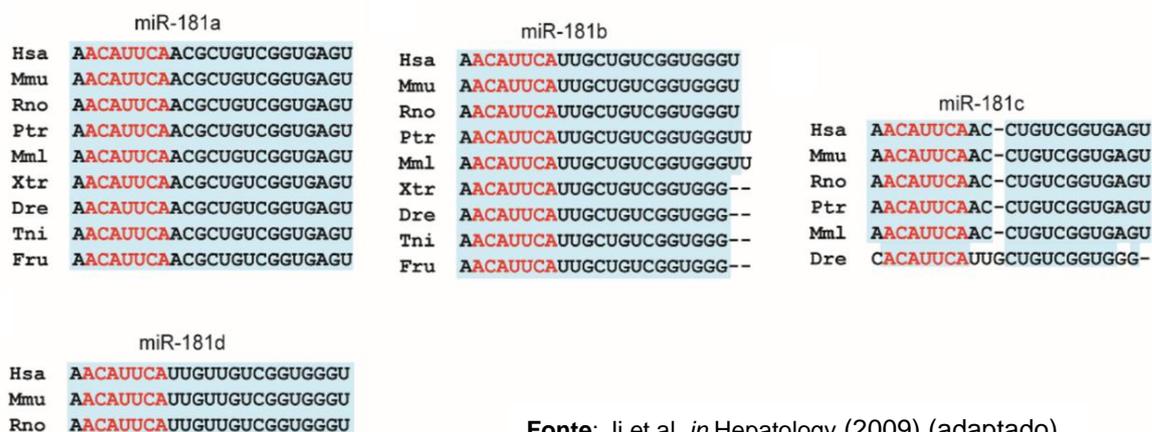
A família miR-181 é formada por seis genes (miR-181a1, miR-181a2, miR-181b1, miR181b2, miR-181c e miR-181d) localizados em três diferentes cromossomos (Figura 3A). Estes genes dão origem a quatro sequências maduras miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d. miR-181a-1 e miR-181a-2, assim como miR-181b-1 e miR-181b-2, possuem sequências maduras idênticas (Figura 3B) (Jl et al., 2009).



Fonte: Ji et al. *in* Hepatology (2009) (adaptado)

Figura 3. Membros da família miR-181. A - Representação esquemática da localização cromossômica dos membros da Família miR-181 em diferentes espécies; B - Sequências humanas maduras de miR-181a/b/c e d. Em vermelho estão representadas as *seed sequences* de cada miRNA. Em azul estão os nucleotídeos comuns aos quatro tipos de miRNAs

A organização genômica destes miRNAs parece ser muito conservada entre as espécies (Figura 4) o que sugere um papel importante destes miRNAs no desenvolvimento dos organismos. Parece haver uma relação muito próxima entre miR-181b e miR-181d e entre miR-181a e miR-181c (Ji et al., 2009).



Fonte: Ji et al. *in* Hepatology (2009) (adaptado)

Figura 4. Distribuição entre dos membros da família miR-181 entre diferentes espécies de organismo. Podemos perceber que a sequência de nucleotídeos destacada em vermelho se mantém inalterada para cada miRNA, mesmo em espécies diferentes.

Os miRNAs da família miR-181 exercem funções diversas e a expressão desregulada destes miRNAs foi associada a uma variedade de malignidades (LI et al., 2012; LI et al., 2014; PARIKH et al., 2014; ZHAO et al., 2016). A família miR-181 foi descrita por Chen et al. (2014) como reguladores da resposta imune durante o desenvolvimento do organismo. No câncer estes miRNAs, dependendo do tipo histológico, podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais. Estudos têm revelado que os miRNAs desempenham um papel importante na regulação dos mecanismos de metástase e invasão no câncer (Ma 2016) e que a família miR-181, constituída por miR-181a/b/c/d tem função associada com a resistência tumoral (SHI et al., 2008; TSITSIOU; LINDSAY 2009; ZHANG et al., 2012).

○ **miR-181a**

Este miRNA controla a resposta imune adaptativa, pois modula a seleção de células T no timo afetando a resposta destas células aos antígenos (PEDERSEN; DAVID, 2008). Em gliomas, tanto miR-181a, quanto miR-181b apresentam expressão reduzida e parecem atuar como supressores tumorais (SHI et al., 2008). Células de gliomas transfectadas com mimicos de miR-181a e submetidas à altas doses de irradiação, mostraram-se significativamente mais sensíveis à radiação, sugerindo a hipótese de que miR-181a pode sensibilizar as células à radioterapia (CHEN et al., 2010). No câncer de ovário, miR-181a também atua como oncogene e a sua hiperexpressão está relacionada com um pior prognóstico e com o aparecimento de recidivas (PARIKH et al., 2014). No CCEO miR-181a é descrito um supressor tumoral sendo capaz de inibir *k-ras*. A expressão ectópica de miR-181a foi capaz de reduzir a capacidade de proliferação e o crescimento no CCEO (SHIN et al., 2011).

○ **miR-181b**

Este miRNA possui genes-alvo com função supressora (SHI et al., 2013; ZHAO et al., 2016). Uma diminuição deste miRNA foi observada em 65 de 97 amostras de câncer colorretal e esta hipoexpressão foi associada com o grau de diferenciação e com estágios avançados deste tumor (ZHAO et al., 2016). Uma meta-análise demonstrou que a hipoexpressão de miR-181a e miR-181b é associada a um pior prognóstico em malignidade hematológicas (LIN et al., 2013). Um estudo anterior já havia demonstrado que a hiperexpressão de miR-181b é um indicador de bom prognóstico para pacientes portadores de em leucemia mielóide aguda (LI et al.,

2012). Apesar de ser descrito como hipoexpressos, outros estudos demonstram uma hiperexpressão de miR-181b como no carcinoma papilar de tireóide (LI et al., 2014). Foi demonstrado que em amostras de câncer oral e de orofaringe, o HPV 16 foi capaz de inibir a expressão de miR-181a, miR-181b e miR-181d promovendo o crescimento tumoral e a capacidade tronco deste tumor (WALD et al., 2011; LEE et al., 2015). O miR-181b é considerado um importante biomarcador na progressão do câncer de cavidade oral. Um aumento na expressão de miR-181b foi observado durante a transformação de leucoplasias durante sua progressão para o CCEO invasivo (CERVIGNE et al., 2009), influenciando no aparecimento de metástases linfonodais, na invasão vascular e em um pior prognóstico (YANG et al., 2013).

○ **miR-181c**

Este miRNA tem como alvos TNF- α (ZHANG et al., 2012) e o ativador de plasminogênio (uPA) responsável pela formação de colágeno tipo 1 (LI et al., 2015). Ele tem funções importantes como a regulação do metabolismo das mitocôndrias (DAS et al., 2012), pois participa do mecanismo inflamatório suprimindo o *Receptor Tipo Toll 4 (Toll-Like Receptor 4)* (LI et al., 2016). Como já foi citado anteriormente, o *status* de metilação de MGMT constitui um marcador favorável em GBMs para implementação da terapia com TMZ. Um estudo retrospectivo que avaliou 38 pacientes com GBM demonstrou que altos níveis de miR-181c e miR-21 foram correlacionados com a progressão desta doença em um período de 6 meses. Apesar de não terem encontrado relação entre miR-181c e o *status* de metilação de MGMT, estes autores recomendam a avaliação dos níveis de expressão de miR-181c e de miR-21 como indicadores com alta especificidade e sensibilidade para a identificação precoce de pacientes com alto risco para esta doença. Baseado nesta expressão preconiza-se para estes pacientes a utilização de terapias mais intensivas após a cirurgia (LAKOMY et al., 2011). Zhao e colaboradores (2016), demonstraram uma hipoexpressão de miR-181c em linhagens leucemia mielóide crônica (K562, KCL22, KU812) e perceberam que esse comportamento se manteve em linhagens primárias de células mononucleares de sangue periférico providas dos pacientes com leucemia mielóide crônica (ZHAO et al., 2016). Não existe até o momento nenhum estudo que avalie o nível deste miRNA em CCEO ou de orofaringe.

○ **miR-181d**

Este miRNA tem como alvos *K-ras*, *Bcl2* (WANG et al., 2012) e *MGMT* (KHALIL et al., 2016). Foi demonstrado em três *cohorts* independentes com pacientes portadores de GBM que a expressão de miR-181d encontrava-se inversamente correlacionada com o prognóstico, constituindo este miRNA como um biomarcador preditivo para prognóstico. Neste mesmo estudo os autores examinaram o perfil de metilação de *MGMT* em 20 amostras de pacientes e em 10 delas *MGMT* encontrou-se fortemente metilado e nas 11 amostras restantes a expressão de *MGMT* foi inversamente proporcional à miR-181d, ressaltando a hipótese de que este gene é alvo direto de miR-181d. Experimentos com transfecção realizados por estes mesmos autores demonstraram que miR-181d interagia diretamente com *MGMT*, regulando este gene em um nível pós-transcricional (ZHANG et al., 2012). Um estudo realizado com linhagens tumorais transfectadas como HPV16, demonstrou que este vírus é capaz de inibir a expressão de miR-181a e miR181d. A superexpressão de miR-181a e miR-181d nestas mesmas células demonstrou que estes miRNAs foram capazes de reverter os fenótipos induzidos pelo HPV16, como o crescimento independente de ancoragem e a capacidade de auto-renovação destas células. Entretanto, estes miRNAs não foram capazes de alterar a expressão das proteínas virais E6 e E7 (LEE et al., 2015).

Considerando a importância do gene *MGMT* e dos membros da família miR-181 como biomarcadores para diagnóstico precoce e prognóstico em diversos tipos de cânceres este estudo teve por objetivo avaliar a expressão destas moléculas em pacientes portadores de CCEO e correlacionar a expressão destas com dados clinicopatológicos destes pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer oral está entre os quinze cânceres mais incidentes na população mundial e no Brasil é o sétimo câncer mais incidente com a incidência prevista para o período de 2016/2017 de 15.490 novos casos (IARC, 2012; INCA, 2016). O estudo desta doença possui grande relevância, por se tratar de uma ameaça significativa para a saúde pública mundial, em razão do impacto do seu tratamento no prognóstico do paciente que compromete consideravelmente a saúde oral e psicossocial (HE et al., 2015). Os principais fatores etiológicos envolvidos em sua gênese são o tabagismo e etilismo, e a infecção pelo HPV responsáveis pelo aparecimento do principal tipo histológico que acomete a região de cabeça e pescoço, o CCEO (LAMSTER et al., 2000).

Estudos demonstram que a expressão da família miR-181 juntamente com o perfil de expressão de *MGMT* podem ser utilizados como bons biomarcadores de prognóstico em GBMs (LAKOMY et al., 2011; ZHANG et al., 2012). A expressão alterada de alguns membros desta família (miR-181a e miR-181b) já foi correlacionada com a capacidade de transformação de lesões pré-malignas em CCEO invasivos (CERVIGNE et al., 2009) e com a capacidade de proliferação e o crescimento no CCEO (SHIN et al., 2011).

Até o momento não existe nenhum estudo que avalie a expressão e a relação destes dois marcadores moleculares (*MGMT* e família miR-181) no câncer oral. Este estudo tem por finalidade a determinação da existência de uma assinatura molecular, baseada no perfil de expressão destas moléculas e a sua relação com os dados demográficos e clínico-patológicos destes pacientes, para que esta assinatura possa servir como ferramenta não-invasiva para o diagnóstico precoce ou para o estabelecimento de terapias menos mutilantes para esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Analisar o perfil de expressão de *MGMT* e dos membros da família miR-181 em amostras de pacientes portadores de CCEO e correlacionar este perfil de expressão com os dados clínico-patológicos destes pacientes.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a população portadora de CCEO atendida na clínica de Estomatologia da UNIGRANRIO em relação aos aspectos demográficos e clínico-patológicos, bem como a presença de hábitos relacionados com a carcinogênese oral;
- Avaliar o nível de expressão de *MGMT* em linhagens de CCEO e em amostras de pacientes portadores de CCEO por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa);
- Avaliar o nível de expressão de membros família miR-181 em linhagens de CCEO e em pacientes portadores de CCEO por qPCR;
- Correlacionar os resultados obtidos durante as análises moleculares com os dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes;
- Correlacionar a expressão de *MGMT* com a expressão de miR-181.

4. METODOLOGIA

4.1. Plano de trabalho

Para facilitar o entendimento sobre as metodologias empregadas nesta pesquisa, um fluxograma contendo uma síntese do plano de trabalho (Figura 5) descreve as abordagens laboratoriais utilizadas neste estudo.

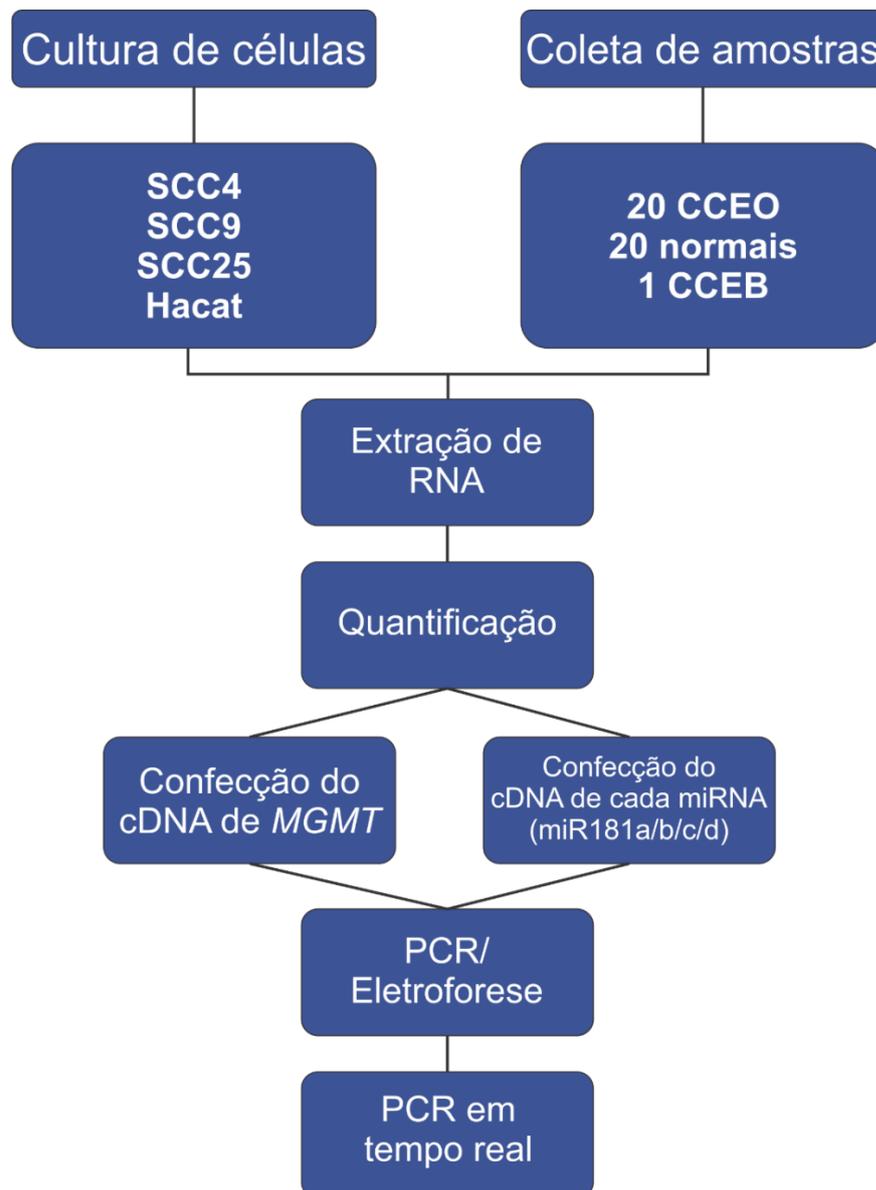


Figura 5. Representação esquemática do plano de trabalho, demonstrado as culturas e amostras utilizadas para o estudo, e os passos de processamento realizado para análise de expressão de *MGMT* e da família miR-181.

4.2. Casuística

Este estudo foi realizado em pacientes que buscaram atendimento na Clínica de Estomatologia e na Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO, Duque de Caxias-RJ, Brasil) no período de (2015 a 2017). A amostra foi composta por 41 pacientes, sendo 21 pacientes com CCEO e 20 pacientes com mucosa oral normal. Os pacientes portadores de CCEO foram recrutados de acordo com a demanda da clínica, e foram avaliados inicialmente através de anamnese e exame físico para a coleta dos dados clínico-patológicos e posteriormente submetidos ao procedimento de biópsia incisional com finalidade diagnóstica. Durante a biópsia diagnóstica foram coletados dois fragmentos de tecido. Um fragmento foi armazenado em formol a 10% e destinado às análises histopatológicas no laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal Fluminense (UFF Niterói-RJ, Brasil). O segundo fragmento coletado, foi acondicionado em um criotubo contendo *RNA Later* e armazenado a – 80 °C para análises moleculares. Foram também coletadas 20 amostras de mucosa oral normal, provenientes de pacientes da Clínica de Periodontia, submetidos à cirurgias periodontais, ou cirurgias pré-implantares seguindo protocolo semelhante aos das amostras de CCEO.

Como critérios de inclusão só foram aceitos os pacientes com confirmação histopatológica de CCEO, somente tumores primários, ausência de tratamento prévio de câncer (cirurgia, quimioterapia, e/ou radioterapia). E como critérios de exclusão não foram aceitos recidivas de câncer oral ou outro tipo histológico de câncer oral.

A utilização das amostras foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO (CAAE -59423416.2.0000.5283) (Anexo 1). Os dados da população foram levantados através da Ficha Clínica e do termo de consentimento pós-informado devidamente assinado por todos os pacientes (Anexos 2 e 3).

4.3. Cultura de células

Foram utilizadas as seguintes linhagens tumorais derivadas de CCEO SCC-9 e SCC-25 do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram comparadas com uma linhagem de queratinócitos normais HaCaT (BCRJ). Todas as linhagens foram cultivadas em meios de cultura específicos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, na presença de antibióticos e antimicóticos.

4.4. Avaliação do nível de expressão de *MGMT*

4.4.1. Extração de RNA das amostras

A extração dos RNAs das amostras de CCEO e de tecido normal foi realizada pelo método do Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 800 µL de Trizol às amostras e em seguida estas foram incubadas com 1,0 µL (20 µg) de glicogênio por 5 min a temperatura ambiente. Após esta incubação adicionou-se 160 µL de clorofórmio, e em seguida centrifugação por 5 min para separar as fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo e os RNAs foram precipitados pela adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado, com incubação à -20 °C *overnight*. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 min a 4 °C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500µl de etanol 70%. O *pellet* foi seco (30 min a temperatura ambiente) e dissolvido em 15 µl de água livre de RNase. Após esta extração, todos os RNAs obtidos foram quantificados no espectrofotômetro *Denovix DS-11* (Wilmington, DE, USA).

4.4.2. Confeção dos cDNAs

Para a confecção das moléculas de cDNAs, cerca de 2,0 µg de RNA total foram submetidos à ação da enzima SuperScript III (Thermo fisher Scientific) conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, ao RNA foi adicionado 1 µL de primer OligodT (500 µg/mL), 1 µL de dNTPs (10 mM) e água DEPC suficiente para 13 µL. Essa mistura foi incubada a 65 °C durante 5 min. Em seguida, adicionou-se 4 µL de 5 X First Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase out (40 U/mL) e 1 µL de da enzima SuperScript III (200 U/µL) perfazendo um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois inativada através de incubação a 70 °C por 15 min. Terminada a reação, o produto da síntese foi diluído 10 X pela adição de 180 µL de água livre de RNase.

A qualidade do cDNA foi avaliada através da amplificação por PCR de um fragmento do gene *β-actina* (NM 001101), com a utilização dos *primers* *ACTB-F* (5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3') e *ACTB-R* (5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'). Para isto foram utilizados 2 µL de cDNA; 2,5 µL de tampão 10 X; 2 mM de

MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 10 pmol de cada primer e 1,25 U de Uni-Taq DNA Polymerase (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) em um volume final de reação de 25µL, e as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, com uma fase de alongamento final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com Gel Red™ (Biotium, Hayward, CA, EUA) com a finalidade de avaliar a integridade das amostras (Figura 6):

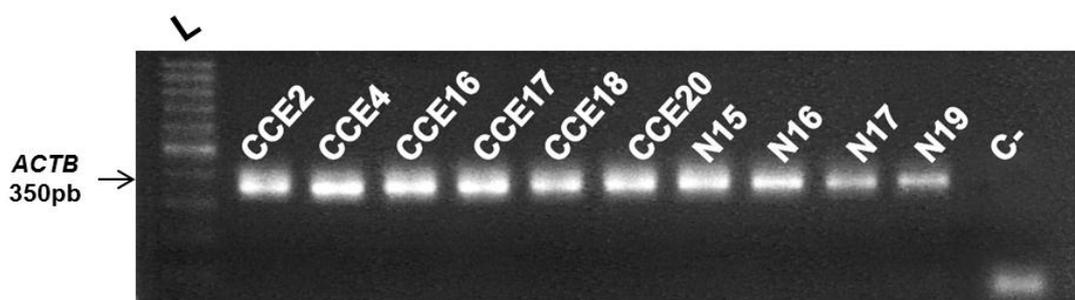


Figura 6. Gel de agarose resultado de eletroforese dos cDNAs confeccionados a partir do RNA extraído de cada amostra. L-(Ladder) Marcador de peso molecular 50 pb CCE são amostras tumorais e C- ao controle negativo da reação. Observa-se a integridade dos cDNAs.

4.4.3. Análise de *MGMT* por qPCR

A técnica de qPCR resulta na coleta de dados à medida que o processo de PCR ocorre, assim à combinação da amplificação e da detecção ocorre ao mesmo tempo, diferente do que acontece na reação de PCR convencional, que a detecção acontece depois de um número pré-determinado de ciclos. Nesta técnica o resultado se dá na forma de um gráfico de amplificações, que é formado durante a reação. O acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, os valores para serem utilizados na quantificação são obtidos através da determinação do *threshold*. O *Cycle threshold (Ct)* é o ciclo da PCR em que o nível de fluorescência ultrapassa o *threshold*. Este ponto é utilizado para calcular a quantidade de produto presente no início da reação.

Para calcular o nível de expressão de *MGMT* foi utilizado o cálculo da expressão relativa de acordo com o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). O método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ou método comparativo de Ct, é uma equação matemática onde

as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras (normais) e as experimentais (tumorais), normalizadas por uma referência. Vale destacar que o valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor de ΔCt para as amostras calibradoras.

Utilizamos o sistema de detecção *Taqman* (*Thermo Fisher Scientific*) que consiste na utilização de dois *primers* e uma sonda específicos para o transcrito em análise. Foram utilizados os ensaios para o gene *MGMT* (Hs01037698_m1) e outro para o normalizador *GAPDH* (Hs04420566_g1). As reações foram todas realizadas em triplicata, sempre com a presença de um controle positivo (CCEB) e um controle negativo de reação. O volume total de cada replicada foi de 20 μL que consistiu em 2 μL de cDNA, 7 μL de água, 10 μL 2 \times TaqMan® Gene Expression Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*) e 1,0 μL de cada ensaio *TaqMan*. As reações foram realizadas no aparelho *QuantStudio 7* (*Thermo Fisher Scientific*) e as condições para a amplificação foram: 50 °C por 2min, 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1min. O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes.

4.5. Análise de expressão da Família mir-181

4.5.1. Confeção de cDNAs

A confecção dos cDNAs de cada miRNA analisado e do endógeno RNU48 foi realizada com o kit *MicroRNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher Scientific*) e primers *Taqman* para cada miRNA analisado. Foram necessários 0.15 μL de dNTPs, 1 μL de *Multiscribe™ RT enzyme* (50 U/ μL), 1.5 μL de Buffer 10 X, 0.19 μL de RNase inhibitor (20 U/ μL), 4.6 μL de água, 3 μL de primer (miR-181a IDOO2317, miR-181b ID462578, miR-181c IDOO2333, RNU48 cat#001006). As condições para a amplificação foram: 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min, 85 °C por 5 min.

4.5.2. Análise por qPCR

Para a avaliação da expressão dos miRNAs da família miR-181 por qPCR seguimos o protocolo semelhante ao do *MGMT* com reações em triplicata, em

presença de um controle positivo (CCEB) e um controle negativo com volume total 20 μL para cada reação e o método da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_q}$. As reações consistiram na aplicação de 1,33 μL de produto de cDNA, 10 μL 2 TaqMan® Master Mix II (Applied Biosystems) e 1 μL de *TaqMan® Small RNA Assay* e 7.67 μL de água. As reações foram realizadas no aparelho *QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA)* e as condições para a amplificação foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1min. O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes.

4.6. Análise Estatística

Os registros das informações referentes aos dados demográficos, clínicos, e histopatológicos foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para computador SPSS *version 22.0*. A associação entre os achados moleculares encontrados neste estudo e as informações clínico-patológicas coletadas foi feita utilizando o teste estatístico do Qui-quadrado. Foi considerado o nível de significância para valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das amostras

Foram analisadas 20 amostras de pacientes CCEOs, sendo 14 do sexo masculino (70%) e seis do sexo feminino (30%), com idades variando de 53 a 86 anos (média de idade= 70 anos). Quando questionados sobre sua etnia, nove (47,37%) se declararam brancos, sete (36,84%) negros e três (15,79%) declararam-se pardos (Tabela 1):

Tabela 1. Descrição dos pacientes portadores de CCEO segundo gênero, idade e etnia.

Parâmetros	Grupos	Frequência (FR)	
Gênero	Feminino	6	(30%)
	Masculino	14	(70%)
Idade	<60	4	(20%)
	>60	16	(80%)
Etnia	Branco	9	(47,4%)
	Negro	7	(36,8%)
	Pardo	3	(15,8%)

Ao serem questionados sobre hábitos importantes relacionados com a carcinogênese oral como tabagismo, etilismo e prática de sexo oral, metade dos pacientes declarou ser tabagista e 75% declarou ser etilista. Quinze pacientes responderam quanto ao hábito da prática de sexo oral, somente 40% afirmaram possuir este hábito. (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos pacientes portadores de CCEO em relação a hábitos associados com a carcinogênese oral.

Parâmetros	Grupos	Frequência (FR)	
Tabagismo	Sim	10	(50%)
	Não	10	(50%)
Etilismo	Sim	15	(75%)
	Não	5	(25%)
Prática de Sexo oral	Sim	6	(40%)
	Não	9	(60%)

Foi observada uma exposição concomitante ao tabaco e álcool em 50% dos pacientes e que 10% dos pacientes se declararam ser simultaneamente tabagistas, e etilistas além de praticarem sexo oral. Outros 10% dos pacientes relataram não possuir nenhum destes hábitos (Figura 7).

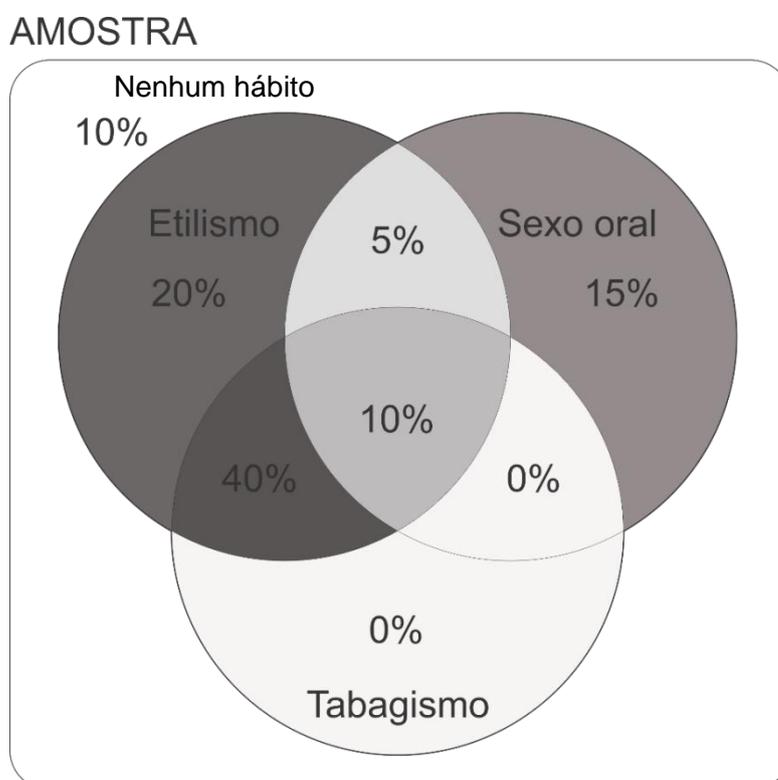


Figura 7: Diagrama representando a exposição dos pacientes portadores de CCEO a diferentes hábitos relacionados com a carcinogênese oral. Podemos perceber que a maioria dos pacientes se encontram no grupo que declarou-se etilistas e tabagistas, dois hábitos de alto risco para o CCEO.

Quanto à localização anatômica, a região de maior incidência do CCEO foi a língua com 45%, principalmente a borda lateral e o assoalho da boca com 35% dos casos cada, seguidos do fundo de saco de vestibulo (10%) e palato (5%) e outras partes da língua, como corpo (5%) e ventre (5%) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição anatômica do CCEO nos pacientes estudados, n= 20.

Parâmetros	Frequência (FR)	
Palato	1	(5%)
Língua		
-Corpo	1	(5%)
-Ventre	1	(5%)
-Borda lateral	7	(35%)
Assoalho de boca	7	(35%)
Fundo de saco de vestibulo	2	(10%)
Outros	1	(5%)

Quanto ao grau de diferenciação histológica, a grande maioria (80%) das amostras apresentou-se como CCEOs moderadamente diferenciados, 10% foram bem diferenciados e os outros 10% pouco diferenciadas (Tabela 4):

Tabela 4. Gradação histológica do CCEO nos pacientes estudados, n= 20.

Parâmetros	Frequência (FR)	
Bem diferenciado	2	(10%)
Moderadamente diferenciado	16	(80%)
Pouco diferenciado	2	(10%)

5.2. Análises de expressão de *MGMT* e de miRNAs

A quantidade de RNA obtida a partir das amostras tumorais variou de 307,2 ng/ μ L a 1426,42 ng/ μ L, a concentração média foi de 803,22 ng/ μ L. O valor médio do parâmetro 260/280 foi de 1,86 (tabela 5).

Tabela 5. Quantificação das amostras tumorais utilizando o Denovix DS-11.

Amostra	260/280	Concentração (ng/ μ L)
CCEB	1,87	1339,2
CCE1	1,76	496,28
CCE2	1,8	931,9
CCE3	1,6	978,6
CCE4	1,55	994,5
CCE5	1,96	681,50
CCE7	1,77	635,7
CCE11	1,56	1225,3
CCE12	1,6	1163,0
CCE13	1,94	822,02
CCE14	1,73	491,1
CCE15	1,96	990,8
CCE16	1,97	483,8
CCE17	2	389,5
CCE18	2,34	940,3
CCE19	2,01	397,9
CCE20	2,38	569,1
CCE21	1,88	825,5
CCE22	1,71	307,2
CCE23	1,92	778,0
CCE24	1,65	1426,42

Nas amostras normais essa variação ficou entre 260,3 ng/ μ L e 1260,9 ng/ μ L, apresentando uma concentração média de 691,65 ng/ μ L. O valor médio do parâmetro 260/280 foi de 1,78 (tabela 6).

Tabela 6. Quantificação das amostras normais utilizando o Denovix DS-11.

Amostra	260/280	Concentração (ng/ μ L)
N1	1,71	913,2
N2	1,68	581,2
N3	1,67	688,9
N4	1,75	1003,6
N5	1,74	1247,6
N7	1,62	260,3
N8	1,69	314,7
N9	1,74	775,5
N10	2,08	648,7
N11	1,63	282,3
N12	1,91	720,3
N13	1,73	633,3
N14	1,85	693,8
N15	1,91	620,8
N16	1,96	642,5
N17	1,73	454,3
N18	1,96	663,2
N19	1,92	764,2
N20	1,86	663,7
N21	1,61	1260,9

5.2.1. Avaliação do perfil de expressão de *MGMT* no CCEO

As análises de expressão deste gene foram realizadas em 20 amostras de CCEO. No entanto, não foi observada a amplificação deste gene em oito destas amostras. A amplificação de *MGMT* foi observada em 12 amostras CCEO, uma CCEB (utilizada como controle positivo) e em 20 amostras de mucosa oral saudável. Foi observada uma redução na expressão de *MGMT* em sete (58,3%) amostras de CCEOs e em CCEB quando comparadas a amostras normais (Figura 8).

MGMT

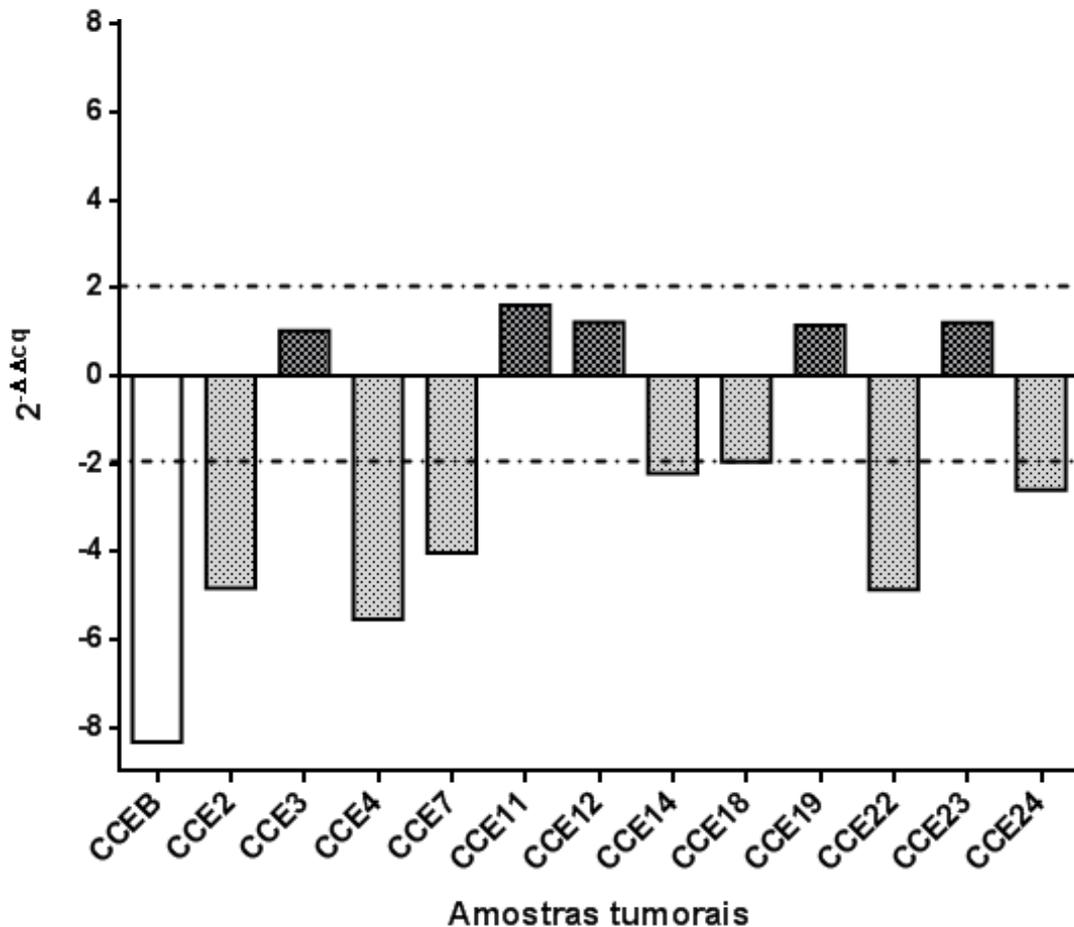


Figura 8. Avaliação relativa da expressão de MGMT por PCR em tempo real das amostras de CCEO utilizando como normalizador GAPDH e como controle normal mucosa oral saudável. A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão.

5.2.2. Avaliação do perfil de expressão da família miR-181 em CCEO

As análises do nível de expressão dos membros da família miR-181 (a/b/c/d) foi realizada primeiramente em 3 linhagens tumorais derivadas de CCEO e em 20 amostras de pacientes portadores de CCEO. Embora os 4 membros desta família foram avaliados nestes dois tipos de amostras (linhagem e fragmentos de tecidos orais dos pacientes), não foi observada a amplificação de miR-181d em nenhum destes dois tipos de amostras.

- Perfil de expressão de miR-181 em linhagens tumorais

As análises dos miRNAs nas linhagens tumorais e em queratinócitos normais, tiveram por objetivo verificar a amplificação destes miRNAs neste tipo celular, dado o padrão tecido-específica destas moléculas.

A expressão de miR-181 não se apresentou de maneira homogênea entre as linhagens tumorais de CCEO quando comparadas com uma linhagem de queratinócitos orais. Percebeu-se que em SCC-25 miR-181a, miR-181b e miR-181c apresentaram-se com expressão reduzida nesta linhagem. Na linhagem SCC-9 miR-181a apresentou hipoexpressão e miR-181b hiperexpressão. Nesta linhagem não foi observada a amplificação de miR-181c. Já na linhagem SCC-4 tanto miR-181a, quanto miR-181c apresentaram-se hiperexpressos e miR-181b apesar da expressão diminuída ficou abaixo da linha de corte (Figura 9):

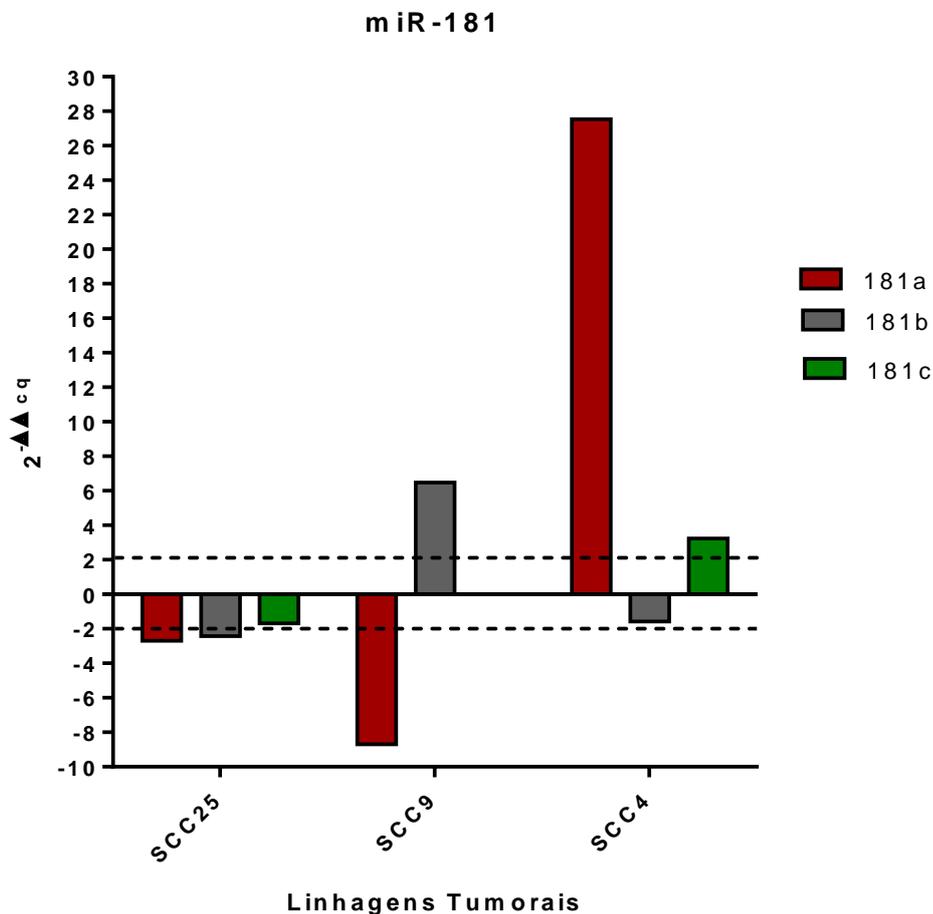


Figura 9: Perfil de expressão de miR-181 por PCR em linhagens de CCEO comparadas com uma linhagem de queratinócitos orais (HaCaT). A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão. Podemos observar uma expressão reduzida de miR-181 em SCC-25; em SCC-9 houve uma hiperexpressão em miR-181b, e hipoexpressão em miR-181a; SCC-4 mostrou-se hiperexpresso em miR-181 a/c.

- Perfil de expressão de miR-181 em amostras de pacientes portadores de CCEO.

Nas análises miR-181a apresentou hipoexpressão em seis (30%) amostras. Esta hipoexpressão também foi observada no controle positivo. A hiperexpressão deste miRNA foi observada em cinco (25%) amostras analisadas (Figura 10).

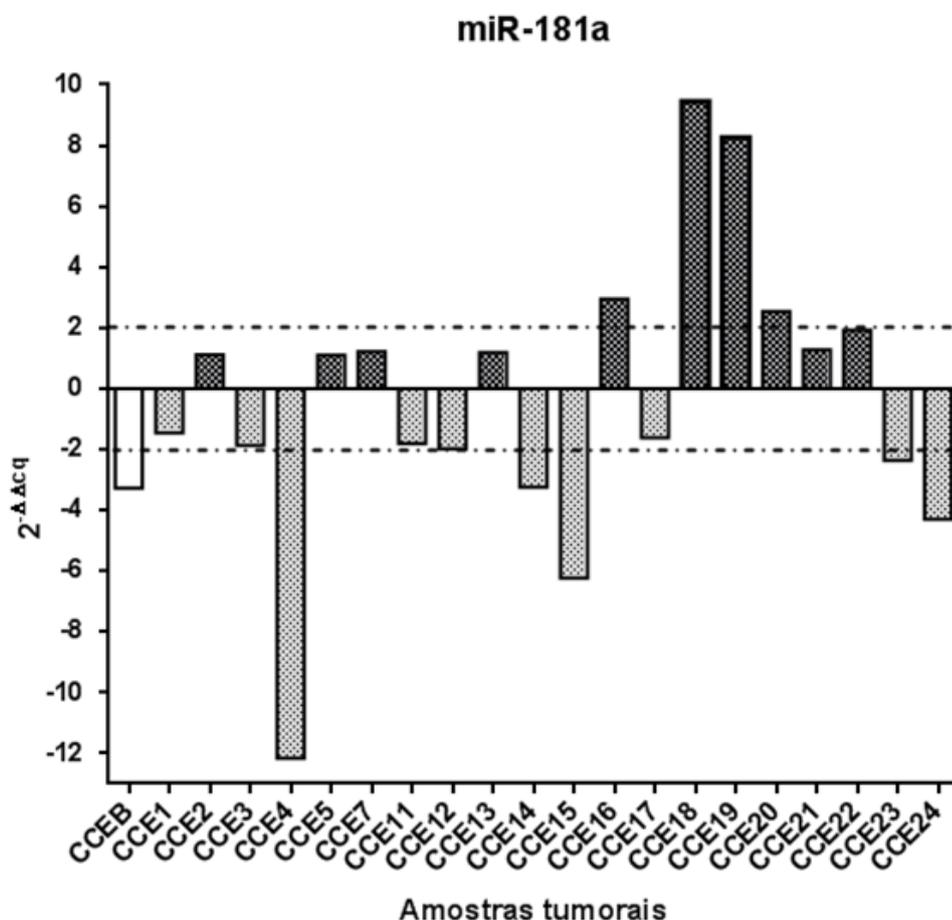


Figura 10. Perfil de expressão de miR-181a por PCR em tempo real em amostras de CCEO comparadas com amostras de mucosa oral normal. Controle positivo: CCEB. A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão. Podemos observar que a maioria das amostras analisadas encontram-se hipoexpressas.

Houve amplificação de miR-181b somente em 17 amostras de CCEO, Foi observada uma hiperexpressão em sete (41,17%) das amostras e uma expressão reduzida em três (17,65%) das amostras de CCEO e no controle positivo (Figura 11):

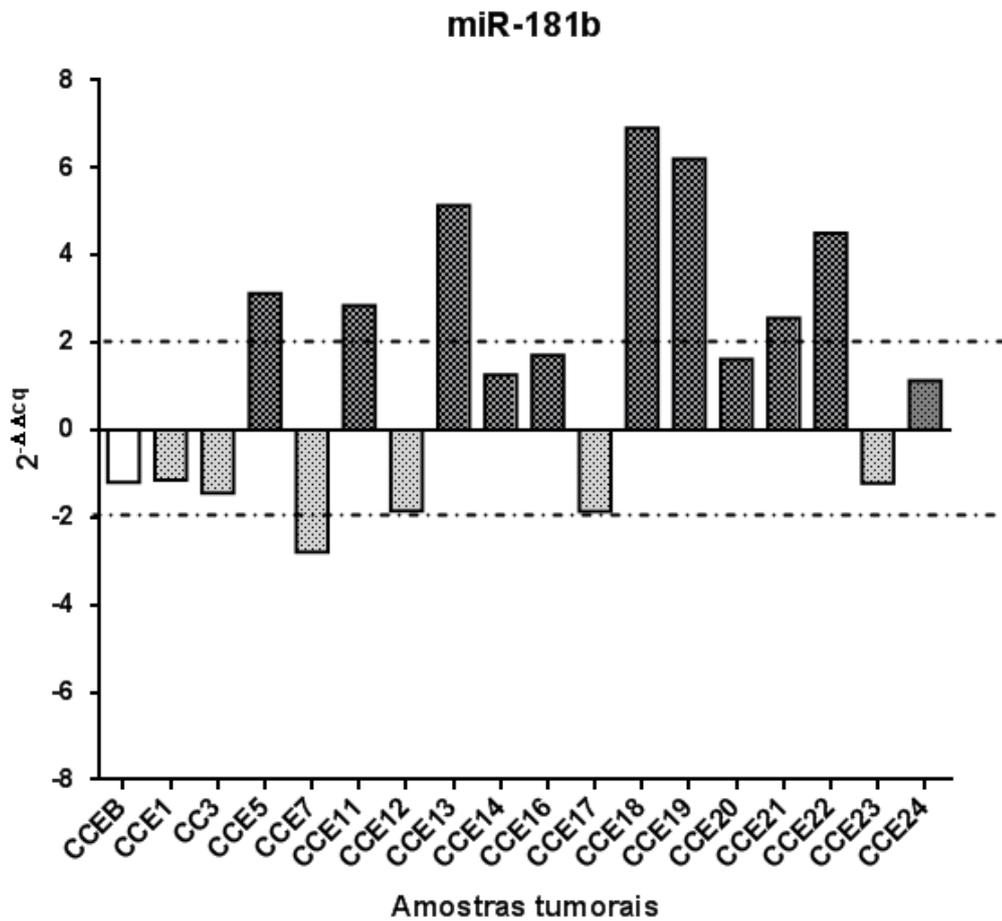


Figura 11. Perfil de expressão de miR-181b por PCR em tempo real em amostras de CCEO comparadas com amostras de mucosa oral normal. Controle positivo: CCEB. A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão. Esse miRNA mostrou-se hiperexpresso na maioria das amostras analisadas.

Em relação a miR-181c as análises demonstraram um aumento de expressão deste miRNA em seis (30%) amostras e uma hipoexpressão em 35% das amostras analisadas além do controle positivo (Figura 12):

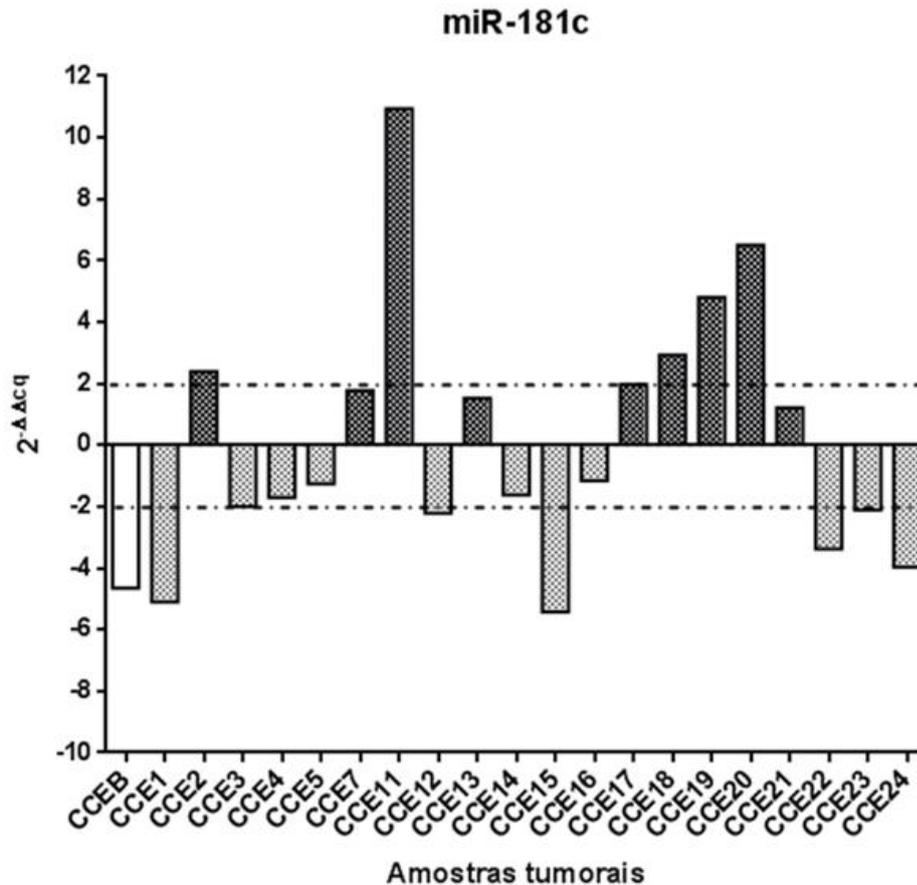


Figura 12. Perfil de expressão de miR-181c por PCR em tempo real em amostras de CCEO comparadas com amostras de mucosa oral normal. Controle positivo: CCEB. A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão. Notamos a hipoxpressão desse miRNA na maioria das amostras analisadas.

Analisando todos os membros da família miR-181, foi possível verificar que em nove (45%) amostras de CCEO o perfil de expressão destes miRNAs foi semelhante, ou seja, em cinco das amostras os miRNAs miR-181a/b/c apresentaram-se com tendência a hipoxpressão e em quatro amostras estes miRNAs tenderam para um aumento de expressão. Esta tendência também pôde ser visualizada no controle CCEB no qual estes miRNAs apresentaram-se com expressão diminuída. Em 75% (15/20) das amostras observou-se uma expressão simultânea de miR-181a e miR-181c (Figura 13).

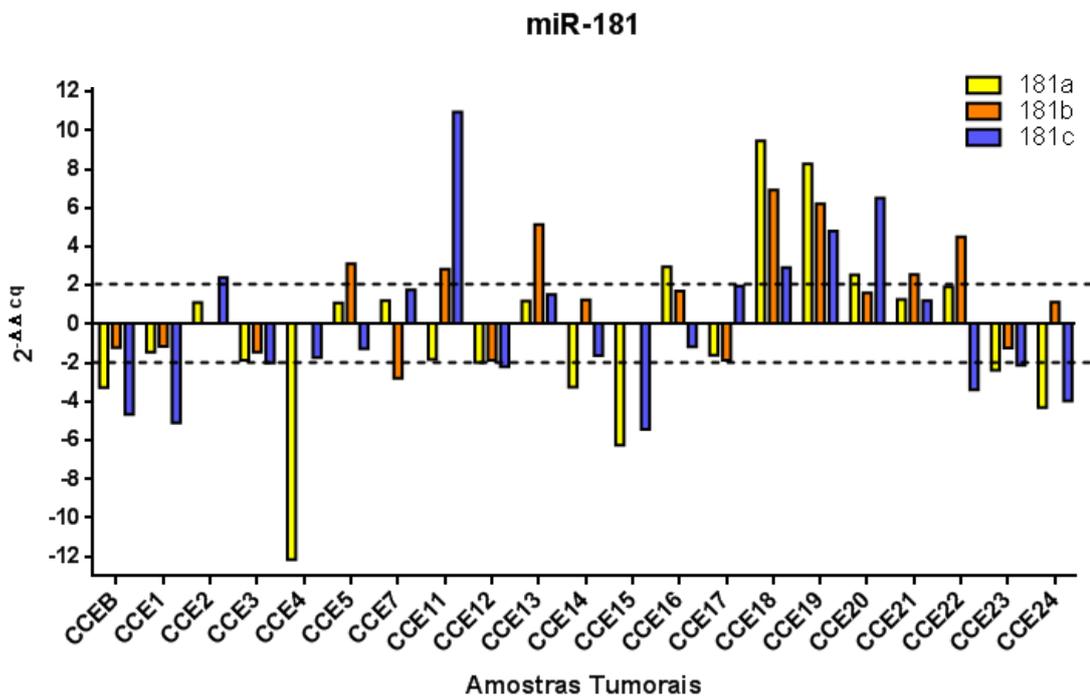


Figura 13. Avaliação da expressão dos membros da família miR-181 no CCEO. A linha pontilhada equivale ao corte de 2 para se considerar diferença de expressão. Podemos observar que em 10 amostras os três miRNA seguiram o mesmo padrão de expressão.

Os resultados das análises estatísticas envolvendo os dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes com os resultados moleculares de *MGMT*, não demonstraram significância. Em relação ao tabagismo, a associação deste com a baixa expressão de *MGMT* foi de $p=0,08$. Para os miRNAs observamos uma correlação entre a baixa expressão de miR-181c e o etilismo ($p=0,02$). Não houve correlação entre a expressão de *MGMT* e a família miR-181.

6. DISCUSSÃO

A incidência do câncer oral vem aumentando constantemente na população brasileira, apesar das políticas públicas de saúde oral. Essa doença chega a representar 3% de todas as neoplasias malignas, estando entre as quinze mais incidentes no mundo (IARC, 2012). Os portadores de câncer oral tendem a evoluir para um pior prognóstico, com altas taxas de recidivas locais e desenvolvimento de metástases à distância, comprometendo, consideravelmente, as chances de sucesso terapêutico (AGRA et al., 2006; ORD et al., 2006; MUCKE et al., 2009). O tipo histológico mais frequente, abrangendo mais de 90% dos casos registrados nesta região anatômica, é o CCEO (SCULLY; BAGAN, 2008). Um fato importante a se considerar a respeito desta doença é a heterogeneidade que ela apresenta entre os seus portadores. Isto pode ser observado nos pacientes classificados com o mesmo estadiamento TNM, com as mesmas características histológicas, submetidos ao mesmo tratamento, mas com cursos clínicos diferentes, onde uns apresentam a cura completa da doença enquanto outros pioram o quadro e até mesmo evoluindo para o óbito (BUNDGAARD et al., 1996; WOOLGAR et al., 1999; MYERS et al., 2001; KANE et al., 2006). Uma das explicações baseia-se na complexidade das alterações moleculares que estão presentes durante o processo de carcinogênese oral.

No presente estudo, identificamos uma maior frequência deste tumor no sexo masculino (70%) e uma proporção homem/mulher de 2,3:1. O perfil encontrado corrobora com os trabalhos da literatura, pois a incidência de câncer de cabeça e pescoço, em todo mundo, é maior na população masculina (IARC, 2017). A justificativa é dada pela maior exposição aos fatores de risco deste grupo (KHAMMISSA et al., 2014). Porém, observa-se uma diminuição na proporção homem/mulher portadora de câncer oral e orofaringe, ao longo dos anos. Esse fato pode ser explicado pela mudança de comportamento feminino, pois as mulheres passaram a se expor aos mesmos fatores de risco que antigamente eram restritos aos homens, como a utilização do tabaco e do álcool (YAKO-SUKETOMO; MARUGAME, 2008; SALIHU et al., 2014). De acordo com o INCA para o período 2016/2017 a proporção homem: mulher portadora de câncer oral e orofaringe será de 2,6:1, no Estado do Rio de Janeiro. Em homens, o CCEO geralmente ocorre após a quinta década de vida. A faixa etária de apresentação desta doença na população asiática está entre 50 e 60 anos. Na população norte-americana, a faixa

etária de acometimento situa-se entre a sétima e oitava década, enquanto um estudo na África do Sul encontrou uma média para o diagnóstico da doença de 58 anos (KHAMMISSA et al., 2014). O perfil de nossa amostra assemelha-se ao da população americana, com a maioria dos portadores (80%) com mais de 60 anos, com idade média de 72 anos.

No presente trabalho, encontramos um percentual maior de indivíduos declaradamente brancos portadores de CCEO (44,5%). Em relação aos grupos étnicos mais acometidos, existe uma grande variação na incidência e mortalidade em diferentes países. A explicação reside na exposição aos diferentes fatores ambientais e a hábitos culturais, que envolvem risco para o desenvolvimento desta doença. A maior incidência e prevalência de CCEO são observadas no subcontinente indiano, onde o risco de desenvolver a doença é aumentado pelos hábitos de mascar tabaco, betel e areca (ATTAR et al., 2010). Um estudo identificou que os chineses têm um menor risco de desenvolver o CCEO do que a população indígena da Malásia. Além disso, a doença é diagnosticada em uma idade mais avançada (ZAIN et al., 1997). Outro estudo, desenvolvido na África do Sul, demonstrou que CCEO afeta homens negros, seguido de homens brancos e mulheres brancas, nesta ordem decrescente de frequência (KHAMMISSA et al., 2014). Nos Estados Unidos a população afrodescendente tem uma menor sobrevivência quando comparada à população de origem caucasiana. Um dos motivos para esta discrepância pode estar na falta de acesso da população afrodescendente ao sistema de saúde americano (GOURIN; PODOLSKY, 2006). Porém, no Brasil, esse tipo de câncer acomete mais pessoas brancas do que indivíduos negros (INCA, 2017). Essa tendência foi verificada em nosso trabalho.

Observamos que 15% de nossos pacientes relataram ser tabagistas, etilistas e praticantes de sexo oral. Embora, a maioria de nossos pacientes entrevistados tenha relatado não apresentar esta prática sexual, podendo este número estar subestimado. Em nossa amostra, também observamos que 55% declararam-se, simultaneamente, tabagista e etilista, estando em concordância com a literatura. Mesmo não constando neste estudo, abordagens relacionadas à detecção do HPV, este grupo requer uma maior atenção em relação à presença da doença na cavidade oral e sua exposição a diferentes hábitos, com risco de desenvolvimento de CCEO, pois os principais fatores etiológicos do CCEO são tabagismo, etilismo e a infecção pelo HPV (WARNAKULASURIYA, 2009). Igualmente, o uso concomitante

do tabaco com o álcool está associado ao aumento de sua incidência. Foi realizado um estudo caso-controle nos Estados Unidos que teve por objetivo demonstrar a relação entre a utilização do tabaco e do álcool em 1114 pacientes portadores de câncer oral e de orofaringe comparados com 1268 indivíduos controle. Nesse estudo foi observado um risco de 35 vezes para o desenvolvimento de cânceres na região da cabeça e pescoço nos indivíduos que faziam o consumo simultâneo do tabaco e do álcool, comparados com aqueles indivíduos que relataram não possuir nenhum destes dois hábitos (BLOT et al., 1988). Na cavidade oral, Atribui-se a presença do HPV à prática do sexo oral. Entretanto, CCE de orofaringe HPV+ é reconhecido como uma entidade distinta, estando associada ao comportamento sexual. Além disso, os pacientes portadores desta malignidade apresentam um melhor prognóstico, devido a sensibilidade aumentada destes tumores a radio e a quimioterapia (MARUR et al., 2010; FAKHRY; D'SOUZA, 2013). Dado a sua significância prognóstica, a rotina de detecção da presença do HPV é preconizada pelo National Comprehensive Cancer Network (NCCN), um programa dos Estados Unidos, destinado a desenvolver diretrizes que auxiliam os clínicos no manejo de pacientes com câncer. Segundo o NCCN, a detecção do HPV em amostras de pacientes deve se tornar um padrão em todas as malignidades que acometem a cavidade oral e orofaringe (FAKHRY; D'SOUZA, 2013). Nosso resultado ressalta a importância em se identificar indivíduos com hábitos semelhantes na população e de estabelecer políticas de saúde bucal pregando o antitabagismo e o antialcoolismo, além do aumento na conscientização sobre a prática do sexo seguro e a importância da vacinação contra o HPV.

Dentro da cavidade oral o sítio anatômico considerado o local de maior incidência do CCEO é a língua (SHAH; LYDIATT, 1995; AKANUMA et al., 1999). Neste trabalho, a região de maior acometimento foi a língua, especialmente, a borda lateral, seguida do assoalho bucal. Esta observação pode estar associada ao fato destas regiões estarem recoberta por epitélio escamoso não queratinizado, facilitando a difusão de carcinógenos derivados do tabaco e do álcool. A região da língua também já foi associada a um maior número de óbitos por câncer oral num estudo que descreveu as tendências da mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, no período de 1980 a 2002. Os autores relataram que a mortalidade observada em portadores de câncer de língua correspondia a 1/3 (2.193 pacientes), do total de pacientes (6.117) que foram a óbito vítimas desta doença

(BIAZEVIC et al., 2006). Entretanto, outro estudo retrospectivo realizado na população brasileira encontrou uma maior prevalência de CCEO no assoalho de boca (28,6%), seguido da língua (26,9%), e palato duro (15,3%) (DANTAS et al., 2016), diferindo, em parte, dos nossos achados.

As análises histopatológicas das nossas amostras demonstraram uma maior quantidade de CCEO com grau moderadamente diferenciado (80,96%), Um estudo indiano publicou achados histopatológicos distinto, sendo que 95,9% das amostras tratavam-se de CCEO bem diferenciados, 3,3% moderadamente diferenciados e somente 0,8% das amostras pouco diferenciadas (NADAF et al., 2016). Em 2017, outro estudo realizado na Índia com 112 portadores de CCEO encontrou 53,57% de carcinomas moderadamente diferenciados, 38,39% bem diferenciados, e somente 8,03%, pouco diferenciados (GADBAIL et al., 2017), conservando alguma semelhança com os nossos resultados.

Alterações genéticas e epigenéticas são constantemente descritas no câncer oral e associadas à heterogeneidade observada durante o curso clínico desta doença (SHAW, 2006; GASCHÉ; GOEL, 2012). O silenciamento de importantes genes supressores tumorais, como IRF6 e TP53 são descritos no CCEO (DZIUNYCZ et al., 2017; SHAIKH et al., 2017), destacando-se particularmente a perda de expressão de *MGMT*. Esse gene possui um papel de supressor tumoral uma vez que ele codifica uma proteína de reparo do DNA (ESTELLER et al., 1999; KATO et al., 2006; HUANG et al., 2010), cuja finalidade é manter a estabilidade genômica.

Nas amostras de CCEO analisadas neste estudo, a *MGMT* apresentou hipossupressão em 58,3% das amostras de CCEO analisadas, quando comparadas com a mucosa oral saudável. Também observamos uma diminuição de aproximadamente oito vezes na expressão de *MGMT*, no controle positivo (CCEB - variante mais agressiva do CCEO) em relação à mucosa oral saudável. Pesquisas relacionadas à expressão de *MGMT* ocupam uma posição importante na literatura em virtude do papel que este gene exerce no prognóstico ou na abordagem terapêutica de alguns tipos de cânceres (PEGG, 2000; NAKAMURA et al., 2001; REIFENBERGER et al., 2012; SZOPA et al., 2017). Alguns autores verificaram uma associação entre a diminuição dos níveis da proteína *MGMT* e a hipermetilação da região promotora deste gene em vários tipos de cânceres. Estes autores

descreveram que a inativação de *MGMT* pode exercer um papel importante na tumorigênese (ESTELLER et al., 1999; SMITH-SORENSEN et al., 2002; KAWAGUCHI et al., 2006; MUNOT et al., 2006). A hipoexpressão de *MGMT* configura-se como um dos fatores fundamentais para se estabelecer o prognóstico em GBMs, sendo considerada como um biomarcador importante para prever a resposta aos agentes alquilantes (WICKSTROM et al., 2015). Em câncer de testículo observou-se a diminuição de *MGMT* em 64% dos casos avaliados (NAGEI et al., 2003). Outro estudo desenvolvido na Índia envolvendo 400 participantes (200 com câncer gástrico e 200 pacientes saudáveis) demonstrou que 46% dos pacientes portadores da doença apresentaram diminuição dos níveis da proteína *MGMT* quando comparado com os pacientes normais (BHAT, 2016). As percentagens de *MGMT* de ambos os estudos citados foram atribuídas, a partir da mensuração da proteína por imunohistoquímica e western blot. No presente trabalho, analisamos a expressão do gene por qPCR. Outros dois trabalhos anteriores avaliaram a expressão de *MGMT* no CCEO por qPCR (KORDI-TAMANDANI et al., 2010; SCHENA et al., 2012). Entretanto, apesar de analisar o mRNA de *MGMT* os dados publicados não fornecem os valores de fold change para se entender qual seria o nível de expressão deste gene nas amostras de CCEO. Este é o primeiro estudo que determina os níveis de expressão deste gene no CCEO.

Além de *MGMT*, outras moléculas são biomarcadores importantes para o diagnóstico precoce, prognóstico e sobrevida de pacientes portadores de câncer, dentre estas estão os miRNAs. A importância dos miRNAs está em sua capacidade de regular a expressão gênica e por sua expressão alterada estar associada ao aparecimento de diversas doenças (BARTEL, 2004; GARTEL; KANDEL, 2006; ZHANG et al., 2007).

Os membros da família miR-181 são associados a processos importantes como inflamação, apoptose, invasão e resistência tumoral (SHI et al. 2008; TSITSIOU; LINDSAY, 2009; ZHANG et al., 2012). Essa família é composta por quatro membros (miR-181a, miR-181b, miR-181c, e miR181d) e da mesma maneira que o *MGMT* são apontados como biomarcadores importantes para o prognóstico no GBM (LAKOMY, et al. 2011; ZHANG et al. 2012). Na literatura, diversos trabalhos associam a inflamação crônica com o risco de câncer, e sua capacidade de promover a progressão tumoral e disseminação metastática (Mantovani; Pierotti, 2008; Aggarwal ; GeHLOT 2009). Estudos associam estes miRNAs às respostas imunes mediadas

por receptores TLRs, onde estes miRNAs são capazes de suprimir a resposta inflamatória ou reduzir as respostas inflamatórias iniciais modulando os níveis de citocinas induzidas por TLR (XIE et al., 2013) Um grupo demonstrou que miR-181d era capaz de regular *MGMT* (ZHANG et al., 2012). Entretanto, não existe nenhum dado que demonstrasse uma avaliação detalhada da família miR181 e *MGMT*, no CCEO.

Inicialmente, realizamos uma avaliação prévia dos quatro membros de miR-181 em três linhagens de CCEO, comparadas com uma linhagem de queratinócitos normais. Não foi observada, amplificação de miR-181d em nenhuma das linhagens. Existem apenas dois trabalhos que avaliaram a expressão de miR-181a em linhagens tumorais e em ambos este miRNA foi descrito como hipoexpresso, reforçando o papel que tem sido atribuído a ele como supressor tumoral (HUANG et al., 2011; SHIN et al., 2011). Em nosso estudo a hipoexpressão de miR-181a foi observada nas linhagens SCC-9 e SCC-25. Quanto a avaliação de miR-181b em linhagens tumorais, existe um estudo que avaliou a hiperexpressão desse após tratamento com EGF (epidermal growth factor). Em nosso estudo, miR-181b foi encontrado hiperexpresso apenas na linhagem SCC-9. Até o momento nenhum outro estudo avaliou a expressão de miR-181c em linhagens de CCEO. Este miRNA apresentou-se hiperexpresso na linhagem SCC-4. A hipoexpressão de miR-181c já foi observada em linhagens de glioblastoma (U251, U87, T98G, e SHG44) e em amostras tumorais.

Após a avaliação nas linhagens tumorais a expressão de miR-181 foi mensurada em amostras de CCEO. Conforme observado nas linhagens tumorais. Não observamos a amplificação de miR-181d. Uma vez que os miRNAs são tecido-específicos, este resultado pode ser explicado por uma provável ausência deste miRNA na cavidade oral. Para miR-181a observamos uma hipoexpressão em 30% das amostras e a hiperexpressão em 25% das amostras. Shin e colaboradores (2011) observaram uma baixa expressão deste miRNA no CCEO. Estes autores observaram que o oncogene K-ras constituía um dos alvos de miR-181a, reforçando uma ação supressora de tumor deste miRNA no CCEO (SHIN et al. 2011). Já foi demonstrado uma relação entre miR-181a e o receptor TLR-4 (XIE et al., 2013). Em camundongos, este miRNA mostrou-se um marcador de respostas inflamatórias (XIE et al., 2013). Já foram descritos com alvos de miR-181a os genes Bcl2, MMP14, CDN1B, Smad7 e HOXA11, estando este miRNA correlacionado positivamente com

o mecanismo de migração e apoptose (SHI et al., 2008). No câncer de mama, demonstrou-se que TGF- β era capaz de induzir a hiperexpressão de miR-181a favorecendo o fenótipo migratório metastático (TAYLOR et al., 2013).

Em nossas amostras, percebemos uma hiperexpressão de miR-181b em 41,17% dos CCEOs. Essa tendência a uma maior expressão também foi observada por Brito e colaboradores que a associaram alguns características citológicas e histopatológicas usadas na classificação da displasia oral com a expressão de três miRNAs potencialmente relacionados ao câncer, dentre eles o miR-181b (BRITO et al., 2014). Outro estudo também correlacionou o aumento de expressão de miR-181b com a progressão do câncer oral, através da investigação na alteração de expressão dos miRNAs em leucoplasias, sendo útil para distinguir aquelas leucoplasias que evoluíram para CCEO. De acordo com este estudo, este miRNA possui importância significativa por constituir a chamada “assinatura de miRNAs” associada à progressão do câncer oral (CERVIGNE et al., 2009). Além disso, miR-181b tem como alvos supressores tumorais como CYLD um inibidor de NF κ B (LI et al., 2014), e TIMP3 um inibidor de metaloproteinase 3 (ZHOU et al., 2016) reforçando o seu potencial oncogênico. No presente trabalho, avaliamos pela primeira vez miR-181c no CCEO. Observamos hipoexpressão em 35% das amostras. Como já mencionado anteriormente, Lakomy e colaboradores associaram a hipoexpressão de miR-181c com a sobrevida de pacientes com GBM, e demonstraram que esse miRNA poderia ser utilizado como marcador sensível e específico para determinar progressão desta doença (LAKOMY et al., 2011). Por outro lado, um grupo demonstrou uma associação entre a recorrência do câncer gástrico com a hiperexpressão desse miRNA (YAMAZAKI et al., 2017). O resultado obtido da expressão desses miRNA nas linhagens não corroborou com os obtidos em amostras dos portadores de CCEO (HE et al., 2016).

Quanto à correlação dos dados de expressão com os aspectos clínico-patológicos dos pacientes não foi encontrada correlação entre este gene e o tabagismo ($p=0,08$). Possivelmente, isso ocorreu devido ao número reduzido de amostras analisadas. Entretanto, a diminuição de *MGMT* em células expostas ao extrato de tabaco em relação às células que não entraram em contato com esse extrato, já foi descrita (ROHATGI et al., 2005).

Não observamos correlação entre os miRNAs e dos dados clínico-patológicos dos pacientes, exceto para miR-181c. Estes resultados podem ser devido ao reduzido número amostral do estudo. Para miR-181c foi encontrada uma correlação entre esse miRNA e o etilismo ($p= 0,02$). Sendo este o primeiro trabalho a revelar esse achado. Todavia, um estudo posterior deve ser realizado para elucidar a ação do álcool na modulação da expressão de miR-181c no CCEO.

Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez, o perfil de expressão de *MGMT* e dos membros da família miR-181 em pacientes portadores de CCEO. Apesar de termos encontrado correlação somente entre a hipoexpressão de miR-181c e o consumo de álcool, análises adicionais deverão ser realizadas com um maior número de pacientes, incluindo também a determinação de presença de HPV, para avaliar a relação entre estes dois biomarcadores (*MGMT* e família *miR-181*) e os dados clínico-patológicos dos pacientes. Uma vez que vários miRNAs já estão sendo isolados em amostras de sangue, saliva, líquido-cefalorraquidiano e outros fluidos corpóreos, para a determinação do diagnóstico precoce, avaliação prognóstica e definição de tratamentos mais adequados, faz-se necessário a realização de pesquisas voltadas para o estudo destas moléculas e a carcinogênese oral.

7. Conclusão

- ✓ O perfil epidemiológico dos pacientes de CCEO analisados neste estudo, demonstrou ser constituído em sua maioria por indivíduos sexo masculino, com mais de 60 anos, de etnia branca, com hábitos de etilismo, tabagismo e prática de sexo oral. Sendo que o tipo histológico predominante foi o CCEO moderadamente diferenciado, tendo a língua a localização como anatômica mais prevalente;
- ✓ *MGMT* apresentou-se hipoexpresso na maioria das amostras de CCEO analisadas;
- ✓ Nas linhagens tumorais, observamos miR-181a hipoexpresso em duas linhagens de CCEO e miR-181b apresenta-se hiperexpresso em apenas uma das linhagens analisadas;
- ✓ Em amostras de pacientes observa-se o nível de expressão de miR-181a/c estava reduzido na maioria das amostras de CCEO e em miR-181b foi observada uma hiperexpressão no CCEO;
- ✓ Esse estudo demonstrou uma correlação significativa entre o etilismo e a expressão de miR-181c;
- ✓ Não foi observada correlação entre a expressão entre *MGMT* e miR-181.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Aug;9(4):351-69.
- Agra IM, Carvalho AL, Ulbrich FS, de Campos OD, Martins EP, Magrin J, Kowalski LP. Prognostic factors in salvage surgery for recurrent oral and oropharyngeal cancer. *Head Neck*. 2006 Feb;28(2):107-13.
- 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 Sep;35(5):476-83.
- Albers AE, Strauss L, Liao T, Hoffmann TK, Kaufmann AM. T cell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer. *Clin Dev Immunol*. 2010.
- Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Rozek LS, Soliman AS. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral Oncol*. 2010 Aug;46(8):591-6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.
- Barciszewska AM, Gurda D, Głodowicz P, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PLoS One*. 2015 Aug 26;10(8):e0136669.
- Bavle RM, Venugopal R, Konda P, Muniswamappa S, Makarla S. Molecular Classification of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2016 Sep;10(9):ZE18-ZE21. Epub 2016 Sep 1.
- Belinsky SA, Devereux TR, Anderson MW. Role of DNA methylation in the activation of proto-oncogenes and the induction of pulmonary neoplasia by nitrosamines. *Mutat Res*. 1990 Nov-Dec;233(1-2):105-16.
- Biazevic MG, Castellanos RA, Antunes JL, Michel-Crosato E. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. *Cad Saude Publica*. 2006 Oct;22(10):2105-14. Portuguese.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988 Jun 1;48(11):3282-7.
- Brito JA, Gomes CC, Guimarães AL, Campos K, Gomez RS. Relationship between

- microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2014 Mar;43(3):211-6. doi: 10.1111/jop.12112. Epub 2013 Sep 11.
- Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sørensen FB, Søgaard H, Nielsen JE. Histopathologic, stereologic, epidemiologic, and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* 1996 Mar-Apr;18(2):142-52.
- Carmo A, Carneiro H, Crespo I, Nunes I, Lopes MC. Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line. *Oncol Lett.* 2011 Nov;2(6):1165-1170.
- Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2009 Dec 15;18(24):4818-29.
- Chen G, Zhu W, Shi D, Lv L, Zhang C, Liu P, Hu W. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 2010 Apr;23(4):997-1003.
- Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther.* 2009 Apr-Jun;5(2):71-7.
- Dantas TS, de Barros Silva PG, Sousa EF, da Cunha Mdo P, de Aguiar AS, Costa FW, Mota MR, Alves AP, Sousa FB. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine (Baltimore).* 2016 Jan;95(3):e2314.
- Das S, Ferlito M, Kent OA, Fox-Talbot K, Wang R, Liu D, Raghavachari N, Yang Y, Wheelan SJ, Murphy E, Steenbergen C. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circ Res.* 2012 Jun 8;110(12):1596-603.
- Dziunycz PJ, Neu J, Lefort K, Djerbi N, Freiburger SN, Iotzova-Weiss G, French LE, Dotto GP, Hofbauer GF. CYFIP1 is directly controlled by NOTCH1 and down-regulated in cutaneous squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2017 Apr 14;12(4):e0173000.
- Elzenaar I, Pinto YM, van Oort RJ. MicroRNAs in heart failure: new targets in disease management. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Oct;94(4):480-9.

- Ereño C, Gaafar A, Garmendia M, Etxezarraga C, Bilbao FJ, López JI. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathological and follow –up study of 40 cases and review of the literature. *Head Neck Pathol.* 2008 Jun;2(2):83-91. doi: 10.1007/s12105-008-0045-6. Epub 2008 Mar 21.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):793-7.
- Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer.* 2006 Jan 30;94(2):179-83.
- Fakhry C, D'Souza G. Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: common questions and answers. *Oral Oncol.* 2013 Sep;49(9):863-871.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. 2005. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier/Academic Press, London, Jun 2005.
- Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head Neck Oncol.* 2009 Jan 30;1:5. doi: 10.1186/1758-3284-1-5.
- Feller L, Lemmer J. New 'second primary' cancers. *SADJ.* 2012 May;67(4):175-8.
- Gadbail AR, Chaudhary M, Gawande M, Hande A, Sarode S, Tekade SA, Korde S, Zade P, Bhowate R, Borle R, Patil S. Oral squamous cell carcinoma in the background of oral submucous fibrosis is a distinct clinicopathological entity with better prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2017 Jul;46(6):448-453.
- Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer. *Biomol Eng.* 2006 Mar;23(1):17-34.
- Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012 Nov;8(11):1407-25.
- Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context- from basic biology to clinical utility. *J Dent Res.* 2012 May;91(5):440-6.
- Gourin CG, Podolsky RH. Racial disparities in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2006 Jul;116(7):1093-106. Erratum in: *Laryngoscope.* 2006 Nov;116(11):2098.
- Hatziapostolou M, Polytarchou C, Iliopoulos D. miRNAs link metabolic reprogramming

- to oncogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Jul;24(7):361-73.
- He X, Liu Z, Peng Y, Yu C. MicroRNA-181c inhibits glioblastoma cell invasion, migration and mesenchymal transition by targeting TGF- β pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 22;469(4):1041-8.
- Hecht SS. Recent studies on mechanisms of bioactivation and detoxification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific lung carcinogen. *Crit Rev Toxicol.* 1996;26(2):163-81.
- Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):733-44. Review. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):84.
- Huang SH, Lee HS, Mar K, Ji DD, Huang MS, Hsia KT. Loss expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jun;109(6):883-9.
- Huang Y, Chuang A, Hao H, Talbot C, Sen T, Trink B, Sidransky D, Ratovitski E. Phospho- Δ Np63 α is a key regulator of the cisplatin-induced microRNAome in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2011 Jul;18(7):1220-30.
- IARC. (2012). "Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwid in 2012. ." de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
- INCA. (2016). 2017, de <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp>.
- Jadhav KB, Gupta N. Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise. *N Am J Med Sci.* 2013 Dec;5(12):671-9.
- Ji J, Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Li C, Deng C, Wauthier E, Reid LM, Ye QH, Qin LX, Yang W, Wang HY, Tang ZY, Croce CM, Wang XW. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology.* 2009 Aug;50(2):472-80.
- Kaina B, Fritz G, Coquerelle T. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ Mol Mutagen.* 1993;22(4):283-92.
- Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D' Cruz A. Depth of invasion is the most significant

- histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Sep;32(7):795-803.
- Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Nov;132(11):735-43. Epub 2006 Jun 22.
- Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Tamiya S, Tateishi N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol*. 2006 Jan;19(1):106-14.
- Khalil S, Fabbri E, Santangelo A, Bezzerri V, Cantù C, Di Gennaro G, Finotti A, Ghimenton C, Eccher A, Dehecchi M, Scarpa A, Hirshman B, Chen C, Ferracin M, Negrini M, Gambari R, Cabrini G. miRNA array screening reveals cooperative MGMT-regulation between miR-181d-5p and miR-409-3p in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016 May 10;7(19):28195-206.
- khammissa RA, Meer S, Lemmer J, Feller L. Oral squamous cell carcinoma in a South African sample: Race/ethnicity, age, gender, and degree of histopathological differentiation. *J Cancer Res Ther*. 2014 Oct-Dec;10(4):908-14.
- Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzehi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch Oral Biol*. 2010 Oct;55(10):809-14.
- Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2186-90.
- Lee SH, Lee CR, Rigas NK, Kim RH, Kang MK, Park NH, Shin KH. Human papillomavirus 16 (HPV16) enhances tumor growth and cancer stemness of HPV negative oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma cells via miR-181 regulation. *Papillomavirus Res*. 2015 Dec 1;1:116-125.
- Leone A. Toxics of Tobacco Smoke and Cardiovascular System: From Functional to Cellular Damage. *Curr Pharm Des*. 2015;21(30):4370-9.
- Li C, Zhu HY, Bai WD, Su LL, Liu JQ, Cai WX, Zhao B, Gao JX, Han SC, Li J, Hu DH.

- MiR-10a and miR-181c regulate collagen type I generation in hypertrophic scars by targeting PAI-1 and uPA. *FEBS Lett.* 2015 Jan 30;589(3):380-9.
- Li D, Jian W, Wei C, Song H, Gu Y, Luo Y, Fang L. Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct 15;7(11):7672-80. eCollection 2014.
- Li X, Liu L, Yang J, Yu Y, Chai J, Wang L, Ma L, Yin H. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine.* 2016 Jun;8:72-82.
- Li Z, Huang H, Li Y, Jiang X, Chen P, Arnovitz S, Radmacher MD, Maharry K, Elkahlon A, Yang X, He C, He M, Zhang Z, Dohner K, Neilly MB, Price C, Lussier YA, Zhang Y, Larson RA, Le Beau MM, Caligiuri MA, Bullinger L, Valk PJ, Delwel R, Lowenberg B, Liu PP, Marcucci G, Bloomfield CD, Rowley JD, Chen J. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood.* 2012 Mar 8;119(10):2314-24.
- Lin S, Pan L, Guo S, Wu J, Jin L, Wang JC, Wang S. Prognostic role of microRNA-181a/b in hematological malignancies: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(3):e59532. doi: 10.1371/journal.pone.0059532. Epub 2013 Mar 22.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- Ma L. MicroRNA and Metastasis. *Adv Cancer Res.* 2016;132:165-207.
- Mallick B, Ghosh Z, Chakrabarti J. MicroRNA switches in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 1;372(3):459-63.
- Mantovani A, Pierotti MA. Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett.* 2008 Aug 28;267(2):180-1.
- 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.
- Mücke T, Loeffelbein DJ, Hohlweg-Majert B, Kesting MR, Wolff KD, Hölzle F. Reconstruction of the maxilla and midface--surgical management, outcome, and prognostic factors. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):1073-8.

- Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2006 Aug;37(8):989-99.
- Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*. 2001 Dec 15;92(12):3030-6.
- Nadaf A, Bavle RM, Soumya M, D'mello S, Kuriakose MA, Govindan S. Analysis of the invasive edge in primary and secondary oral squamous cell carcinoma: An independent prognostic marker: A retrospective study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016 May-Aug;20(2):239-45.
- Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, Nomura M, Kamikawa Y, Yonezawa S, Sugihara K. Aberrant DNA methylation of tumor related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2012 Sep 1;118(17):4298-308.
- Nagel G, Brenner W, Johnsson K, Kaina B. DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in testis and testicular tumors as determined by a novel nonradioactive assay. *Anal Biochem*. 2003 Oct 1;321(1):38-43.
- Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001 Oct;22(10):1715-9.
- NCI. (2017). "Surveillance Epidemiology and End Results Program. Cancer Statistics." 2017, de <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>.
- Ord RA, Kolokythas A, Reynolds MA. Surgical salvage for local and regional recurrence in oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Sep;64(9):1409-14.
- Parikh A, Lee C, Joseph P, Marchini S, Baccarini A, Kolev V, Romualdi C, Fruscio R, Shah H, Wang F, Mullokandov G, Fishman D, D'Incalci M, Rahaman J, Kalir T, Redline RW, Brown BD, Narla G, DiFeo A. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun*. 2014;5:2977.
- Parshad S, Nandi S, Marwah N, Mehta P, Tripathi M, Netrapal, Gogna S, Karwasra RK. Human papillomavirus 16 and 18 in squamous cell carcinoma of oral cavity and

- sexual practices: A pilot study at a Tertiary Care Hospital of North India. *Natl J Maxillofac Surg*. 2015 Jul-Dec;6(2):185-9.
- Pedersen I, David M. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*. 2008 Sep;43(3):391-4. doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.016. Epub 2008 Aug 12. Review.
- Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*. 2000 Apr;462(2-3):83-100.
- Peng W, Si S, Zhang Q, Li C, Zhao F, Wang F, Yu J, Ma R. Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Aug 8;34:79.
- Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977 Mar;43(3):383-90.
- Quintavalle C, Mangani D, Roscigno G, Romano G, Diaz-Lagares A, Iaboni M, Donnarumma E, Fiore D, De Marinis P, Soini Y, Esteller M, Condorelli G. MiR-221/222 target the DNA methyltransferase MGMT in glioma cells. *PLoS One*. 2013 Sep 19;8(9):e74466.
- Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, Schackert G, Simon M, Schnell O, Westphal M, Wick W, Pietsch T, Loeffler M, Weller M; German Glioma Network. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer*. 2012 Sep 15;131(6):1342-50.
- Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. 2014 Jul;8(1):7-11. Epub 2014 Apr 29.
- Rohatgi N, Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Smokeless tobacco (khaini) extracts modulate gene expression in epithelial cell culture from an oral hyperplasia. *Oral Oncol*. 2005 Sep;41(8):806-20.
- Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):939-42.
- Ryzek DF, Mantsopoulos K, Künzel J, Grundtner P, Zenk J, Iro H, Psychogios G. Early stage oropharyngeal carcinomas: comparing quality of life for different treatment

- modalities. *Biomed Res Int.* 2014;2014:421964.
- Salihi S, Krasniqi B, Sejfiija O, Heta N, Salihaj N, Geci A, Sejdini M, Arifi H, Isufi R, Ueeck BA. Analysis of potential oral cleft risk factors in the Kosovo population. *Int Surg.* 2014 Mar-Apr;99(2):161-5.
- Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Ralhan R. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol.* 2007 May;43(5):515-22. Epub 2006 Sep 25.
- Scesnaite A, Jarmalaite S, Mueller M, Agaimy A, Zenk J, Hartmann A, Iro H, Peters B, Schwarz S, Schneider-Stock R. Prognostic value of O-6-methylguanine DNA methyltransferase loss in salivary gland carcinomas. *Head Neck.* 2014 Sep;36(9):1258-67.
- Schena M, Guarrera S, Buffoni L, Salvadori A, Voglino F, Allione A, Pecorari G, Ruffini E, Garzino-Demo P, Bustreo S, Consito L, Bironzo P, Matullo G. DNA repair gene expression level in peripheral blood and tumour tissue from non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell cancer patients. *DNA Repair (Amst).* 2012 Apr 1;11(4):374-80.
- Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *BMJ.* 2000 Jul 8;321(7253):97-100.
- Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin.* 1995 Nov-Dec;45(6):352-68.
- Shah S, Cooper B. The epidemiology of stroke and transient ischaemia in Brisbane, Australia. *Ital J Neurol Sci.* 1995 Dec;16(9):603-12.
- Shaikh MH, Clarke DTW, Johnson NW, McMillan NAJ. Can gene editing and silencing technologies play a role in the treatment of head and neck cancer? *Oral Oncol.* 2017 May;68:9-19.
- Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Feb;35(2):101-8. Epub 2005 Sep 8.
- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir 181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* 2008 Oct 21;1236:185-93.
- Shi ZM, Wang XF, Qian X, Tao T, Wang L, Chen QD, Wang XR, Cao L, Wang YY,

- Zhang JX, Jiang T, Kang CS, Jiang BH, Liu N, You YP. MiRNA-181b suppresses IGF-1R and functions as a tumor suppressor gene in gliomas. *RNA*. 2013 Apr;19(4):552-60.
- Shin KH, Bae SD, Hong HS, Kim RH, Kang MK, Park NH. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 28;404(4):896-902. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.055. Epub 2010 Dec 15.
- Shridhar K, Aggarwal A, Walia GK, Gulati S, Geetha AV, Prabhakaran D, Dhillon PK, Rajaraman P. Single nucleotide polymorphisms as markers of genetic susceptibility for oral potentially malignant disorders risk: Review of evidence to date. *Oral Oncol*. 2016 Oct;61:146-51. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.08.005.
- Smith-Sørensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fosså SD, Fodstad Ø, Stenwig AE, Jakobsen KS, Lothe RA. Frequent promoter hypermethylation of the O6 Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene*. 2002 Dec 12;21(57):8878-84.
- Steinhilber J, Bonin M, Walter M, Fend F, Bonzheim I, Quintanilla-Martinez L. Next-generation sequencing identifies deregulation of microRNAs involved in both innate and adaptive immune response in ALK+ ALCL. *PLoS One*. 2015 Feb 17;10(2):e0117780.
- Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8013575.
- Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):150-63.
- Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Aug;9(4):514-20.
- Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2003 May 20;105(1):41-6.
- Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus.

- Head Neck. 2011 Apr;33(4):504-12.
- Wang X, Du J, Li HH. [The role of miRNA-155 in cardiovascular diseases]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2013 Oct;44(5):377-80. Chinese.
- Wang XF, Shi ZM, Wang XR, Cao L, Wang YY, Zhang JX, Yin Y, Luo H, Kang CS, Liu N, Jiang T, You YP. MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Apr;138(4):573-84.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J Oral Pathol Med. 2008 Mar;37(3):127-33.
- Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. Br Dent J. 2009 Nov 28;207(10):471-5.
- Weng H, Lal K, Yang FF, Chen J. The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia. Cancer Genet. 2015 May;208(5):225-9. Wickström M, Dyberg C, Milosevic J, Einvik C, Calero R, Sveinbjörnsson B, Sandén E, Darabi A, Siesjö P, Kool M, Kogner P, Baryawno N, Johnsen JI. Wnt/ β catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. Nat Commun. 2015 Nov 25;6:8904.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. Mol Cell Biol. 2000 Nov;20(22):8329-42.
- Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. Oral Oncol. 1999 May;35(3):257-65.
- Xie W, Li Z, Li M, Xu N, Zhang Y. miR-181a and inflammation: miRNA homeostasis response to inflammatory stimuli in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 11;430(2):647-52.
- Yako-Suketomo H, Marugame T. Comparison of time trends in lip cancer incidence (1973-97) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents, Vols IV-VIII. Jpn J Clin Oncol. 2008 Jun;38(6):456-7.
- Yamazaki N, Koga Y, Taniguchi H, Kojima M, Kanemitsu Y, Saito N, Matsumura Y. High expression of miR-181c as a predictive marker of recurrence in stage II colorectal cancer. Oncotarget. 2017 Jan 24;8(4):6970-6983.

- Yang J, Liu H, Wang H, Sun Y. Down-regulation of microRNA-181b is a potential prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Pathol Res Pract*. 2013 Aug;209(8):490-4.
- Zain RB, Ikeda N, Razak IA, Axéll T, Majid ZA, Gupta PC, Yaacob M. A national epidemiological survey of oral mucosal lesions in Malaysia. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997 Oct;25(5):377-83.
- Zhang B, Farwell MA. microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2008 Jan-Feb;12(1):3-21. Epub 2007 Dec 14.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007 Feb 1;302(1):1-12. Epub 2006 Aug 16.
- Zhang J, Luo N, Luo Y, Peng Z, Zhang T, Li S. microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb. *Int J Oncol*. 2012 Mar;40(3):747-56.
- Zhang W, Zhang J, Hoadley K, Kushwaha D, Ramakrishnan V, Li S, Kang C, You Y, Jiang C, Song SW, Jiang T, Chen CC. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol*. 2012 Jun;14(6):712-9.
- Zhang X, Abreu JG, Yokota C, MacDonald BT, Singh S, Coburn KL, Cheong SM, Zhang MM, Ye QZ, Hang HC, Steen H, He X. Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1565-77.
- Zhao LD, Zheng WW, Wang GX, Kang XC, Qin L, Ji JJ, Hao S. Epigenetic silencing of miR-181b contributes to tumorigenicity in colorectal cancer by targeting RASSF1A. *Int J Oncol*. 2016 May;48(5):1977-84.
- Zhou J, Tao D, Tang D, Gao Z. Correlation of human papilloma virus with oral squamous cell carcinoma in Chinese population. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Oct 15;8(10):18172-8. eCollection 2015.
- Zhou Q, Zheng X, Chen L, Xu B, Yang X, Jiang J, Wu C. Smad2/3/4 Pathway Contributes to TGF- β -Induced MiRNA-181b Expression to Promote Gastric Cancer Metastasis by Targeting Timp3. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(2):453-66.
- Zyczkowski M, Bogacki R, Paradysz A. [The impact of smoking on diseases of the

genitourinary system]. Wiad Lek. 2014;67(4):540-7.

Anexo I

PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação do gene MGMT no câncer oral

Pesquisador: Cláudia Maria Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50423416.2.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.753.202

Apresentação do Projeto:

Este estudo está sendo realizado com pacientes que buscam atendimento na Faculdade de Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO). A amostra será composta por 80 pacientes, sendo 40 pacientes com carcinoma de células escamosas ora -I CCEO e 40 pacientes normais. Durante o procedimento cirúrgico de biópsia incisional dos 40 pacientes com CCEO são coletados 2 fragmentos de tecido. Um fragmento será armazenado em formol a 10% e será destinado às análises histopatológicas pelo laboratório de Patologia Oral da Unigranrio. O segundo fragmento será coletado em um criotubo contendo RNA Later e será armazenado a - 80°C para análises moleculares posteriores. Serão também coletadas 40 amostras de mucosa oral normal, provenientes de pacientes portadores de mucosa oral saudável que são submetidos à extração de dentes inclusos ou cirurgias de implantes na Clínica de Periodontia. Estes fragmentos serão coletados conforme o protocolo descrito para o CCEO. Os resultados moleculares obtidos neste estudo serão relacionados com os dados clínico-patológicos dos pacientes. Os estudos dos mecanismos epigenéticos será feito primeiramente através do perfil de expressão da família miR-181 já descrita como reguladora de MGMT e logo em seguida pela análise do perfil de metilação de MGMT utilizando a técnica de técnica de MSP (Methylation Specific PCR). Uma vez que a perda de expressão do gene O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase - MGMT constitui uma importante ferramenta de prognóstico em câncer, a determinação do perfil de expressão deste gene em

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: oep@unigranrio.com.br

Continuação do Parecer: 1.753.202

amostras de CCEO provenientes da região da Baixada Fluminense e dos mecanismos envolvidos em sua regulação, poderão contribuir para a descoberta de marcadores moleculares que podem ser importantes no diagnóstico precoce ou na terapia do CCEO e no desenvolvimento de novas terapias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar os níveis de expressão de MGMT em amostras de pacientes portadores de CCEO e investigar os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação deste gene.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar o nível de expressão de MGMT em amostras de CCEO comparados com amostras de mucosa oral normal por PCR quantitativa (qPCR);
2. Avaliar o nível de expressão da família miR-181, envolvida com a regulação de MGMT em amostras de CCEO e mucosa normal por qPCR ;
3. Investigar o padrão de metilação de MGMT em amostras de CCEO e em amostras de mucosa normal pela técnica de MSP (Methylation Specific PCR);
4. Correlacionar os resultados obtidos durante as análises moleculares com os dados clínico-patológicos dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os Riscos relacionados com a participação seriam aqueles relacionados ao procedimento cirúrgico. Uma vez que tais procedimentos cirúrgicos já estão muito bem estabelecidos na rotina odontológica e que a remoção da mucosa consistirá apenas em uma pequena quantidade de amostra, este risco torna-se bastante reduzido.

Benefícios:

Os benefícios deste estudo envolvem o diagnóstico do câncer oral, o levantamento das necessidades odontológicas do paciente, preparo da cavidade oral para tratamento oncológico com vistas a minimizar a possibilidade de osteorradionecrose e referenciamento para serviço de tratamento oncológico

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
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

Continuação do Parecer: 1.753.202

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo poderá contribuir para a determinação do perfil de expressão deste gene em indivíduos da Baixada Fluminense e

o mecanismo epigenético que estaria envolvido no controle de sua expressão. Além disso, os dados obtidos nesta pesquisa poderão servir de embasamento para estudos mais amplos, que possam avaliar o potencial biomarcador destes dois mecanismos reguladores na resistência a tratamentos e prevenção de recidivas no carcinoma de células escamosas oral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados como determina a Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Recomendações:

Recomendo que os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, sejam divulgados em eventos científicos e publicações na forma de artigos e textos em revista indexadas pelo Qualis

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa apresenta relevância científica e atende aos requisitos da Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 29 de setembro de 2016. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,

CEP/Unigranrio

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	29/08/2016		Aceito

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

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

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.753.202

Básicas do Projeto	ETO_569296.pdf	22:42:37		Aceito
Outros	Ficha_clinica.pdf	29/08/2016 22:41:45	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Cronograma	CRONOG_mgmt.pdf	29/08/2016 22:39:59	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_MGMT.pdf	11/08/2016 20:50:56	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Outros	usoimagem_MGMT009.pdf	11/08/2016 19:45:34	Cláudia Maria Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1_MGMT011.pdf	11/08/2016 19:44:41	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Outros	risco_confidencial_MGMT008.pdf	11/08/2016 19:43:42	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Orçamento	orcamento_MGMT010.pdf	11/08/2016 19:41:16	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_MGMT007.pdf	11/08/2016 19:41:02	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_MGMT006.pdf	11/08/2016 19:37:18	Cláudia Maria Pereira	Aceito

Situação do

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 29 de Setembro de 2016

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
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

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 “Análise do perfil de expressão de MGMT e da família miR-181 no câncer 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.

Os objetivos deste estudo são a identificação da expressão de *MGMT* e dos Mir-181, moléculas que se apresentam alteradas nos cânceres da cavidade oral em comparação com a mucosa normal. Sua participação nesta pesquisa consistirá no fornecimento de um pequeno fragmento da mucosa de boca retirada durante o diagnóstico diferencial na clínica de Estomatologia ou com finalidade pré-protética na clínica de Periodontia. Os riscos relacionados com sua participação seriam aqueles relacionados com o risco cirúrgico. Uma vez que esses procedimentos cirúrgicos já estão muito bem estabelecidos na rotina odontológica e que a remoção da mucosa consistirá apenas em uma pequena quantidade de amostra, esses riscos tornam-se bastante reduzidos. Os benefícios relacionados com a sua participação, consistirá no diagnóstico obtido pelo exame clínico e histopatológico da mucosa oral, da condição de normalidade ou alteração. Caso seja verificado esta última condição, você receberá informações a respeito de tal alteração e tratamento adequado; ou será encaminhado para uma instituição capacitada para tal atendimento.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os dados referentes ao seu nome servirão apenas para identificação de sua amostra e serão mantidos em sigilo pelo coordenador da pesquisa e em hipótese alguma, serão divulgados

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Cláudia Maria Pereira (coordenadora) e Carina Maciel da Silva Boghossian e dos alunos Ana Beatriz machado Lima, Carlos Alberto Barros dos Santos e Andressa Raquel Alves Pinheiro, no e-mail: claudemarie_br@yahoo.com.br ou no telefone (21) 26727877.

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

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20__.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal

ANEXO III

Escola de Odontologia

Ficha de Atividades Clínicas Data: ___/___/___

Nome do aluno examinador: _____ Matrícula: _____

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Cor: _____ Sexo: _____

Pai: _____ Mãe: _____

CPF: _____ RG: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Estado Civil: _____ Religião do paciente: _____

Profissão: _____ Ocupação: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefone: (____) _____ Em caso de recados: _____

INFORMAÇÕES PESSOAIS DO PACIENTE

2. MORADIA/FAMÍLIA/RENDA/ATENDIMENTO MÉDICO:

- Você já viveu em outras(s) cidades(s)? () não () sim .Qual (quais)? _____ Motivo(s)/Tempo: _____
- A casa em que você mora: É própria? () não () sim. Há quanto tempo você reside nela ____?.
- Tem luz elétrica? () não () sim. Tem esgoto sanitário? () não () sim. Tem fossa? () não () sim.
- Como você se abastece de água? _____. De que material é feita a sua casa ? Paredes: _____ Telhado: _____ Chão: _____
- Quantas pessoas moram na casa com você? _____. Você divide o cômodo de dormir com outra(s) pessoas(s)? () não () sim. Quantas? _____.
- Filhos: () não () sim. Quantos: _____. Vivos: _____. Mortos: _____. Causas(s) da(s) morte (s): _____.
- Você possui animais domésticos? () não () sim. Qual?. _____.
- A sua renda individual é de: _____ salário(s) mínimo(s)
- A sua renda familiar é de: _____ salário (s) mínimo (s)
- Você tem plano de saúde? () não () sim. Em caso afirmativo qual? _____
- Quando você adoece onde se trata? _____

3. HÁBITOS E VÍCIOS:

- Fumante? () não () sim. Há quanto tempo? _____. Qual o tipo? _____ Qual a frequência do uso ? _____

- Ingere bebidas alcoólicas ? () não () sim. Há quanto tempo? _____
Qual o tipo? _____. Qual a frequência da ingestão? _____
- Fez ou faz uso de drogas? () não () sim. Há quanto tempo? _____
Qual o tipo? _____. Qual a frequência do uso? _____
- Faz uso rotineiro de algum medicamento? () não () sim. Qual (is)? _____. Dose (s):

Para quê? _____. Há quanto tempo? _____.
- Possui hábitos de roer as unhas? () não () sim .
- Sofre de alguma doença? () não () sim – Qual? _____
- Já foi operado? () não () sim –Por quê? _____
- Está em tratamento médico atualmente? () não () sim – Qual? _____
- Tem ou já teve algum problema de cicatrização? () não () sim
- Tem ou teve problemas com anestesia? () não () sim
- Tem ou teve problemas com hemorragia? () não () sim
- Tem ou teve doenças congênitas do coração? () não () sim
- Tem ou teve doenças cardíacas? (enfarte, angina, derrame, pressão alta) () não () sim
- Tem ou teve respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? () não () sim
- Tem ou já teve desmaios, convulsões ou epilepsia? () não () sim
- Tem ou já teve dor de cabeça freqüente (duas vezes ou mais por semana)? () não () sim
- Tem ou já teve hepatite, doenças hepáticas ou icterícia? () não () sim
- Tem ou já teve úlceras ou outros problemas estomacais? () não () sim
- Tem ou já teve reação alérgica a anestésicos, antibióticos (ex. penicilina, tetraciclina, sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros) () não () sim
- Faz uso rotineiro de algum medicamento? () não () sim
- Possui hábitos de colocar ou manter objetos entre os dentes? () não () sim. Em caso afirmativo qual objeto? _____
- Possui hábitos de ranger os dentes? () não () sim. Em caso afirmativo: () dia () noite.

4. DIETA

- Ingere doces? () não () sim. Há quanto tempo? _____
Qual o tipo? _____. Qual a frequência da ingestão? _____.
- Ingere refrigerantes? () não () sim. Há quanto tempo? _____
Qual o tipo? _____. Qual a frequência da ingestão? _____.

5. HÁBITOS DE HIGIENE/MOTIVAÇÃO:

- Quantas vezes escova os dentes ao dia? _____ vezes. Quando? _____
Quanto tempo dura em média uma escova de dentes para o seu uso? _____.

O que o leva a trocar sua escova de dentes? _____.

- Como você escolhe sua pasta de dentes? () pela marca () pelo sabor () por apresentar flúor () pelo preço () por indicação do seu dentista
- Já lhe ensinaram a escovar os dentes? () não () sim .Quem? _____.
Com que idade? _____anos.
- Faz uso de fio dental? () não () sim. Com que frequência? _____ .
- Faz uso de bochechos? () não () sim. Por quê? _____ .
Qual? _____ . Com que frequência? _____ .

6. PREFERÊNCIAS E PRÁTICAS SEXUAIS:

- Tem parceiro(a) sexual: () não () sim; () único exclusivo () múltiplos. Em caso de múltiplos indique o número de parceiros no último ano: _____
- Uso de preservativos: () sempre () às vezes () nunca
- Práticas sexuais: () homossexual () bissexual () heterossexual
- Prática de sexo oral: () sempre () às vezes () nunca
- Prática de sexo oral: ()paciente no(a) parceiro(a) ()parceiro(a) no(a) paciente
- Prática de sexo anal: () sempre () às vezes () nunca
()paciente no(a) parceiro(a) ()parceiro(a) no(a) paciente
- Quanto a doenças sexualmente transmissíveis: () é portador () Já foi portador.
Qual(is)? _____
- Você já foi submetido(a) a exame anti-HIV? () não () sim. Qual o motivo? _____

7.CIRURGIAS/TRANSFUSÕES DE SANGUE:

- Já foi submetido a alguma cirurgia? () não () sim. Números de vezes _____.
Qual (is) o(s) tipo(s)? _____. Motivo(s) _____
_____. Quando ? _____
- Já se submeteu a transfusão sanguínea? () não () sim. Número de vezes _____
Motivo(s)? _____ Quando ? _____
- Já teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária? () não () sim
- Já teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? () não () sim

8.EXCLUSIVO PARA MULHERES:

- Estupro: () não () sim. Quando? _____anos. Número de vezes? _____. Por quem?
-
- Menstruação: Idade da 1º vez ____anos. Data da última: ____/____/____

- Tempo de permanência do fluxo _____.Tempo médio do ciclo _____.
- Gravidez: () sim () não. Quantas? _____.
- Partos: Normais: _____. Cesarianas: _____. Abortos: () sim () não
Quantos? _____. () espontâneo (s) () provocado (s).
- Quando fez o último exame preventivo? _____.
- Faz ou fez uso de alendronato para osteoporose? () não () sim

ROTEIRO A SER SEGUIDO PARA REALIZAÇÃO DO EXAME CLÍNICO

9.QUEIXA PRINCIPAL:

10. HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL:

**11.HISTÓRIA PATOLÓGICA
PREGRESSA:**

12. HISTÓRIA FAMILIAR:

13. EXAME FÍSIO

- **13.1 – SINAIS VITAIS:**
Pressão arterial: Sistólica _____ mm Hg. Diastólica _____ mm Hg.

Pulso: Quantidade: _____ **Qualidade:** _____
Temperatura corporal: _____
Frequência respiratória: _____

13.2 – INSPEÇÃO GERAL DO PACIENTE/ECTOSCOPIA:

13.3 – INPEÇÃO LOCO-REGIONAL:

13.4 – EXAME DA ARTICULAÇÃO TEMPORO-MANDIBULAR: _____

13.5 – INSPEÇÃO INTRA-ORAL:

13.5.1 – TECIDOS MOLES:

MBI	Mancha Branca Inativa (faces)	SE	Selante
CT	Coroa total	HIP	Hipoplasia do esmalte

PARA AS FACES DOS DENTES CONSIDERE:

M: Mesial D: Distal O: Oclusal V: Vestibular P: Palatina L: Lingual I: Incisal

- 1. CIRCULE EM VERMELHO O DENTE QUE NECESSITA DE TRATAMENTO.**
- 2. CIRCULE EM AZUL O DENTE QUE NÃO NECESSITA DE TRATAMENTO.**

EXAME DENTÁRIO – DATA: ____ / ____ / ____

QUADRANTE I			QUADRANTE II		
11	51		21	61	
12	52		22	62	
13	53		23	63	
14	54		24	64	
15	55		25	65	
16			26		
17			27		
18			28		

QUADRANTE III			QUADRANTE IV		
31	71		41	81	
32	72		42	82	
33	73		43	83	
34	74		44	84	
35	75		45	85	
36			46		
37			47		
38			48		

ESTOMATOLOGIA

Profissional Examinador: _____ Data: _____

1. Queixa principal:

2. História da doença pessoal (início e curso):

3. História médica progressiva (alergias, doenças, hospitalização, medicamentos, hábitos e vícios):

4. Antecedentes familiares (doenças familiares em pais, irmãos ou outros parentes):

5. Exame físico (localização e aspecto clínico e aumento de lesões incluindo cavidade oral, cabeça, pescoço e outras regiões):

6. Pressão arterial:

Exames complementares (radiografias, biópsias, hemograma e outros):

7. Diagnóstico clínico provável:

8. Diagnóstico diferencial:

9. Plano de tratamento:



Nome do paciente: _____ Matrícula:

Nome do Aluno : _____ Turma:

FICHA DE EVOLUÇÃO E PROCEDIMENTOS			
DATA	Procedimentos Realizados	Aluno	Prof.

