



UNIGRANRIO

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES

**ANÁLISE DA VIA TGF- β , MMP7 E SUA
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DOS MIR-
181a/b/c,17 E 214 NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ORAL**

DUQUE DE CAXIAS

JUNHO

2019

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES

**ANÁLISE DA VIA TGF- β , MMP7 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DOS
MIR-181a/b/c,17 E 214 NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade do Grande Rio como requisito à obtenção do grau de Biomédico.

Orientadores: Professora Doutora Cláudia Maria Pereira

Dr. Rômulo Sperduto Dezone

DUQUE DE CAXIAS

JUNHO

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES

ANÁLISE DA VIA TGF- β , MMP7 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DOS MIR-181a/b/c,17 E 214 NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade UNIGRANRIO como requisito à obtenção do grau de Biomédico, pela banca examinadora:

Profa. Doutora Cláudia Maria Pereira (UNIGRANRIO)

Orientadora

Prof. Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans)

Prof. Doutor Rômulo Sperduto Dezone (UNIGRANRIO)

Co-orientador

Prof. Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans)

Profa. Doutora Sara Gemini Piperni (UNIGRANRIO)

Banca

Profa. do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (Biotrans)

Profa. Doutora Joice Stipursky Silva (UFRJ)

Banca

Profa. Adjunto Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Duque de Caxias, ____ de _____ de 2019

Aos meus pais pelo suporte e compreensão, e por acreditarem nos meus projetos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e capacitação.

Aos meus orientadores Cláudia Maria Pereira e Rômulo Sperduto Dezonne que durante todo o período de Iniciação Científica me acompanharam e contribuíram para meu aprimoramento acadêmico, e me proporcionaram todo o auxílio necessário para a realização desse projeto.

A toda equipe do laboratório LAMP que participou da pesquisa, pela colaboração e disposição no processo de obtenção de dados.

Ao Curso de Biomedicina da Universidade do Grande Rio.

À professora Natália de Moraes Cordeiro por toda dedicação, paciência e incentivo a nos tornarmos não só profissionais melhores, mas também pessoas melhores.

Aos meus pais e família por investirem em mim e acreditarem em meus projetos.

Ao meu noivo por me ajudar e me incentivar a crescer.

Ao apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, oferecido pelos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPERJ e Funadesp.

“Nenhuma alta sabedoria pode ser atingida sem uma dose de sacrifício.”

C. S. Lewis

RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) corresponde ao tipo histológico mais frequente nessa região e possui altas taxas de incidência e mortalidade, assim como de metástase e recidivas. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), o câncer oral corresponde a 16° neoplasia maligna com maior incidência no mundo. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer oral é o 5° mais frequente em homens e 12° em mulheres, constituindo dessa forma, um problema de saúde pública. Dentre os fatores associados à carcinogênese oral, encontra-se a desregulação da via de TGF- β , as alterações nos níveis de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e microRNAs (miRNAs). Os miRNAs já foram descritos como importantes reguladores da transição epitélio mesenquimal (TEM), processo que está associado à agressividade e metástase de diversos tumores. Esse estudo teve por objetivo avaliar a expressão do receptor beta 2 do fator de crescimento transformante beta (*TGFBR2*), da *MMP7* e sua correlação com os miRNAs 181a/b/c, 17 e 214. Para isso utilizamos 12 amostras de pacientes portadores de CCEO e 11 amostras de mucosa oral normal. A expressão de *TGFBR2* e *MMP7* foi analisada por PCR quantitativo (qPCR). Em nossa avaliação, não encontramos diferença significativa na expressão de *TGFBR2* e *MMP7* entre CCEO e amostras normais. Não observamos correlação entre a expressão da *MMP7* e os dados clínicopatológicos dos pacientes. No entanto, *TGFBR2* mostrou correlação com metástase em linfonodos regionais, nos pacientes CCE3 e CCE4. Além disso, *TGFBR2* apresentou correlação positiva com miR-181a, podendo estar associada ao papel de supressão tumoral que os dois exercem no CCEO. miR-214 apresentou correlação positiva com miR-17 e miR-181c. Porém, estudos futuros serão realizados, ampliando-se o número amostral para melhor caracterização. Dessa forma, concluímos que a correlação positiva do miR-181a com *TGFBR2*, demonstra a importância da regulação dessas via durante a carcinogênese oral.

Palavras-chave: Câncer oral, carcinogênese e microRNAs

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) corresponds to the most frequent histological type in oral cavity and it possesses a high rate of incidence and mortality, as well as of metastasis and recurrence. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), oral cancer corresponds to the 16th most malignant tumor in the world. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), oral cancer is the 5th most frequent in men and 12th in women, thus constituting a public health problem. Among the factors associated with oral carcinogenesis are the deregulation of TGF- β signaling pathway, changes in expression and levels of matrix metalloproteinases (MMPs) and microRNAs (miRNAs). The miRNAs have been described as important regulators of the mesenchymal epithelial transition (TEM), a process associated with aggressiveness and metastasis of several tumors. The aim of this study was to evaluate the expression of transforming growth factor beta-2 receptor (TGFBRII), MMP7 and its correlation with miRNAs 181a / b / c, 17 and 214. For this purpose, we used 12 samples from patients with OSCC and 11 samples of normal oral mucosa. Expression of TGFBRII and MMP7 was analyzed by quantitative PCR (qPCR). In our evaluation, we found no significant difference in the expression of TGFBRII and MMP7 between CCEO and normal samples. We also did not observe a correlation between MMP7 expression and the patients' clinical and pathological data. However, TGFBRII showed a correlation with metastasis in regional lymph nodes in patients CCE3 and CCE4. In addition, TGFBRII showed a positive correlation with miR-181a that may be associated with the role of tumor suppression in the OSCC. miR-214 showed a positive correlation with miR-17 and miR-181c. However, future studies will be carried out, expanding the sample number for better characterization. Thus, we conclude that the positive correlation of miR-181a with TGFBRII, demonstrates the importance of these pathways during oral carcinogenesis.

Key-words: Oral cancer, carcinogenesis and microRNAs

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Via de Sinalização TGF- β	5
Figura 2	Biogênese dos miRNAs.....	9
Figura 3	Aumento de miR-181a/b em CCEO.....	11
Figura 4	Aumento de miR-17 em CCEO.....	12
Figura 5	Amplificação de MMP7, TGF β R2 e GAPDH.....	21
Figura 6	Curva de <i>melting</i> de MMP7, TGF β R2 e GAPDH.....	22
Figura 7	Análise de MMP7 e TGFBR2 nas amostras normais e de CCEO.....	23
Figura 8	Comparação entre miR-181a/b/c e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	25
Figura 9	Comparação entre miR-181a/b/c e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	27
Figura 10	Comparação entre miR-17, miR-214 com MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	28
Figura 11	Comparação entre miR-17, miR-214 com TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e presença de hábitos viciosos em pacientes portadores de CCEO.....	17
Tabela 2	Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO que foram avaliados molecular e histopatologicamente.....	24
Quadro 1	Sequências de <i>primers</i> para avaliação da expressão dos genes do estudo por qPCR	20

LISTA DE ABREVIATURAS

CCEO -	Carcinoma de células escamosas oral.
CCECP -	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.
CCEP -	Carcinoma de células escamosas de pele.
DANT -	Doenças e agravos não transmissíveis.
EGFR -	Receptor de crescimento epidermal do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> .
miRNA -	MicroRNA.
MMPs -	metaloproteinases de matriz.
PTEN -	Fosfatase homóloga à tensina, do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i> .
TEM -	Transição epitélio mesenquimal.
TGFBRI -	Receptor beta I do fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>transforming growth factor beta receptor I</i> .
TGFBRII -	Receptor beta II do fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>transforming growth factor beta receptor II</i> .
SiRNA -	RNAs de interferência , do inglês <i>small interfering RNA</i> .

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer	1
1.2	Carcinoma de células escamosas oral	1
1.3	Carcinogênese oral	3
1.4	Transição epitélio-mesenquimal	3
1.5	Via de TGF β	4
1.6	TGF β e MMP7	6
1.7	MicroRNA	7
1.7.1	miR-181a/b/c	10
1.7.2	miR-17	12
1.7.3	miR-214	12
2.	JUSTIFICATIVA	14
3.	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	METODOLOGIA	16
4.1	Casuística	16
4.2	Extração de RNA das amostras	17
4.3	Cultura de células	18
4.4	Desenho dos <i>primers</i>	18
4.5	Confecção dos cDNAs para TGFBRII/MMP7	18
4.6	Análise por qPCR	19
4.7	Análise estatística	19
5.	RESULTADOS	20
5.1	Análise de MMP7 e TGFBRII	20

5.2	Comparação dos dados clinicopatológicos com os miRNAs .	23
5.3	Comparação da expressão de miR-181a/b/c com MMP7 e TGFBRII	25
5.4	Comparação da expressão de miR-17 e miR-214 com MMP7 e TGFBRII	27
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O câncer, também denominado de neoplasia maligna, faz parte das Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT) e corresponde a segunda maior causa de morte no mundo (OPAS, 2018). No ano de 2018, foram responsáveis por 9,6 milhões das mortes registradas nesse período. Dos 18 milhões de novos casos no ano de 2018, 52,3% corresponderam ao sexo masculino e 47,7% ao sexo feminino (IARC, 2018). A neoplasia maligna é caracterizada pela proliferação celular descontrolada e desordenada, com perda de diferenciação celular e do mecanismo de apoptose. Dessa forma, essas células possuem capacidade de invadir tecidos vizinhos e de migrar para outros órgãos, levando ao processo denominado de metástase (PEREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2006). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer incluem tabagismo; etilismo; infecção viral; baixo consumo de frutas e legumes; sedentarismo; e exposição à radiação (ISLAMI *et al.*, 2018).

1.2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tipo histológico mais frequente de câncer que acomete a cavidade oral, correspondendo a 90% dos casos (BARASCH, 1998). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) para o biênio 2018/2019, são estimados 354.864 casos novos de câncer de cavidade oral e orofaringe no mundo (IARC, 2018). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2018/2019 apontam para o surgimento de 11.200 novos casos de câncer oral e orofaringe, sendo 7.700 dos casos em homens e 3.500 em mulheres (INCA, 2018). O CCEO é considerado um problema de saúde pública no mundo inteiro, em virtude do impacto físico e psicossocial causado ao paciente, tanto pela doença, quanto por seu tratamento, que envolve na maioria dos casos, cirurgias extensas e mutilantes. Tais fatores irão influenciar diretamente no prognóstico e na sobrevida do paciente (SHRIDHAR *et al.*, 2016).

O CCEO se desenvolve a partir de uma lesão pré-maligna, como as leucoplasias e eritroplasias, causadas pela exposição a agentes cancerígenos (SHRIDHAR *et al.*, 2016), que se desenvolvem, principalmente no assoalho bucal e

na língua, mas podem acometer outros sítios anatômicos, como palato duro, trígonoretromolar, gengivas e mucosa labial (SHAH ; LYDIATT, 1995; AKANUMA *et al.*, 1999; SCULLY ; PORTER, 2000). A exposição à carcinógenos, como álcool, tabaco e infecção pelo HPV, são os principais fatores etiológicos do CCEO, que levam a alterações genéticas e epigenéticas, responsáveis por transformar a lesão pré-maligna no carcinoma in situ (SASAHIRA *et al.*, 2014).

Apesar do avanço no diagnóstico e no tratamento de diversos tipos de câncer, ainda existe uma alta taxa de mortalidade e morbidade de indivíduos com CCEO. Dessa forma, há uma busca para identificar fatores com relevância no prognóstico, com o objetivo de atender melhor às demandas de cada paciente. Esses fatores podem estar relacionados com idade, consumo de tabaco e álcool, atraso no diagnóstico, condições socioeconômicas, comorbidades, sítio anatômico, estágio da doença, espessura do tumor, disseminação extracapsular, diferenciação histológica e marcadores moleculares (MASSANO *et al.*, 2006).

A detecção da lesão com potencial de malignidade, quando feita em seu estágio inicial, diminui tanto a taxa de morbidade, quanto a taxa de mortalidade de pacientes portadores de CCEO. Contudo, a maioria dos casos de câncer oral são detectados nos estágios mais avançados da doença (SHRIDHAR *et al.* 2016), com percentual de 82% para sobrevida de 5 anos em pacientes com doença em estágio inicial e 49% nos estágios mais avançados (GUERRA *et al.*, 2005).

Atualmente, a grande barreira para o acompanhamento da progressão do câncer oral é o fato de não existirem biomarcadores genéticos e epigenéticos que auxiliem no diagnóstico precoce da doença, apesar do fácil acesso à cavidade oral para detecção de lesões cancerizáveis. Dessa forma, a descoberta de novos marcadores, para detecção precoce e para avaliação de respostas a terapias serão extremamente úteis, com a finalidade de estabelecer tratamentos menos invasivos, implicando em uma menor morbimortalidade e uma melhor qualidade de vida para este paciente.

1.3. CARCINOGENESE ORAL

O câncer se desenvolve a partir de mutações no DNA, que desencadeiam alterações genéticas e epigenéticas, resultando na inativação de genes supressores tumorais ou ativação de proto-oncogenes, ou ambos (PEREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2006). Na carcinogênese oral, estudos têm demonstrado alterações genéticas relacionadas a *breakpoints* em regiões cromossômicas, a mutações na família do oncogene *Ras* e *C-myc*, além de alterações nos genes supressores de tumor *p53* e *E-caderina* (CALIFANO *et al.*, 2000). Os principais eventos epigenéticos envolvidos na carcinogênese oral, estão associados à metilação do DNA, modificação de histonas, remodelação dos nucleossomas e miRNAs (SARANATH *et al.*, 1991; JIN *et al.*, 1990; ARGIRIS *et al.*, 2008; NÉMETH *et al.*, 2019).

Após a fase inicial da carcinogênese, para o tumor se desenvolver e alcançar potencial de invasão, cascatas moleculares associadas a proliferação celular, apoptose, angiogênese e metástase, deverão ser ativadas para garantir um microambiente favorável (ARGIRIS *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado a importância da transição epitélio mesenquimal (TEM) na agressividade de diversos tipos de câncer, como em osteossarcomas, gliomas e tumores de mama (ZHAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; CANTINI *et al.*, 2019).

1.4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL

A TEM é um processo fisiológico caracterizado pela transformação das epiteliais em células mesenquimais (KALLURI ; WEINBERG, 2009). Ela é dividida em três tipos, com ações biológicas distintas. A TEM tipo 1, ocorre durante o desenvolvimento embrionário, especialmente associada a gastrulação (OHTA *et al.*, 2007; NAKAYA *et al.*, 2008). Já a TEM tipo 2, está relacionada ao processo de cicatrização de feridas, reparo tecidual e fibrose de órgãos (KALLURI ; NEILSON, 2003). Enquanto o tipo 3, ocorre em células neoplásicas que sofreram alterações genéticas e epigenéticas, favorecendo o desenvolvimento e metástase tumoral (HEUBERGER ; BIRCHMEIER, 2010; RASOOL *et al.*, 2017; VALD-NIELSEN *et al.*, 2019). As vias moleculares que estão envolvidas neste processo incluem a perda de adesão célula-a-célula, reorganização dos microfilamentos de actina, expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e alterações na expressão de miRNAs (KRISANAPRAKORNKIT ; IAMAROON, 2012).

Esse processo já foi associado à via TGF- β , um ativador dos fatores de transcrição indutores da TEM (HELDIN *et al.*, 2012). A via de TGF- β , também é capaz de regular os níveis de MMPs, enzimas que degradam a matriz extracelular, exercendo importante papel na invasão e migração das células tumorais (MOUSTAKAS ; HELDIN, 2016).

1.5. VIA DE TGF- β

Uma importante via relacionada com a homeostase das células epiteliais é a via de TGF- β . A ação canônica de TGF- β consiste na ligação de TGF- β aos seus receptores de membrana específicos do tipo I (TGFBRI) e do tipo II (TGFBRII) que possuem atividade serina treonina-quinase (**Figura 1**) (FENG ; DERYNK, 2005). A ligação ao TGFBRII leva à fosforilação de TGFBRI e consequentemente à ativação de proteínas denominadas de SMADs, que irão se deslocar para o núcleo, e por sua vez, regular a expressão de genes-alvo (FENG ; DERYNCK, 2005).

TGF- β é uma citocina regulatória do processo inflamatório (GUO *et al.*, 2016). A desregulação desta via está associada com o processo de inflamação, migração e angiogênese (FERRARI *et al.*, 2009). Já foi demonstrado em linhagens de CCEO que a desregulação na via de TGF- β pode induzir a migração e invasão nestas células, por ativação do fenótipo TEM (QUAN *et al.*, 2013). A perda de expressão de TGFBRII pode promover a metástase no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP). A perda de TGFBRII observada por imunohistoquímica foi correlacionada com a redução nos níveis de RNA mensageiro de TGFBRII, sugerindo que esta perda de expressão no CCECP poderia estar ocorrendo em nível pré-traducional (LU *et al.*, 2006).

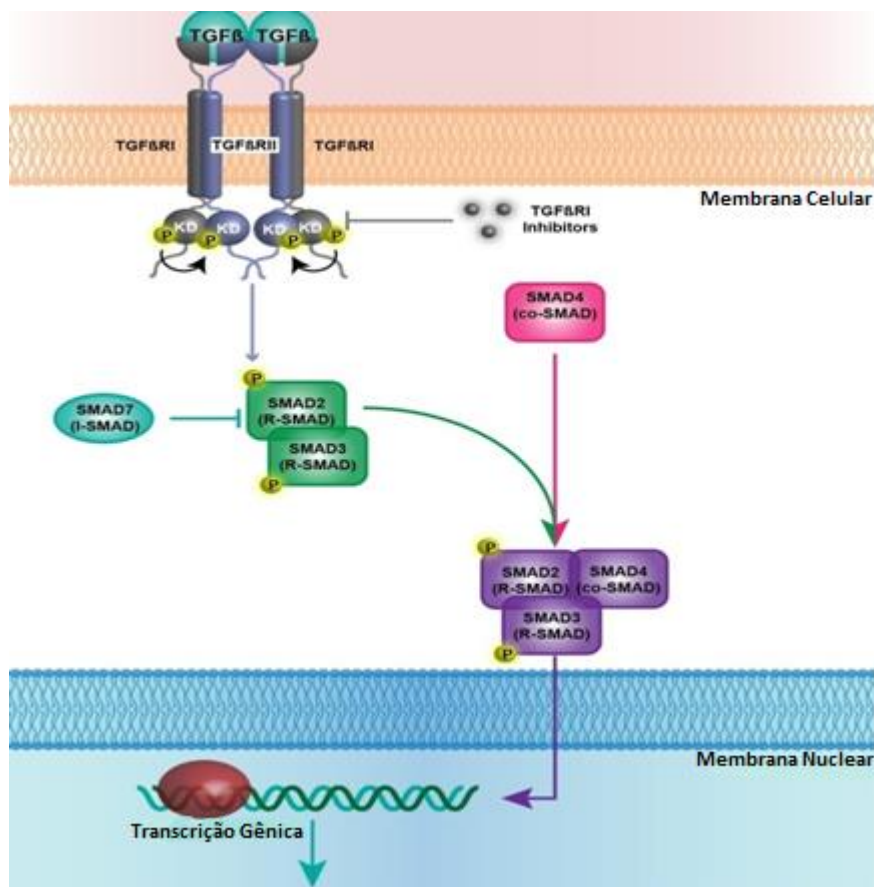


Figura 1: Via de Sinalização TGF-β. TGF-β se liga ao seu receptor de membrana do tipo II que ativa e fosforila o receptor de membrana do tipo I. A sinalização intracelular é propagada pelas proteínas SMADs, SMAD2 e 3 são ativadas pelo receptor do tipo I, essas duas proteínas formam um complexo com SMAD4 capaz de se deslocar para o núcleo da célula e ativar a transcrição gênica (adaptado de *My Cancer Genome*, 2019).

As proteínas SMADs estão são os principais efetores da via de TGF-β na carcinogênese. O papel de SMAD3 é dual, apresentando tanto uma atividade supressora, quanto oncogênica. Análises em câncer de mama demonstraram que a ativação da SMAD2/3 pode regular tanto o processo carcinogênico quanto a supressão tumoral, dependendo da fase do desenvolvimento tumoral (TIAN *et al.*, 2004). Uma avaliação dos membros da família TGF-β em 20 lesões orais potencialmente malignas, como leucoplasia e fibrose submucosa, demonstrou uma diminuição gradual na expressão de SMAD2, SMAD4, TGFβRI e TGFβRII nos tecidos normais, coletados de indivíduos saudáveis, para os tecidos malignos. E que a proteína SMAD3 estava significativamente reduzida nos tecidos malignos. A diminuição de TGFβRII foi associada com um pior índice de sobrevida ($p=0.012$) (SIVADAS *et al.*, 2015).

A via de TGF- β também foi descrita com importante na indução e ativação das MMPs, contribuindo para o processo de TEM (KANOAKA *et al.*, 2018; KILARI *et al.*, 2018).

1.6. TGF- β e MMP7

As MMPs fazem parte de uma família de enzimas zinco dependentes que degradam os componentes da matriz extracelular e da membrana basal (CURRAN ; MURRAY, 2000). As MMPs possuem papel importante em processos fisiológicos, como: cicatrização, angiogênese, morfogênese, remodelação óssea e comunicação celular (NAGASE *et al.*, 2006).

Essas moléculas já foram associadas ao processo de invasão e metástase tumoral *in vitro*, em linhagens celulares de câncer de mama (COCKETT *et al.*, 1998) e em modelos animais, no câncer de fígado e colorretal (KAWAMATA *et al.*, 1995). Em linhagem celular de câncer de mama, TGF- β induziu a atividade da MMP9 (SUAREZ-CUERVO *et al.*, 2004). Em linhagem celular de carcinoma de células escamosas de pele, TGF- β aumentou os níveis de tanto de MMP1 quanto de MMP13 (JOHNSSON *et al.*, 2000). Em adição, em linhagens celulares de câncer de próstata, a MMP1 promoveu a TEM ao ativar o TGF- β extracelular e induziu também a secreção de Wnt5a, fornecendo um sinal parácrino para as células tumorais (NGUYEN *et al.*, 2016).

A MMP7, também chamada de Matrilisina, desempenha um papel importante na remodelação tecidual, visto que, possui ampla atividade proteolítica e ativa outras MMPs (MÄKINEN *et al.*, 2014). Essa molécula também possui hiperexpressão em diversos tipos de tumores. No carcinoma de esôfago, um estudo demonstrou que a superexpressão da MMP7 está associada com recidivas e um pior prognóstico (YAMAMOTO *et al.*, 1999). No câncer de pâncreas, a MMP7 também se apresenta superexpressa, sendo considerado um potencial indicador de prognóstico negativo neste tumor (JONES *et al.*, 2004). No CCEO, a MMP7 se encontra hiperexpressa e está associada com invasão e metástase (TAKAHARA *et al.*, 2017).

No carcinoma hepatocelular foi descrita uma correlação entre a via de TGF- β e MMP7 (ZENG *et al.*, 2016). A secreção de TGF- β 1 aumentou a atividade da MMP7 e induziu a expressão de Syndecan-1, estabelecendo um *loop* autócrino entre MMP7, Syndecan-1 e TGF- β 1, induzindo a TEM nas células tumorais (ZENG

et al., 2016). Outra molécula que regula a expressão da MMP7 é a Sirtuína1 (SIRT1), que atua diminuindo os níveis da proteína SMAD4, um transdutor da via de TGF- β . No CCEO, foi evidenciado que o tratamento das células tumorais com TGF- β 1 aumentou a expressão da proteína SMAD4 e da MMP7, resultando na diminuição da SIRT1 (CHEN *et al.*, 2014).

A MMP7 também está sujeita a regulação epigenética, especialmente pelos miRNAs. Essa correlação já foi descrita no câncer gástrico por infecção pela *Helicobacter pylori*, em que os miRNAs miR-128 e miR-146a diminuíram a expressão da MMP3 e da MMP7 (YANG *et al.*, 2018). A MMP7 também demonstrou ser um alvo do miR-143 no câncer colorretal, inibindo a proliferação das células tumorais (YU *et al.*, 2017). Enquanto, no câncer hepatocelular, o miR-489 inibiu a expressão da MMP7, e consequentemente diminuiu a migração e invasão desse tumor (LIN *et al.*, 2017).

1.7. miRNAs

Os miRNAs fazem parte de um grupo de RNAs não codificantes que possuem funções regulatórias (AMBROS, 2004). Essas moléculas variam de 18 a 22 nucleotídeos e regulam a expressão gênica ao se parearem ao seu RNA mensageiro alvo, induzindo a clivagem e/ou repressão transcricional (BARTEL, 2004). Os miRNAs possuem importante papel em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, imunidade, apoptose e carcinogênese (COWLAND *et al.*, 2007).

A biogênese do miRNA se inicia com a sua transcrição no núcleo celular pela polimerase II, majoritariamente, e o posterior processo de clivagem do miRNA primário (pri-miRNA) pelo complexo Drosha, que gera o miRNA precursor (pré-miRNA), estrutura em forma de *hairpin* (**Figura 2**). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma através da Ran-GTPase exportina-5. No citoplasma o pré-miRNA é clivado pelo complexo formado pela enzima Dicer, dando origem a uma dupla fita com aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas origina o miRNA maduro, que é incorporado ao complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), que apresenta como um dos seus componentes a proteína Argonauta (AGO)(BARTEL, 2004; WINTÉ *et al.*, 2011; NAVEED *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação dos miRNAs está relacionado com o grau de complementaridade das fitas de RNAm alvo e o miRNA. Quando o grau de complementaridade for próximo de 100%, o mecanismo utilizado é a degradação do RNAm através da via dos RNAs de interferência (siRNA), via utilizada pelo Reino *Plantae*. Porém, quando o grau de complementaridade é imperfeito, o mecanismo de ação é a repressão transcricional do mRNA usado nos metazoários (NAVEED *et al.*, 2017).

Uma vez que a complementaridade das fitas de RNAm alvo e do miRNA não é total na maioria das células eucariotas, um mesmo miRNA pode regular diferentes mRNA. Dessa forma, estima-se que essas moléculas sejam responsáveis por regular 30% dos genes que codificam proteínas (LEWIS *et al.*, 2005). Isso faz com que os miRNAs sejam classificados como os reguladores de genes mais abundante no organismo (SASSEN *et al.*, 2008).

A alteração no perfil de expressão dos miRNAs está associada a diversas doenças, dentre elas o câncer (LIN ; GREGORY, 2015). No desenvolvimento das neoplasias malignas, os miRNAs podem assumir função de supressão tumoral, no combate às células tumorais, ou de oncogenes, favorecendo o desenvolvimento do câncer. Os estudos relacionando os miRNAs e o câncer são feitos comparando o perfil de expressão dessas moléculas em células tumorais, e células normais. Basicamente, possuem função oncogênica, quando regulam proteínas supressoras tumorais, e função supressora, quando inativam possíveis proteínas oncogênicas (ZHANG *et al.*, 2007).

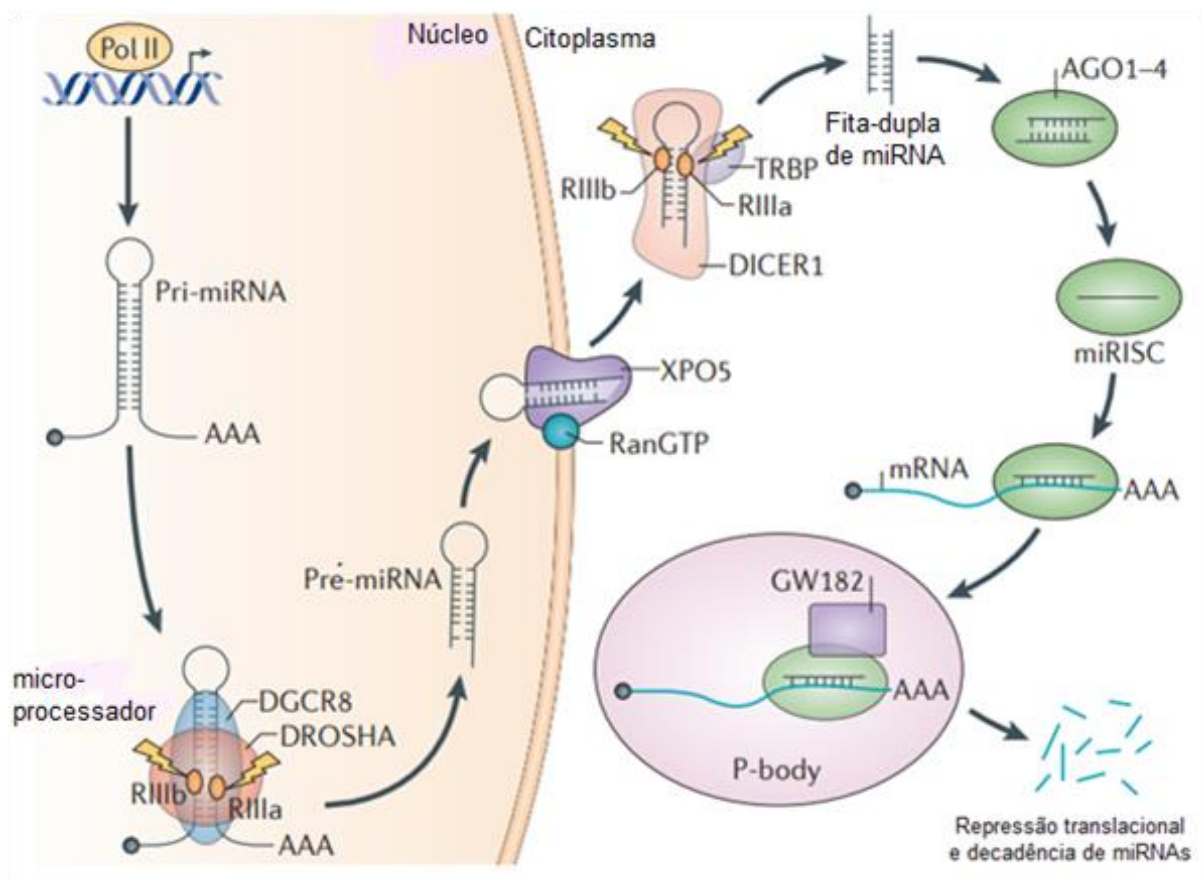


Figura 2: Biogênese dos miRNAs. O pri-miRNA é transcrito no núcleo da célula e posteriormente clivado pelo complexo Drosha que dá origem ao pré-miRNA. O pré-miRNA é transportado para o citoplasma da célula e em seguida é clivado pela Dicer dando origem a uma dupla fita com aproximadamente 22 nucleotídeos. O miRNA maduro é anexado ao complexo RISC, e a outra fita é degradada (adaptado de LIN ; GREGORY, 2015).

A interação entre a via de TGF- β e os miRNAs tem sido investigada. Nesse contexto, foi descrito o importante papel das SMADs no processamento dos miRNAs no núcleo das células epiteliais de pulmão (WARNER *et al.*, 2004; DAVIS ; HATA, 2009). Dentre os miRNAs regulados por TGF- β estão miR-181a/b/c (WANG *et al.*, 2010; CARRELLA *et al.*, 2015). Estudos em linhagens celulares tumorais revelaram que a via TGF- β aumenta a expressão do miR-181a e promove metástase no câncer de mama (TAYLOR *et al.*, 2013). No câncer de estômago, TGF- β aumenta a expressão de miR-181b induzindo o processo de metástase (ZHOU *et al.*, 2016). Por sua vez, o miR-181c foi associado a via TGF- β em células-tronco e células embrionárias de camundongos (REDSHAW *et al.*, 2013). Entretanto, dados de bioinformática e estudos *in vivo*, demonstraram que miR-181a/b também são capazes de regular a via de TGF- β , tendo como alvos TGFBR1, TGFBR2 e SMAD3 (CHEN *et al.*, 2018).

Outro importante miRNA, o miR-17-5p, também foi descrito como um regulador da via de TGF- β diminuindo a expressão de TGFBRII em linhagens de câncer de pulmão, atuando como supressor tumoral (LI *et al.*, 2017). No câncer cervical, miR-17 atua como um oncogene, ao promover a proliferação das células tumorais e metástase inibindo TGFBRII (CAI *et al.*, 2018). Um estudo do desenvolvimento dentário de murinos revelou que a inibição do miR-214 também foi capaz de controlar níveis de TGF- β 1, mostrando haver uma correlação entre os dois (KHAN *et al.*, 2013).

1.7.1. miR-181a/b/c

O miR-181a, 181b e 181c fazem parte da família miR-181, que é composta por seis diferentes genes (miR-181a1, miR-181a2, miR-181b1, miR181b2, miR-181c e miR-181d) que dão origem a quatro sequências maduras (miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d) (JI *et al.*, 2009). A família miR-181, segundo CHEN e colaboradores (2004), possui importante papel na regulação da resposta imune e possuem importante função na miogênese (NAGUIBNEVA *et al.*, 2006).

O miR-181a é altamente expresso no timo, e sua expressão leva ao aumento/enriquecimento de células CD4⁺ e CD8⁺. Isso indica que esse miRNA contribui para o desenvolvimento de células T, ou seja, controla a resposta imune adaptativa (PEDERSEN ; DAVID, 2008). No câncer, este miRNA pode se apresentar como um supressor tumoral ou um oncogene. Em gliomas, tanto miR-181a como miR-181b, atuam como supressores tumorais (SHI *et al.* 2008). Neste modelo, células transfectadas com mimico de miR-181a foram submetidas à altas doses de radiação, e uma maior sensibilidade à radioterapia foi observada (CHEN *et al.*, 2010). No câncer de mama, miR-181a atua como um oncogene, é regulado positivamente por TGF- β e está associado ao potencial metastático nesse tipo de tumor (TAYLOR *et al.*, 2013). Todavia, no CCEO, atua como supressor tumoral através da inibição de k-ras (SHIN *et al.*, 2011).

O miR-181b atua como supressor tumoral no câncer colorretal e em malignidades hematopoiéticas, como a leucemia mielóide aguda (ZHAO *et al.*, 2016, LI *et al.*, 2012). Apesar de ser considerado um supressor em diversos tipos tumorais, foi descrito hiperexpresso no carcinoma papilar de tireóide (LI *et al.*, 2014). Também é apontado como bom biomarcador no CCEO, visto que sua hiperexpressão está

associada à progressão de leucoplasias para o CCEO invasivo atuando como um oncogene nesse tipo de tumor (CERVIGNE *et al.*, 2009).

O miR-181c já foi descrito como um importante regulador em diversos tipos tumores. No câncer de mama, esse miRNA promove a proliferação das células tumorais ao inibir a fosfatase homóloga à tensina (PTEN, do inglês *phosphatase and tensin homolog*), um gene supressor tumoral com funções reguladoras no crescimento e sobrevivência celular (ZHANG *et al.*, 2015). No câncer de ovário, ele atua como um supressor tumoral inibindo a proliferação, migração e metástase das células tumorais, ao diminuir os níveis de PRKCD, proteína importante na regulação da apoptose (YAO *et al.*, 2015). O miR-181c também atua como um supressor tumoral no glioblastoma ao regular negativamente o gene Notch2 e dessa forma, diminui a capacidade de proliferação, invasão e auto-renovação das células tumorais (RUAN *et al.*, 2015). Outro estudo demonstrou que o miR-181c, no glioblastoma, inibe a TEM regulando negativamente os componentes da via TGF- β (HE *et al.*, 2016). No CCEO, foi observado por Wong e colaboradores, (2008) a hiperexpressão desse miRNA. Contudo, ainda há poucos estudos correlacionando o miR-181c em tecidos tumorais de CCEO.

Dados recentes do nosso grupo, demonstram que o miR-181a e o miR-181b apresentaram hiperexpressão nas amostras de CCEO (**Figura 3a e 3b**) comparados com amostras de mucosa oral saudável. Entretanto, miR181c (**Figura 3c**) não apresentou diferença significativa entre os dois grupos (MACHADO *et al.*, 2016).

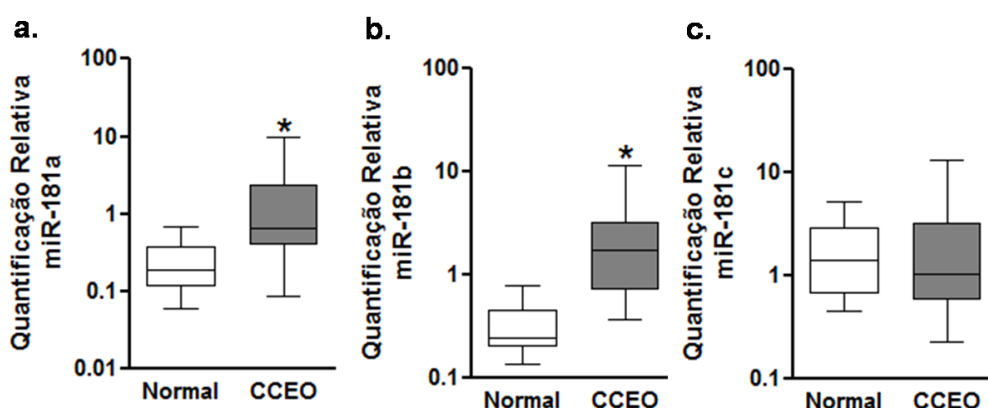


Figura 3: Aumento de miR-181a/b em CCEO. (a) Avaliação de miR-181a; (b) miR-181b e (c) miR-181c nas amostras de CCEO comparadas com as amostras normais. Observa-se um aumento do miR-181a e miR-181b nos pacientes portadores de CCEO. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa (Modificado da Dissertação de Mestrado de Ana Beatriz Machado Lima, 2017).

1.7.2 miR-17

O miR-17 faz parte do cluster miR-17-92, que está localizado no cromossomo 13 e origina sete miRNAs diferentes: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-20a, miR-18a, miR-19a, miR-19b e miR-92a. Estudos demonstraram expressão elevada de miR-17-5p em células-tronco embrionária de camundongos, o que indica seu importante papel no desenvolvimento embrionário (THOMSON *et al.*, 2004). Esse miRNA também está superexpresso em diversos tipos de câncer, de mama (HESARI *et al.*, 2018), gástrico (LU *et al.*, 2007) e de pâncreas (ZHU *et al.*, 2018). No CCEO, o miR-17 atua como supressor tumoral, visto que sua expressão é diminuída em linhagens agressivas de CCEO e sua expressão é inversamente proporcional a migração celular desse tumor (CHANG *et al.*, 2013).

Dados recentes do nosso grupo, demonstram que o miR-17 apresentou hiperexpressão nas amostras de CCEO comparados com amostras de mucosa oral saudável (MORELI *et al.*, 2019) (**Figura 4a**).

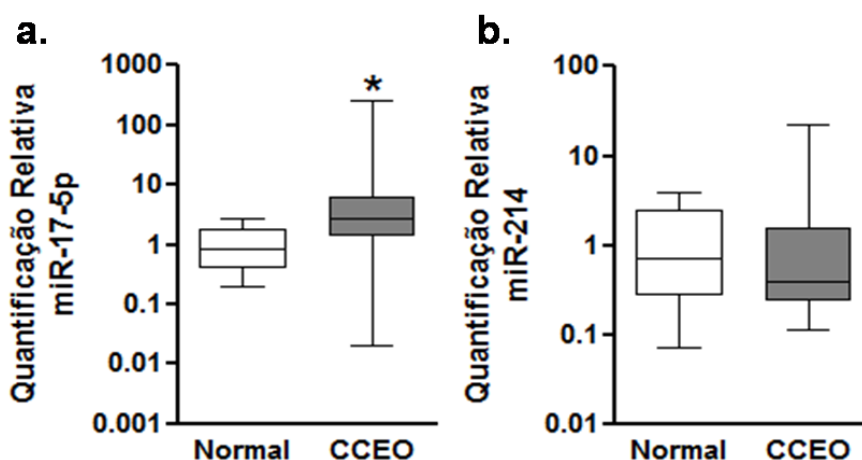


Figura 4: Aumento de miR-17 em CCEO. (a) Avaliação de miR-17 e (b) miR-214 nas amostras de CCEO comparadas com as amostras normais. Observou-se aumento do miR-17 nas amostras de pacientes portadores de CCEO. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa (Modificado da Tese de Doutorado de Andrea Moreli, 2019).

1.7.3 miR-214

O miR-214 está localizado na região cromossomal 1q24.3, no íntron 14 do gene Dynamin-3 (DNM3). Esse gene origina três diferentes miRNAs: miR-214, miR-199a e miR-199a* (WATANABE *et al.*, 2008). Porém, foi descoberto que esse gene codifica uma outra sequência de miRNA no sentido reverso, o miR-3120 (SCOTT *et*

al., 2012). O miR-214 exerce importante papel na diferenciação e morfogênese muscular (FLYN *et al.*, 2007), esquelética (WATANABE *et al.*, 2008), do sistema nervoso (CHEN *et al.*, 2010) e do pâncreas (JOGLEKAR *et al.*, 2007).

Esse miRNA está relacionado à diversos tipos de câncer. No câncer colorretal atua como um supressor tumoral, inibindo a proliferação, migração e o processo de TEM (SUN *et al.*, 2018). No melanoma maligno atua como oncogene e está associado às variantes mais agressivas da doença, uma vez que sua expressão está relacionada à metástase (PENNA *et al.*, 2011). No CCEO, miR-214 está superexpresso e atua como um oncogene inibindo o membro 5 do domínio de associação da família RAS (RASSF5), um supressor tumoral (LI *et al.*, 2017).

Dados recentes do nosso grupo, acentuam a importância deste miRNA durante o processo de carcinogênese oral. Embora o miR-214 não tenha apresentado diferença significativa entre as amostras de CCEO quando comparados com amostras de mucosa oral saudável (**Figura 4b**), ele estava significativamente elevado nos pacientes etilistas (MORELI *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer oral e de orofaringe ocupam a 16ª posição entre as neoplasias malignas mais frequentes no mundo, com estimativa para o biênio 2018/2019 de 354.864 casos novos; sendo deste total 246.420 homens e 108.444 mulheres (IARC, 2018). No Brasil, essa neoplasia ocupa a 12ª posição entre todos os cânceres, e constitui o quarto tipo de câncer mais frequente em homens na Região Sudeste (INCA, 2018).

Apesar dos avanços observados nas pesquisas no campo das terapias para o tratamento do câncer (cirurgia, radioterapia e quimioterapia), da natureza agressiva e invasiva do CCEO, e ainda, em virtude da dificuldade no diagnóstico diferencial entre esta doença e outras lesões bucais, as taxas de mortalidade para o CCEO ainda se mantêm elevadas (INCA, 2018; IARC, 2018). Além disso, a cirurgia, considerada o tratamento padrão-ouro do CCEO, é na maioria das vezes extensa e mutilante, afetando a qualidade de vida do paciente. Para isto, a identificação de marcadores moleculares que permitam um diagnóstico precoce, e também o desenvolvimento de terapias mais conservadoras, poderá contribuir para a melhora no prognóstico e na sobrevida destes pacientes.

Estudos em diversos tipos de câncer vêm revelando a importância dos miRNAs na progressão e invasão do câncer, dentre eles miR-181a/b/c, miR-17 e miR-214 (SHIN *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017). Além disso, esses miRNAs também foram associados com a via TGF- β e com as MMPs cuja desregulação já foi descrita em muitos tumores (LI *et al.*, 2019; ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC *et al.*, 2019).

Portanto, uma melhor compreensão sobre vias moleculares envolvidas na carcinogênese oral, e principalmente sobre a conexão existente entre a via de TGF- β 1, MMPs e os miRNAs se faz importante para auxiliar na identificação de novos alvos diagnósticos e terapêuticos, bem como avaliar a prognose dos portadores de CCEO.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão e dos genes TGFBRII e MMP7 no câncer oral e sua correlação com os miRNAs: miR-181a/b/c, miR-17 e miR-214.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar os *primers* para os genes TGFBRII e MMP7 utilizando a ferramenta *Gene Runner* para análises por qPCR;
- Padronizar os *primers* de TGFBRII e MMP7 e otimizar as reações para as análises para qPCR;
- Avaliar a expressão de TGFBRII e MMP7 em linhagens e amostras de CCEO por qPCR;
- Correlacionar os resultados da expressão de TGFBRII e MMP7 com miR-181a/b/c, miR-17 e miR-214, com os dados clínico patológicos dos pacientes, já obtidos pelo nosso grupo.

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este estudo foi realizado utilizando amostras de 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 2018). A amostra foi composta por 23 pacientes, sendo 12 pacientes com CCEO e 11 pacientes com mucosa oral normal. Contudo, das 12 amostras de CCEO, somente 8 amplificaram MMP7 e TGFBR2, e das 11 amostras de mucosa oral normal, apenas 9 amplificaram MMP7 e 7 amplificaram TGFBR2. 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 clinicopatológicos e posteriormente submetidos ao procedimento de biópsia incisiva 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 amostras de mucosa oral normal, provenientes de pacientes da Clínica de Periodontia, submetidos a cirurgias periodontais, ou cirurgias pré-implantares, seguindo protocolo de coleta semelhante ao das amostras de CCEO.

Neste estudo foram incluídos somente os pacientes com confirmação histopatológica de CCEO, CCEOs primários, pacientes que não sofreram tratamento prévio de câncer (cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia). Não puderam participar deste estudo os pacientes portadores de recidivas de câncer oral ou outro tipo histológico de câncer, pacientes que já haviam sido tratados anteriormente por câncer, ou outro tipo histológico de câncer de cavidade oral. A utilização das amostras foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO (nº do parecer: 1.753.202). Os dados da população foram levantados através da Ficha Clínica e o termo de consentimento pós-informado para utilização das amostras foram devidamente assinados por todos os pacientes.

A população de pacientes portadora de CCEO foi constituída em sua maioria por indivíduos do sexo masculino, com idade superior aos 60 anos, brancos, sendo

41,66% tabagistas e 66,66% de etilistas. O tipo histológico CCEO moderadamente diferenciado foi o mais comumente observado (**Tabela 1**):

Tabela 1: Características demográficas e presença de hábitos viciosos em pacientes portadores de CCEO

Variáveis	Grupos	Total (n=12)	%
Sexo	Feminino	4	33,34
	Masculino	8	66,66
Idade	> 60 anos	11	91,66
	< 60 anos	1	8,34
Localização	Língua	7	58,33
	Assoalhofubucal	2	16,67
	Outros	3	25
Tabagismo	Sim	5	41,66
	Não	7	58,34
Etilismo	Sim	8	66,66
	Não	4	33,34
Grau de diferenciaçãohistológica	Bem diferenciado	1	8,33
	Moderadamente diferenciado	10	83,34
	Pouco diferenciado	1	8,33

4.2. 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, Waltan, 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).

4.3. Cultura de células

Foi utilizada neste estudo uma linhagem tumoral derivada de CCEO de língua (SCC-9) e uma linhagem de queratinócitos normais (HaCaT), provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC -www.atcc.org). Estas linhagens foram cultivadas em meio DMEN/F12 (Gibco-Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, E.U.A.), a 10% de soro fetal bovino, hidrocortisona (400 ng/mL), a 37°C, 5% de CO₂ em presença de antibióticos e antimicóticos. Após este período, o RNA destas células foi extraído, confeccionados os cDNAs e posteriormente foi realizada a avaliação da expressão dos genes e dos miRNAs por qPCR.

4.4. Desenho dos Primers

Para as análises da expressão de TGFBRII e MMP-7 foram desenhados os primers utilizando as ferramentas *in silico* Nucleotide (NCBI), *University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* e *Gene runner*. O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador da reação de qPCR.

4.5. Confeção dos cDNAs para TGFBRII/MMP7

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.

4.6. Análise por qPCR

Para a avaliação da expressão de TGFBRII/MMP7 o sistema *Sybr Green*. As reações em triplicata, em presença de um controle negativo com volume total 20 µL para cada reação e o método da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_q}$, no aparelho QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

4.7. 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 serão realizadas utilizando-se o programa estatístico para computador SPSS *version* 22.0. A análise entre da expressão dos miRNAs, dos genes alvo, bem como, a associação com os dados clínicopatológicos coletadas serão realizados utilizando o teste estatístico Mann-Whitney, Kruskal Wallis e a correlação de Spearman. Será considerado o nível de significância para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise de MMP7 e TGFBR2

Foram desenhadas as sequências dos *primers* para MMP7, TGFBR2 e o normalizador GAPDH. As sequências destes *primers* e seus respectivos produtos estão descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1: Sequências de *primers* para avaliação da expressão dos genes do estudo por qPCR

NCBI	Nome	Sequências	Tm*	Produto
NM_002423	MMP7	F:5'TGCTGTGTGCCTGCTGCC 3'	56.0	91pb
		R:5'GTCCTGAGCCTGTTCCCACTGTA 3'	56.6	
NM_001024847.2	TGFBR2	F:5'ATGGCTCTGGTGCTCTGGGAA 3'	57.9	186pb
		R:5'CTGGATGCCCTGGTGGTTGAG 3'	58.5	
NM_002046.5	GAPDH	F:5'AAATCCCATCACCATCTTCCAGG3'	57.5	130pb
		R:5'CCCCTGCAAATGAGCCCC3'	57	

*Temperatura de *melting*; ^a produto

Após a síntese dos *primers* iniciou-se a padronização de MMP7 e TGFBR2 e GAPDH nas concentrações de 50nM, 300nM e 900nM. Para isto, foram utilizadas amostras de pacientes normais e de CCEO. Além disso, usamos uma linhagem de queratinócitos humanos (Hacat) e uma linhagem de carcinoma de CCEO, SCC9. Os resultados obtidos da PCR em tempo real, demonstraram que a concentração de 300nM apresentava uma melhor amplificação(**Figura 5**) e especificidade, pela curva de dissociação dos *primers* (**Figura 6**) das amostras do estudo.

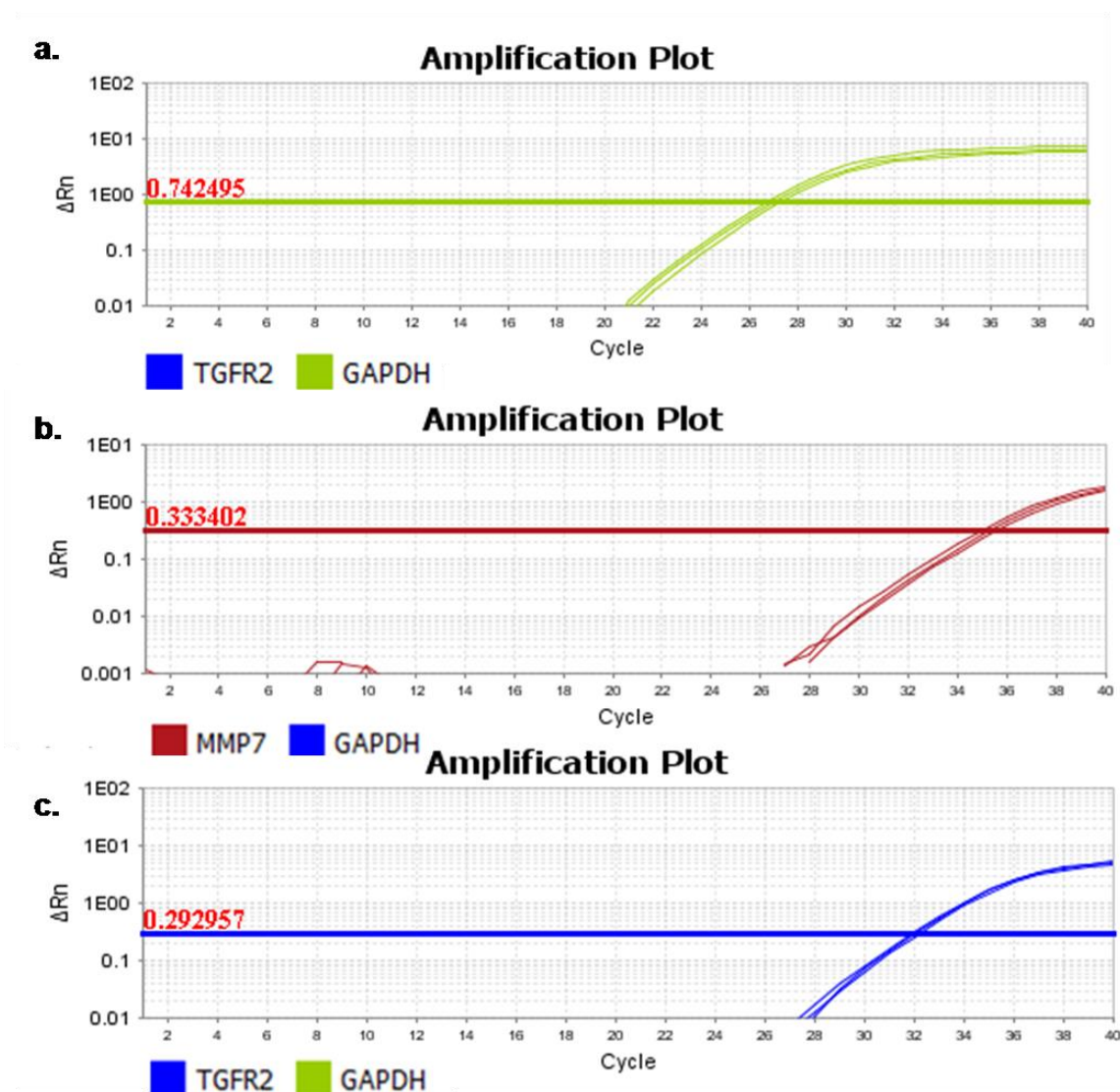


Figura 5: Amplificação de MMP7, TGF β R2 e GAPDH. (a) Curva de amplificação do *primer* GAPDH na amostra de CCE22; (b) Curva de amplificação do *primer* MMP7 na amostra CCE22 e (c) Curva de amplificação do *primer* TGFBRII na amostra CCE22. A concentração de 300nM mostrou boa amplificação para MMP7, GAPDH e TGFBRII.

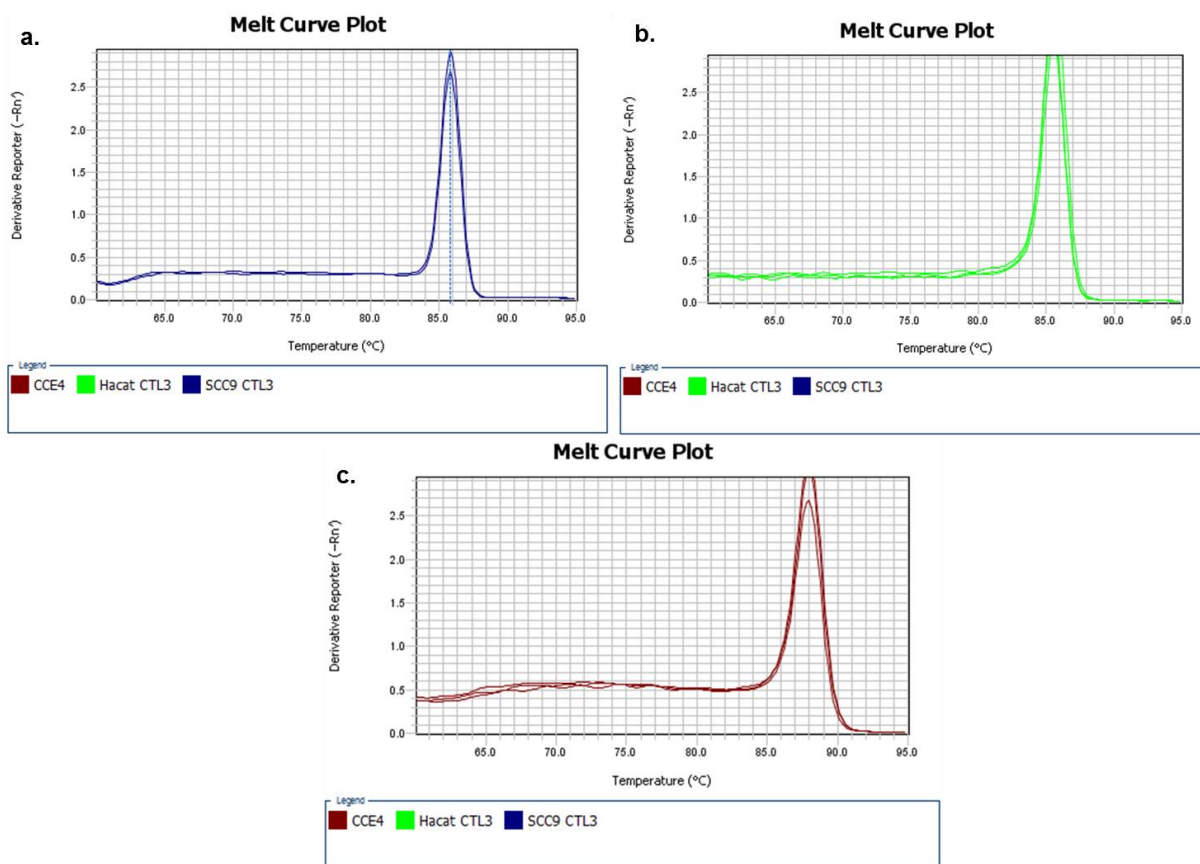


Figura 6: Curva de *melting* de MMP7, TGFβR2 e GAPDH. (a) Curva de *melting* do *primer* TGFBR2 na amostra de SCC9 a300nM; (b) Curva de *melting* do *primer* GAPDH na amostra Hacat à 300nM; e (c) Curva de *melting* do *primer* MMP7 na amostra CCE4 à 300nM; Não houve amplificação de material indesejado com os *primers* TGFBR2, GAPDH e MMP7 à 300nM.

Inicialmente foram realizadas as análises de MMP7 e TGFBR2 nas amostras de CCEO comparadas com amostras de pacientes normais. Entretanto, das 11 amostras de mucosa oral saudável, somente 9 amplificaram o gene MMP7, e 7 amplificaram TGFBR2. Quanto às amostras de CCEO, do total de 12 amostras, somente 8 amplificaram MMP7, e 8 TGFBR2.

Nestas análises, observamos hiperexpressão de MMP7 (**Figura 7a**) em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 37,5% (3 amostras de 8) das amostras de CCEO. Já a hipoexpressão de MMP7, foi encontrada em 22,2% (2 amostras de 9) das amostras normais, e em 37,5% (3 amostras de 8) das amostras de CCEO. TGFBR2 apresentou-se hiperexpresso em 42,85% (3 amostras de 7) das amostras normais e 25% (2 amostras de 8) nas amostras de CCEO (**Figura 7b**). A hipoexpressão de TGFBR2 foi observada em 28,5% (2 amostras de 7) das amostras

normais e 62,5% (4 amostras de 8) das amostras tumorais. Entretanto, de forma geral, não encontramos diferenças significativas entre a mucosa oral normal e os CCEO (**Figura 7**). Contudo, na análise de *Spearman* encontramos uma tendência de correlação inversa entre a expressão de TGFBRII e MMP7 ($r = -0,600$ e $p = 0,08$).

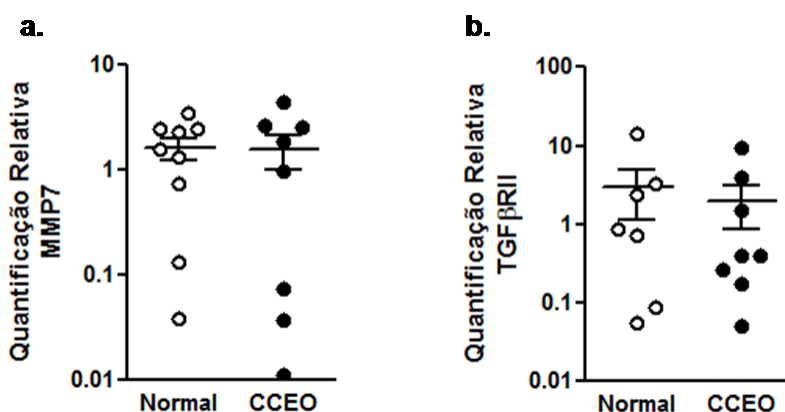


Figura 7: Análise de MMP7 e TGFBRII nas amostras normais e de CCEO. (a) Avaliação de MMP7 e de (b) TGFBRII nas amostras de CCEO comparadas com as amostras normais. As reações foram feitas em triplicata. GAPDH foi utilizado como normalizador da reação. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão de MMP7 e TGFBRII entre o grupo normal e o CCEO.

5.2. Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO

Ao compararmos a expressão da MMP7 e de TGFBRII com os dados clinicopatológicos, dos pacientes observamos associação ($p = 0,046$) entre a presença de metástase nos linfonodos regionais e a expressão de TGFBRII. Entretanto, não houve associação da expressão dos genes alvos com os outros dados clinicopatológicos (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO que foram avaliados molecular e histopatologicamente

Amostra	Localização	Tabaco	Alcool	Gênero	Idade (anos)	Diferenciação histológica	Sobrevida (2 anos)	Linfonodos +	TGFBRII	MMP7	miR-181a	miR-181b	miR-181c	miR-17	miR-214
CCE2	AB	S	S	M	73	MD	n.i	#	0,39	0,07	1,26	#	3,08	0,18	0,59
CCE3	L-CO	N	N	M	69	MD	vv	S	3,82	#	0,60	0,68	0,61	0,85	0,30
CCE4	L-CO	N	S	F	81	BD	vv	S	9,41	0,03	0,09	#	0,68	1,69	22,01
CCE7	AB	N	S	M	81	PD	++	#	0,04	0,01	1,33	0,38	2,11	244,57	4,83
CCE12	L-CO	S	S	M	58	MD	vv	#	#	0,96	0,55	0,56	0,56	0,14	0,32
CCE14	L-CO	N	N	F	86	MD	++	#	0,39	#	0,34	11,06	0,73	0,71	0,15
CCE15	FV	N	N	M	74	MD	n.i	#	0,17	1,86	0,16	#	0,21	0,37	0,11
CCE16	L-CO	S	S	M	62	MD	vv	#	#	4,43	3,3	1,61	1,05	3,00	5,02
CCE17	L-CO	S	S	M	84	MD	n.i.	#	0,26	#	0,68	0,57	2,47	1,22	0,26
CCE20	L-CO	N	S	M	70	MD	n.i	#	#	2,57	2,84	1,64	8,3	1,79	2,00
CCE22	FV	N	N	F	67	MD	n.i	#	1,46	#	1,9	2,02	0,59	3,43	0,14
CCE23	RA	S	S	F	75	MD	vv	#	#	2,65	0,43	0,81	0,57	1,2	0,33

Legenda: CCE, paciente portador de CCEO; Localizações: L-CO, língua-cavidade oral; AB, assoalho de boca; ORO, orofaringe; FV, fundo de vestibulo; GEN, gengiva; RA, rebordo alveolar. Diferenciação: BD, bem-diferenciado; MD, moderadamenediferenciado; PD, pouco diferenciado. Sobrevida: vv =vivo, ++ falecido, n.i. =não in

5.3. Comparação da expressão de miR-181a/b/c com MMP7 e TGFBR2

Em seguida, avaliamos a expressão dos miR-181a/b/c juntamente com a expressão dos genes alvos (**Figura 8 e 9**). Ao comparar a expressão de miR-181a com MMP7 (**Figura 8**), observamos expressão diretamente proporcional em 55,6% (5 amostras de 9) das amostras normais e 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. Contudo, encontramos expressão inversamente proporcional em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. Para miR-181b, houve expressão diretamente proporcional em 55,6% (5 amostras de 9) das amostras normais e 80% (4 amostras de 5) das amostras de CCEO. Por outro lado, notamos expressão inversamente proporcional em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 20% (1 amostra de 5) das amostras de CCEO. Quanto ao miR-181c, encontramos expressão diretamente proporcional em 55,6% (5 amostras de 9) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. No entanto, observamos expressão inversamente proporcional em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras tumorais.

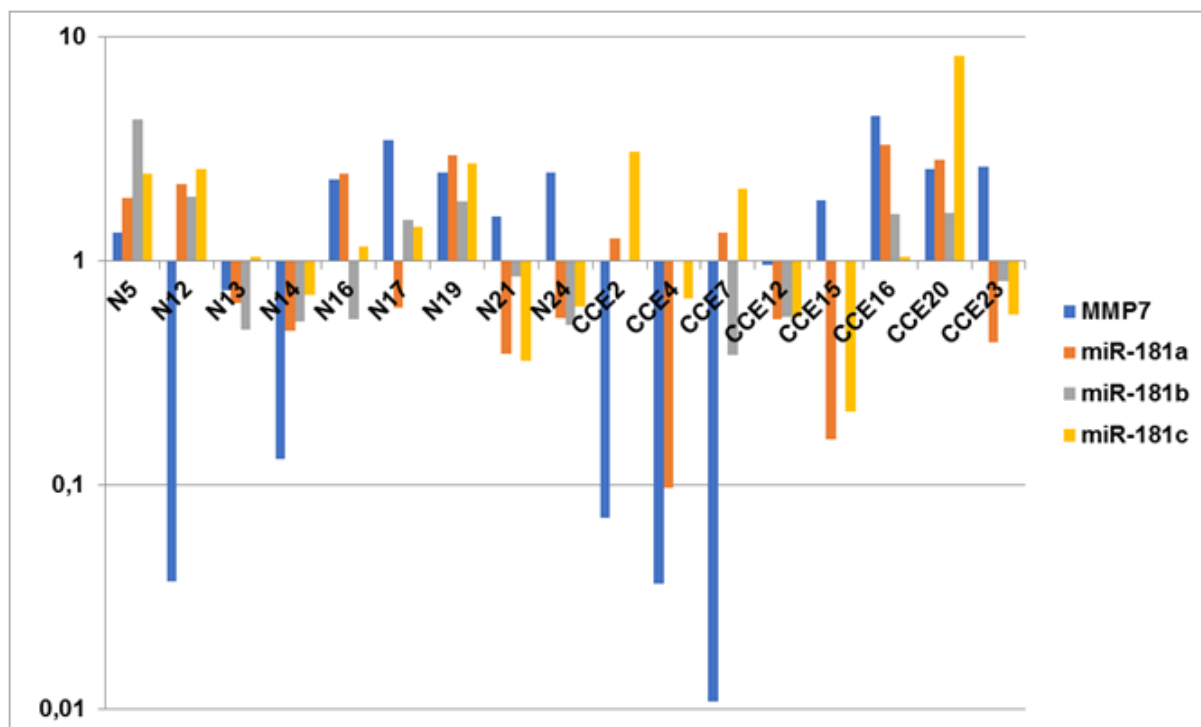


Figura 8: Comparação entre miR-181a/b/c e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável. As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras apresentou expressão diretamente proporcional entre MMP7 e miR-181a/b/c.

Na análise da correlação dos miR-181a com TGFBRII (Figura 9), encontramos expressão diretamente proporcional em 71,4% (5 amostras de 7) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. Por outro lado, observamos expressão inversamente proporcional em 28,6% (2 amostras de 7) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras de carcinoma. Entretanto, na análise de Spearman encontramos correlação positiva moderada entre a expressão de TGFBRII e o miR-181a ($r=0,629$, $p=0,012$).

Para o miR-181b, houve expressão diretamente proporcional em 42,8% (3 amostras de 7) das amostras normais e em 60% (3 amostras de 5) das amostras de CCEO. No entanto, notamos expressão inversamente proporcional em 57,2% (4 amostras de 7) das amostras normais e 40% (2 amostras de 5) das amostras tumorais. Quanto ao miR-181c, encontramos expressão diretamente proporcional em 42,8% (3 amostras de 7) das amostras normais e 25% (2 amostras de 8) em amostras de CCEO. Contudo, observamos expressão inversamente proporcional em 57,2% (4 amostras de 7) das amostras normais e 75% (6 amostras de 8) nas amostras tumorais.

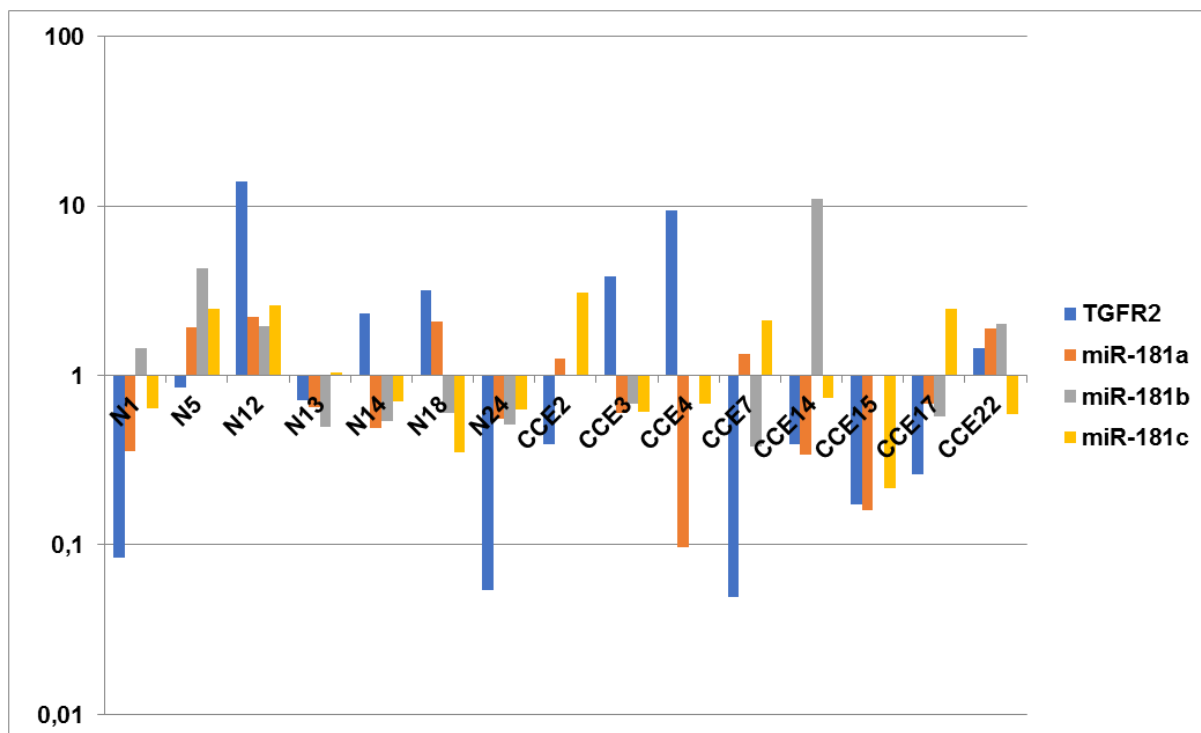


Figura 9: Comparação entre miR-181a/b/c e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável. As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras apresentou expressão diretamente proporcional entre TGFBR2 e miR-181a/b. Contudo, com relação ao miR-181c e TGFBR2, a maioria das amostras apresentou expressão inversamente proporcional.

5.4. Comparação da expressão de miR-17 e miR-214 com MMP7 e TGFBR2

Posteriormente, comparamos a expressão dos miR-17 e miR-214 e os genes alvos (**Figura 10,11**). Ao comparar a expressão do miR-17 com a MMP7 (**Figura 10**), observamos expressão diretamente proporcional em 50% (4 amostras de 8) das amostras normais e em 62,5% (5 amostras de 8) das amostras de CCEO. No entanto, notamos expressão inversamente proporcional em 50% (4 amostras de 8) das amostras normais e em 37,5% (3 amostras de 8) das amostras de carcinoma. Já o miR-214, apresentou-se com expressão diretamente proporcional em 50% (4 amostras de 8) das amostras normais e nas amostras de CCEO. Contudo, observamos expressão inversamente proporcional em 50% (5 amostras de 10) das amostras normais e tumorais.

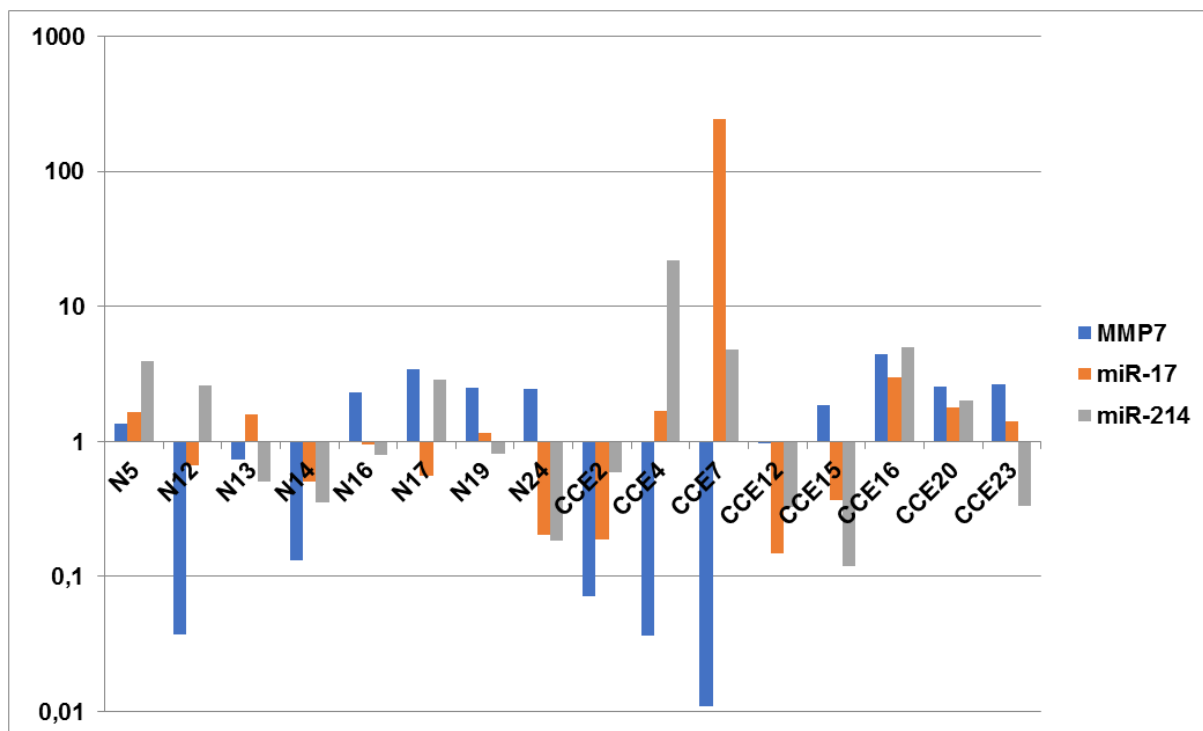


Figura 10: Comparação entre miR-17, miR-214 com MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável. As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras apresentou expressão diretamente proporcional entre TGFBR11 e miR-7 e miR-214.

Na análise da correlação dos miR-17 com TGFBR11 (**Figura 11**), encontramos expressão diretamente proporcional em 42,8% (3 amostras de 7) das amostras normais e em 62,5% (5 amostras de 8) das amostras de CCEO. No entanto, notamos expressão inversamente proporcional em 57,2% (4 amostras de 7) das amostras normais e em 37,5% (3 amostras de 8) das amostras tumorais. Já o miR-214, apresentou expressão diretamente proporcional em 42,8% (3 amostras de 7) das amostras normais e em 62,5% (5 amostras de 8) das amostras de CCEO. Contudo, observamos expressão inversamente proporcional em 57,2% (4 amostras de 7) das amostras normais e em 37,5% (3 amostras de 8) das amostras tumorais.

Na análise de *Spearman* observamos correlação positiva moderada entre a expressão de miR-214 tanto com miR-17($r= 0,536$, $p=0,010$) como com o miR-181c($r=0,499$ e $p= 0,018$).

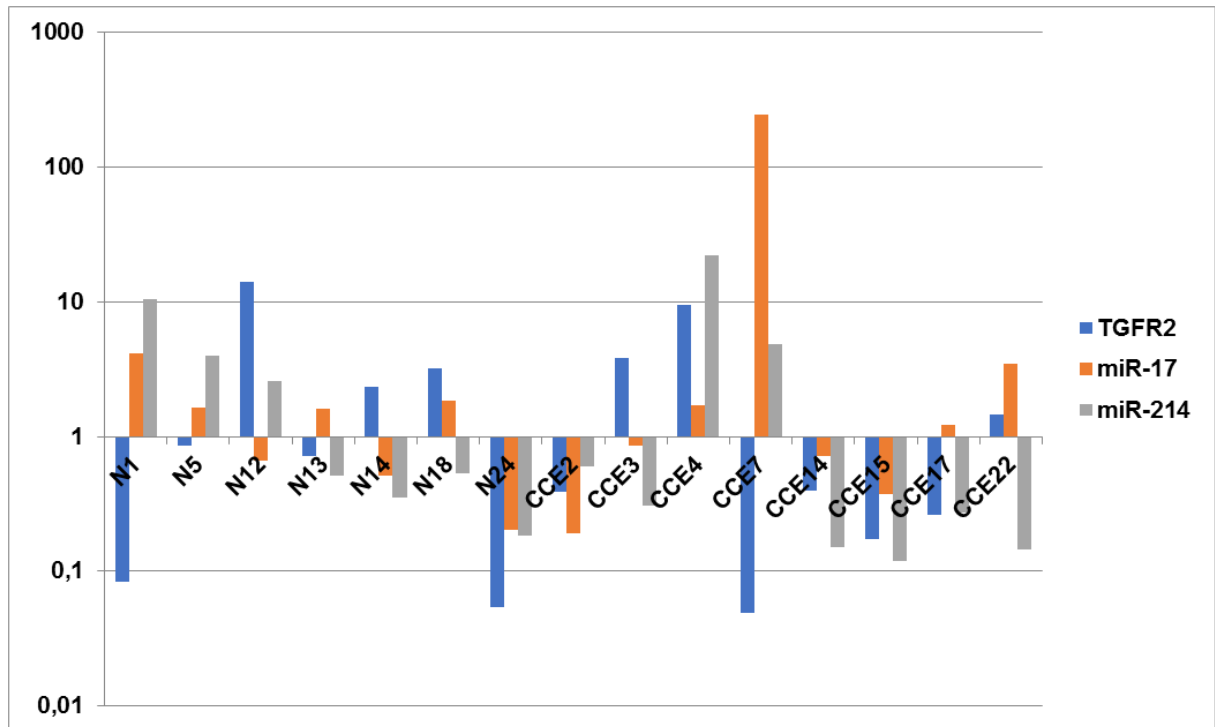


Figura 11: Comparação entre miR-17, miR-214 com TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável. As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras normais apresentou expressão inversamente proporcional entre TGFBR2 e miR-17 e miR-214. Entretanto, a maioria das amostras de CCEO apresentou expressão diretamente proporcional.

6. DISCUSSÃO

O câncer oral corresponde a 16^a maior incidência mundial (IARC, 2018) e é considerado um problema de saúde pública devido a sua grande morbidade e mortalidade, apesar do fácil e rápido acesso a região bucal (MASSANO *et al.*, 2006). A agressividade desse tumor é responsável pelo pior prognóstico mesmo em pacientes que são diagnosticados no início da doença, e pode estar relacionada com a heterogeneidade que o câncer oral apresenta (KANE *et al.*, 2006). Nesse contexto, esse estudo visou elucidar qual seria a importância dos miRNAs e da via TGF- β na TEM que pode estar relacionada com a agressividade e as altas taxas de metástase desse tumor.

No presente estudo, 66,66% (n=8) da população de CCEO foi constituída pelo sexo masculino com uma proporção de aproximadamente 2:1 entre os sexos, este resultado se assemelha aos dados mundiais (IARC, 2018). Esse perfil pode ser explicado pela maior exposição do gênero masculino aos fatores de risco do CCEO. Contudo, essa proporção vem diminuindo ao longo dos anos, pois as mulheres têm mudado seus hábitos, se expondo aos mesmos fatores que os homens, como o consumo de álcool e tabaco (JOHANSON *et al.*, 2000; SALIHU *et al.*, 2014). Em relação à idade, as taxas variam de acordo com a região, neste estudo, 91,66% (n=11) dos pacientes possuíam mais de 60 anos, resultado semelhante à população americana (KHAMMISSA *et al.*, 2014).

No presente estudo, observamos que 41,66% (n=5) dos pacientes declararam-se tabagistas, 66,66% (n=8) etilistas e 41,66% (n=5) faziam uso de tabaco e álcool concomitantemente. O tabaco mata por ano 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2017), e 150.200 no Brasil (DROPE *et al.*, 2018), seu uso está associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo o CCEO (WHO, 2008). O uso em conjunto do tabaco e do álcool é responsável por 90% dos casos de CCECP, e é explicado pelo sinergismo produzido pela combinação dessas substâncias (SHAH ; LYDIATT, 1995).

Quanto ao sítio anatômico, neste estudo, a região de maior acometimento foi a língua (58,33%), seguida do assoalho bucal (16,67%). Esse resultado corrobora com estudos que demonstraram a língua como sítio anatômico de maior incidência do CCEO (SHAH ; LYDIATT, 1995; AKANUMA *et al.*, 1999). Muitos estudos têm descrito a relevância da localização do tumor no prognóstico e na sobrevida do paciente

(MASSANO *et al.*, 2006; SILVERMAN ; GORSKY, 1990). Um estudo de Leite e Koifman, (1998) demonstrou altas taxa de mortalidade em pacientes com CCEO localizados na língua e assoalho bucal, isso pode ser explicado pela facilidade de disseminação dos tumores nessas regiões, o que leva ao desenvolvimento de metástases regionais.

A análise histopatológica revelou que 83,34% (n=10) dos pacientes apresentavam CCEO com grau moderadamente-diferenciado, 8,33% (n=1) bem-diferenciado e 8,33% (n=1) pouco-diferenciado. Esses dados corroboram com um estudo conduzido no *University College London Hospital (UCLH)*, que demonstrou que o grau de diferenciação histopatológica predominante foi o moderadamente-diferenciado, 50% das amostras (JERJES *et al.*, 2010). Um estudo conduzido na Índia encontrou resultados distintos, 83,34% (n=10) das amostras tratava-se de CCEO bem-diferenciado, e somente 3,3% (n=1) de CCEO moderadamente-diferenciado (NADAF *et al.*, 2016).

Muitos fatores moleculares estão associados ao processo de carcinogênese, dentre eles a desregulação da via TGF- β e da expressão das MMPs. A via TGF- β possui importante papel na homeostasia das células epiteliais, mas já foi associada ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores, como o CCECP (LU *et al.*, 2004). Dessa forma, esse estudo se propôs a analisar TGFBRII, receptor de membrana de TGF- β , que já foi apresentado como um importante fator na carcinogênese oral. Em nossas amostras, observamos hipoexpressão de TGFBRII em 62,5% (n=5) dos pacientes portadores de CCEO e hiperexpressão em 25% (n=2). Esse resultado corrobora com os dados da literatura que correlacionaram a diminuição da expressão de TGFBRII com o aumento da angiogênese e inflamação no CCECP (LU *et al.*, 2006). Outro estudo que avaliou 86 amostras de CCEO demonstrou que 70,1% delas apresentaram hipoexpressão de TGFBRII e a sua diminuição estava associada com um pior índice de sobrevida ($p= 0,012$), dessa forma, constituindo-se um fator prognóstico promissor para o CCEO (SIVADAS *et al.*, 2015).

Observamos nos pacientes CCE3 e CCE4, a correlação da hiperexpressão de TGFBRII com a presença de metástase nos linfonodos regionais. Esse resultado não corrobora com um estudo em modelo animal de CCEO, que demonstrou a associação da perda de TGFBRII com o desenvolvimento de metástase nos linfonodos regionais em 35% de sua amostra (LU *et al.*, 2006). Os autores descreveram que a perda

desse receptor permitia o acúmulo de múltiplas alterações moleculares que são descritas no CCEO, assim como hiperexpressão do receptor de crescimento epidermal (do inglês *epidermal growth factor receptor* - EGFR), ativação de STAT3 e de ciclina D1 e a perda do alelo p53 (MASUDA *et al.*, 2002; OPITZ *et al.*, 2002; GRANDIS ; SOK, 2004). Além disso, a perda de TGFBRII aumentou os níveis endógenos de TGF- β 1, secretados pelas células epiteliais ou células estromais, indicando um *feedback* negativo após a perda desse receptor. Dessa forma, a hiperexpressão de TGF- β 1 aumentou seus efeitos no estroma tumoral, como a angiogênese e a inflamação (LI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005).

Uma vez que o TGFBRII está ausente das células epiteliais no CCECP, TGF- β 1 não possui a capacidade de regular essas células, e nesse contexto, não é capaz de ativar a TEM no CCEO. Contudo, outras vias de sinalização também ativam a TEM em diversos tipos de tumores, como a via de EGF/EGFR e a sinalização por STAT3, uma oncoproteína constitutivamente ativada em muitos cânceres humanos e implicada na progressão do tumor (NIU *et al.*, 2002; LO *et al.*, 2007). Dessa forma, as alterações moleculares da perda de TGFBRII, que incluem aumento da expressão de EGFR e STAT3, podem contribuir para a TEM no CCEO (GRANDIS ; SOK, 2004; LU *et al.*, 2006).

Entretanto, a presença de metástase nos linfonodos pode estar associada à localização do tumor nesses pacientes, a língua. Tumores localizados nesse sítio anatômico possuem maior facilidade de disseminação e, portanto, maior potencial de desenvolver metástase regional (MASSANO *et al.*, 2006).

A MMP7 já foi descrita em diversos tipos de tumores e associada ao pior prognóstico. No carcinoma de células escamosas do pescoço, a expressão da MMP7 foi relacionada à profundidade de invasão, estágio avançado do tumor, recidivas e na recorrência no primeiro ano pós-operatório (YAMAMOTO *et al.*, 1999). No CCEO, inúmeros autores têm demonstrado que a MMP7 encontra-se hiperexpressa. Um estudo realizado em 73 pacientes nos estágios I e II do CCEO de língua sugeriu que a expressão elevada da MMP7 está associada à metástase nos estágios iniciais desse tipo de tumor (MÄKINEN *et al.*, 2014). De Vicente e colaboradores também relataram expressão aumentada da MMP7 no CCEO, e sua correlação com a metástase linfonodal. No presente estudo, observamos hiperexpressão em 37,5% (n=3) das amostras de CCEO e hipoexpressão em 37,5% (n=3), e não houve

diferença significativa entre o grupo normal e os pacientes portadores de CCEO. Esse resultado pode estar associado ao pequeno número amostral do estudo.

Em nossas análises, encontramos uma tendência de correlação inversa entre a expressão de TGFBRII e MMP7 ($p= 0,08$). Esse resultado pode ser explicado pela função inversa que os dois desempenham no CCEO, TGFBRII parece apresentar função de supressor tumoral, enquanto a MMP7 parece apresentar função oncogênica. Contudo, no câncer colorretal com Síndrome de Lynch, expressão de TGFBRII teve correlação positiva com a MMP7, e estavam relacionados com a profundidade de invasão de metástase linfonodal (GU *et al.*, 2014). No entanto, existem poucos estudos avaliando a expressão de TGFBRII e MMP7.

Na carcinogênese, além da desregulação da via TGF- β e das MMPs, os miRNAs despontam como importantes reguladores epigenéticos e já foram descritos em diversos tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2007). O desequilíbrio da expressão do miR-181a/b/c já foi associado a progressão e metástase em muitos tumores, dentre eles o CCEO (SHI *et al.* 2008; CHEN *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2011; CERVIGNE *et al.*, 2009). Em um estudo prévio, realizado pelo nosso grupo, observamos que 30% das amostras apresentaram hipoexpressão do miR-181a e 25% apresentaram hiperexpressão (MACHADO *et al.*, 2016). Resultado que se assemelha com os descritos na literatura que sugerem um papel de supressor tumoral desse miRNA no CCEO (SHIN *et al.*, 2011). Para o miR-181b, observamos hiperexpressão de 41,17% das amostras, dado confirmado pelos achados na literatura que descrevem miR-181b com ação oncogênica nesse câncer (CERVIGNE *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2016). E na avaliação do miR-181c, encontramos hipoexpressão de 35% das amostra de CCEO (MACHADO *et al.*, 2016). Todavia, ainda há poucos estudos que revelam o perfil de expressão deste miRNA no CCEO, o mais recente, data de 2008. Nesse artigo, os autores observaram a hiperexpressão do miR-181c em carcinoma de língua (WONG *et al.*, 2008).

Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, avaliamos a expressão do miR-17 e 214 no CCEO (MORELI *et al.*, 2018). Nossos achados revelaram aumento significativo do miR-17 nos pacientes portadores de CCEO ao compararmos com as amostras de mucosa oral saudável. Esse mesmo perfil foi observado no estudo de Wu e colaboradores em linhagem celular de CCEO provocado pelo hábito de mascar

betel. Contudo, outro estudo demonstrou que o miR-17-5p inibe a migração das células tumorais no CCEO, ao diminuir a expressão de ITG β 8, um oncogene responsável por aumentar a habilidade migratória das células de CCEO, conferindo a este miRNA uma ação supressora (CHANG *et al.*, 2013). Poucos estudos correlacionam a expressão do miR-17-5p no CCEO e ainda não há uma concordância na literatura quanto ao seu papel nesse tumor.

Entretanto, encontramos hipoexpressão do miR-214 em 30% das amostras de CCEO em comparação com o grupo normal, e hiperexpressão de 25%. Um estudo que objetivou avaliar quais miRNAs seriam bons marcadores no prognóstico da sobrevida de 5 anos de pacientes com CCEO, observou que o miR-214 estava hipoexpresso no grupo de pior prognóstico (YOON *et al.*, 2014). Entretanto, Li e colaboradores, (2017) demonstraram que o miR-214 encontra-se aumentado no CCEO e sua expressão é inversamente proporcional ao gene RASSF5, um supressor tumoral, conferindo ao miRNA um papel de oncogene nesse tipo de tumor.

Em nossas análises observamos correlação positiva entre o miR-214 tanto com o miR-181c como com o miR-17. Apesar de ainda não haver uma concordância na literatura quanto a atividade do miR-17 e 214 no CCEO, os três miRNAs já foram descritos com ação oncogênica e sua atividade em conjunto pode criar um ambiente favorável para o desenvolvimento do carcinoma. No entanto, até o momento não existem estudos descrevendo a correlação desses miRNAs no CCEO.

Já existem estudos investigando a importância de alguns miRNAs na regulação da via TGF- β e na expressão das MMPs. Foi demonstrado que a inibição da via TGF- β , no desenvolvimento da retina, reduziu significativamente os níveis maduros de miR-181a e b (CARRELA *et al.*, 2015). Um estudo em embriões de camundongos, revelou que a inibição de TGF- β causou uma redução nos níveis do miR-181c, confirmando que ele é um alvo dessa via (REDSHAW *et al.*, 2013). Em 2011, Wang e colaboradores observaram que TGF- β induziu a expressão de miR-181a e b em linhagens celulares de câncer de mama. Entretanto, estudos *in vivo* e dados de bioinformática demonstraram que miR-181a e b podem regular a via TGF- β inibindo TGFBR1, TGFBR2 e SMAD3 (YAO *et al.*, 2018).

Ao avaliarmos a expressão do miR-181a/b/c com os níveis do gene TGFBR2, encontramos correlação positiva entre o miR-181a e TGFBR2. Esse resultado pode estar associado à função de supressor tumoral que eles dois exercem, dessa forma,

podemos inferir que miR-181a não tem como alvo direto TGFBR2, uma vez que isso implicaria na inibição desse receptor pelo miRNA. Não há até o momento, estudos descrevendo essa correlação no CCEO. Contudo, pesquisas recentes, demonstraram a ação inibitória do miR-181a sobre o oncogene K-ras, associado ao desenvolvimento do CCECP nos estágios iniciais da doença (SHIN *et al.*, 2011). Outro estudo revelou que a hiperexpressão de K-ras e a perda de TGFBR2 são eventos comuns na CCECP. Contudo, somente a associação das duas alterações é capaz de desenvolver o carcinoma, a mutação em K-ras no estágio inicial, e a perda de TGFBR2 nos estágios mais avançados da doença (LU *et al.*, 2006). Dessa forma, miR-181a parece desempenhar um importante papel na fase inicial do CCEO ao regular a expressão do gene K-ras.

Quanto a correlação da via TGF- β com o miR-17, um estudo realizado em linhagem celular de câncer cervical, demonstrou que o miR-17 diminuiu os níveis de TGFBR2, e aumentou a proliferação e migração das células tumorais, indicando que esse gene é um alvo direto do miR-17 (CAI *et al.*, 2018). No câncer de pulmão de células não pequenas, o miR-17 diminuiu os níveis de TGFBR2, e mostrou ter um importante papel na regulação da proliferação celular das células tumorais (LI *et al.*, 2017). Já no câncer gástrico, miR-17 ao diminuir os níveis de TGFBR2, promoveu a proliferação e migração das células tumorais (QU *et al.*, 2016). Entretanto, em nossas amostras, não houve correlação entre a expressão do miR-17 e TGFBR2.

Na avaliação da via TGF- β com o miR-214, observamos que não houve correlação na expressão de TGFBR2 com os níveis de miR-214. Contudo, através de ferramentas de bioinformáticas, encontramos que SMAD4 se constituía um possível alvo do miR-214 (<http://www.targetscan.org>). Quanto aos achados na literatura, um estudo da osteoporose pós-menopausa, que avaliou a função do miR-214 nas células-tronco da medula óssea, revelou que TGF- β foi suprimido pela hiperexpressão desse miRNA, indicando haver uma correlação entre os dois (QIU *et al.*, 2018). Uma análise da expressão de TGF- β 1 no desenvolvimento dentário em murinos, demonstrou que a transfecção in vivo com anti-miR-214 diminuiu os níveis de TGF- β 1, reiterando a relação entre essa via e o miR-214 (KHAN *et al.*, 2013).

Muitos miRNAs foram descritos como importantes reguladores das MMPs no nível pós-transcricional, e têm sido alvos de pesquisas quanto a importância dessa correlação na invasão e metástase no câncer (WAN *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2015;

RAK *et al.*, 2017). Quanto a relação da expressão de miR-181a com as MMPs, um estudo em linhagem de câncer de mama, demonstrou que a MMP14 é diretamente inibida pelo miR-181a-5p, resultando na diminuição da migração celular, invasão e angiogênese (LI *et al.*, 2015). Já o miR-181b foi associado a supressão de TIMP3, um inibidor de MMPs, tanto na hepatocarcinogênese quanto na estenose aórtica, favorecendo a progressão do carcinoma hepatocelular e da calcificação da válvula aórtica (WANG *et al.*, 2010; HEATH *et al.*, 2018). Até o momento, não existe na literatura, nenhum estudo descrevendo a ação do miR-181a/b/c sobre a MMP7. Em nossas amostras também não observamos correlação entre esses miRNAs e a MMP7.

Existem poucos estudos correlacionando a regulação do miR-17 nas MMPs, porém um estudo em linhagem celular de carcinoma hepatocelular demonstrou que a superexpressão do miR-17 diminuiu os níveis tanto do RNAm e quanto da proteína MMP3, e reduziu a migração celular e a capacidade de invasão das células tumorais (LIN *et al.*, 2013).

Um estudo de fibrose hepática em humanos, relatou que a hiperexpressão do miR-214 aumentou os níveis das MMP2 e MMP9, demonstrando a correlação existente entre a expressão deste miRNA e as MMPs (LIZUKA *et al.*, 2012). Um estudo computacional de miRNAs no câncer de bexiga, demonstrou que a MMP9 se constituía um alvo do miR-214, e estava associada a TEM nesse tumor (FALZONE *et al.*, 2016). Já no câncer de mama, a superexpressão do miR-214 aumentou os níveis da MMP2 e MMP9, e diminuiu os níveis de TIMP1, um inibidor de MMPs, resultando no aumento da capacidade de invasão das células tumorais (WANG *et al.*, 2015). Contudo, ainda não há artigos descrevendo sobre a regulação de miR-214 na expressão da MMP7.

Apesar de não termos observado uma relação direta entre os miRNAs e os seus prováveis genes alvos, a regulação de TGFBR2 e MMP7 pode estar ocorrendo em nível pós-transcricional. Portanto, uma análise futura dos níveis protéicos de TGFBR2 e MMP7 será realizada para melhor caracterizarmos a correlação entre miRNA e genes-alvos.

Dessa forma, concluímos que a perda da função da via de TGF- β possui importante papel no desenvolvimento do CCEO, e que alterações nos seus componentes desencadeiam desajustes em outras vias de sinalização, que

associadas aumentam a agressividade e o potencial de invasão das células tumorais. Além disso, averiguamos a importância dos miRNAs na regulação do processo de carcinogênese oral.

7. CONCLUSÃO

- Não houve diferença significativa na expressão da MMP7 e TGFBRII das amostras de CCEO quando comparadas com as amostras de mucosa oral normal. Contudo, a maior parte das amostras de CCEO apresentou hipoexpressão de TGFBRII, como o descrito na literatura;
- Encontramos correlação positiva entre a expressão de TGFBRII e do miR-181a, e pode estar associado a função supressora tumoral que os dois apresentam no CCEO;
- Não encontramos correlação entre a expressão de MMP7 com as variáveis demográficas e clinicopatológicas. A expressão de TGFBRII mostrou correlação com a presença de metástase linfonodal nas amostras CCE3 e CCE4. Esse resultado pode estar associado ao sítio anatômico em que o tumor estava localizado. No entanto, posteriores ensaios de migração e mobilidade celular serão realizados para confirmar se a via de TGF- β está ou não associada ao processo de metástase nos linfonodos regionais dos pacientes portadores de CCEO;
- Observamos a existência de correlação positiva moderada entre a expressão do miR-214 com miR-17 e miR-181c, esse resultado pode estar associado a função oncogênica já descrita desses miRNAs, evidenciando a importância da ação conjunta de diferentes miRNAs no processo de carcinogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350, 2004.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., & Ferris, R. L. Head and neck cancer. *The Lancet*, 371(9625), 1695-1709, 2008.
- 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.* Sep;35(5):476-83, 1999.
- Barasch, A., Safford, M., & Eisenberg, E. Oral cancer and oral effects of anticancer therapy. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 65(5-6), 370-377, 1998.
- Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297, 2004.
- Brito, J. A., Gomes, C. C., Guimarães, A. L., Campos, K., & Gomez, R. S. Relationship between micro RNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 43(3), 211-216, 2014.
- Cai, N., Hu, L., Xie, Y., Gao, J. H., Zhai, W., Wang, L., & Qiang, R. MiR-17-5p promotes cervical cancer cell proliferation and metastasis by targeting transforming growth factor-beta receptor 2. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(7), 1899-906, 2018.
- Califano, J., Westra, W. H., Meininger, G., Corio, R., Koch, W. M., & Sidransky, D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clinical Cancer Research*, 6(2), 347-352, 2000.
- Cantini, L., Bertoli, G., Cava, C., Dubois, T., Zinovyev, A., Caselle, M., & Martignetti, L. Identification of microRNA clusters cooperatively acting on epithelial to mesenchymal transition in triple negative breast cancer. *Nucleic acids research*, 47(5), 2205-2215, 2019.
- Cao, L., Xie, B., Yang, X., Liang, H., Jiang, X., Zhang, D., & Shao, Z. MiR-324-5p suppresses hepatocellular carcinoma cell invasion by counteracting ECM degradation through post-transcriptionally downregulating ETS1 and SP1. *PLoS One*, 10(7), e0133074, 2015.
- Carrella, S., Barbato, S., D'Agostino, Y., Salierno, F. G., Manfredi, A., Banfi, S., & Conte, I. TGF- β controls miR-181/ERK regulatory network during retinal axon specification and growth. *PloS one*, 10(12), e0144129, 2015.
- 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.* Dec 15;18(24):4818-29, 2009.
- Chang, C. C., Yang, Y. J., Li, Y. J., Chen, S. T., Lin, B. R., Wu, T. S., & Tan, C. T. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 49(9), 923-931, 2013.
- Chen, S., Tuttle, D. L., Oshier, J. T., Knot, H. J., Streit, W. J., Goodenow, M. M., & Harrison, J. K. Transforming growth factor- β 1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1 α -stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1

- entry in human monocyte-derived macrophages. *Immunology*, 114(4), 565-574, 2005.
- Chen H, Shalom-Feuerstein R, Riley J et al. miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth *in vitro*. *BiochemBiophys Res Commun* 394:921–7, 2010.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *science*, 303(5654), 83-86, 2014.
- Chen, I. C., Chiang, W. F., Huang, H. H., Chen, P. F., Shen, Y. Y., & Chiang, H. C. Role of SIRT1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis. *Molecular cancer*, 13(1), 254, 2014.
- Chen, K., Chen, W., Liu, S. L., Wu, T. S., Yu, K. F., Qi, J., & Hou, P. Epigallocatechingallate attenuates myocardial injury in a mouse model of heart failure through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 17(6), 7652-7660, 2018.
- Cockett, M. I., Murphy, G., Birch, M. L., O'Connell, J. P., Crabbe, T., Millican, A. T., & Docherty, A. J. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. In *Biochemical Society Symposium* (Vol. 63, pp. 295-313), 1998.
- Cowland, J. B., Hother, C., & Grønbaek, K. MicroRNAs and cancer. *Apmis*, 115 (10), 1090-1106, 2007.
- Curran, S., & Murray, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European journal of cancer*, 36(13), 1621-1630, 2000.
- Davis, B. N., & Hata, A.. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, 7(1), 18, 2009.
- De Vicente, J. C., Lequerica-Fernández, P., Santamaria, J., & Fresno, M. F. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. *Journal of oral pathology & medicine*, 36(7), 415-424, 2007.
- Drope J, Schluger N, Cahn Z, Hamill S, Islami F, Liber A, Nargis N, Stoklosa M. The Tobacco Atlas. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies, 2018.
- Falzone, L., Candido, S., Salemi, R., Basile, M. S., Scalisi, A., McCubrey, J. A., & Libra, M. Computational identification of microRNAs associated to both epithelial to mesenchymal transition and NGAL/MMP-9 pathways in bladder cancer. *Oncotarget*, 7(45), 72758, 2016.
- Feng, Xin-Hua; Derynck, Rik. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 21, p. 659-693, 2005.
- Ferrari, G., Cook, B. D., Terushkin, V., Pintucci, G., & Mignatti, P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 449-458, 2009.
- Flynt AS, Li N, Thatcher EJ et al. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet* 39:259–63, 2007.

- Grandis, J. R., & Sok, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & therapeutics*, 102(1), 37-46, 2004.
- Gu, G. L., Zhu, X. Q., Wei, X. M., Ren, L., Li, D. C., & Wang, S. L. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer tissue of patients with Lynch syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(1), 250, 2014.
- Guerra M, Gallo C, Mendonça G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol* 51(3):227-34, 2005.
- Guo, Y., Deng, Y., Li, X., Ning, Y., Lin, X., Guo, S., & Han, M. Glutaminolysis Was Induced by TGF- β 1 through PP2Ac Regulated Raf-MEK-ERK Signaling in Endothelial Cells. *PloS one*, 11(9), e0162658, 2016.
- He, X., Liu, Z., Peng, Y., & Yu, C. MicroRNA-181c inhibits glioblastoma cell invasion, migration and mesenchymal transition by targeting TGF- β pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 469(4), 1041-1048, .2016.
- Heath, J. M., Esmerats, J. F., Khambouneheuang, L., Kumar, S., Simmons, R., & Jo, H. Mechanosensitive microRNA-181b regulates aortic valve endothelial matrix degradation by targeting TIMP3. *Cardiovascular engineering and technology*, 9(2), 141-150, 2018.
- Heldin, C. H., Vanlandewijck, M. & Moustakas, A. Regulation of EMT by TGFbeta in cancer. *FEBS Lett.* 586, 1959–1970, 2012.
- Hesari, A., Azizian, M., Darabi, H., Nesaei, A., Hosseini, S. A., Salarinia, R., ...&Ghasemi, F. .Expression of circulating miR-17, miR-25, and miR-133 in breast cancer patients. *Journal of cellular biochemistry*, 120(5), 7109-7114, 2019.
- Heuberger, J., & Birchmeier, W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), a002915, 2010.
- IARC."Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwid in 2018."2018. Disponível em:<<<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>>> Acesso em: 07/02/2019.
- INCA, Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil, 2018. Disponível em:<<<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>>Acesso em: 18/12/2018
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., ... & Flanders, W. D. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(1), 31-54, 2018.
- Jerjes, W., Upile, T., Hamdoon, Z., Mosse, C. A., Akram, S., & Hopper, C. Prospective evaluation of outcome after transoral CO2 laser resection of T1/T2 oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(2), 180-187, 2011.
- 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*. Aug;50(2):472-80, 2009.

Jin, Y., Higashi, K., Mandahl, N., Heim, S., Wennerberg, J., Biörklund, A., & Mitelman, F. Frequent rearrangement of chromosomal bands 1p22 and 11q13 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2(3), 198-204, 1990.

Joglekar MV, Parekh VS, Hardikar AA New pancreas from old: micro regulators of pancreas regeneration. *Trends Endocrinol Metab* 18:393–400, 2007.

Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V., Grénman, R., Fusenig, N. E., López-Otín, C., & Kahari, V. M. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci*, 113(2), 227-235, 2000.

Johnson, N. W., Jayasekara, P., & Amarasinghe, A. H. K. (2011). Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology*, 57(1), 19-37, 2000.

Jones, L. E., Humphreys, M. J., Campbell, F., Neoptolemos, J. P., & Boyd, M. T. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clinical Cancer Research*, 10(8), 2832-2845, 2004.

Kalluri, R., & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776-1784, 2003.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428, 2009.

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*. Sep;32(7):795-803, 2006.

Kanaoka, M., Yamaguchi, Y., Komitsu, N., Feghali-Bostwick, C. A., Ogawa, M., Arima, K., ... & Aihara, M. Pro-fibrotic phenotype of human skin fibroblasts induced by periostin via modulating TGF- β signaling. *Journal of dermatological science*, 90(2), 199-208, 2018.

Kawamata, H., Kameyama, S., Kawai, K., Tanaka, Y., Nan, L., Barch, D. H., ... & Oyasu, R. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *International journal of cancer*, 63(4), 568-575, 1995.

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, 2014.

Khan, Q. E. S., Sehic, A., Khuu, C., Risnes, S., & Osmundsen, H. Expression of Clu and Tgfb1 during murine tooth development: effects of in-vivo transfection with anti-miR-214. *European journal of oral sciences*, 121(4), 303-312, 2013.

Kilari, S., Yang, B., Sharma, A., McCall, D. L., & Misra, S. Increased transforming growth factor beta (TGF- β) and pSMAD3 signaling in a Murine Model for Contrast Induced Kidney Injury. *Scientific reports*, 8, 2018.

Krisanaprakornkit, S., & Iamaroon, A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN oncology*, 2012.

Leite, I. C. G.; Koifman, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology*, v. 34, n. 5, p. 347-352, 1998.

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*, 120(1), 15-20, 2005.

Li, A. G., Wang, D., Feng, X. H., & Wang, X. J. Latent TGF β 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *The EMBO journal*, 23(8), 1770-1781, 2004.

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*. 119(10):2314-24, 2012.

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*. 7(11):7672-80. eCollection, 2014.

Li, Y., Kuscü, C., Banach, A., Zhang, Q., Pulkoski-Gross, A., Kim, D., ... & Denoya, P. I. miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14. *Cancer research*, 75(13), 2674-2685, 2015.

Li, T. K., Yin, K., Chen, Z., Bao, Y., & Zhang, S. X. MiR-214 regulates oral cancer KB cell apoptosis through targeting RASSF5. *Genetics and molecular research: GMR*, 16(1), 2017.

Li, H., Zhou, H., Luo, J., & Huang, J. MicroRNA-17-5p inhibits proliferation and triggers apoptosis in non-small cell lung cancer by targeting transforming growth factor β receptor 2. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(6), 2715-2722, 2017.

Li, L., Ji, Y., Fan, J., Li, F., Li, Y., Wu, M., & Xu, C. Demethylzeylasteral (T-96) inhibits triple-negative breast cancer invasion by blocking the canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1-11, 2019.

Lin, Y. H., Liao, C. J., Huang, Y. H., Wu, M. H., Chi, H. C., Wu, S. M., ... & Wu, T. I. Thyroid hormone receptor represses miR-17 expression to enhance tumor metastasis in human hepatoma cells. *Oncogene*, 32(38), 4509, 2013.

Lin, S., & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*, 15(6), 321, 2015.

Lin, Y., Liu, J., Huang, Y., Liu, D., Zhang, G., & Kan, H. MicroRNA-489 plays an anti-metastatic role in human hepatocellular carcinoma by targeting matrix metalloproteinase-7. *Translational oncology*, 10(2), 211-220, 2017.

Lizuka, M., Ogawa, T., Enomoto, M., Motoyama, H., Yoshizato, K., Ikeda, K., & Kawada, N. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), 12, 2012.

- Lo, H. W., Hsu, S. C., Xia, W., Cao, X., Shih, J. Y., Wei, Y., ... & Hung, M. C. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*, 67(19), 9066-9076, 2007.
- Lu, S. L., Reh, D., Li, A. G., Woods, J., Corless, C. L., Kulesz-Martin, M., & Wang, X. J. Overexpression of transforming growth factor β 1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer research*, 64(13), 4405-4410, 2004.
- Lu, Shi-Long et al. Loss of transforming growth factor- β type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes & development*, v. 20, n. 10, p. 1331-1342, 2006.
- Lu, Y., Thomson, J. M., Wong, H. Y. F., Hammond, S. M., & Hogan, B. L. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-5p-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Developmental biology*, 310(2), 442-453, 2007.
- Łukaszewicz-Zajac, M., Gryko, M., Pączek, S., Szmitkowski, M., Kędra, B., & Mroczko, B. (Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in pancreatic cancer (PC). *Oncotarget*, 10(3), 395, 2019.
- Machado, A. B. L. Dissertação de mestrado análise do perfil de expressão de MGMT e da família miR-181 no cancer oral, 2016.
- Mäkinen, L. K., Häyry, V., Hagström, J., Sorsa, T., Passador-Santos, F., Keski-Säntti, H., ... & Atula, T. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-25 in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 36(12), 1783-1788, 2014.
- Massagué, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298, 2004.
- Massano, J.; Regateiro, F.S.; Januário, G. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 102, p. 67-76, 2006.
- Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., ... & Weinstein, I. B. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 62(12), 3351-3355, 2002.
- Moreli, A. B. Tese de doutorado Análise da Expressão de microRNAs relacionados com a via Sonic Hedgehog em Carcinoma de Células Escamosas Oral, 2019.
- Moustakas, A., & Heldin, C. H. Mechanisms of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Journal of clinical medicine*, 5(7), 63, 2016.
- My cancer genome, TGF- β Signaling. Disponível em: <<<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/TGF-beta-signaling>>> Acesso em: 05/03/2019.
- 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*. May-Aug;20(2):239-45, 2016.

- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 69(3), 562-573, 2006.
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., & Harel-Bellan, A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature cell biology*, 8(3), 278, 2006.
- Nakaya, Y., Sukowati, E. W., Wu, Y., & Sheng, G. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nature cell biology*, 10(7), 765, 2008.
- Naveed, A., Abdullah, S., & Naveed, M. A.A concise review of MicroRNA exploring the insights of MicroRNA regulations in bacterial, viral and metabolic diseases. *Molecular biotechnology*, 59(11-12), 518-529, 2017.
- Németh, C. G., Röcken, C., Siebert, R., Wiltfang, J., Ammerpohl, O., & Gassling, V. Recurrent chromosomal and epigenetic alterations in oral squamous cell carcinoma and its putative premalignant condition oral lichen planus. *PloS one*, 14(4), e0215055, 2019.
- Neu, J., Dziunycz, P. J., Dzung, A., Lefort, K., Falke, M., Denzler, R., Dotto, G. P. miR-181a decelerates proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting the proto-oncogene KRAS. *PloSone*, 12(9), e0185028, 2017.
- Nguyen, H. L., Kadam, P., Helkin, A., Cao, K., Wu, S., Samara, G. J., & Cao, J. MT1-MMP activation of TGF- β signaling enables intercellular activation of an epithelial-mesenchymal transition program in cancer. *Current cancer drug targets*, 16(7), 618-630, 2016.
- Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., & Heller, R. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21(13), 2000.
- Ohta, S., Suzuki, K., Tachibana, K., Tanaka, H., & Yamada, G. Cessation of gastrulation is mediated by suppression of epithelial-mesenchymal transition at the ventral ectodermal ridge. *Development*, 134(24), 4315-4324, 2007.
- OPAS. Folha informativa – Câncer. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>> Acesso em: 30/05/2019.
- Opitz, O. G., Harada, H., Suliman, Y., Rhoades, B., Sharpless, N. E., Kent, R., & Rustgi, A. K. A mouse model of human oral-esophageal cancer. *The Journal of clinical investigation*, 110(6), 761-769, 2002.
- Pedersen I, David M. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*. Sep;43(3):391-4. Epub, 2008.
- Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Tenaglia, E., Lembo, A., Quaglino, E., & Pinatel, E. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *The EMBO journal*, 30(10), 1990-2007, 2011.
- Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M., & Jordan, R. C. K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical pathology*, 59(5), 445-453, 2006.

- Qiu, J., Huang, G., Na, N., & Chen, L. MicroRNA-214-5p/TGF- β /Smad2 signaling alters adipogenic differentiation of bone marrow stem cells in postmenopausal osteoporosis. *Molecular medicine reports*, 17(5), 6301-6310, 2018.
- Quan, T., Wang, F., Shao, Y., Rittié, L., Xia, W., Orringer, J. S., & Fisher, G. J. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 658-667, 2013.
- Qu, Y., Zhang, H., Duan, J., Liu, R., Deng, T., Bai, M., & Wang, X. MiR-17-5p regulates cell proliferation and migration by targeting transforming growth factor- β receptor 2 in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(22), 33286, 2016.
- Rak, B., Mehlich, D., Garbicz, F., Domosud, Z., Paskal, W., Marczevska, J. M., & WŁODARSKI, P. K. Post-transcriptional regulation of MMP16 and TIMP2 expression via miR-382, miR-410 and miR-200b in endometrial cancer. *Cancer Genomics-Proteomics*, 14(5), 389-401, 2017.
- Rasool, R. U., Nayak, D., Chakraborty, S., Jamwal, V. L., Mahajan, V., Katoch, A., ...& Goswami, A. Differential regulation of NM23-H1 under hypoxic and serum starvation conditions in metastatic cancer cells and its implication in EMT. *European journal of cell biology*, 96(2), 164-171, 2017.
- Redshaw, N., Camps, C., Sharma, V., Motallebipour, M., Guzman-Ayala, M., Oikonomopoulos, S., & Episkopou, V. TGF- β /Smad2/3 signaling directly regulates several miRNAs in mouse ES cells and early embryos. *PloS one*, 8(1), e55186, 2013.
- Ruan J, Lou S, Dai Q, Mao D, Ji J, Sun X. Tumor suppressor miR-181c attenuates proliferation, invasion, and self-renewal abilities in glioblastoma. *Neuroreport* 26:66–73, 2015.
- Salihu S, Krasniqi B, Sejfiija O, Heta N, Salihaj N, Geci A, Sejdini M, ArifiH, Isufi R, Ueeck BA. Analysis of potential oral cleft risk factors in the Kosovo population. *Int Surg. Mar-Apr;99(2):161-5*, 2014.
- Saranath, D., Chang, S. E., Bhoite, L. T., Panchal, R. G., Kerr, I. B., Mehta, A. R., & Deo, M. G. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *British journal of cancer*, 63(4), 573, 1991.
- Sasahira, T., Ueda, N., Yamamoto, K., Kurihara, M., Matsushima, S., Bhawal, U. K., & Kuniyasu, H. Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 9(3), e92534, 2014.
- Sassen, S., Miska, E. A., & Caldas, C. MicroRNA—implications for cancer. *VirchowsArchiv*, 452(1), 1-10, 2008.
- Scott, H., Howarth, J., Lee, Y. B., Wong, L. F., Bantounas, I., Phylactou, L., & Uney, J. B. MiR-3120 is a mirror microRNA that targets heat shock cognate protein 70 and auxilin messenger RNAs and regulates clathrin vesicle uncoating. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14726-14733, 2012.
- Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *BMJ*. 321(7253):97-100, 2000.
- Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin*. 45(6):352-68, 1995.

- 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.* 1236:185-93, 2008.
- 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. *BiochemBiophys Res Commun.* 404(4):896-902. Epub, 2011.
- Shridhar, K., Walia, G. K., Aggarwal, A., Gulati, S., Geetha, A. V., Prabhakaran, D., & Rajaraman, P. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. *Oral oncology*, 53, 1-9, 2016.
- Silverman Jr, S., & Gorsky, M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data—1973 to 1985. *The Journal of the American Dental Association*, 120(5), 495-499, 1990.
- Sivadas, V. P., Saakshi, G., Iype, E. M., Balan, A., & Kannan, S. Prognostic implication of the loss of TGFBRII expression in oral carcinoma. *Neoplasma*, 62(3), 398-404, 2015.
- Suarez-Cuervo, C., Merrell, M. A., Watson, L., Harris, K. W., Rosenthal, E. L., Väänänen, H. K., & Selander, K. S. Breast cancer cells with inhibition of p38 α have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clinical & experimental metastasis*, 21(6), 525, 2004.
- Sun, G. L., Li, Z., Wang, W. Z., Chen, Z., Zhang, L., Li, Q., & He, Z. Y. miR-324-3p promotes gastric cancer development by activating SMAD4-mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Journal of gastroenterology*, 1-15, 2018.
- Takahara, T., Kasamatsu, A., Yamatoji, M., Iyoda, M., Kasama, H., Saito, T., ...&Uzawa, K. SIPA1 promotes invasion and migration in human oral squamous cell carcinoma by ITGB1 and MMP7. *Experimental cell research*, 352(2), 357-363, 2017.
- Taylor, M. A., Sossey-Alaoui, K., Thompson, C. L., Danielpour, D., & Schiemann, W. P. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), 150-163, 2013.
- Tian, F., Byfield, S. D., Parks, W. T., Stuelten, C. H., Nemani, D., Zhang, Y. E., & Roberts, A. B. Smad-binding defective mutant of transforming growth factor β type I receptor enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer research*, 64(13), 4523-4530, 2004.
- Vad-Nielsen, J., Gammelgaard, K. R., Daugaard, T. F., & Nielsen, A. L. Cause-and-Effect Relationship Between FGFR1 Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Lung Cancer*, 2019.
- Zeng, Y., Yao, X., Chen, L., Yan, Z., Liu, J., Zhang, Y., & Liu, X. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- β autocrine loop. *Oncotarget*, 7(39), 63324 2016.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1), 1-12, 2007.
- Zhang, W. L., & Zhang, J. H. miR-181c promotes proliferation via suppressing PTEN expression in inflammatory breast cancer. *International journal of oncology*, 46(5), 2011-2020, 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. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(2), 453-466, 2016.

Zhao, L. D., Zheng, W. W., Wang, G. X., Kang, X. C., Qin, L., Ji, J. J., & Hao, S. Epigenetic silencing of miR-181b contributes to tumorigenicity in colorectal cancer by targeting RASSF1A. *International journal of oncology*, 48(5), 1977-1984, 2016.

Zhao et al, miR-17-5p promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human osteosarcoma cells by targeting SRC kinase signaling inhibitor 1, 2018.

Zhu, Y., Gu, J., Li, Y., Peng, C., Shi, M., Wang, X., & Wu, J. MiR-17-5p enhances pancreatic cancer proliferation by altering cell cycle profiles via disruption of RBL2/E2F4-repressing complexes. *Cancer letters*, 412, 59-68, 2018.

Wan, Y., Fei, X. F., Wang, Z. M., Jiang, D. Y., Chen, H. C., Yang, J., ...& Huang, Q. Expression of miR-125b in the new, highly invasive glioma stem cell and progenitor cell line SU3. *Chinese journal of cancer*, 31(4), 207, 2012.

Wang, B., Hsu, S. H., Majumder, S., Kutay, H., Huang, W., Jacob, S. T., & Ghoshal, K. TGF β -mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 29(12), 1787, 2010.

Wang, Y., Yu, Y., Tsuyada, A., Ren, X., Wu, X., Stubblefield, K., & Wang, S. E. Transforming growth factor- β regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene*, 30(12), 1470, 2011.

Wang, F., Lv, P., Liu, X., Zhu, M., & Qiu, X. microRNA-214 enhances the invasion ability of breast cancer cells by targeting p53. *International journal of molecular medicine*, 35(5), 1395-1402, 2015.

Wang, L., Ma, J., Wang, X., Peng, F., Chen, X., Zheng, B., & Zhao, S. Kaiso (ZBTB33) Downregulation by Mirna-181a Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and the Epithelial–Mesenchymal Transition in Glioma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(3), 947-958, 2018.

Warner, D. R., Bhattacharjee, V., Yin, X., Singh, S., Mukhopadhyay, P., Pisano, M. M., & Greene, R. M. Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 70-76, 2004.

Watanabe, T., Sato, T., Amano, T., Kawamura, Y., Kawamura, N., Kawaguchi, H., & Nakaoka, T. Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(12), 3738-3748, 2008.

WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.

Winter, J., & Diederichs, S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods in Molecular Biology*, 676, 3–22, 2011.

Wong, T. S., Liu, X. B., Wong, B. Y. H., Ng, R. W. M., Yuen, A. P. W., & Wei, W. I. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2588-2592, 2008.

World Health Organization (WHO). Monitoring tobacco use and prevention policies, 2017. Disponível em:

<<https://www.who.int/tobacco/global_report/2017/en/>> Acesso em: 04/05/2019

Yang, Y., Li, X., Du, J., Yin, Y., & Li, Y. Involvement of microRNAs-MMPs-E-cadherin in the migration and invasion of gastric cancer cells infected with *Helicobacter pylori*. *Experimental cell research*, 367(2), 196-204, 2018.

Yamamoto, H., Adachi, Y., Itoh, F., Iku, S., Matsuno, K., Kusano, M., & Imai, K. Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 59(14), 3313-3316, 1999.

Yao, L., Wang, L., Li, F., Gao, X., Wei, X., & Liu, Z. MiR181c inhibits ovarian cancer metastasis and progression by targeting PRKCD expression. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9), 15198, 2015.

Yao, W., Pan, Z., Du, X., Zhang, J., & Li, Q. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6807-6821, 2018.

Yoon, A. J., Wang, S., Shen, J., Robine, N., Philipone, E., Oster, M. W., & Santella, R. M. Prognostic value of miR-375 and miR-214-3p in early stage oral squamous cell carcinoma. *American journal of translational research*, 6(5), 580, 2014.

Yu, B., Liu, X., & Chang, H. MicroRNA-143 inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting MMP7. *Minerva medica*, 108(1), 13-19, 2017.