



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAROLINA RODRIGUES TEÓFILO

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A
EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE
MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE
CANCERIZAÇÃO.**

FORTALEZA

2017

CAROLINA RODRIGUES TEÓFILO

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- T29i Teófilo, Carolina.
INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO. / Carolina Teófilo. – 2017.
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. MicroRNAs. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. Lesões pré-cancerosas. 4. Fator de Transcrição STAT3. 5. Interleucina-6. I. Título.

CDD 617.6

CAROLINA RODRIGUES TEÓFILO

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Eveline Turatti

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família: minha mãe, Verônica, meu pai, Edson, meus irmãos Cristiana, Leonardo e Mauro, que sempre estiveram do meu lado, me incentivaram e me apoiaram fazendo-me acreditar que seria possível.

Ao meu esposo, Ramon, que esteve presente em todos os momentos e vivenciou toda a minha jornada de perto. Obrigada por ter compreendido os períodos de ausência e por me encorajar sempre.

À minha orientadora, Ana Paula, por ter-me conduzido nesse processo de crescimento científico e profissional.

Aos Professores Bitu e Mário, por todas as contribuições e estímulo para que nos tornássemos melhores.

À Camile, Prof^ª. Raquel e Prof^ª. Ândrea, por terem me recebido na UFPA e possibilitado a realização de todas as reações de PCR realizadas neste trabalho.

Ao Prof. Renato, por ter sido fundamental na minha formação desde a graduação e por sua imensa ajuda e presteza.

Ao prof. Fábio Wildson, pessoa altamente competente e simples, por ter-se mostrado disponível em todos os momentos em que precisei.

À amiga Malena, cuja amizade iniciou durante a seleção do mestrado, mesmo parecendo que foi desde sempre. Obrigada por toda a ajuda, pela amizade e por transmitir tanta tranquilidade.

Ao colega de trabalho e amigo Luiz André que foi parceiro em tantos momentos de pesquisa, atendimento clínico e na vida. Agradeço pela ajuda na coleta de amostras, no esclarecimento de dúvidas sobre vias e metodologias.

Às amigas Juliana e Patrícia, que surgiram na minha vida durante o mestrado e espe que nunca mais saiam. Obrigada por todas as conversas divertidas e pelo apoio.

Aos colegas da Estomatologia, em especial ao Paulinho, por sempre estar disponível e pela ajuda em todas as análises estatísticas. Aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante esse período: Camila, Ernando, Artur, Clarissa, Thales, Elisa, Mariana, Laryssa, Thinali, Isabelly, Karine.

Aos colegas da cirurgia, pela ajuda durante a coleta de tecidos normais para controle das reações e por estarem sempre disponíveis.

À coordenação da Unichristus, por ter permitido que me ausentasse em alguns momentos para possibilitar a realização de experimentos.

À coordenação de saúde bucal de Fortaleza, em especial à Janaína e ao José Carlos, por terem compreendido e me ajudado em todos os momentos que necessitei.

À minha primeira aluna de monitoria e orientanda, Cassia, pelo companheirismo, entusiasmo e garra, e por fazer-me acreditar que escolhi o caminho certo.

À Soninha, atendente de nossas clínicas, que não mediu esforços para ajudar sempre! Sua jornada na UFC foi brilhante.

Aos amigos do CEO Floresta, com quem convivi diariamente durante esses cinco anos. Não me esquecerei dos momentos de incentivo e da amizade de cada um. André, Mariana, Renata, Salma, Walter e Adriano, muito obrigada! Sentirei muita falta.

Às amigas Andreia e Renata, obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Agradeço, finalmente, a todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, mesmo muitas vezes estando em situação de fragilidade. Espero que tenham passado por tratamentos exitosos e que todos sigam bem.

“O importante é não deixar de fazer perguntas”

Albert Einstein

RESUMO

As neoplasias malignas de cavidade oral constituem um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo o tumor maligno mais comum em boca o Carcinoma de Células Escamosas (CCE). Frequentemente, antes do surgimento do CCE, ocorrem alterações clínicas e histológicas com maior potencial de transformação maligna, chamadas desordens potencialmente malignas (DPM). Fatores moleculares podem contribuir para o desenvolvimento dessa neoplasia. O *Signal Transducers and Activators of Transcription-3* (STAT3) é um transdutor de sinais frequentemente ativado por citocinas, como IL-6, que pode atuar nesse processo. Já os microRNAs (miRNAs) regulam a expressão gênica pós-transcricional degradando ou silenciando RNAs mensageiros. O presente trabalho objetivou quantificar os níveis de microRNAs miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31 em campo de cancerização de displasias e CCE. Adicionalmente, avaliou-se o padrão de expressão de IL-6 e STAT3 nessas lesões. Para tanto, foram coletadas amostras de 47 CCEs, 21 displasias e 21 de mucosa normal. Nos grupos CCE e DPM, foi coletada amostra adicional de mucosa perilesional, distando 1 cm da lesão. Os miRNAs foram analisados por PCR em tempo real e STAT3 e IL-6 por imunohistoquímica (IQ). Os casos de CCE eram, predominantemente, moderadamente diferenciados (91,5%), com crescimento em lençóis ou ninhos (73%) e não-ceratinizantes (52,6%). As displasias leves apresentaram-se mais frequentemente (52%), sendo que 42,8% mostravam inflamação subepitelial intensa. A idade média dos pacientes dos três grupos foi de 52±21 anos. Houve predomínio do sexo masculino no grupo CCE (67,3%) e do feminino nas displasias (57,1%). Detectou-se hiperexpressão dos miRNAs estudados em CCE e displasias, assim como nas regiões perilesionais. Identificou-se correlação positiva entre todos os miRNAs estudados no grupo CCE, enquanto na área adjacente ao tumor o aumento de miR-31 foi acompanhado de elevação nos níveis de miR-17, assim como o aumento de miR-29c foi seguido por incremento de miR-10a. Houve aumento significativo da expressão de miR-17 e miR-29c em CCE em relação a displasias. Nestas, houve correlação positiva do miR-10a com miR-29c e miR-17, ocorrendo situação semelhante entre miR-31 e miR-17. Em região perilesional de DPM, os microRNAs miR-10a e miR-29c apresentaram correlação positiva. O aumento da expressão de miR-31 foi relacionado a displasias com classificação histológica mais severa. Obteve-se alta expressão de IL-6 em 100% das amostras de CCE e DPM. STAT3 apresentou positividade para 84,6% das amostras de CCE e 88,2% de DPM. Correlação positiva entre miR-29c e miR-10a foi encontrada no CCE, nas displasias e áreas perilesionais, indicando que a hiperexpressão desses microRNAs é um evento precoce no processo de carcinogênese oral.

Palavras-chave: MicroRNAs; Carcinoma de Células Escamosas; Lesões pré-cancerosas; Fator de Transcrição STAT3; Interleucina-6; Regulação Neoplásica da Expressão Gênica.

ABSTRACT

Oral cavity malignant neoplasms are a serious public health problem in Brazil and in the world. The most common histologic subtype in the mouth are squamous cell carcinoma (SCC). Often, before the onset of SCC, there are clinical and histological changes with a greater potential for malignant transformation, called potentially malignant disorders (PMD). Multiple molecular factors may contribute to the development of this neoplasms. Signal Transducers and Activators of Transcription-3 (STAT3) is a cytokine-activated signal transducer, which may be directly active in neoplastic. High levels of IL-6, a possible STAT3 activator, have been associated with poor prognosis in SCC. MicroRNAs (miRNAs) are a group of RNAs that act as gene-regulator in the post-transcriptional phase through the degradation or silencing of messenger RNAs. The present study aimed to quantify microRNAs miR-10a, miR-17, miR-29c and miR-31 in the field effect area of oral dysplasia and SCC. Additionally, it is intended to evaluate the expression of IL-6 and STAT3 in these lesions. For this, samples of 47 SCC, 21 PMD and 21 controls were collected. In the patients with SCC or PMD, in addition to the lesion area, a normal mucosa sample was collected, 1 cm away from the lesion. miRNAs were analyzed by real-time PCR and STAT3 and IL-6 by immunohistochemistry. The SCC sample was, most of them, moderately differentiated (91.5%), with growth in nets (73%) and non-keratinizing (52.6%). Dysplasia presented, more frequently, mild (52%), and 42.8% of them showed intense subepithelial inflammation. The mean age of the patients in the three groups was 52 ± 21 years. Males were predominant in the SCC group (67.3%) and female in DPM (57.1%). The most frequent localization site for both groups was tongue. Hyperexpression of all studied miRNAs were observed in SCC and PMD, as well as in the perilesional regions. Evaluating SCC, all the miRNAs studied were correlated with each other, while in SCC perilesion increase of miR-31 was accompanied by elevation of miR-17 levels, as well as hyperexpression of miR-29c was accompanied by miR-10a increase. There was an increase of miR-17 and miR-29c in SCC compared to PMD. In PMD, the increase of miR-10a was accompanied by an increase of miR-17 and miR-29c; a similar situation occurred between miR-31 and miR-17. In PMD perilesion, miR-10a and miR-29c presented positive correlation. High expression of IL-6 was obtained in 100% of the SCC and PMD samples. STAT3 presented positivity for 84.6% of SCC samples and 88.2% of DPM samples. Positive correlation between miR-29c and miR-10a was found in SCC, in dysplasias and perilesional areas, indicating that hyperexpression of these microRNAs is an early event in the oral carcinogenesis.

Keywords: MicroRNAs; Carcinoma, Squamous Cell; Potentially malignant lesions; STAT3 Transcription Factor; Interleukin-6, Gene Expression Regulation, Neoplastic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do Master Mix para reação de transcriptase reversa.....	57
Tabela 2 – Discriminação dos tempos e temperaturas programados no termociclador	57
Tabela 3 – Perfil das amostras de CCEs e displasias em relação às variáveis clínicas de localização, sexo, idade e exposição a fatores de risco.....	64
Tabela 4 – Variação de microRNAs nos grupos-controle, displasia e carcinoma de células escamosas orais.....	65
Tabela 5 – Quantificação de miRNAs em tecidos lesionais e perilesionais de displasias e carcinomas de células escamosas orais	65
Tabela 6 – Perfil de expressão de miRNAs em CCEs e displasias orais em relação ao "fold change"	66
Tabela 7 – Perfil de expressão de microRNAs em lesões e tecido perilesional de CCE e displasia oral em relação ao "fold change".....	66
Tabela 8 – Expressão de microRNAs em relação ao padrão de crescimento tumoral	67
Tabela 9 – Influência dos dados clínicos no perfil de expressão de microRNAs em displasias epiteliais orais e carcinoma de células escamosas orais	68
Tabela 10 – Perfil microscópico e imunoistoquímico de amostras de CCE e displasia oral.	70
Tabela 11 – Imunomarcção de STAT3 em CCEs e displasias relacionada às variáveis clínicas sexo e idade.....	72
Tabela 12 – Perfil de escore de marcação de STAT3 em relação à gradação histológica	72
Tabela 13 – Perfil dos escores de marcação de STAT3 para CCEs com presença de coilocitose	73
Tabela 14 – Escores de marcação de STAT3 em relação ao padrão de crescimento tumoral	73
Tabela 15 – Correlação entre microRNA 17, 31, 29c e 10a em região perilesional de CCEs e de displasias	74
Tabela 16 – Correlação das características moleculares e imunoistoquímicas das amostras de lesão de CCE e displasia oral.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de progressão de mucosa normal para carcinoma.....	25
Figura 2 - Desenho esquemático de células alteradas geneticamente seguidas de iniciação como preconizado no conceito de campo de cancerização	30
Figura 3 - Biossíntese dos microRNAs.	32
Figura 4 - Resumo dos miRNAs descritos na literatura avaliados no Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço e suas funções no câncer	33
Figura 5 - Alvos do miRNA-21 envolvidos na carcinogênese.....	34
Figura 6 - Funções dos sítios de STAT3	38
Figura 7 - Esquema de ativação de STAT3, genes regulados por ele e funções destes na carcinogênese.	40
Figura 8 - Interação IL-6 - IL-6R e implicações na carcinogênese.....	44
Figura 9 - Contagem de células marcadas e não marcadas com auxílio do software ImageJ	61
Figura 10 - Curva de PCR evidenciando CT da primeira amostra a amplificar.....	61
Figura 11 - Painel de imunomarcção dos anticorpos IL-6 e STAT3 em mucosa normal, displasias e CCEs	70
Figura 12 - Síntese esquemática da correlação entre microRNAs, STAT3 e IL-6 das amostras de displasias e CCEs.	76
Figura 13 - Fluxograma final de resultados.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANP32A – Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A- Fosfoproteína ácida 32 rica em leucina nuclear.

AP-1 – Activated protein-1- Proteína ativadora-1

APC – Adenomatous polyposis coli – Polipose adenomatosa coli (supressor tumoral)

AKT – Proteína quinase B

BCL-X - B-cell lymphoma-large

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CDK- 4 – Quinase dependente de ciclina-4

cDNA – DNA complementar

C-MYC – gene cell myelocytomatosis oncogenes

DAB - 3,3' – Diaminobenzidina

DKK-2 – Dickkopf-2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPM – Desordens potencialmente malignas

EGFR – Receptor de fator de crescimento epidérmico

EIF4E – Eukaryotic translation initiation factor 4E – Fator iniciador de tradução de eucariotos 4E

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de imunoabsorção enzimática

ERK – Extracellular signal-regulated kinases – Quinase regulada pela sinalização extracelular

Faz-L – Ligante de Faz

FIH – Fator indutor de hipóxia

IFN- α – Interferon alfa

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina-6

IL-6R – Receptor de interleucina-6

IQ- Imunoistoquímica

ITGB1 – Integrina Beta 1

HIF-1 – Fator induzido por hipóxia 1

HPV – Vírus do papiloma humano

JAK – Janus-quinase

K-RAS - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LINE-1 – Long interspersed nuclear elements – Longos elementos intercalados-1

LPS – Lipopolissacarídeos

MAPK – Mitogen-activated *protein* kinase – Proteína quinase ativada por mitógeno

MEK - Mitogen-activated protein kinase

MGMT – Proteína codificada pelo gene O⁶-metilguanidina DNA metiltransferase

MMP - Metaloproteinase

MMP-9 – Metaloproteinase-9

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNA

mTOR – *Mechanistic target of rapamycin* – Alvo mecânico da rapamicina

NFI – fator nuclear I

NF-KappaB – Fator nuclear kappa B

OMS – Organização Mundial de Saúde

p16 – Proteína reguladora do ciclo celular 16

PBS – Phosphate buffer saline – Tampão fosfato-salino

PCR - Polymerase Chain Reaction

PDCD4 – Programmed cell death protein 4 – Proteína da morte celular programada 4

PDGFR – Platelet-derived growth factor receptor- Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PIAS – Protein inhibitor of activated STAT – Proteína inibidora de STAT ativado

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PMD – Potentially Malignant Disorders

PTEN – Phosphatase and tensin homolog – Fosfatase homóloga à tensina

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa

RAF – Proteína Rapid Accelerated Fibrosarcoma

RAS – Proteína Rat Sarcoma

RECK – Reversion-inducing cysteine rich protein with kazal motif - Proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínios Kazal

RNA – ácido ribonucleico

SCC – Squamous Cell Carcinoma

SOC3 – Suppressor of cytokine signaling 3 - Inibidor de sinal de citocinas-3

STAT3 – Signal Transducers and Activators of Transcription-3 – Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição -3

TGF- β – Transforming grow factor beta – Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNM – classificação de neoplasias malignas – Tamanho (T), envolvimento de linfonodos (N) e metástase à distância (M).

TIMP3 – Inibidor tecidual de metaloproteinase-3

TP53 – Gene codificador da proteína p53

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Câncer de boca.....	21
2.2	Desordens potencialmente malignas.....	24
2.3	Alterações Moleculares do Câncer de Boca e Campo de Cancerização.....	27
2.4	MicroRNAs.....	31
2.5	STAT3	37
2.6	Interleucina-6.....	43
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	Objetivo geral:	50
3.2	Objetivos específicos:	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	Aspectos éticos	51
4.2	Cálculo Amostral	51
4.3	Critérios de inclusão	52
4.4	Critérios de exclusão.....	52
4.5	Critérios de retirada	52
4.6	Coleta das amostras	53
4.7	Análise Histopatológica.....	54
4.7.1	Técnica.....	54
4.7.2	Avaliação	54
4.8	Análise molecular	55
4.8.1	Técnica.....	55
4.8.1.1	Extração de RNA	55
4.8.1.2	PCR em tempo real qualitativa (qRT-PCR).....	56
4.8.1.3	Imunoistoquímica.....	58
4.8.2	Avaliação molecular	59
4.9	Análise estatística	62
5	RESULTADOS.....	63
5.1	Caracterização clínico-patológica.....	63
5.2	Avaliação dos miRNAs	64
5.2.1	– Avaliação de miRNAs pela variação de ΔC_t	64
5.2.2	- Avaliação de microRNAs pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$	65

5.3 Imunoistoquímica	69
5.4 – Correlação entre microRNAs, STAT3 e IL-6.....	73
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 2	103
APÊNDICE C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO	104
TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

As neoplasias malignas de cavidade oral constituem um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, foram previstos, para os anos de 2016 e 2017, 15.364 novos casos de câncer de boca no Brasil, sendo 3.070 originados no Nordeste e 540 no Estado do Ceará (INCA, 2015). Cerca de 2,1% das neoplasias malignas que ocorrem em todo o mundo correspondem ao câncer oral, apresentando predileção pelo sexo masculino. Mesmo com os avanços no tratamento e a difusão de informações sobre fatores de risco, a taxa de mortalidade ainda é alta, principalmente em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2015).

O tipo histológico de tumor maligno mais comum em boca, presente em cerca de 90 a 95%, é o Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; WOLFF; FOLLMANN; NAST, 2012). Esse tumor representa uma neoplasia epitelial invasiva e agressiva, com graus variáveis de diferenciação escamosa e exibem propensão para desenvolvimento de metástase nodal precoce (JAMADAR *et al.*, 2014).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CCE intraoral são, principalmente, fumo e sua associação com o consumo de bebidas alcoólicas (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; PETTI, 2009). Atualmente, têm-se sugerido, também, a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) como agente etiológico para essa neoplasia (MARTÍN-HERNÁN *et al.*, 2013). Os fatores de risco não atuam em uma localização específica da mucosa, estando toda a cavidade oral passível de apresentar alterações promovidas por esses agentes carcinogênicos, mesmo que não apresentem lesões clinicamente visíveis. Esse é um dos fatores que podem justificar a alta recorrência de CCEs orais e surgimento de segundos tumores primários em áreas próximas à neoplasia maligna inicial. O fato de tecidos expostos a agentes carcinogênicos, apesar de não apresentarem alterações clinicamente detectáveis, estarem passíveis de apresentar alterações moleculares que promovam maior risco de malignização deu origem à teoria de campo de cancerização (INCZE *et al.*, 1982; THOMSON, 2002). Essa teoria foi confirmada por vários estudos clínicos, histopatológicos e moleculares em que foram realizadas análises de tecidos adjacentes ao tumor comparadas a tecidos de pacientes livres de lesão, mostrando que o tecido peritumoral apresenta alterações bioquímicas e subcelulares semelhantes à área lesional (BABJI *et al.*, 2015; BOSCOLO-RIZZO *et al.*, 2015; OGDEN, *et al.*, 1993).

Frequentemente, ocorre o surgimento de lesões e alterações teciduais que precedem o surgimento de neoplasias malignas, sendo denominadas desordens potencialmente malignas. Estas podem permanecer estáveis por um considerável período de tempo antes de evoluir, ou não, para malignidade e invasão. De acordo com estudo indiano, cerca de 80% das neoplasias de cavidade oral são precedidas por desordens potencialmente malignas (DPM) (GUPTA *et al.*, 1989). O percentual de DPM que sofre transformação maligna pode variar de 0,13 a 50% (HEGARTY; HUNTER, 2016; HOLMSTRUP *et al.*, 2006; REIBEL, 2003; SHAH, A. Y.; DOHERTY; ROSEN, 2010; SHIU *et al.*, 2000). É de grande importância identificar a ocorrência de mudanças no padrão molecular dessas lesões que indiquem a progressão para malignidade, possibilitando a intervenção antes que a transformação maligna ocorra.

As principais desordens potencialmente malignas que acometem a região oral são leucoplasia com displasia epitelial, eritroplasia e queilite actínica. Leucoplasia é definida como placa esbranquiçada que não pode ser caracterizada como qualquer outra lesão e apresenta-se, histologicamente, como área hiperkeratótica, com hiperplasia, podendo ou não haver displasia (RHEE; KHURI; SHIN, 2004). A eritroplasia apresenta-se como uma placa eritematosa que não pode ser caracterizada como qualquer outra lesão e tem como características histológicas presença de atrofia epitelial e displasia. A queilite actínica é uma alteração causada em lábios pela ação da radiação solar que apresenta frequente transformação maligna e caracteriza-se, histologicamente, por hiperqueratose, acantose, atrofia epitelial, infiltrado inflamatório crônico, elastose solar e displasia (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007).

Por ser o CCE uma neoplasia de grande prevalência e por apresentar baixos índices de sobrevida quando diagnosticado em estágios tardios, é de fundamental importância que se conheçam as alterações moleculares envolvidas na progressão das DPMs para CCEs bem como nos diversos graus de diferenciação deste, relacionados à agressividade do tumor, pois estas podem ser utilizadas como alvos terapêuticos ou sinalizadores de progressão (WU, *et al.*, 2016).

O *Signal Transducers and Activators of Transcription-3* (STAT3) pertence à família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição, podendo ser ativada por citocinas como IL-6, ou fatores de crescimento. Inicialmente, o STAT3 é recrutado para a membrana plasmática devido à ligação de citocinas ou fatores de crescimento aos seus receptores na superfície da célula. Na sequência, o STAT3 torna-se ativado por meio da fosforilação por um resíduo de tirosina e inicia-se o processo de dimerização, promovendo a ligação de duas moléculas de STAT3. Posteriormente, a molécula fosforilada e dimerizada adentra o núcleo da

célula, onde se liga a regiões específicas do DNA, localizadas no cromossomo 17, estimulando a cascata de transcrição de proteínas como BCL-x, Ciclina-D1 e survivina. Portanto, essa proteína pode funcionar como oncogene, pois apresenta capacidade de promover transformação maligna de células epiteliais, pois sua expressão aumentada contribui para a sobrevivência e proliferação de células malignas, angiogênese e evasão do sistema imune (GEIGER; GRANDIS; BAUMAN, 2016; SIVEEN *et al.*, 2014). O exato mecanismo que promove sua hiperativação em neoplasias malignas ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que as moléculas sinalizadoras para ativação de STAT3 estariam aumentadas ou que STAT3 estaria constitutivamente aumentado em neoplasias malignas (KIJIMA *et al.*, 2002). Estudos mostram que há uma provável associação entre a expressão aumentada de IL-6, ativando a via STAT3, que contribui para a progressão tumoral e a diminuição da efetividade da quimioterapia em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (JOHNSTON *et al.*, 2015). Por outro lado, a inibição do receptor de IL-6 através da utilização do anticorpo tocilizumab foi associada à diminuição da expressão de STAT3 fosforilado (SHINRIKI *et al.*, 2009).

A interleucina-6 (IL-6), glicoproteína composta por 184 aminoácidos, é uma citocina pleiotrópica que atua em diversos processos fisiológicos, como inflamação e resposta imune. Macrófagos e linfócitos secretam essa citocina, que apresenta funções como indução da proliferação celular, apoptose e angiogênese, atuando principalmente na inflamação crônica. Estudos mostram que a IL-6 pode também ser sintetizada e secretada por células tumorais (LEE, *et al.*, 2006; WANG, *et al.*, 2010). Quando desregulada, IL-6 pode exercer função importante no desenvolvimento de neoplasias malignas (CULIG, 2013), como carcinomas de próstata (HUANG *et al.*, 2016), mama (SA-NGUANRAKSA *et al.*, 2016), endométrio e ovário (SO *et al.*, 2015), além de carcinomas de cabeça e pescoço (WU, D. *et al.*, 2016). Altos níveis séricos e teciduais de IL-6 têm sido associados a mau prognóstico em carcinomas de cabeça e pescoço, sendo relacionados à baixa sobrevida, recidiva tumoral e surgimento de segundos tumores primários (CULIG, 2013). Os níveis salivares de IL-6 podem estar aumentados mesmo em estágios iniciais da carcinogênese, sendo um possível fator prognóstico em distúrbios potencialmente malignos orais (RHODUS *et al.*, 2005).

A transformação maligna está associada às mutações genéticas que promovem alterações no ciclo celular. A carcinogênese ocorre em múltiplos passos, havendo acúmulo de mutações consecutivas em proto-oncogenes e supressores tumorais ou em agentes que regulam sua atuação, propiciando a proliferação desenfreada das células alteradas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Os proto-oncogenes são responsáveis pela regulação positiva da

proliferação celular, enquanto os genes supressores tumorais inibem a multiplicação das células. Durante o desenvolvimento das neoplasias, ocorre a ativação de proto-oncogenes, passando a se chamar de oncogenes, concomitante à inativação de genes supressores tumorais (EVAN; VOUSDEN, 2001)

Os microRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenos RNAs, compostos por 18 a 24 nucleotídeos, que atuam regulando a expressão de genes na fase pós-transcricional através da degradação ou silenciamento de RNAs mensageiros (mRNAs). Os miRNAs atuam na regulação de vários processos biológicos, como proliferação celular, apoptose, resposta imune e carcinogênese. Um único miRNA é capaz de controlar múltiplos mRNAs, tendo mais de cem genes-alvo (IBORRA *et al.*, 2012; KASINSKI; SLACK, 2011; WU, *et al.*, 2011). É sugerido que mais de um terço dos genes codificadores de proteína estejam sob controle de miRNAs e que estes funcionam como importantes reguladores de processos fisiológicos e patológicos (CARTHEW, 2006).

Alguns miRNAs assumem função de supressores tumorais enquanto outros apresentam características oncogênicas, podendo promover aumento ou diminuição de funções importantes como proliferação, apoptose, sobrevivência, diferenciação, motilidade e metástases (LIU, X. *et al.*, 2009). Assim, têm sido alvo de vários estudos que objetivam desvendar o papel dos genes no desenvolvimento de doenças ou sua possível atuação como marcadores biológicos de neoplasias (IORIO *et al.*, 2005; KOZAKI *et al.*, 2008).

Vários trabalhos têm objetivado identificar conjuntos de miRNAs que funcionem como biomarcadores de carcinomas de cabeça e pescoço. Entretanto, uma assinatura de miRNAs conclusiva para o CCE ou desordens potencialmente malignas ainda não foi estabelecida (NAGADIA *et al.*, 2013).

Vários miRNAs vêm sendo relacionados ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, estando alguns hiperexpressos e outros hipoexpressos

O miR-31 já foi relatado como o mais hiperexpresso em comparação ao tecido normal (LAJER *et al.*, 2011), tendo sido relacionado à inibição da enzima inibidora do fator indutor de hipóxia (FIH) e à progressão do CCE de cabeça e pescoço (LIU, *et al.*, 2010).

O miR-29c mostrou-se diferentemente expresso quando comparados tecido neoplásico com metástase linfonodal em CCEs. Tem sido sugerido que possui influência sobre

o comportamento metastático, participando no processo de ativação de ITGB1, PI3K e NF-KAPPAB (SERRANO, *et al.*, 2012).

Outro microRNA desregulado em neoplasias é o miR-17. Sua ação está relacionada ao crescimento celular e invasão, promovendo desregulação do ciclo celular (WONG, P. *et al.*, 2010; YANG, *et al.*, 2013). Em carcinomas de língua e cabeça e pescoço foi observada uma hiperexpressão de miR-17 (HUI *et al.*, 2010; YU, X.; LI, 2016).

Existem poucos estudos avaliando o miR-10a em carcinomas de células escamosas de cavidade oral. Apenas um trabalho encontrou variação estatisticamente significativa em CCE de cabeça e pescoço, estando esse com expressão diminuída (HUI *et al.*, 2010). Comportamento semelhante é encontrado em tumores gástricos, o que sugere sua atuação como supressor tumoral (JIA, H. *et al.*, 2014).

Alguns estudos recentes procuram desvendar o perfil de miRNAs em áreas de campo de cancerização de lesões malignas localizadas em pulmão (SHIKKEVA *et al.*, 2016; TSAY *et al.*, 2015). No entanto, não foram encontrados estudos na literatura que avaliem tal comportamento em carcinoma de células escamosas orais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de boca

A definição de câncer de cavidade oral e orofaringe, ainda, é confusa porque as margens da boca são imprecisas (TAPIA; GOLDBERG, 2011), no entanto é considerado para o câncer bucal, as lesões compreendidas na área anatomicamente abrangida pela mucosa labial, anteriormente; mucosas jugais, lateralmente; dois terços anteriores da língua, inferiormente; e palato duro, superiormente, além de região retromolar na porção posterior. Todas as estruturas contidas nesse espaço, dentes, gengiva e rebordos alveolares fazem parte dessa região (DE CAMARGO CANCELA *et al.*, 2010).

As neoplasias malignas de cavidade oral constituem um sério problema de saúde pública no mundo (WARNAKULASURIYA, SAMAN, 2009). Em algumas regiões, como o sul da Ásia, a incidência dessa neoplasia é ainda maior, chegando a 25/100.000 por ano em Nova Guiné (FERLAY *et al.*, 2015). Os estudos epidemiológicos mostram aumento de incidência de câncer de boca em alguns países, como a Índia, e diminuição em outros, como a Croácia (CHI; DAY; NEVILLE, 2015). No Brasil, os números aumentam anualmente (INCA, 2015).

Mesmo com os avanços no tratamento e difusão de informações sobre fatores de risco, a taxa de mortalidade ainda é alta, principalmente em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2015).

O grupo em que a incidência de CCE é mais alta são homens, de classes econômicas baixas, acima de 50 anos. Todavia, a incidência de casos de câncer de boca em indivíduos jovens, abaixo dos 45 anos de idade, vem aumentando, principalmente no sexo feminino (MONTERO; PATEL, 2015; PATEL *et al.*, 2011).

Como o subtipo histológico predominante do câncer de boca é o CCE, a maioria dos trabalhos utiliza-o como alvo de estudo (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; WOLFF; FOLLMANN; NAST, 2012). Esse tumor representa uma neoplasia epitelial invasiva e agressiva, com graus variáveis de diferenciação escamosa e exibem propensão para desenvolvimento de metástase linfonodal (JAMADAR *et al.*, 2014). Os outros 5% de neoplasias malignas encontradas em cavidade oral correspondem a outros tumores de origem

epitelial, adenocarcinomas, sarcomas, linfomas ou melanomas. Caso houvesse a intenção de incluir todos os subtipos histológicos de tumores que acometem essa região em um estudo, o grupo seria muito heterogêneo, o que dificultaria as análises (CHOI; MYERS, 2008).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CCE intraoral são, principalmente, fumo e sua associação com o consumo de bebidas alcoólicas (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; OGDEN, GRAHAM R., 2005; PETTI, 2009; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011). O tabaco, em todas as suas formas, está associado a cerca de 75% dos cânceres de boca, sendo que indivíduos fumantes apresentam seis vezes mais chances de desenvolver câncer de boca do que não fumantes. Já o uso de tabaco associado ao álcool aumenta o risco de desenvolver CCEs em quinze vezes (OGDEN, GRAHAM R., 2005). No tabaco, são encontradas diversas moléculas carcinogênicas, como hidrocarbonetos policíclicos e nitrosaminas. Os efeitos do fumo são cumulativos e dose-dependentes. Uma vez que seu uso é cessado, o risco para desenvolvimento de CCE é diminuído, mas continua existindo (MONTERO; PATEL, 2015). Com relação ao álcool, não existe consenso em relação à possibilidade de iniciar o desenvolvimento de neoplasias malignas orais sem associação com o fumo, porém a maioria dos trabalhos mostra que ele funciona apenas como agente promotor (CONNOR, 2016; RAM *et al.*, 2011). O consumo de álcool pode aumentar a permeabilidade da mucosa, facilitando a entrada de outros carcinógenos. Há evidências de que o consumo de 170 gramas diárias de whisky aumenta o risco de desenvolvimento de CCEs orais em dez vezes em relação a etilistas leves (RAM *et al.*, 2011).

Atualmente, tem-se sugerido, também, a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) como agente etiológico para essa neoplasia oral. Especialmente os subtipos de HPV de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias uterinas, 16 e 18, têm sido recentemente associados aos casos de câncer de boca que se desenvolvem em indivíduos jovens e não fumantes ou etilistas (MARTÍN-HERNÁN *et al.*, 2013). A associação entre HPV e câncer de orofaringe já está estabelecida (BOUVARD *et al.*, 2009). Entretanto, quando se avaliam neoplasias de cavidade oral, observa-se que, embora haja um grande número de lesões HPV-positivas, apenas uma diminuta parcela apresenta o vírus participando ativamente do processo de carcinogênese. Apesar de os casos serem reduzidos, há uma provável diferença no comportamento biológico nos CCEs cuja oncogênese foi mediada pelo HPV, apresentando melhor resposta à quimioterapia e maiores taxas de cura. Não se sabe ao certo o motivo que leva os HPVs de alto risco a desenvolverem neoplasias malignas em região de orofaringe e terem um comportamento diferente em cavidade oral, mas uma hipótese é de que a orofaringe,

principalmente as tonsilas, apresentaria uma área de maior fragilidade do epitélio, com áreas não ceratinizadas e que também apresentam descontinuidade da membrana basal, facilitando a entrada do vírus. Outra teoria é de que existem receptores ainda não identificados, localizados na superfície das células na região de orofaringe, que se ligariam especificamente ao HPV (MIRGHANI *et al.*, 2015).

Clinicamente, o CCE apresenta-se como uma úlcera ou tumoração, indolor, inicialmente, de bordos elevados, endurecido ao toque. A aparência clínica de distúrbios potencialmente malignos, como leucoplasia ou eritroplasia, também pode esconder áreas de invasão epitelial em tecido conjuntivo já presentes na avaliação histopatológica (MARKOPOULOS, 2012). Embora não traga sintomatologia dolorosa inicial, o CCE pode progredir trazendo sensação de queimação e dor em estágios avançados. A evolução é rápida, com tendência à metástase linfonodal (MARKOPOULOS, 2012).

O local de predileção para o desenvolvimento de CCE, no Ocidente, é a língua, principalmente borda e ventre lingual, seguido de assoalho (DOOBAREE *et al.*, 2009; VAN DIJK *et al.*, 2016). Em outras localizações como gengiva, mucosa jugal e palato é menos comum (CHI; DAY; NEVILLE, 2015).

O tratamento para o CCE exige atuação interdisciplinar, devendo ser composto por equipe de cirurgião, radiologista, oncologista, patologista e cirurgião-dentista. A modalidade terapêutica selecionada está diretamente relacionada com o estágio da doença. O uso da classificação TNM, que leva em consideração o tamanho da lesão, a presença de metástases linfonodais e metástases à distância, tem sido universalmente aceito como método para predição de tratamento e prognóstico. Em estágios iniciais, a cirurgia com margem de segurança de 1 a 2 cm é o tratamento de escolha. Adicionalmente, quando há metástase linfonodal ou risco aumentado desta, é indicado o esvaziamento cervical. Quando a doença se apresenta em estágios intermediários, além da cirurgia, a radioterapia associada ou não à quimioterapia adjuvante é indicada. Em caso de doença fora de possibilidade cirúrgica, a radioterapia ou quimiorradioterapia é indicada (MONTERO; PATEL, 2015). Embora quando diagnosticado em estágio inicial tenha prognóstico favorável e baixa morbidade, grande parte dos casos é diagnosticada tardiamente. Os possíveis fatores associados à falha diagnóstica precoce podem ser relacionados ao desconhecimento dos pacientes sobre essa lesão, dificuldade de acesso aos serviços ou mesmo negação da doença (GÓMEZ *et al.*, 2010). A sobrevida é diretamente relacionada com o estágio tumoral, sendo que indivíduos em estágio I apresentam sobrevida de

cinco anos de 80% enquanto naqueles que se apresentam em estágio IV é de 20% (LINGEN *et al.*, 2011). Apesar dos avanços em relação às terapêuticas utilizadas para o câncer, não houve grande mudança nos últimos anos com relação à sobrevida de pacientes com câncer de boca em países mais pobres (MEHROTRA; YADAV, 2006). Entretanto, em países desenvolvidos, o diagnóstico precoce e o uso de novos tratamentos para o câncer avançado têm mostrado melhora expressiva na sobrevida (SCHWAM; JUDSON, 2016).

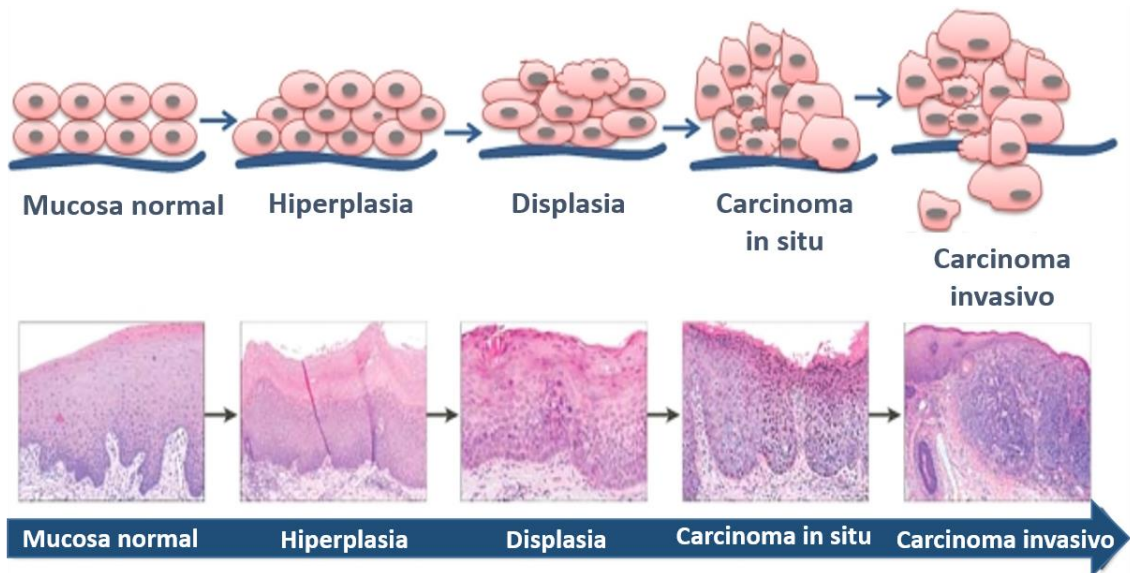
O CCE oral pode ser precedido por alterações clínicas e histopatológicas que mostram risco de progressão maligna, sendo essas alterações chamadas de desordens potencialmente malignas (NAPIER; SPEIGHT, 2007).

2.2 Desordens potencialmente malignas

Desordens potencialmente malignas (DPMs) são alterações clínicas e histológicas que apresentam maior risco de evolução para uma neoplasia maligna (HEGARTY; HUNTER, 2016). No Brasil, as DPMs mais comumente encontradas em cavidade oral, são leucoplasia e eritroplasia (WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007).

Leucoplasias e eritroplasias se apresentam como diagnósticos clínicos de exclusão, sendo lesões clinicamente assintomáticas, que variam desde pequenas lesões até múltiplas e difusas por toda a cavidade oral. Histologicamente, a leucoplasia apresenta graus variados de hiperplasia epitelial, podendo exibir áreas displásicas, que correspondem a desordens de maturação e proliferação celular, promovendo o aumento do número de mitoses típicas e atípicas, hiper cromatismo nuclear, pleomorfismo celular, aumento da proporção núcleo-citoplasma. As eritroplasias comumente apresentam graus mais avançados de displasia, além de atrofia epitelial. Quando as áreas displásicas são restritas às camadas basal e parabasal, a displasia é classificada em leve; quando se estende até a camada média, é chamada de displasia moderada; em situações de acometimento de todo o epitélio, é dita displasia severa. Quanto maior o grau de displasia, maior será o risco de transformação maligna. A história natural do CCE mostra uma evolução microscópica gradual de epitélio normal, para hiperplasia, seguida de alterações displásicas progressivas que podem ocupar todo o tecido epitelial (carcinoma *in situ*), finalizando com a invasão do tecido conjuntivo (Figura 1) (SHAH, *et al.*, 2011).

Figura 1 - Esquema de progressão de mucosa normal para carcinoma



Fonte: adaptado de Shah *et al.*, (2011)

As leucoplasias podem se apresentar, clinicamente, na forma de mancha homogênea, placa irregular, nódulos esbranquiçados, ou ainda salpicada, quando compostas por áreas ora leucoplásicas, ora eritroplásicas (HEGARTY; HUNTER, 2016). Podem ser lesões únicas ou difusas, ocupando algumas vezes múltiplos sítios da mucosa. Quando mostram algum grau de displasia, são consideradas potencialmente malignas (LINGEN *et al.*, 2011) sendo a prevalência de leucoplasias que exibem displasia entre 16 a 45% (LEE, J. J. *et al.*, 2006; NEVILLE; DAY, 2002). Entretanto, alguns estudos recentes têm mostrado que mesmo lesões sem displasias podem apresentar transformação maligna (GOODSON *et al.*, 2015).

A incidência de DPMs varia consideravelmente de acordo com as populações envolvidas, sendo estimada a incidência mundial de 6.2 a 29.1 por 100.000 indivíduos (PETTI, 2003). Acredita-se que a prevalência média seja de 1 a 5%. Diferenças entre o número de lesões encontradas estão fortemente relacionadas ao padrão de uso do tabaco em cada região (NAPIER; SPEIGHT, 2007).

A eritroplasia é encontrada mais comumente em indivíduos de meia idade, como lesões únicas. A prevalência dessas lesões é mais baixa do que a de leucoplasias, entretanto, apresentam maior risco de transformação maligna. Em muitos casos, ao suspeitar-se

cl clinicamente de eritroplasia, histologicamente, já são observadas alterações displásicas severas ou mesmo carcinomas (HEGARTY; HUNTER, 2016).

O perfil de pacientes portadores de DPM varia de acordo com os países em que esses indivíduos residem. Em países desenvolvidos, essas lesões iniciam da quarta à sétima década de vida, enquanto em países em desenvolvimento elas ocorrem cinco a dez anos mais cedo (NAPIER; SPEIGHT, 2007; VAN DER WAAL, 2010). Homens historicamente têm sido mais afetados do que mulheres, provavelmente devido ao consumo mais frequente do tabaco (CHHER *et al.*, 2016).

Embora as DPMs apresentem maior risco de evolução para malignidade do que o tecido normal, elas podem permanecer estáveis por tempo indeterminado e até nunca chegarem a originar uma lesão maligna (LINGEN *et al.*, 2011). O risco de transformação maligna em cinco a dez anos chega a 85% para eritroplasias, e 5% para leucoplasias. Quando as leucoplasias têm uma aparência clínica não homogênea, a possibilidade de progressão aumenta, sendo o percentual de transformação maligna de cerca de 30% (KALAVREZOS; SCULLY, 2015).

Avaliando a evolução de lesões displásicas em mucosa oral, Arduino *et al.* (2009) acompanharam, por um ano, pacientes portadores de displasias orais, encontrando 39% de remissão, 20% de lesões estáveis, 33% dos pacientes desenvolveram novas lesões displásicas e 7% evoluíram para CCE. Já na meta-análise realizada por Mehanna *et al.* (2009), foi verificada taxa de transformação maligna de 12% em trabalhos que acompanharam pacientes por 1,5 a 9,3 anos.

Em alguns casos, é impossível se distinguir clinicamente entre DPM e câncer de boca, sendo a biópsia procedimento mandatório para elucidação do quadro histopatológico e conclusão diagnóstica. Estudos mostram que 3,1 a 12,9% das lesões das quais se suspeitava clinicamente de leucoplasias se tratavam de CCEs (LEE, *et al.*, 2006).

As DPMs, assim como os CCEs apresentam etiologia multifatorial. Os fatores de risco mais comumente relacionados ao surgimento de DPMs são os mesmos conhecidos para o CCE, sendo fumo, nas suas diversas formas, e o álcool os principais envolvidos (NAPIER; SPEIGHT, 2007; RADOI; LUCE, 2013). Pacientes fumantes exibem risco seis vezes maior de apresentar DPM do que não fumantes (VAN DER WAAL, 2010).

A excisão cirúrgica é atualmente o tratamento indicado para DPMs, embora não elimine o risco de recidiva da lesão. Há possibilidade, ainda, de ocorrer desenvolvimento

posterior de neoplasias malignas no local onde a DPM foi excisada ou em outros sítios da mucosa oral. Os índices de recorrência variam de 0 a 30%. Portanto, o acompanhamento em longo prazo torna-se mandatório (HEGARTY; HUNTER, 2016; MEHANNA *et al.*, 2009). Além disso, a eliminação dos fatores de risco, caso esses ainda estejam presentes, é outro ponto fundamental para cessar o dano a novas células (HEGARTY; HUNTER, 2016).

2.3 Alterações Moleculares do Câncer de Boca e Campo de Cancerização

As células humanas são compostas, em geral, por uma dupla fita de DNA, composta por 23 pares de cromossomos, localizada no interior do núcleo. As sequências de nucleotídeos originam RNAs mensageiros, que, por sua vez, traduzem proteínas que agem como moléculas efetoras de vários processos celulares. Em situações de normalidade, várias cascatas de eventos excitatórios e inibitórios regulam os processos celulares que ocorrem no epitélio, como divisão celular, diferenciação e morte. Um ligante extracelular proteico liga-se a um receptor na superfície da célula, gerando sinais que são enviados ao núcleo e/ou citoplasma e regulam as funções celulares (KRISHNA *et al.*, 2015).

O surgimento do CCE em cavidade oral é consequência de múltiplos eventos moleculares provenientes da predisposição genética associada à exposição ambiental aos agentes carcinogênicos (LINGEN *et al.*, 2011). A exposição aos carcinógenos pode acarretar danos aos genes individuais bem como a múltiplas regiões do DNA. O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em uma população clonal de células pode promover mudanças no fenótipo, conferindo vantagens de sobrevivência como evasão de morte celular, aumento da proliferação, indução de angiogênese, e habilidade para promover invasão e metástase. (LINGEN *et al.*, 2011; MARKOPOULOS, 2012). Alterações como mutações pontuais, amplificação, rearranjo e deleções, além de perda de heterozigose e polimorfismos de base única, podem ser encontradas como alterações genéticas na carcinogênese oral (RAM *et al.*, 2011).

Existem duas grandes classes de genes envolvidos no processo de carcinogênese: oncogenes e supressores tumorais. Alguns oncogenes são derivados de alterações em genes existentes em células normais, chamados proto-oncogenes, que participam da proliferação celular. A conversão de proto-oncogenes em oncogenes envolve a ocorrência de mutações que

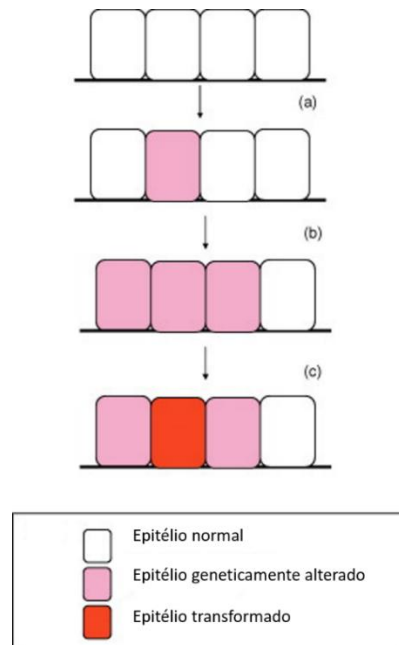
promovem alterações na função gênica. Dentre elas, podem-se citar fatores de crescimento e seus receptores, fatores de transcrição, transdutores de sinais, inibidores de apoptose, e reguladores do ciclo celular. Vários oncogenes estão envolvidos com a carcinogênese oral como *EGFR*, *K-RAS*, *C-MYC* e *BCL-X*. Danos genéticos e epigenéticos também podem gerar inativação de genes supressores tumorais, relacionados à inibição da proliferação celular. A combinação dessas alterações leva à desregulação celular que, por fim, promove o crescimento celular autônomo associado aos mecanismos de invasão. (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; KRISHNA *et al.*, 2015).

A interação receptor-ligante pode dar início a uma cascata de passos intracelulares que regulam a fosforilação de proteínas, um evento fundamental para a ativação de sua função. Mutações podem gerar a expressão de maior número de receptores e/ou ativação deste mesmo na ausência do ligante. A interação entre o receptor e seu ligante pode resultar em homodimerização (ligação a outra molécula semelhante) ou heterodimerização (ligação a uma molécula diferente) e consequente ativação da porção intracelular de tirosino-quinase por fosforilação, que, por sua vez, resulta na iniciação de várias cascatas de sinalização, como RAS/RAF/MEK/ERK e RAS/PI3K/PTEN/AKT/mTOR. (VECCHIONE *et al.*, 2011).

Alterações epigenéticas são aquelas que promovem mudanças estáveis da expressão gênica sem alteração na sequência de DNA, mas que são potencialmente reversíveis (LOD *et al.*, 2014). As modificações epigenéticas causam remodelamento da cromatina, que pode acarretar em ativação ou inativação de um gene, funcionando como fator que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças (ARANTES *et al.*, 2014). Os mecanismos envolvidos na regulação epigenética são classificados em modificações no DNA, modificações em histonas e modificações em RNAs. Embora epigenética e genética sejam alterações distintas, pode haver interação entre elas, podendo as alterações epigenéticas facilitar alterações diretas do DNA e vice-versa (LANGEVIN *et al.*, 2014). Das alterações que promovem modificação do DNA, a metilação é a mais comum. Nela, há adição de um grupo metil em genes específicos, culminando no silenciamento desses genes (ARANTES *et al.*, 2014). A perda da metilação tem sido associada ao risco aumentado de desenvolvimento de tumores. Na carcinogênese oral, esse evento foi relacionado às alterações iniciais, promovendo mudança da célula normal para pré-maligna (SINGH *et al.*, 2016). As alterações epigenéticas que promovem mudanças no RNA ocorrem principalmente em um grupo chamado RNAs não codificantes, sendo os microRNA um dos membros mais estudados do grupo (SINGH *et al.*, 2016).

A teoria do campo de cancerização foi inicialmente sugerida em 1953 e hoje é amplamente aceita para carcinogênese oral. Ela pressupõe que o epitélio oral como um todo é exposto aos fatores carcinogênicos e que, portanto, toda a mucosa apresenta risco para desenvolvimento de lesões malignas a partir do acúmulo de alterações em oncogenes e genes supressores tumorais (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953). Assim, sugere que, mesmo sem alterações clinicamente detectáveis, tecidos próximos ao tumor estariam molecularmente alterados. Achados mais recentes sugerem que, nas lesões malignas de cavidade oral, há um campo de células geneticamente modificadas originadas a partir de uma única célula-tronco que sofreu transformação inicial. Esse campo de células pré-neoplásicas apresentaria expansão gradual (BRAAKHUIS *et al.*, 2003). Com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, uma região do epitélio clinicamente normal mas geneticamente alterado, iniciaria o processo de transformação, apresentando proliferação seguida de invasão. As regiões adjacentes ao tumor por conseguinte, apresentariam maior risco de recidivas ou novos tumores primários (MOHAN; JAGANNATHAN, 2014) (Figura 2). Ge *et al.* (2010) levantam, ainda, a possibilidade de células do estroma também apresentarem alterações genéticas ou até mesmo iniciarem sua alteração antes do tumor, contribuindo para transformação de células epiteliais.

Figura 2 - Desenho esquemático de células alteradas geneticamente seguidas de iniciação como preconizado no conceito de campo de cancerização



a) Epitélio sem alterações genéticas ou clínicas; b) Célula inicial geneticamente alterada (em rosa); c) Expansão da célula inicialmente alterada (múltiplas células em rosa); d) Célula transformada (em vermelho).

Fonte: Adaptado de Ge et al., (2010)

Estudo avaliando perda da heterozigotidade em regiões clinicamente inalteradas adjacentes a CCEs orais mostrou que havia alterações genéticas em cerca de um terço delas (TABOR *et al.*, 2001). Na mesma linha, Van Houten *et al.* (2002) encontraram presença de mutações em TP53 em 63% de margens de CCEs de cabeça e pescoço clinicamente saudáveis, enquanto Hande *et al.* (2015) detectaram alta expressão de p53 em biópsias espelhadas de pacientes portadores de CCEs orais, realizadas em áreas inalteradas clinicamente. Ainda avaliando agentes importantes no ciclo celular, a ciclina D1 também se encontrou hiperexpressa em áreas adjacentes ao tumor (IZZO *et al.*, 1998).

Acrescentam-se, ainda, alterações na quantificação de telomerase em áreas adjacentes ao tumor e clinicamente inalteradas (YAJIMA *et al.*, 2004), além de encurtamento dos telômeros (BOSCOLO-RIZZO *et al.*, 2015). Comportamento análogo foi encontrado ao se avaliarem citoqueratinas (MANE *et al.*, 2012), mostrando comportamento idêntico à área tumoral. A vascularização em tecidos vizinhos ao tumor também pode estar aumentada (EL-GAZZAR; MACLUSKEY; OGDEN, 2005). Outro estudo avaliando expressão de MGMT, p16

e APC em margens tumorais de CCEs orais encontrou perfil semelhante entre região tumoral e margens livres de doença (KATARZYNA STRZELCZYK *et al.*, 2016). O marcador de proliferação Ki-67 mostrou-se aumentado em mucosa clinicamente livre de tumor e foi associada à recorrência da doença (MONTEBUGNOLI *et al.*, 2011).

Estudo realizado por Li *et al.* (2015) avaliou, por meio de imunoistoquímica e citometria de fluxo, a expressão de p53, p21CIP1/WAF1, eIF4E e Ki-67 em tecidos clinicamente saudáveis de pacientes portadores de CCE oral em distâncias diferentes do tumor. Os grupos foram divididos da seguinte forma: P1 avaliou lesões localizadas a 0-0,5 cm do tumor; o grupo P2, de 0,5-1 cm; o grupo P3, de 1-1,5 cm; o grupo P4, de 1,5-2 cm. Nos grupos P1 e P2, ainda existia tumor em região submucosa. Nos grupos P3 e P4, houve diminuição gradual de p53, Ki-67 e eIF4E, à medida que se distanciava do tumor, enquanto p21CIP1/WAF1 apresentou comportamento inverso, aumentando gradualmente.

2.4 MicroRNAs

Em 1993, ocorreu o primeiro relato de detecção de RNA de tamanho reduzido, o lin-4, em análise genética do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Nessa época, acreditava-se tratar de uma molécula anômala específica dessa larva, em sua fase de desenvolvimento. Entretanto, após oito anos, os pesquisadores conseguiram identificar sua presença em humanos e outros vertebrados e, então, estabeleceram a nomenclatura de microRNAs (LEE, 2001).

Os miRNAs fazem parte do sistema de regulação pós-transcricional, tendo a função de se ligarem aos RNAs mensageiros impedindo a tradução de proteínas (BARTEL, 2009). Por consequência, influenciam processos biológicos importantes como proliferação celular, apoptose, resposta imune e carcinogênese (IBORRA *et al.*, 2012; KASINSKI; SLACK, 2011; WU, *et al.*, 2011).

A biossíntese dos miRNAs (Figura 3) inicia-se no núcleo pela transcrição gênica auxiliada pela RNA polimerase II, originando uma molécula precursora chamada pri-miRNA. Em seguida, há a clivagem do pri-miRNA pela enzima RNase III Drosha juntamente com a proteína Pasha, originando o pré-miRNA. Este é, então, transportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é processado pela RNase III Dicer, gerando um microRNA de fita dupla com

aproximadamente 22 nucleotídeos. O próximo evento é a incorporação a um complexo multimérico RISC (*RNA-induced silence complex*), que permanece ligado a uma das fitas produzidas, formando o microRNA final (HA; KIM, 2014).

Figura 3 - Biossíntese dos microRNAs.

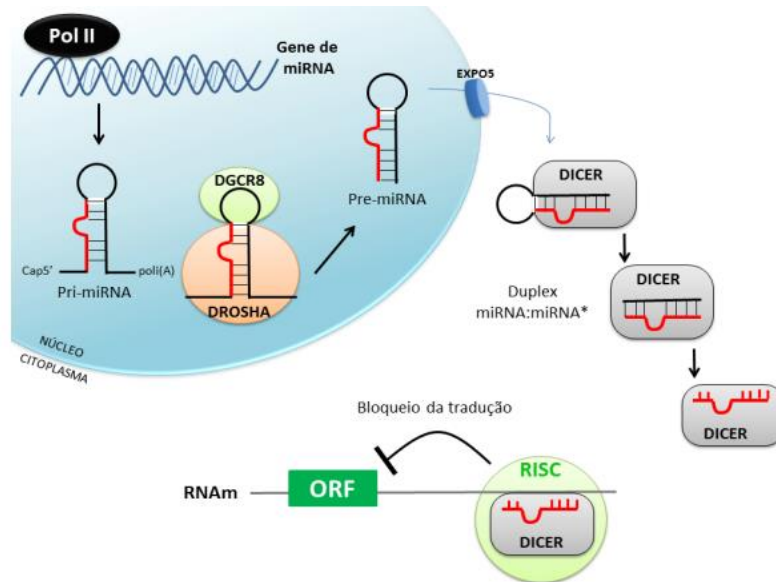


Ilustração do processo de formação dos microRNAs a partir da transcrição gênica, no núcleo, formação de pri-microRNAs, seguido de modificação para Pre-microRNAs, migração para citosol, separação em única fita, finalizando sua função na regulação da translação de proteínas acarretada por ligação ao RNA mensageiro. Fonte: Dzik, (2013).

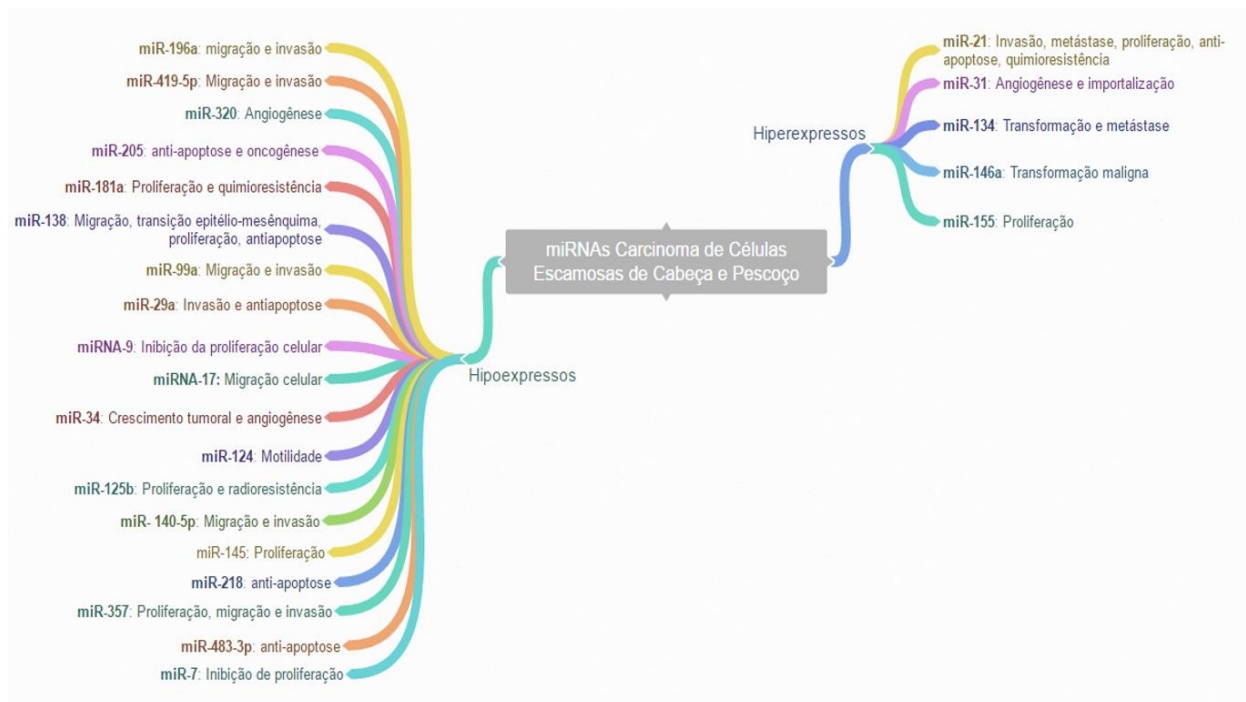
Eles têm sido amplamente envolvidos na patogênese de várias doenças, incluindo o câncer. A alteração da expressão de microRNAs tanto aumentada como diminuída está relacionada a importantes fatores influenciadores na patogênese das neoplasias: quando aumentados, contribuem para diminuição da codificação de genes supressores tumorais; quando diminuídos, podem influenciar no aumento da codificação de proteínas oncogênicas (BERINDAN-NEAGOE *et al.*, 2014). Nos primeiros estudos envolvendo microRNA, acreditava-se que, por se localizarem em regiões fragilizadas do genoma, poderiam estar associados ao risco de desenvolvimento de neoplasias malignas (CALIN, *et al.*, 2004). Estudos posteriores têm provado que existem perfis específicos de microRNAs para iniciação e progressão do câncer e que eles são expressos diferentemente em neoplasias localizadas em sítios distintos, podendo funcionar como biomarcadores (CALIN, GEORGE ; CROCE, 2006).

Uma das principais dificuldades em avaliar carcinomas de cabeça e pescoço é o fato de ser um grupo heterogêneo de neoplasias com etiologia multifatorial, promovendo o

surgimento de lesões com características diferentes (BABU *et al.*, 2011). Os diversos precursores de microRNA bem como os agentes envolvidos no seu processamento, como Dicer e Drosha, podem influenciar na desregulação do microRNA nessas neoplasias (MURALIDHAR *et al.*, 2011; ZHANG, X. *et al.*, 2009).

Vários miRNAs têm-se mostrado hipoeexpressos ou hiperexpressos no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Os microRNAs hipoeexpressos têm a função de genes supressores tumorais, enquanto os hiperexpressos apresentam função de oncogenes. Os principais microRNAs citados na literatura como alterados para essa neoplasia são miR-21, miR-31, miR31*, miR-134, miR-196a, miR-146a, miR-155 e miR-7, porém outros miRNAs já foram analisados (MIN *et al.*, 2015). Esquema resumindo os principais miRNAs estudados no CCE oral, seu grau de expressão e função está apresentado na figura 4.

Figura 4 - Resumo dos miRNAs descritos na literatura avaliados no Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço e suas funções no câncer



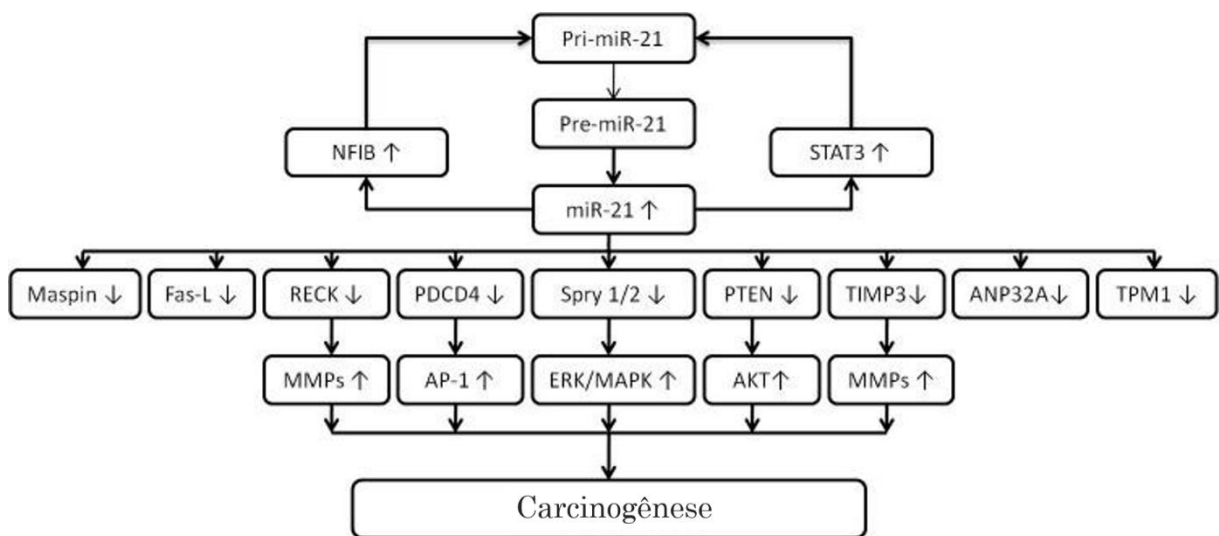
Síntese do comportamento de alguns microRNAs estudados em Carcinoma de Células Escamosas de cabeça e pescoço, evidenciando seus comportamentos quanto à expressão.

Fonte: Adaptado de Min *et al.*, (2015).

O miR- 21 é um miRNA citado muito frequentemente na literatura, em estudos de desordens malignas e potencialmente malignas intraoral e de cabeça e pescoço. Esse microRNA regula vários genes conhecidos como supressores tumorais, como PTEN (MENG *et al.*, 2007),

PDC4 (*Programed cell death 4*) (REIS *et al.*, 2010), trompomiosina, RECK (*Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*) (JUNG *et al.*, 2012) e DKK2 (*Dickkopf 2*) (KAWAKITA *et al.*, 2014). Outras cascatas relacionadas a STAT3, AP-1 (*activated protein-1*), fator nuclear I (NFI), maspin (*mammary serine protease inhibitor*), Fas-L, inibidor tecidual da metaloproteinase 3 (TIMP3), ANP32A, MMP, c-JUN, ERK, MAPK foram descritas por (FENG; TSAO, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Alvos do miRNA-21 envolvidos na carcinogênese.



Relação dos possíveis alvos do microRNA-21 e suas expressões em neoplasias malignas. Fonte: adaptado de Feng e Tsao, (2016).

Estudo de Cervigne *et al.* (2009) buscou identificar o perfil de miRNAs de leucoplasias que progrediram para CCE. Após análise, identificou 109 microRNAs expressos diferentemente em leucoplasias que se transformaram em lesões malignas e em CCEs. Os microRNAs miR-21, miR-181b and miR-345 aumentaram progressivamente à medida que a lesão aumentava a sua severidade, sugerindo que eles funcionariam como possível assinatura para identificar lesões progressivas. Outro estudo, realizado subsequentemente, encontrou resultados semelhantes em relação à maior expressão desses microRNAs em CCE comparados com displasia e tecido normal (BRITO *et al.*, 2014).

O miR-31 encontra-se hiperexpresso em várias neoplasias malignas localizadas em fígado (BANDRÉS *et al.*, 2006), carcinomas colorretais (SLABY *et al.*, 2008), mama (YAN, L.-X. *et al.*, 2008) e língua (WONG, T.-S. *et al.*, 2008). Entretanto, em neoplasias de próstata,

pode estar hipoexpresso e contribuir para carcinogênese por mecanismos diferentes (LIN *et al.*, 2013). Reforçando seu efeito pleiotrópico, pode assumir, ainda, função supressora tumoral em carcinomas de esôfago com alta expressão de p21 (NING *et al.*, 2014) e em carcinomas de pulmão (KIM *et al.*, 2015).

O miR-31 e seu precursor miR-31* também vêm se mostrando hiperexpressos em leucoplasia oral e CCEs orais (CHANG *et al.*, 2013; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2016). Em CCEs de cabeça e pescoço, foi observada a ação desse miRNA sobre o fator inibidor de hipóxia (FIH), permitindo a ação do fator indutor de hipóxia, que, por sua vez, promove a transcrição de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), aumentando a angiogênese tumoral (LIU *et al.*, 2010). Outro estudo sugere que esse miRNA também estaria envolvido na imortalização celular desde os estágios iniciais da carcinogênese e influenciando diretamente na transformação maligna (LIU *et al.*, 2010).

Estudo de Hung *et al.* (2016) avaliou desordens potencialmente malignas que progrediram para malignidade e identificou que o miR-31 está significativamente aumentado nessas lesões. Sugeriu que este microRNA pode funcionar como método para *screening* de lesões de alto risco de progressão bem como para aquelas que apresentam alto risco de recidiva. Identificou, ainda, que o miR-21 também se encontra hiperexpresso em desordens potencialmente malignas, mas não prediz risco de evolução.

Outro trabalho avaliando desordens potencialmente malignas e câncer sugeriu que os microRNA miR-31, miR-31*, miR-7 e miR-204 estariam aumentados nos CCEs orais, enquanto miR-133a e miR-206 se apresentariam reduzidos. Já em leucoplasias, todos se encontraram hiperexpressos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2016).

Tem sido sugerido que o microRNA-17 também se apresenta como importante ator nas neoplasias malignas, promovendo crescimento e invasão pelo aumento da proliferação celular e imortalização, como descrito por YANG *et al.* (2013), avaliando tumores de próstata. Um alvo importante desse microRNA é p21, inibidor da atividade dos complexos ciclina-CDK2 E CDK4, essencial para regulação do ciclo celular. Assim, as células passam da fase G1 para fase S do ciclo celular de maneira indiscriminada, promovendo a proliferação celular (WONG, *et al.*, 2010). Adicionalmente, a família E2F, que também atua no ciclo celular, pode ser inibida por esse microRNA. O supressor tumoral PTEN é outro alvo desse miR-17, também regulando a via PI3K/AKT, promovendo a imortalização celular (YANG *et al.*, 2013). Em carcinomas de

língua e cabeça e pescoço, foi observada uma hiperexpressão de miR-17 (HUI *et al.*, 2010; YU; LI, 2016).

Por outro lado, em carcinomas de esôfago, o miR-17 pode funcionar como agente inibidor de migração e invasão através do silenciamento da cascata do TGF- β (JING *et al.*, 2016).

Outro trabalho sugerindo assinatura de leucoplasias que progridem para malignidade encontrou quatro microRNAs diferentemente expressos: miRNAs-208b-3p (hiperexpresso), 204-5p, 129-2-3p e 3065-5p (hipoexpressos). Esse estudo, diferentemente dos anteriormente citados, avaliou leucoplasias sem displasias ou com baixos graus de displasia, propondo que a alteração nesses microRNAs seria um fator relevante na avaliação de lesões com risco de progressão para CCE que não apresentam atipia histológica proeminente (PHILIPONE *et al.*, 2016).

MicroRNA 10a está hipoexpresso em carcinomas de esôfago (INOUE *et al.*, 2010), gástrico (JIA *et al.*, 2014), carcinomas renais metastáticos (HEINZELMANN *et al.*, 2011) e em leucemias mieloides crônicas (AGIRRE *et al.*, 2008). Entretanto, em outras neoplasias como carcinoma hepatocelular (VARNHOLT *et al.*, 2007) e leucemia mieloide aguda, o miR-10a encontra-se hiperexpresso (GARZON *et al.*, 2008). O efeito regulatório desse microRNA em carcinomas tem sido relacionado ao aumento de proliferação, migração e invasão (CHEN, *et al.*, 2012). O trabalho de Hui *et al.* (2010) avaliou expressão de microRNAs em carcinomas de cabeça e pescoço, tendo encontrado, dentre outros resultados, uma hipoexpressão de miR-10a. Foi sugerido, em câncer gástrico, que a diminuição de miR-10a pode ser justificada pela metilação do DNA nas áreas de transcrição desse microRNA (JIA *et al.*, 2014).

O miR-29c apresenta possível relação com a sensibilidade à apoptose, por meio da regulação do receptor de morte Fas. Ele se encontra hipoexpresso em carcinomas de pulmão (MATSUSHIMA; ISHIYAMA, 2016), nasofaringe (SENGUPTA *et al.*, 2008), bexiga (FAN *et al.*, 2014) e fígado (BAE *et al.*, 2014), estando hiperexpresso em câncer de laringe (GUAN *et al.*, 2015). Em estudo realizado por Liu, *et al.* (2016), observou-se relação desse microRNA com diminuição da proliferação e indução da apoptose. Também tem sido relacionado com inibição da angiogênese (HU *et al.*, 2015). Todavia, estudo envolvendo câncer gástrico mostra que esse microRNA pode estar envolvido com a iniciação de células malignas (HAN *et al.*, 2014). A hiperexpressão de miR-29c foi relatada em CCEs de língua agressivos, cujos portadores das lesões tinham menos de 30 anos. Além deste, let-7c, miR-130a, miR-361, miR-

99a e let-7d também apresentaram níveis mais elevados nesse perfil de lesões (HILLY *et al.*, 2016). Outro estudo avaliando CCEs de cabeça e pescoço mostrou que esse microRNA encontra-se diferentemente expresso em carcinomas metastáticos e não metastáticos (SERRANO, NICHOLAS *et al.*, 2012).

2.5 STAT3

Os Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição, do inglês *Signal transducer and activator of transcription* (STAT), são uma família de fatores de transcrição residentes no citoplasma de forma latente. Foram inicialmente descobertos em 1994, por sua relação com a fase aguda da inflamação (AKIRA *et al.*, 1994). Os membros integrantes dessa família de fatores são STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6 (FURQAN *et al.*, 2013). Os STATs atuam tanto de forma fisiológica na resposta imune, desenvolvimento embrionário e organogênese quanto na proliferação celular, transformação, metástase e angiogênese (GELETU *et al.*, 2013; LEVY, 1999). Os genes responsáveis por codificar essa família de moléculas estão localizados em três regiões cromossômicas distintas, sendo o do STAT3 localizado no cromossomo 12. O STAT3 é uma proteína que pesa 92 quilodaltons, composta por 770 aminoácidos, estruturalmente composta por: um domínio N-terminal composto por “coiled-coil” (duplas hélices paralelas); um domínio de ligação ao DNA; um domínio de ligação; um domínio SH2; um domínio de ativação da tirosina; e um domínio de transativação, cada um com funções específicas. A função de cada sítio está descrita no quadro abaixo (Figura 6):

Figura 6 - Funções dos sítios de STAT3

Domínio	Função
Domínio amino-terminal	Formação de homodímeros entre STATs não fosforilados em repouso
“Ciled-coil”	Interação com outras proteínas e fatores de transcrição
Ligação ao DNA	Ligação do STAT ao sítio específico do gene a ser transcrito no DNA
Domínio de Ligação	Manutenção da conformação adequada entre domínio de dimerização e domínio de ligação ao DNA.
SH2	Envolvimento na formação do dímero de STAT ativado
Domínio de ativação da tirosina	Fosforilação desse domínio - fundamental para ativação de STAT
Domínio de Transativação	Ativação transcricional dos genes-alvo por meio da interação com reguladores.

Síntese dos sítios que compõem a molécula de STAT3 e suas funções. Fonte: Wen; Darnell, (1997)

O STAT3 é uma molécula capaz de transmitir sinais da superfície para o núcleo da célula. Para isso, ele necessita ser ativado através de fosforilação. Alguns receptores associados a tirosina-quinases localizados na membrana plasmática, como fator de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e fator estimulador de colônias -1 podem mediar o processo de fosforilação de STAT3. Outra possibilidade é a ativação dessa molécula por tirosina-quinases não associadas a receptores, como Src ou abl, ou por receptores de citocinas como IL-6R ou IFN- α (Interferon alfa). Este, por sua vez, associado a JAK (janus-quinases ativadas) pode catalisar a reação. Diversas quinases não associadas à tirosina também já foram descritas como ativadores de STAT3 como MAPK e mTOR (KAMRAN; PATIL; GUDE, 2013; MATIKAINEN *et al.*, 1999).

Concluindo a ativação, há uma acetilação da molécula de lisina por uma histona-acetiltransferase. Esse processo provavelmente está envolvido na transcrição e promoção da estabilização dos homodímeros (YUAN *et al.*, 2005).

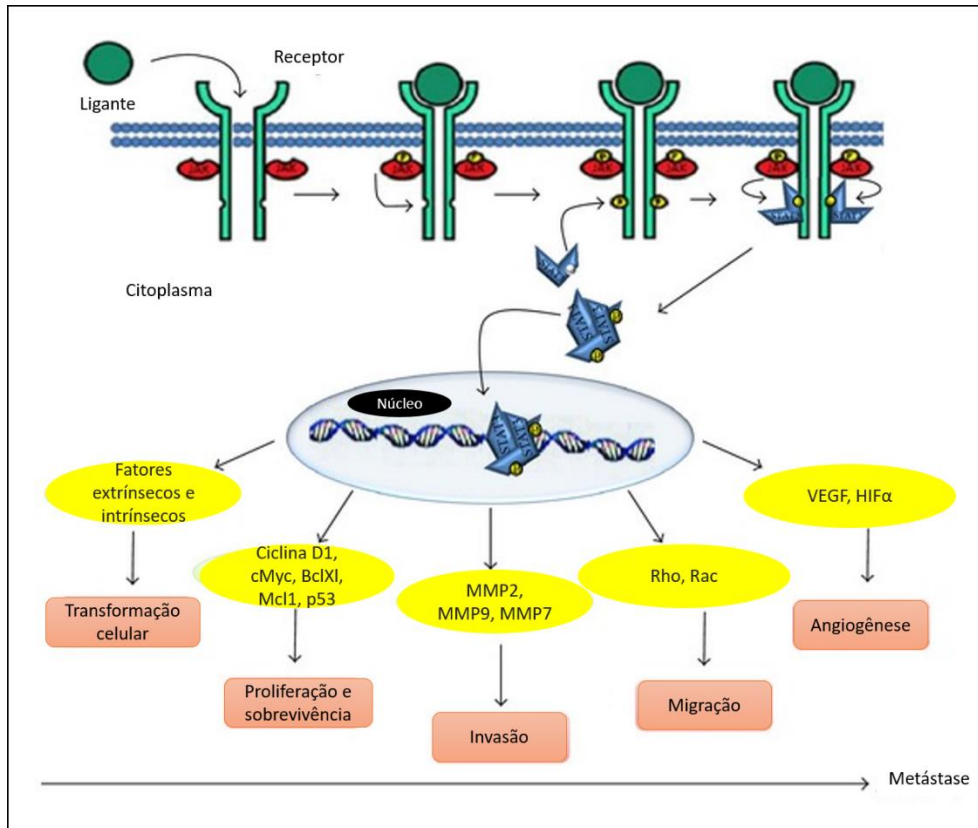
Após fosforilação, haverá a ligação entre duas moléculas de STAT3, chamada de homodimerização ou entre uma molécula de STAT3 a outra de STAT1, ocorrendo a heterodimerização (CARPENTER; LO, 2014). Em sequência, haverá a migração para o núcleo, onde se liga ao DNA, promovendo a transcrição gênica (TAKEDA; AKIRA, 2000).

A cascata de ativação de STAT3 pode ser inibida pelo inibidor de sinal de citocina 3 (SOC3) ou por inibidores de STAT ativado (PIAS)(ABBAS *et al.*, 2015).

Embora a maioria dos estudos avaliem a ação de STAT3 fosforilado, há evidências de que essa proteína é capaz de adentrar o núcleo e promover ativação gênica mesmo na forma não fosforilada e sem dimerização (YANG, J. *et al.*, 2005).

Em células normais, a ativação de STAT3 é controlada, sendo um processo que demora minutos ou algumas horas (MACHA *et al.*, 2011). No entanto, em células tumorais, têm-se observado maior expressão de STAT ativado, sugerindo que essa molécula possa interferir diretamente nos processos neoplásicos malignos (JI *et al.*, 2016). Tem sido encontrada hiperativação de STAT3 em linfomas, leucemias, mielomas múltiplos (BOWMAN *et al.*, 2000), carcinomas de mama (GARCIA *et al.*, 2001), próstata (LOU *et al.*, 2000) e cabeça e pescoço (KIJIMA *et al.*, 2002). Nas neoplasias malignas, STAT3 foi relacionado à transcrição de genes que acarretam angiogênese, por promoverem o aumento da transcrição de VEGF, além de apoptose e desregulação do ciclo celular por alterarem a expressão de Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, survivina, Ciclina D, entre outros agentes pró-carcinogênicos (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de ativação de STAT3, genes regulados por ele e funções destes na carcinogênese.



Esquema detalhando a ativação de STAT3, que ocorre após a ativação de um receptor localizado na membrana plasmática. Em seguida, STAT3 adentra o núcleo e promove a transcrição de várias proteínas que influenciarão a transformação celular, proliferação, invasão e angiogênese. Fonte: Adaptado de Kamran, Patil e Gude, (2013)

Nagpal, Mishra e Das (2002) examinaram carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço e DPMs que tiveram como fator etiológico o fumo mascado, encontrando marcação intensa de STAT3 em 58,9% dos casos. Somente em um caso de DPM foi encontrado grau intermediário de acúmulo de STAT3. Relacionando o estágio do tumor, identificaram alta densidade de marcação em estágios T1 e T2, moderado em T3 e T4 e ausência de marcação em tecido normal, evidenciando a participação de STAT3 em estágios precoces do desenvolvimento tumoral.

Em estudo avaliando CCEs de cabeça e pescoço, Kijima *et al.* (2002) observaram que há uma ativação constitutiva de STAT3 nesses tumores, acarretando crescimento celular promovido por aumento na transcrição de Bcl-x e Ciclina D1, proteínas importantes na apoptose e progressão do ciclo celular. Corroborando com esse achado, Scheper, Nikitakis e Sauk (2007) observaram que, ao inibir STAT3, havia decréscimo no crescimento celular e apoptose, e que

a diminuição de survivina estava relacionada com esse processo, sugerindo que a survivina promove aumento de STAT3 e conseqüente progressão tumoral.

Objetivando avaliar a desregulação de STAT3 em CCE de cabeça e pescoço, Sriuranpong *et al.* (2003) examinaram a relação entre receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) em linhagens celulares. Encontraram ativação de STAT3 na maioria das linhagens, porém somente três linhagens, das dez estudadas, foram positivas para EGFR. Mesmo nos CCEs positivos para EGFR, a ativação de STAT3 não dependia desse receptor. O bloqueio do receptor gp130 acarretou redução dos níveis de STAT3, sugerindo que a ativação de STAT3 no CCE de cabeça e pescoço é dependente de IL-6.

Shah, *et al.* (2006) estudaram o perfil imunoistoquímico de STAT3 em CCEs orais e correlacionaram-no com variáveis clínico-patológicas. Marcação positiva, seja nuclear ou citoplasmática, foi encontrada em 62% dos casos, havendo marcação somente nuclear em 44%. O percentual de marcação em tumores avançados foi maior do que naqueles em estágios iniciais. Entretanto, em lesões avançadas, a intensidade de marcação diminuiu. Além do estágio da doença, houve correlação de STAT3 com a presença de linfonodos comprometidos e o tamanho do tumor. Avaliando análise de sobrevida, concluíram que a marcação de STAT3 seria fator prognóstico independente de sobrevida sem recorrência e tempo de sobrevida em pacientes apresentando doença em estágio inicial. Em estudo posterior, evidenciaram que STAT3 pode funcionar como preditor de progressão de hiperplasias para displasias orais (SHAH, *et al.*, 2007).

Estudo avaliando a imunomarcação de STAT3 fosforilado (pSTAT3) em leucoplasias com e sem displasia e carcinoma de células escamosas orais demonstrou maior perfil de marcação nuclear de pSTAT3 nessas lesões do que em tecido normal, sugerindo que este seria um marcador de pior prognóstico em CCEs orais. Observou, ainda, associação entre pSTAT3 nuclear e consumo de tabaco (MACHA *et al.*, 2011). Corroborando com a hiperativação de STAT3 em CCEs orais, Klosek *et al.* (2004) encontraram imunomarcação pra pSTAT3 em 62 de 84 amostras estudadas.

Em busca de desvendar os mecanismos que promovem o crescimento celular em CCEs de cabeça e pescoço, Squarize *et al.* (2006) encontraram correlação positiva entre acúmulo nuclear de pSTAT3, NFkappaB e IL-6, havendo diminuição de STAT3 e IL-6 durante bloqueio de NFkappaB.

Como vários estudos demonstraram a ação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, em CCEs orais, Kurago *et al.* (2008) levantaram a hipótese de que lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bactérias que colonizam os CCEs orais, juntamente com os monócitos, estariam envolvidas no processo de manutenção de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a progressão tumoral. Identificaram que LPS tem a capacidade independente de promover o estímulo à liberação de quimiocinas que recrutam monócitos, assim como secreção de IL-6 e VEGF. Adicionalmente, o nível de STAT3, que nas células tumorais era baixo, foi aumentado à medida que IL-6 foi estimulada. Concluíram, assim, que monócitos e colonização bacteriana podem contribuir para a progressão desses tumores.

A quimiorresistência também está associada ao aumento da expressão de STAT3. Zhou *et al.* (2014), após avaliação de 43 CCEs orais, classificados entre cisplatinas resistentes e sensíveis, encontraram aumento da expressão de STAT3 e miR-21 em amostras resistentes à cisplatina. Relacionam a hiperexpressão de miR-21 e a diminuição da expressão de seus alvos, como PTEN, TIMP3 (*Metalloproteinase inhibitor 3*) e PDCD4 à regulação positiva de STAT3.

Outras vias ativadas mediadas por STAT3 também foram estudadas, como a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2). Gkouveris *et al.* (2014) identificaram um redução dose-dependente no crescimento e viabilidade de células escamosas malignas quando inibiram ERK 1/2 e este, por sua vez, apresenta correlação negativa com STAT3 fosforilado na porção Ser727.

A relação de STAT3 com metástases e prognósticos de CCEs localizados em língua foi examinada por Zhao *et al.* (2012), sendo identificada correlação significativa entre metástases, recorrência e sobrevida e a marcação por STAT3. Por outro lado, ao se inibir STAT3, as células diminuam sua mobilidade e atividade invasiva.

Darvin *et al.* (2015), avaliando o comportamento de linhagem YD-38, originada a partir de CCE de gengiva, identificaram que o antioxidante ácido tânico é capaz de promover a permanência das células cancerígenas no estágio G1 do ciclo celular e o envio dessas para apoptose. Tal efeito se dá pela inibição da cascata Jak2/STAT3.

O exato mecanismo que promove a hiperativação de STAT3 em neoplasias malignas ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que as moléculas sinalizadoras para ativação de STAT3 estariam aumentadas ou que STAT3 estaria constitutivamente aumentado em neoplasias malignas (KIJIMA *et al.*, 2002). Estudos mostram

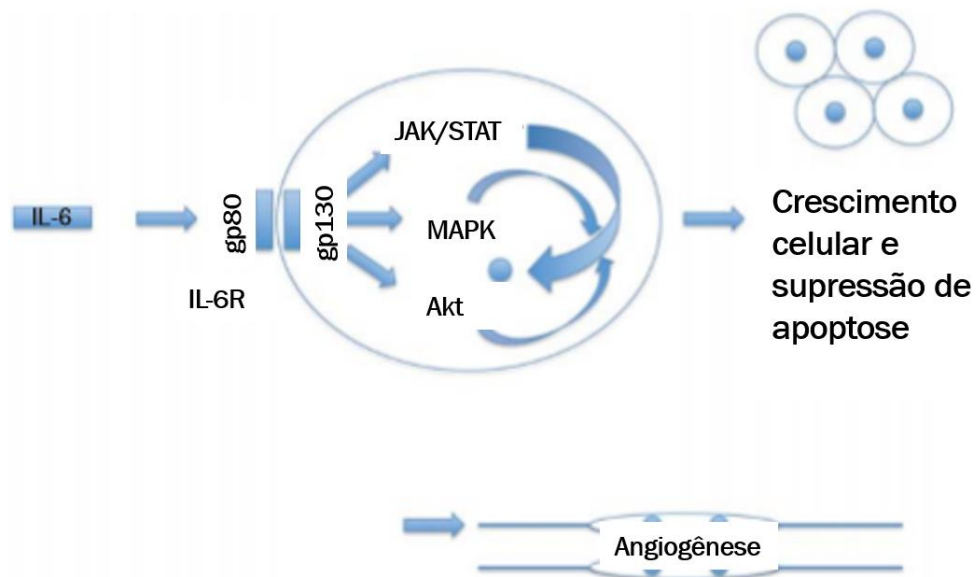
que há uma provável associação entre a expressão aumentada de IL-6, ativando a via STAT3, que contribui para a progressão tumoral e a diminuição da efetividade da quimioterapia em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (JOHNSTON *et al.*, 2015). Por outro lado, a inibição do receptor de IL-6 através da utilização do anticorpo tocilizumab foi associada à diminuição da expressão de STAT3 fosforilado (SHINRIKI *et al.*, 2009). Fatores como radiação solar, radiação ultravioleta, estresse, fumo ou infecções também podem influenciar a ativação de STAT3 (KAMRAN; PATIL; GUDE, 2013).

2.6 Interleucina-6

A inflamação desempenha papel importante no desenvolvimento de vários cânceres. Uma das hipóteses é que as células inflamatórias secretam mediadores que estimulam a proliferação celular e manutenção do microambiente favorável ao desenvolvimento de neoplasias. Uma citocina frequentemente presente em neoplasias malignas e que pode estar envolvida nesse processo é a IL-6 (KUMARI *et al.*, 2016).

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida e secretada por vários tipos celulares, que pertence a uma família de mediadores que apresentam um receptor de sinais chamado gp130. Ela se liga a um receptor de citocina tipo 1 específico chamado de IL-6R, que é formado por sítio de ligação gp80, também chamado de receptor alfa (ou CD126) e uma região gp130 (ou CD130), responsável pela transdução do sinal (CULIG, 2013; GUO *et al.*, 2012). Quando ocorre a ligação de IL-6 com IL-6R, inicia-se a dimerização das cadeias gp130, resultando na ativação de JAK. Este, quando ativado, tem a capacidade de mediar outras vias, como STATs, Ras-MAPK, PI3K-Akt, entre outras, daí a sua característica pleiotrópica (HEINRICH *et al.*, 2003; SHINRIKI *et al.*, 2011) (Figura 8). Alternativamente, em células onde não há IL-6R na membrana, outro tipo de receptor solúvel, chamado de IL-6sR, está presente nos fluidos corporais e, ao ligar-se à IL-6, promove a ativação de gp130 diretamente na membrana plasmática, sendo esse processo nomeado trans-sinalização (CULIG, 2013). As principais células produtoras de IL-6 são macrófagos, mastócitos, células dendríticas, linfócitos B e T. Outras células não hematopoiéticas como fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais também podem secretar essa citocina (NAGASAKI *et al.*, 2014).

Figura 8 - Interação IL-6 - IL-6R e implicações na carcinogênese



Ligação IL-6-IL-6R promovendo ativação de vias JAK/STAT, MAPK e Akt, que acarretam crescimento celular, supressão de apoptose e angiogênese. Fonte: Culig (2013).

Funções importantes mediadas por essa citocina podem estar envolvidas no desenvolvimento de neoplasias como migração, invasão, crescimento, proliferação, apoptose, angiogênese e diferenciação. Inicialmente, sua atuação era relacionada somente à resposta imune e inflamatória (KISHIMOTO, 2005), porém outras funções fundamentais na regulação de respostas fisiológicas, como manutenção de hepatócitos, de células hematopoiéticas, do esqueleto, sistema cardiovascular, placenta, sistema nervoso e endócrino, foram sendo desvendadas (KUMARI *et al.*, 2016).

Estímulos como radiação ionizante, ultravioleta, espécies reativas derivadas de oxigênio, vírus, produtos bacterianos e outras citocinas podem desencadear o aumento de IL-6. Todos esses apresentam consequências semelhantes aos tecidos: danos ou estresse (KUMARI *et al.*, 2016).

Os níveis séricos de IL-6 apresentam-se em 1pg/ml em situações de normalidade. Entretanto, em várias situações como ciclo menstrual (ANGSTWURM; GÄRTNER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1997), atividade física (REIHMANE; DELA, 2014) e gestação (KESKI-NISULA *et al.*, 2004) pode-se observar aumento desses níveis.

Estudos mostram o aumento de sua expressão sérica em neoplasias, podendo ser produzidas tanto por células tumorais quanto do estroma de diversas neoplasias malignas como carcinoma de ovário (FERRARESI *et al.*, 2016), esôfago (DONG *et al.*, 2016) e pâncreas (MACE *et al.*, 2016). O nível aumentado dessa citocina tem sido relatado aos piores prognósticos e recorrência (DUFFY *et al.*, 2008). Outro fato a ser observado é que a irradiação e o uso de alguns quimioterápicos acarretam aumento de IL-6 em células tumorais e estromais, levando à resistência terapêutica (FURQAN *et al.*, 2013; SIVEEN *et al.*, 2014; WU, C.-T. *et al.*, 2013).

Avaliando os níveis séricos em CCEs, Jablonska, Piotrowski e Grabowska (1997) encontraram níveis séricos aumentados de IL-6 em CCEs orais comparados com controle e incremento gradual desses níveis com a evolução do estágio clínico da doença. Em outro estudo longitudinal com amostra de 444 pacientes não tratados, foram encontrados níveis séricos médios de 13pg/m, com níveis máximos de 453 pg/ml. Correlacionaram os níveis de IL-6 com sobrevida e concluíram que este pode ser utilizado como fator prognóstico independente, sendo que níveis mais elevados dessa citocina são relacionados com menor sobrevida e altas taxas de recorrência (DUFFY *et al.*, 2008).

Estudo de coorte avaliando níveis séricos de IL-6 pré-tratamento demonstrou que estes encontravam-se mais altos em pacientes portadores de CCEs orais do que em pacientes saudáveis ou portadores de DPM. Os níveis de IL-6 foram maiores em tumores de maiores proporções, maior estadiamento, com invasão óssea e maiores profundidades de invasão. Altos níveis de IL-6 também foram associados a menor sobrevida independente do tipo de tratamento utilizado. Análise de regressão logística multivariada indicou que os níveis séricos de IL-6 podem ser utilizados como predictor independente de prognóstico de sobrevida e sobrevida livre de doença (CHANG, *et al.*, 2013). Outro trabalho avaliando níveis séricos de IL-6 pré-tratamento identificou correlação entre essa citocina e os níveis de proteína C reativa e relação neutrófilo-linfócito (divisão do número absoluto de neutrófilos pelo número absoluto de linfócitos). Os três fatores avaliados foram passíveis de utilização como marcadores prognósticos para resposta à quimioterapia com 5-Fluorouracil e sobrevida (NAKASHIMA *et al.*, 2016).

A saliva é outro fluido corporal na qual se podem avaliar os níveis de IL-6. Rhodus *et al.* (2005) quantificaram citocinas pró-angiogênicas, dentre elas, a IL-6, em saliva de pacientes portadores de DPMs orais e identificaram que há um aumento de IL-6 nessas lesões, mostrando sua participação desde os estágios iniciais da carcinogênese. Brailo *et al.* (2006)

confirmaram a existência de níveis aumentados de IL-6 em saliva de pacientes com leucoplasias orais acrescentando a informação de que não há correlação entre níveis salivares de IL-6 e tamanho e localização de leucoplasias. Avaliando o perfil de IL-6 salivar em pacientes portadores de CCEs orais nos períodos pré, trans e pós-tratamento Sato *et al.* (2010) observaram aumento dos níveis de IL-6 durante o tratamento e decréscimo não estatisticamente significativo após finalização. Em sequência, publicaram novo trabalho correlacionando níveis salivares de IL-6 pós-tratamento com as recorrências locorregionais, identificando que pacientes com recidivas precoces apresentam níveis mais altos de IL-6. Entretanto, não encontraram relação entre níveis pré-operatórios e recorrência. Também foram encontrados níveis pós-operatórios mais altos nos pacientes cuja recorrência ocorreu tardiamente. Concluíram, então, que a análise sequencial de IL-6, em períodos pós-operatórios, pode ser utilizada como marcador para diagnóstico de recorrências precoces e tardias (SATO *et al.*, 2015).

Tendo em vista que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e, como tal, pode estar aumentada em processos inflamatórios crônicos, Sharma *et al.* (2011) examinaram os níveis salivares de IL-6 em pacientes portadores de leucoplasia com displasias orais associadas ou não à doença periodontal. Demonstraram níveis aumentados de IL-6 em pacientes com leucoplasia associada à doença periodontal e níveis progressivos de IL-6 foram encontrados com o aumento da severidade das displasias. Outro fator elevador dos níveis de IL-6 salivar foi o uso do fumo. O estudo sugere que outros fatores inflamatórios orais podem estar relacionados ao aumento dos níveis de IL-6 na saliva e que há uma possibilidade de contribuição destes para a progressão tumoral.

A utilização dos níveis de IL-6 salivar como marcador para detecção de lesões malignas e desordens potencialmente malignas em cavidade oral foi alvo do estudo de Panneer Selvam e Sadaksharam (2015). Três grupos de 25 pacientes com leucoplasias, CCEs orais, e não portadores de lesão foram selecionados. Após análise pelo método ELISA, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, confirmando a possibilidade de utilização de IL-6 salivar como marcador para diagnóstico.

Comparando os níveis séricos e salivares de IL-6, IL-1 β e TNF- α , em pacientes com CCEs orais e leucoplasias, Brailo *et al.* (2012) obtiveram concentrações mais altas de IL-6 e IL-1 β na saliva de indivíduos com CCEs do que em leucoplasias e no controle. Entretanto, não identificaram diferenças nos níveis séricos. Sugerem, então, que os níveis salivares de IL-6 podem ser usados como marcadores de evolução maligna em desordens potencialmente malignas orais. Resultado parcialmente concordante foi descrito por St John *et al.* (2004),

quando avaliou mRNAs e níveis proteicos de IL-6 em CCEs orais e de orofaringe, encontrando níveis aumentados dessa citocina em saliva e sangue.

Buscando identificar funcionamento da IL-6 em tecidos tumorais, Woods *et al.* (1998) constataram relação entre os níveis de IL-6 e IL-1 secretados por carcinomas de células escamosas orais, mostrando que IL-1 promove aumento da secreção de IL-6. Concluíram, ainda, que células que apresentam DNA de HPV ativo não alteram a expressão de IL-6.

Nakano *et al.* (1999) avaliaram expressão tumoral de IL-6 e TNF- α em CCEs orais, e observaram que havia uma concentração dessa interleucina em macrófagos do estroma tumoral e em células tumorais, principalmente na região de frente, sugerindo a produção de IL-6 pelas células tumorais. Em tumores mais extensos, os níveis de IL-6 apresentaram-se maiores. Também apontaram decréscimo nos níveis dessa citocina em pacientes que passaram por tratamentos efetivos com radiação ionizante ou quimioterápicos. Kayamori *et al.* (2010) confirmam que a IL-6 é produzida não somente por células tumorais, mas também pelas células estromais como fibroblastos e osteoclastos localizados na interface tumoral.

No trabalho de Wang, et al. (2002), níveis aumentados em tecidos tumorais tanto de IL-6R (quantificados através de imunistoquímica) quanto de níveis aumentados mRNAs de IL-6 (avaliados através de hibridização *in situ*), foram identificados em CCEs orais. A hiperexpressão de IL-6R foi associada aos tumores maiores e graus histológicos mais severos, enquanto maiores expressões de mRNA de IL-6 relacionaram-se com tumores que promoveram metástases linfonodais à distância e ao desenvolvimento de segundos tumores primários (WANG *et al.*, 2002).

Estudos de Shinriki *et al.* (2009) avaliaram o bloqueio de receptores de IL-6 em carcinomas orais e observaram que ocorria uma diminuição de angiogênese tumoral, podendo funcionar como alvo terapêutico. Em estudos subsequentes, demonstraram que alta expressão de IL-6, identificada através de imunistoquímica, estava associada a metástases linfonodais pela indução da transcrição do fator linfogiogênico VEGF-C, avaliado pelo método de PCR. Sugeriram, para tanto, que IL-6 agiria ativando a cascata PI3K-Akt, que aumentaria os níveis de mRNA de VEGF-C (SHINRIKI *et al.*, 2011).

Outro estudo avaliou a ação de tristetrapolina (TTP), uma molécula capaz de regular a ação de algumas citocinas, em CCEs de cabeça e pescoço. Para tanto, realizou *tissue microarray*, avaliando, através de imunistoquímica, fragmentos de tecido tumoral e normal de pacientes pré-tratamento. Encontrou correlação inversa ente imunomarcagem de IL-6 e

tristetrapolina, sendo que os pacientes com tumores mostrando alta marcação para IL-6 e baixa pra TTP apresentaram menor sobrevida. Ressalta, ainda, que alta marcação de IL-6 está envolvida na progressão desses tumores, estando relacionada com pior prognóstico e recorrência tumoral (VAN TUBERGEN *et al.*, 2011).

Jinno *et al.* (2015) analisaram a relação entre expressão tumoral de IL-6 em CCEs orais e progressão tumoral, quimiorresistência e prognóstico. No grupo em que se obtiveram altos níveis de marcação de IL-6, foi identificada maior prevalência de metástases linfonodais e à distância. Esses tumores manifestaram pior resposta à quimiorradioterapia pré-operatória e prognóstico desfavorável. Nos tumores que exibiam alto percentual de marcação para IL-6, foram detectados altos níveis de IL-6R e STAT3. Sugerem, assim, que IL-6 pode estar envolvida na resistência das células neoplásicas ao tratamento e que pode ser indicativo de resposta diminuída à quimiorradiação e prognóstico desfavorável. Estudo realizado previamente por outro grupo de pesquisadores detalhou o mecanismo de aumento de radiosensibilidade e sensibilidade ao 5-fluorouracil, utilizado como quimioterápico, mostrando relação direta entre resistência aos agentes terapêuticos e à produção de fatores de crescimento e pró-angiogênicos e IL-1, IL-6, IL-8, VEGF e MMP-9. Evidenciou, ainda, que quando há inibição de NFkappaB todos esses fatores tornam-se diminuídos e observa-se aumento da sensibilidade das células neoplásicas à quimiorradiação (TAMATANI *et al.*, 2004).

A ação da IL-6 como agente atuante na transição epitélio-mesênquima foi avaliada por Yadav *et al.* (2011). Nesse processo, há uma diminuição da adesão intercelular e da polaridade, resultando na capacidade de migração e invasão. O microambiente tumoral provavelmente exerce função importante na aquisição do fenótipo migratório. Ao realizar tratamento de culturas celulares com IL-6, houve aumento do marcador mesenquimal vimentina associado à diminuição de e-caderina, responsável pela adesão celular, através da via JAK/STAT. Por sua vez, quando há supressão de STAT3, esse processo mediado por IL-6 cessa. Estudo posterior realizado por Wu, *et al.* (2016) confirmou a ação de IL-6 na transição epitélio-mesênquima e que esta está envolvida diretamente na ativação das vias PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK e JAK/STAT3 (WU, *et al.*, 2016).

Gasche *et al.* (2011) estudaram o papel da inflamação mediada por IL-6 na metilação do DNA em CCEs orais. Após indução de IL-6, houve aumento na metilação em genes supressores tumorais, resultando em silenciamento e hipometilação global em LINE-1 (*long interspersed nucleotide element-1*).

Considerando que múltiplas vias estão envolvidas no desenvolvimento de neoplasias potencialmente malignas e malignas de cavidade oral bem como o fato de não estar claro o comportamento, do ponto de vista molecular, dos tecidos adjacentes às lesões displásias e câncer, fazem-se necessários estudos que busquem auxiliar na identificação destas desregulações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a associação entre os microRNAs miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31 e expressão de IL-6 e STAT3, em distúrbios orais potencialmente malignos, no carcinoma de células escamosas e campo de cancerização destes.

3.2 Objetivos específicos:

- quantificar a expressão de miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31 em carcinoma de células escamosas, displasias orais e região perilesional;
- correlacionar a expressão dos microRNA miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31 com variáveis clínicas e histopatológicas em carcinoma de células escamosas, displasias orais e região perilesional;
- quantificar o percentual e a intensidade de marcação de STAT3 e IL-6 e correlacioná-los às variáveis clínicas e histopatológicas em carcinoma de células escamosas e distúrbios potencialmente malignos orais;
- analisar a relação entre expressão de STAT3 e IL-6 em carcinomas de células escamosas e displasias orais;
- investigar a correlação entre miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31, STAT3 e IL-6 em carcinoma de células escamosas e displasias orais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos da pesquisa foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, obedecidas as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 466/12) do Conselho Nacional de Saúde, respeitando as normas éticas e os direitos dos pacientes.

Antes de iniciar a coleta, os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices A e B). Para os blocos arquivados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará, foi procedida assinatura de termo de fiel depositário pelo responsável pelo serviço (Apêndice C).

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará e aprovado sob protocolo 20778614.8.0000.5054.

4.2 Cálculo Amostral

Baseado no percentual do número de casos de CCE que apresentaram baixa expressão de microRNA da família miRNA-29c (75%) versus o número de casos com alta expressão desse microRNA (25%) (COUTINHO-CAMILLO *et al.*, 2015), em relação à mucosa normal, estimou-se serem necessários 23 casos de carcinomas de células escamosas e 23 casos de mucosa normal para obter uma amostra representativa com 90% de poder e 95% de confiança à hipótese nula do trabalho (método Fleiss com correção de continuidade). Tendo em vista que o presente estudo também objetivou avaliar desordens potencialmente malignas, acrescentaram-se 23 casos de displasias orais. Devido à escassez de trabalhos e de resultados extremamente conflitantes sobre a expressão de microRNAs no câncer de boca, os autores optaram por utilizar uma proporção de 2:1, sendo avaliados 46 casos de CCE.

4.3. Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes que apresentaram lesões de Displasia Epitelial (leucoplasia, eritroplasia ou queilite actínica) e Carcinoma de Células Escamosas Orais que procuraram as clínicas de Estomatologia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, com lesões apresentando mais de 1cm.

Para os controles, foram selecionados pacientes portadores de terceiros molares inferiores inclusos, sem história de fumo ou consumo de álcool e que passariam por exodontia desses elementos.

Os blocos histopatológicos confeccionados a partir das biópsias desses pacientes também foram utilizados para análise em hematoxilina e eosina e reação de imunohistoquímica.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa:

- pacientes que apresentaram lesões muito pequenas, cuja remoção de fragmento para análise molecular prejudicasse o exame histopatológico;
- pacientes que foram submetidos a tratamento prévio de radioterapia ou quimioterapia de cabeça e pescoço;
- blocos parafinados contendo fragmento tecidual não representativo da lesão ou com baixa qualidade de conservação;
- pacientes com história de pericoronarite, para aqueles selecionados como amostra de mucosa normal.

4.5 Critérios de retirada

Foram retirados da amostra:

- pacientes com diagnóstico clínico de leucoplasia apresentando ausência de displasia após análise histológica.

- lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica ou carcinoma de células escamosas e que apresentaram conclusão histopatológica diferente destas.
- fragmentos teciduais emblocados em parafina que não foram adequadamente fixados e que apresentaram coloração imunoistoquímica deficiente.
- blocos parafinados que não apresentavam remanescentes representativos da lesão.

4.6 Coleta das amostras

Foram coletados dois fragmentos de mucosa da região correspondente à lesão, sendo um fixado em formol neutro a 10% para análise histopatológica e outro conservado em RNA later® e armazenado em freezer -80° C. Do mesmo indivíduo, foi coletado, ainda, um fragmento de mucosa íntegra, distando 1 (um) centímetro da área lesional (carcinoma de células escamosas ou lesão potencialmente maligna), em local clinicamente saudável, o qual foi conservado em RNA later® e congelamento a -80° C.

Para o grupo controle foi coletada uma amostra proveniente da mucosa gengival de recobrimento de terceiros molares inferiores inclusos, sem história de pericoronarite, previamente ao procedimento de exodontia de terceiros molares. A amostra de tecido normal seguiu o mesmo protocolo de armazenamento, visando a manutenção da integridade do RNA presente.

No momento do exame inicial, foram anotados dados sobre fatores de risco para o desenvolvimento de lesões malignas intraorais como história de fumo, consumo de álcool, exposição à radiação solar e história de doenças sexualmente transmissíveis. Adicionalmente, informações sobre a localização da lesão, idade e sexo foram catalogadas. Para fins estatísticos, após coleta dos dados, a variável localização foi agrupada, de acordo com as lesões mais prevalentes em: 1. língua, 2. assoalho bucal e 3. rebordo alveolar, gengiva, fundo de sulco e palato. A variável idade também foi reunida em: mais de 60 anos e menos de 60 anos, tendo em vista a faixa etária de maior acometimento de CCEs orais. Quanto ao sexo, foi considerado masculino e feminino em todas as análises.

4.7 Análise Histopatológica

4.7.1 Técnica

A técnica para confecção de lâminas histológicas foi baseada no método preconizado por Junqueira e Carneiro (2013). Após fixação em formol a 10% por período mínimo de 24 horas, os tecidos coletados passaram por processamento histológico. Este consiste na clivagem do material a ser analisado, seguido por desidratação em gradiente alcoólico crescente (70%, 95%, 100%), diafanização com a utilização de xilol, infiltração por parafina, processo este realizado em histotécnico automatizado (PT05, Luptec®), finalizando com a inclusão da peça em blocos parafinados. Posteriormente, os blocos foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm e depositados sobre lâminas histológicas. Os cortes seguiram para estufa e, na sequência, para banhos em xilol, objetivando remover a parafina. Para reidratação, foram realizados banhos em gradiente alcoólico decrescente, após o qual passaram por coloração pelo método da hematoxilina-eosina. Concluída a coloração, os cortes passaram novamente pelo processo de desidratação e banhos em xilol, completando o processo com a montagem com bálsamo do Canadá e lamínula. Após confecção da lâmina, foi realizada análise microscópica para conclusão diagnóstica.

4.7.2 Avaliação

Para avaliação histológica, as lâminas foram examinadas, inicialmente, em microscópio óptico (Olympus CX 31, Olympus Corporation, Japão), utilizando-se aumentos de 200x e 400x.

Os carcinomas de células escamosas foram classificados, em relação ao grau de diferenciação, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado (BARNES *et al.*, 2005). Adicionalmente, foram coletados dados referentes ao padrão de infiltração tumoral, à presença de ceratinização e à presença de coilocitose, sinal sugestivo de presença de HPV. A coilocitose é visualizada por meio da coloração com hematoxilina-eosina em microscopia

óptica, nas células epiteliais com presença de núcleos picnóticos envoltos por halos claros (KOSS; DURFEE, 1956).

As lesões com diagnóstico clínico de potencialmente malignas coletadas foram avaliadas quanto à presença de displasia, sendo aquelas sem esta alteração removidas da amostra. As displasias foram classificadas em leve, moderada e severa, considerando as alterações arquiteturais e intensidade das atipias citológicas encontradas nos fragmentos coletados. Quando as alterações celulares apresentaram-se em camada basal e parabasal, foram classificadas como leve; quando se estendiam até a camada média, foram classificadas como moderadas; e quando ocupavam todo o epitélio, foram classificadas como severas (BARNES *et al.*, 2005). Informações sobre a presença e intensidade de inflamação subepitelial também foram observadas.

4.8 Análise molecular

4.8.1 Técnica

4.8.1.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído seguindo as orientações do protocolo do kit de extração High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science®).

Foram adicionados 50 mg de tecido congelado e 400 µl de *Binding Buffer* a 20% em um microtubo estéril, seguindo o conjunto para centrifugação por dois minutos em máxima velocidade. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo estéril. Colheram-se 150 µl de material previamente preparado ao qual foram adicionados 312 µl de *Binding Buffer*, passando a mistura por rápida homogeneização em vortex. Na sequência, foram acrescentados 200 µl de *Binding Enhancer*, passando, em seguida, por vortex em três vezes de cinco segundos. Após adaptação do *High pure filter tube* a um tubo de 2 ml, foi pipetado todo o material na parte superior e, em seguida, centrifugado por trinta segundos a 13.000 g, descartando-se o sobrenadante. Duas doses seguidas de *Washing Buffer* foram acrescentadas,

sendo a primeira de 500 μl e a segunda de 300 μl , seguidas por centrifugação por trinta segundos a 13.000 g e descarte do sobrenadante. Finalmente, foi procedida nova centrifugação por um minuto, com finalidade de promover a secagem total do filtro. Um microtubo de 1,5 ml com *High pure filter tube* recebeu o produto total e, a ele, foram agregados 50 μl de *Elution Buffer*, sendo o conjunto incubado em temperatura de 20°C por um minuto. Em seguida, a amostra foi centrifugada durante um minuto e, ao final, foi obtido o RNA total.

Finalizado o processo de extração, foi realizada a quantificação do RNA extraído, sendo suas concentrações determinadas no equipamento Qubit[®]2.0 (Life Technologies, Foster City, CA, US). O RNA total extraído foi diluído em água livre de RNase para concentração final de 5 ng/ μL e armazenado a -80°C.

4.8.1.2 PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

A quantificação de miRNAs por RT-PCR ocorre em dois passos:

1) reação de Transcriptase Reversa, a qual converte o RNA em cDNA (DNA complementar) específico à região de interesse utilizando um de primer RT, o qual possui um stem-loop que se liga à porção 3' da molécula de miRNA e é transcrita reversamente (cDNA);

2) amplificação de moléculas por reação em cadeia de polimerase com sondas Taqman.

1) Reação de Transcriptase Reversa

Para reação de Transcrição Reversa (TR), foi utilizado o kit TaqMan[®] Micro-RNA RT (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante, avaliando miR-29c, miR-17, miR-31 e miR-10a. Para cada 15 μL de transcriptase, foram adicionados 3 μL de *primer*, 5 μL de amostras de RNA e 7 μL de solução Master Mix (tabela 1), sendo o preparado levado para termociclador (tabela 2). O produto da Transcriptase Reversa (cDNA) foi estocado a -20°C para o uso subsequente.

Tabela 1- Componentes do Master Mix para reação de Transcriptase Reversa

Componentes do Master Mix	Quantidade (15 µl reação).
100mMdNTPs (com dTTP)	0.15
multiScriber™ Transcriptase Reversa 50 U/µL	1.00
Tampão 10X Transcriptase Reverse	1.50
Inibidor de Rnase a 20 U/µL	0.19
Água livre de nuclease	4.16
Volume total	7.00

Fonte: AppliedBiosystems

Tabela 2 - Discriminação dos tempos e temperaturas programados no termociclador

Etapas	Tempo	Temperatura (°C)
Desnaturação	30	16
Hibridização	30	42
Elongação	5	85
Resfriamento	∞	4

Fonte: AppliedBiosystems

2) Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

Para a reação de PCR, os cDNAs foram diluídos a 5 ng e submetidos à reação de amplificação para análise dos miRNAs com sondas e reagentes TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), utilizando-se o equipamento Rotor-Gene Q (QIAGEN). Todas as reações foram executadas em triplicata em um mesmo momento. O RNA sintético RNU6B (Splicing de pre-mRNAs) (Applied Biosystem, Foster City, CA) foi utilizado como endógeno, a fim de propiciar uma quantificação relativa, corrigindo variações na eficiência da reação e promovendo a normatização dos resultados (GEE *et al.*, 2011). Cada reação contou com uma amostra sem RNA para avaliar possível contaminação. Os testes foram realizados em triplicata para cada amostra, utilizando-se como dado final a média dos 3 *Cycle Thresholds* (CT).

4.8.1.3 Imunoistoquímica

4.8.1.3.1 Interleucina -6

Após desparafinização em estufa a 65°C por uma hora, os cortes foram reidratados em série crescente de álcool até lavagem em água corrente. A recuperação antigênica se fez por calor em micro-ondas, durante vinte minutos, em solução de citrato pH 6.0. Após lavagens com tampão fosfato-salino (*Phosphate buffer saline* – PBS), realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS. Após lavagens, realizou-se a incubação com o anticorpo primário anti-IL-6 (Abcam), na diluição 1:20, durante oito horas. Em seguida, procederam-se lavagens com PBS e incubação com anticorpo biotilado anti-rabbit-mouse (Nichei) por vinte minutos e complexo biotina-peroxidase (Abcam) por mais vinte minutos. Após lavagens subsequentes, as amostras foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina (DAB) por cinco minutos, contracoradas com hematoxilina de Harris por dez segundos, desidratadas e montadas com Enthelan. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de linfonodo e, como controle negativo, a supressão do anticorpo primário da reação.

4.8.1.3.2 STAT3

Inicialmente, realizou-se o processo de desparafinização em estufa a 65°C por uma hora, seguido de reidratação em gradiente alcoólico crescente até lavagem em água corrente. A

recuperação antigênica foi realizada pelo calor, em panela de pressão, utilizando-se como tampão o citrato (pH 6). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3%, por dez minutos. A reação de imunistoquímica foi realizada pelo método semiautomatizado, utilizando-se o equipamento Leica Bond Max. O anticorpo primário utilizado foi o phospho-STAT3 (ThermoFisher®, policlonal), na diluição 1:800, por trinta minutos. Após lavagens, foi realizada incubação do primeiro passo do sistema de polímero (Bond Polymer Refine Detection, DS9800, Leica®) por dez minutos, seguida do segundo passo por dez minutos. A revelação da reação foi realizada com DAB por dez minutos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por dez minutos, seguidas de lavagem com água por cinco minutos. Foi finalizado o processo com a montagem de lâminas utilizando Enthelan. Como controle positivo da reação, foi utilizada adenocarcinoma de cólon e, como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário, seguindo o mesmo protocolo previamente descrito.

4.8.2 Avaliação molecular

4.8.2.1 Avaliação imunistoquímica

Inicialmente, imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, câmera (DFC 295) acoplada a microscópio de luz (Leica® DM 200). A princípio, foi realizada uma varredura inicial do tumor, utilizando pequeno aumento (40 vezes), com a finalidade de identificar as zonas de maior marcação. Em seguida, utilizando aumento de 200 vezes, foram selecionados cinco campos aleatórios em cada amostra e capturadas imagens digitais coloridas dos campos escolhidos. As imagens foram armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP).

A imunistoquímica para IL-6 foi classificada em positiva ou negativa, com base na metodologia utilizada por Kamperos *et al.* (2016).

Para análise de STAT3 foram quantificadas as células marcadas pelo anticorpo, avaliando o local de marcação, se nuclear ou citoplasmática, com o auxílio do software ImageJ (Figura 9). Também foram computadas as células negativas para cálculo do percentual de células marcadas em relação ao total de células e aquisição do *Label Index* (LI). O percentual de marcação total (nuclear + citoplasmática) foi, então, classificado em escores (0-10% = escore 0; 11-30% = escore 1; 31-50% = escore 2; 51-70% = escore 3; 71-100% = escore 4). Também foi

avaliada a intensidade de marcação em cada caso e classificada em negativa (escore 0), leve (escore 1), moderada (escore 2) ou intensa (escore 3). Após a aquisição dos escores de percentual e intensidade, foi realizada a soma dos escores, sendo considerada marcação positiva a lesão com escore total maior ou igual a 3 (MACHA *et al.*, 2011). Nas displasias, foram quantificadas células positivas e negativas somente nas camadas que apresentavam alterações citoarquiteturais, sendo procedida análise em displasias leves nas camadas basal e parabasal; em displasia moderada até a camada média; e em displasias severas foi quantificada toda a extensão do epitélio.

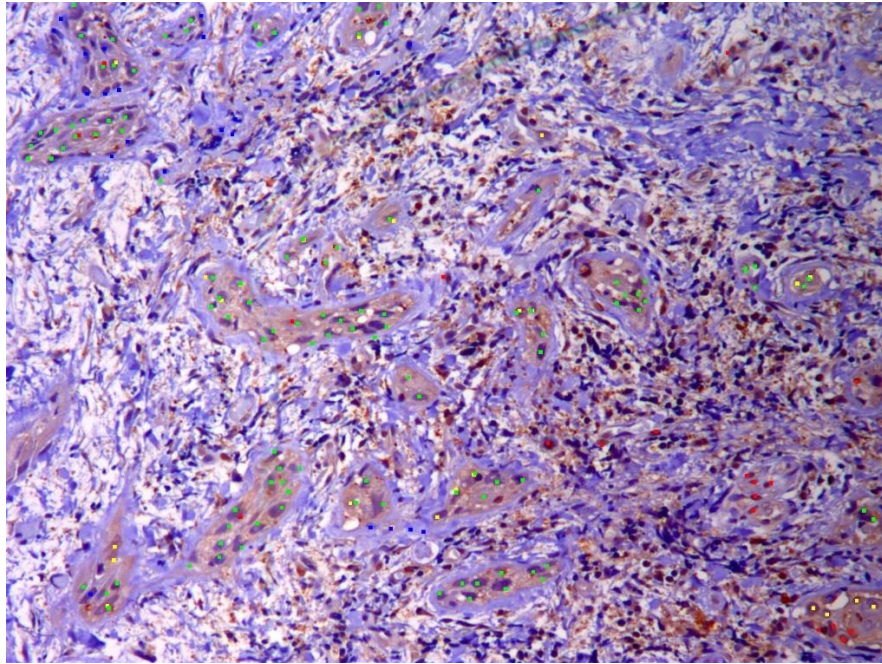
4.8.2.2 Avaliação de miRNAs

Os dados dos microRNA foram avaliados de duas formas distintas:

- 1- comparação entre ΔC_t de tecido normal, perilesão e lesão;
- 2- comparação de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ entre lesões e perilesão.

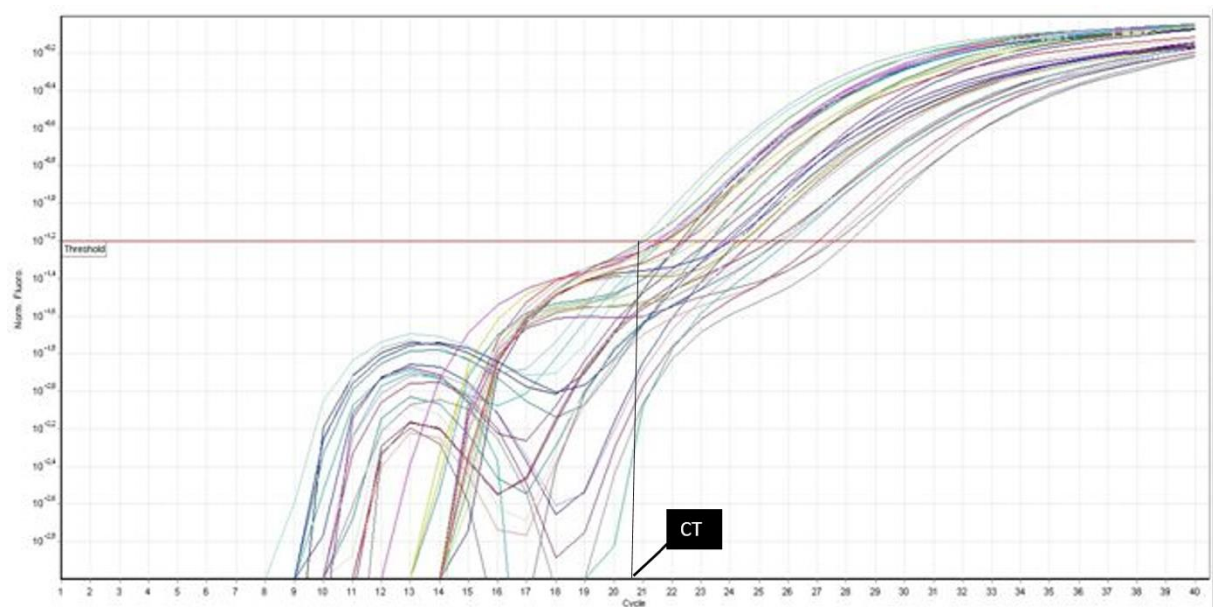
Inicialmente, os valores dos CTs que correspondem ao número de ciclos em que a quantidade de DNA amplificado atinge quantidade suficiente para emitir fluorescência acima do valor pré-determinado para o grupo de amostras (Figura 10) foram quantificados em relação a RNU6b, utilizado como RNA endógeno padrão. O ΔC_t foi, então, calculado através do CT da amostra diminuída do CT do RNU6b no mesmo tecido, gerando um dado normalizado ($\Delta C_t = C_t$ expressão do gene no tecido lesional $- C_t$ expressão do gene controle, RNU6b, no mesmo tecido). Esse valor foi utilizado para realização da primeira estatística.

Figura 9 - Contagem de células marcadas e não marcadas com auxílio do software ImageJ



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - Curva de PCR evidenciando CT da primeira amostra a amplificar



Fonte: Elaborado pelo autor

Objetivando avaliar o fold change, que determina quantas vezes o microRNA avaliado está aumentado ou diminuído em relação ao tecido normal, foi realizado o cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para tal análise, foi calculada a média de todos os ΔCt s do grupo

tumor/displasia/perilesão diminuídos do Δ CT do tecido normal do mesmo gene (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2016; PFAFFL, 2001).

4.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para Windows, considerando uma confiança de 95% para todas as avaliações.

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. Os dados quantitativos foram analisados por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média e desvio-padrão, comparados por meio do teste de Mann-Whitney e correlacionados por meio da correlação de Spearman (dados não paramétricos).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínico-patológica

No presente estudo, foram coletados um total de 21 displasias epiteliais orais (DEOs), 47 carcinomas de células escamosas (CCEs) e 21 amostras de tecido controle. Dos CCEs levantados, 43 (91,5%) eram moderadamente diferenciados e apenas quatro (9,5%) bem diferenciados. Das displasias, 11 (52%) foram classificadas como leve, sete (33,3%) moderadas e três (14,7%) severas.

Avaliando o padrão de infiltração dos carcinomas através da microscopia óptica em lâminas coradas pela técnica da hematoxilina-eosina, 27 (73,7%) apresentavam-se em lençóis ou ninhos, enquanto dez (26,3%) exibiam padrão cordonal. Dos CCEs, 17 (47,4%) eram ceratinizantes e vinte (52,6%) não produziam ceratina.

A presença de inflamação subepitelial nas displasias também foi avaliada, estando ausente em um caso (6,3%), leve em seis casos (37,5%), moderada em dois casos (12,5%) e intensa em sete (43,8%).

Com relação ao sítio de localização das lesões, a maior parte dos CCEs (44,7%) apresentava-se em língua, assim como as displasias (47,6%). Outros sítios de localização das lesões foram gengiva, rebordo alveolar, palato duro, fundo de sulco e assoalho.

A idade média dos pacientes estudados nos três grupos foi de 52 ± 21 anos (mediana = 57 anos, mínima = 16, máxima = 84).

Com relação ao sexo, no grupo CCE, 32 (67,3%) pacientes eram do sexo masculino e 15 (32,7%) do sexo feminino; no grupo displasias, havia 12 mulheres (57,1%) e nove homens (42,9%). No grupo-controle, 12 amostras pertenciam ao sexo masculino (57,1%) e nove ao sexo feminino (42,9%),

O fumo foi um fator de risco observado em 38 pacientes (77,6%) portadores de CCEs e 18 (85,7%) de displasias. Com relação ao consumo de álcool, 19 pacientes (38,8%) apresentando CCE e dez (47,6%) do grupo displasia faziam uso de bebidas alcoólicas. A presença de sinais histológicos sugestivos de presença HPV foi observada em sete (14,3%) CCEs e duas (10%) displasias. A exposição solar intensa foi relatada por três (6,1%) dos pacientes portadores de CCE. Os dados expostos encontram-se sintetizados na tabela 3.

Tabela 3 – Perfil das amostras de CCE e displasias em relação às variáveis clínicas de localização, sexo, idade e exposição a fatores de risco

	Lesão		p-Valor
	CCE	Displasia	
Localização			
Língua	21 44,7%	10 47,6%	^a 0,073
Rebordo/gengiva/fundo de Sulco /palato	12 25,5%	5 23,8%	
Mucosa Jugal/Mucosa Labial	5 10,6%	6 28,6%	
Assoalho bucal	9 19,1%	0 ,0%	
Sexo			
Feminino	15 32,7%	12 57,1%	^a 0,055
Masculino	32 67,3%	9 42,9%	
Exposição a fatores de risco			
Fumo	38 77,6%	18 85,7%	^a 0,434
Álcool	19 38,8%	10 47,6%	
Exposição solar	3 6,1%	0 ,0%	^a 0,549
Coilocitose	7 14,3%	2 10,0%	
Idade	61,70±14,20	57,70±13,52	^b 0,748

p<0,05; ^ateste exato de Fisher ou qui-quadrado (frequência absoluta e percentual); ^bTeste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

5.2 Avaliação dos miRNAs

5.2.1 – Avaliação de miRNAs pela variação de ΔC_t s

A expressão de miR-31 mostrou-se significativamente aumentada nos CCEs (3,56±0,51) e nas displasias orais (3,87±0,49) em relação ao grupo controle (-0,10±0,80) (p<0,001). Com relação ao miR-17, houve aumento significativo gradual de sua expressão do grupo controle (2,31±0,62) para a displasia (4,59±0,43) e para o CCE (7,11±0,47) (p<0,001). O miR-10a mostrou-se hipoexpresso, porém com aumento em sua expressão no grupo das displasias epiteliais (-0,83±0,52) e do CCE (-0,79±0,32) em relação ao grupo controle (-4,04±0,57). Já o miR-29c não mostrou diferença significativa entre o grupo controle

(+0,51±0,55) e as displasias (+0,24±0,63), mas os CCEs (+2,06±0,32) mostraram-se significativamente com maior expressão que ambos os grupos (p=0,006) (Tabela 4).

Tabela 4 - Variação de microRNAs nos grupos-controle, displasia e carcinoma de células escamosas orais

	Controle	Displasia	Neoplasia	p-Valor
miR 31	-0,10±0,80	+3,87±0,49*	+3,56±0,51*	<0,001
miR 17	+2,31±0,62	+4,59±0,43*	+7,11±0,47*†	<0,001
miR 10a	-4,04±0,57	-0,83±0,52*	-0,79±0,32*	<0,001
miR 29c	+0,51±0,55	+0,24±0,63	+2,06±0,32*†	0,006

*p<0,05 versus Controle; †p<0,05 versus Displasia. ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

No grupo CCE, não houve diferença significativa entre a expressão de miR-31 (p=0,830), miR-17 (p=0,495), miR-10a (p=0,210) e miR-29c (p=0,309) entre lesão e perilesão. No grupo de displasias, apesar de igualmente não haver diferença entre a expressão perilesional ou lesional dos miR-31 (p=0,618) e miR10a (p=0,167), houve aumento da expressão de miR17 e miR29c no tecido perilesional (+6,52±0,28 e +2,19±0,52, respectivamente) em relação ao tecido lesional (+4,59±0,43 e +0,24±0,63, respectivamente) (p=0,003 e p=0,038, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantificação de miRNAs em tecidos lesionais e perilesionais de displasias e carcinomas de células escamosas orais

	Displasia			CCE		
	Perilesão	Lesão	p-Valor	Perilesão	Lesão	p-Valor
miR 31	+3,33±1,11	+3,87±0,49	0,618	+3,38±0,51	+3,56±0,51	0,830
miR 17	+6,52±0,28	+4,59±0,43	0,003	+6,59±0,42	+7,11±0,47	0,495
miR 10a	+0,27±0,52	-0,83±0,52	0,167	-0,07±0,46	-0,79±0,32	0,210
miR 29c	+2,19±0,52	+0,24±0,63	0,038	+2,85±0,91	+2,06±0,32	0,309

*p<0,05, teste t de Student (Média±EPM).

5.2.2- Avaliação de microRNAs pelo método 2^{-ΔΔCt}

Os miRNAs miR-17, miR-31, miR-29c e miR-10a encontram-se hiperexpressos em relação ao tecido normal tanto em CCEs quanto em displasias orais. Houve aumento estatisticamente significativo de miR-17 (6,5 vezes aumentado) e miR-29c (4,8 vezes aumentado) no CCE em relação ao grupo de displasias (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de expressão de miRNAs em CCEs e displasias orais em relação ao "fold change"

miRNA	Lesão		p-Valor
	CCE	Displasia	
miR- 17	51,27±82,00	7,80±6,03	0,005*
miR- 31	51,60±89,40	33,61±28,39	0,526
miR- 29c	7,49±14,33	1,55±2,39	0,014*
miR- 10a	16,36±35,24	43,58±64,92	0,528

*p<0,05; Teste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

Avaliando o comportamento do tecido clinicamente saudável perilesional de displasias, com exceção de miR-17, não houve diferença entre tecidos perilesionais e lesões, mostrando comportamento molecular semelhante a despeito das diferenças clínicas. O miR-17 mostrou-se 23 vezes aumentado em região de perilesão das displasias e 7,8 vezes maior na lesão de displasia, quando comparados com o tecido normal. Verificou-se que no miR-17, há um incremento de sua expressão em áreas clinicamente saudáveis (perilesão) seguido de uma diminuição da expressão quando a lesão displásica já é observada clinicamente. Contudo, ressalta-se que, ainda há aumento em relação ao tecido normal. Enfatiza-se que no grupo CCE, este microRNA apresenta-se hiperexpresso, tanto em áreas de lesão (51,27±82,00) como perilesão (47,84±89,85) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7- Perfil de expressão de microRNAs em lesões e tecido perilesional de CCE e displasia oral em relação ao "fold change"

	Lesão	Perilesão	p-Valor
CCE			
miR- 17	51,27±82,00	47,84±89,85	^a 0,940
miR- 31	51,60±89,40	23,12±30,81	^a 0,444
miR- 29c	7,49±14,33	25,76±70,38	^a 0,553
miR- 10a	16,36±35,24	31,96±52,47	^a 0,423
Displasia			
miR- 17	7,80±6,03	23,53±19,34	^a0,024*
miR- 31	33,61±28,39	67,73±59,44	^a 0,297
miR- 29c	1,55±2,39	3,97±6,61	^a 0,257
miR- 10a	43,58±64,92	60,70±70,84	^a 0,267

*p<0,05; ^aTeste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

O padrão de crescimento tumoral também não mostrou diferença em relação à expressão de microRNA (Tabela 8). Idade, sexo, fumo, álcool, alterações morfológicas

sugestivas de presença HPV ou gradação histológica não alteraram a expressão dos miRNAs estudados nos CCEs. Avaliando as displasias, houve maior expressão de miR-29c em lesões de displasia localizadas em língua do que naquelas que se desenvolveram em outros sítios. Entretanto, não houve diferença entre os miRNAs estudados e as demais variáveis clínicas (Tabela 9).

Tabela 8 - Expressão de microRNAs em relação ao padrão de crescimento tumoral

miRNA	Crescimento tumoral		p-Valor
	Lençóis/Ninhos	Cordões	
17	47,56±82,02	37,55±32,27	0,862
31c	65,32±100,91	17,65±30,57	0,298
29c	6,31±13,61	2,28±1,54	0,912
10a	18,97±42,91	4,15±6,05	0,110

p<0,05; Teste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

Tabela 9 - Influência dos dados clínicos no perfil de expressão de microRNAs em displasias epiteliais orais e carcinoma de células escamosas orais.

	Displasia				Neoplasia			
	miR 31	miR 17	miR 10a	miR 29c	miR 31	miR 17	miR 10a	miR 29c
Idade								
Até 60 anos	+2,98±1,15	+3,85±1,01	-0,95±1,05	+0,85±0,84	+3,82±0,87	+6,51±0,85	-0,58±0,42	+2,30±0,48
> 60 anos	+4,39±0,36	+5,03±0,32	-0,77±0,59	-0,12±0,88	+3,43±0,64	+7,40±0,56	-0,90±0,44	+1,95±0,41
p-Valor	0,167	0,192	0,870	0,474	0,719	0,377	0,653	0,610
Sexo								
Masculino	+4,09±0,85	+4,49±0,35	-0,84±0,53	+0,72±0,59	+3,79±0,60	+7,64±0,57	-0,77±0,43	+2,23±0,44
Feminino	+3,75±0,62	+4,65±0,66	0,83±0,79	0,04±0,95	+3,10±0,95	+6,04±0,76	0,85±0,46	+1,73±0,38
p-Valor	0,747	0,863	0,993	0,576	0,527	0,106	0,908	0,466
Fumo								
Sim	+4,31±0,60	+4,52±0,56	-0,42±0,72	+0,82±0,70	+3,45±0,53	+7,40±0,54	-0,90±0,40	+2,04±0,39
Não	+2,93±0,78	+4,75±0,68	-1,73±0,38	-1,02±1,24	+3,99±1,44	+5,95±0,78	-0,37±0,35	+2,14±0,28
p-Valor	0,195	0,807	0,256	0,183	0,677	0,218	0,52	0,907
Álcool								
Sim	+4,16±1,19	+3,85±1,04	-0,79±1,04	+0,73±0,57	+3,25±0,80	+7,87±0,79	-0,63±0,62	+2,66±0,43
Não	+3,74±0,50	+4,94±0,41	-0,85±0,63	+0,01±0,89	+3,79±0,67	+6,55±0,55	-0,91±0,35	+1,62±0,44
p-Valor	0,702	0,249	0,959	0,612	0,603	0,164	0,676	0,105
Coilocitose								
Sim	+1,50±3,24	+1,60±2,71	-2,12±2,02	+1,37±1,35	+2,47±1,34	+7,50±0,73	-0,02±0,76	+2,35±1,10
Não	+4,15±0,42	+4,94±0,32	-0,68±0,55	+0,11±0,69	+3,76±0,55	+7,03±0,54	-0,94±0,36	+2,01±0,32
p-Valor	0,561	0,431	0,414	0,555	0,365	0,719	0,309	0,704
Gradação								
Grau 1 ^a	+4,20±0,51	+4,70±0,54	-0,30±1,04	0,30±1,10	+0,90±1,80	+6,57±1,44	0,98±0,83	+1,80±1,06
Grau 2 ^b	+5,29±0,45	+5,27±0,29	-0,25±0,96	+0,60±1,13	+3,70±0,52	+7,15±0,51	-0,86±0,35	+2,08±0,34
p-Valor	0,138	0,357	0,972	0,584	0,218	0,727	0,921	0,806
Localização								
Língua	+5,04±0,26	+5,15±0,45	+0,35±0,87	+1,91±0,79*	+3,72±0,79	+7,43±0,87	0,22±0,58	+2,28±,47
Mucosa	+3,61±0,70	+4,54±0,49	1,32±0,80	0,72±1,12	+4,49±2,47	+6,56±1,35	1,26±0,44	+0,81±,97
Outros	+2,73±1,58	+3,87±1,73	1,52±1,02	0,10±0,38	+2,99±0,71	+6,99±0,64	0,98±0,43	+2,39±,46
p-Valor	0,458	0,810	0,380	0,044	0,658	0,856	0,470	0,368

*p<0,05, teste t de Student ou ANOVA/Bonferroni; Média±EPM;

^aGrau 1: CCE = bem diferenciado, displasia = leve;

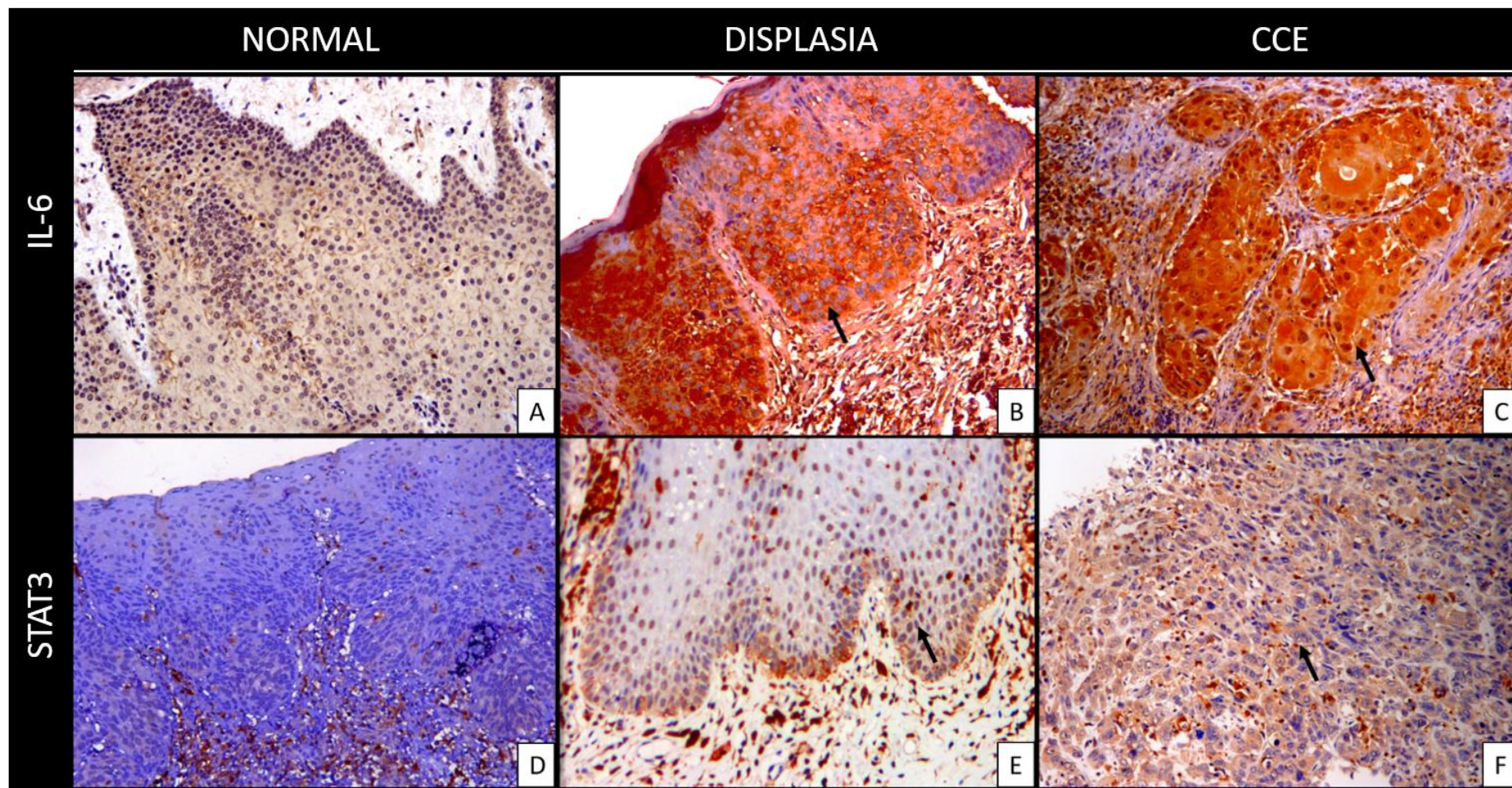
^vGrau 2: CCE = moderadamente diferenciado, displasia = moderada ou severa

5.3 Imunoistoquímica

Com relação à imunoexpressão de IL-6, houve marcação intensa em todas as amostras de displasia e carcinoma, sendo que 28,2% dos CCEs e 17,6% das displasias apresentaram marcação multifocal, enquanto as demais amostras mostraram marcação positiva difusa (Tabela 10) (Figura 11).

A marcação para STAT3 foi positiva em 33 amostras de CCE (84,6%) e 15 amostras de displasia (88,2%). Houve marcação citoplasmática mais frequentemente do que expressão nuclear tanto em CCEs como em displasias. Com relação aos escores de marcação, foram encontrados valores de dois a seis, não havendo diferença entre CCEs e displasias (Tabela 10). A intensidade de marcação variou de leve a moderada, mostrando-se leve na maioria dos CCEs (89%) e displasias (81,2%). Não houve diferença entre as variáveis sexo, idade ou fumo (Tabela 11), gradação histológica (Tabela 12) ou indícios morfológicos sugestivos de HPV (Tabela 13) no perfil de marcação de STAT3. Com relação ao padrão de crescimento tumoral, foi encontrado maior percentual de imunomarcação citoplasmática em CCEs que apresentavam invasão cordonal do que naqueles que se arranjavam em ninhos ou lençóis (Tabela 14).

Figura 11 - Painel de imunomarcação dos anticorpos IL-6 e STAT3 em mucosa normal, displasias e CCEs



Marcação de IL-6 e STAT3 em mucosa normal (A e D, respectivamente), displasia (B e E, respectivamente) e CCE (C e F, respectivamente). Setas indicam células positivamente marcadas. Aumento de 200x. Fonte: Elaborada pelo.

Tabela 10 - Perfil microscópico e imunoistoquímico de amostras de CCE e displasia oral.

	Lesão		p-Valor
	CCE	Displasia	
IL6			
Positivo multifocal	11 28,2%	3 17,6%	^a 0,401
Positivo difuso	28 71,8%	14 82,4%	
STAT3 (escore de marcação)			
Positivo	33 84,6%	15 88,2%	^a 1,000
Negativo	6 15,4%	2 11,8%	
STAT3 escore			
2	6 15,4%	2 11,8%	^a 0,067
3	7 17,9%	0 ,0%	
4	7 17,9%	9 52,9%	
5	15 38,5%	5 29,4%	
6	4 10,3%	1 5,9%	
STAT3 citoplasma (%)	59,21±28,43	56,30±28,55	
STAT3 núcleo (%)	7,21±12,80	6,90±10,99	^b 0,950

*p<0,05; ^ateste exato de Fisher ou qui-quadrado (frequência absoluta e percentual); ^bTeste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

Tabela 11 - Imunomarcção de STAT3 em CCEs e displasias relacionadas às variáveis clínicas sexo e idade

	CCE		Displasia	
	Lesão	<i>p-Valor</i>	Lesão	<i>p-Valor</i>
STAT3 citoplasma				
Feminino	41,43±27,05	1,000	62,17±26,03	1,000
Masculino	62,64±26,58	1,000	47,50±33,83	1,000
<i>p-Valor</i>	0,050		0,050	
STAT3 núcleo				
Feminino	11,43±15,97	1,000	4,17±9,72	1,000
Masculino	6,95±12,79	1,000	11,00±12,94	1,000
<i>p-Valor</i>	0,095		0,095	
STAT3 citoplasma				
Até 60 anos	61,65±26,82	1,000	54,67±32,59	1,000
Mais de 60 anos	51,67±29,25	1,000	58,75±25,72	1,000
<i>p-Valor</i>	0,213		0,963	
STAT3 núcleo				
Até 60 anos	6,71±14,15	1,000	11,33±12,58	1,000
Mais de 60 anos	9,92±12,77	1,000	0,25±0,50	1,000
STAT3 citoplasma				
Não fuma	63,20±27,98	1,000	52,33±28,85	1,000
Fuma	56,33±28,20	1,000	53,33±28,60	1,000
<i>p-Valor</i>	0,440		0,441	
STAT3 núcleo				
Não fuma	6,20±7,16	1,000	14,25±10,69	1,000
Fuma	8,42±14,51	1,000	7,67±11,37	1,000

p<0,05; ^aTeste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

Tabela 12 - Perfil de escore de marcação de STAT3 em relação à gradação histológica

	Gradação_CCE			<i>p-Valor</i>	Gradação_Displasia			<i>p-Valor</i>
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado			Leve	Moderada	Severa	
STAT3								
Positivo	2 66,7%	31 83,7%		^a 0,421	7 77,8%	4 100,0%	4 100,0%	^a 0,365
Negativo	1 33,3%	6 16,3%			2 22,2%	0 ,0%	0 ,0%	

p<0,05; ^ateste exato de Fisher ou qui-quadrado (frequência absoluta e percentual).

Tabela 13 – Perfil dos escores de marcação de STAT3 para CCEs com presença de coilocitose

	CCE	
	Coilocitose (-)	Coilocitose (+)
STAT3		
Positivo	30 85,7%	3 75,0%
Negativo	5 14,3%	1 25,0%

Teste exato de Fisher ou qui-quadrado (frequência absoluta e percentual).

Tabela 14 – Escores de marcação de STAT3 em relação ao padrão de crescimento tumoral

	Crescimento		p-Valor
	Lençóis/Ninhos	Cordões	
STAT3			
Positivo	22 75,8%	10 100,0%	^a 0,162
Negativo	7 24,2%	0 ,0%	
STAT3			
Citoplasma	51,40±28,45	72,20±24,32	^b 0,048*
Núcleo	7,00±11,68	6,70±13,96	^b 0,203

*p<0,05; ^ateste exato de Fisher ou qui-quadrado (frequência absoluta e percentual); ^bTeste Mann-Whitney, (média±desvio-padrão).

5.4 – Correlação entre microRNAs, STAT3 e IL-6

Observou-se correlação positiva em CCEs orais, entre marcação multifocal de IL-6 e miR-10a. Além disso, miR-31, miR-17, miR-29c e 10a apresentaram correlação positiva entre si. A marcação citoplasmática de STAT3 correlacionou-se positivamente com graus histológicos maiores, enquanto a marcação nuclear deste correlacionou-se negativamente. Não foi possível correlacionar STAT3 e IL-6 nas neoplasias malignas estudadas.

Em região de perilesão de CCEs orais, foi encontrada correlação positiva entre microRNAs 31 e 17 e entre miR-29c e miR-10a enquanto, em região perilesional de displasia, houve correlação apenas entre miR-29c e miR-10a (Tabela 15).

Avaliando o comportamento desses microRNAs em displasias orais, observou-se correlação positiva entre miR-31 e miR-17 e miR-10a, miR-17 e miR-29c. Não houve correlação entre imunomarcagem de STAT3 e IL-6 e microRNAs, nas amostras de displasia analisadas (Tabela 16). Adicionalmente, houve correlação positiva entre displasias e aumento expressão de miR-31, mostrando elevação crescente deste microRNA à medida que se observava aumento do grau histológico.

O comportamento dos microRNA, STAT3 e IL-6 em displasias e carcinomas está esquematizado na figura 12.

Tabela 15 - Correlação entre microRNA 17, 31, 29c e 10a em região perilesional de CCE e de displasias

		CCE perilesão				Displasia perilesão			
		miR 17	miR 31	miR 29c	miR 10a	miR 17	miR 31	miR 29c	miR 10a
miR 17	<i>r</i>	-	0,560*	0,332	-0,158	-	0,452	0,048	0,429
	<i>p-Valor</i>	-	0,008	0,141	0,493	-	0,260	0,910	0,289
miR 31	<i>r</i>	-	-	0,003	-0,069	-	-	0,263	0,310
	<i>p-Valor</i>	-	-	0,991	0,767	-	-	0,528	0,456
miR 29c	<i>r</i>	-	-	-	0,453*	-	-	-	0,778*
	<i>p-Valor</i>	-	-	-	0,039	-	-	-	0,023
miR 10a	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>p-Valor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

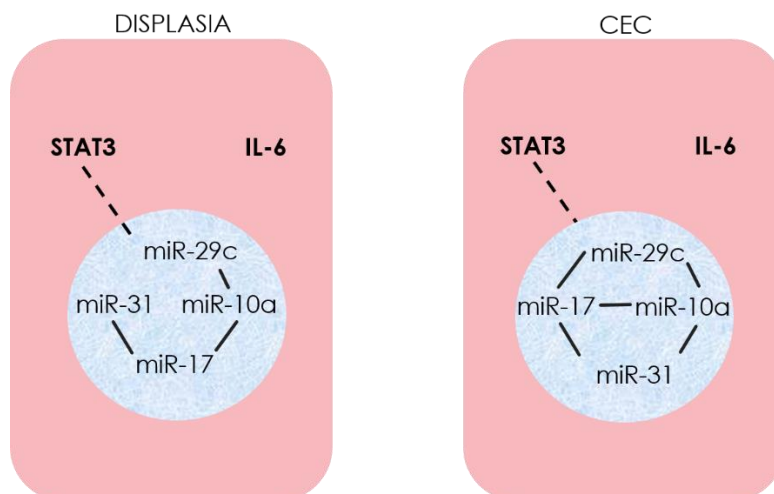
* $p < 0,05$; Correlação de Spearman.

Tabela 16 - Correlação das características moleculares e imunoistoquímicas das amostras de lesão de CCE e displasia oral

		CCE Lesão					Displasia Lesão						
		STAT3	miR-17	miR-31	miR-29c	miR-10a	Gradação histológica	STAT3	miR-17	miR-31	miR-29c	miR-10a	Gradação histológica
STAT3	<i>r</i>	-	0,045	-0,031	0,029	0,234	-0,138	-	0,348	0,348	0,261	0,435	-0,328
	<i>p-Valor</i>	-	0,814	0,868	0,872	0,190	0,416	-	0,324	0,324	0,466	0,209	0,199
miR 17	<i>r</i>	-	-	0,341*	0,520*	0,356*	0,045	-	-	0,578*	0,415	0,723*	0,498
	<i>p-Valor</i>	-	-	0,034	0,001	0,024	0,785	-	-	0,030	0,140	0,003	0,059
miR 31	<i>r</i>	-	-	-	0,037	0,346*	0,222	-	-	-	0,389	0,437	0,711*
	<i>p-Valor</i>	-	-	-	0,816	0,025	0,162	-	-	-	0,169	0,118	0,003
miR 29c	<i>r</i>	-	-	-	-	0,616*	0,100	-	-	-	-	0,807*	0,370
	<i>p-Valor</i>	-	-	-	-	<0,001	0,527	-	-	-	-	<0,001	0,175
miR 10a	<i>r</i>	-	-	-	-	-	0,020	-	-	-	-	-	0,339
	<i>p-Valor</i>	-	-	-	-	-	0,900	-	-	-	-	-	0,216

* $p < 0,05$; ^aCorrelação de Spearman.

Figura 12 - Síntese esquemática da correlação entre microRNAs, STAT3 e IL-6 das amostras de displasias e CCEs.



_____ * $p < 0,05$; Correlação de Spearman.

----- Localização de STAT3 citoplasmática e nuclear

Observa-se correlação positiva entre miR-29c e miR-10a, miR-10a e miR-17, miR-17 e miR-31 em displasias. No grupo CCE, foi visualizada correlação entre miR-29c e miR-17 e miR-10a, miR-17 com miR-10a e miR-31. STAT3 e IL-6 apresentaram imunomarcagem positiva em displasias de carcinomas de células escamosas. Fonte: Elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

A observação do comportamento dos microRNAs em relação às variáveis clínico-patológicas é importante para que se obtenham informações sobre a ação destes nos carcinomas de células escamosas orais, pois, embora já tenham sido relatadas inúmeras funções e alvos desses microRNAs, ainda não está claro o real comportamento no câncer bucal nem nas desordens potencialmente malignas.

O microRNA-31 vem-se mostrando hiperexpresso em tecidos originados de CCEs orais (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2016; DE SARKAR *et al.*, 2014; HUNG, K. F. *et al.*, 2016; SEVERINO *et al.*, 2015; SIOW *et al.*, 2014; WONG, T.-S. *et al.*, 2008). Além disso, fluidos orgânicos como saliva e plasma de pacientes portadores de câncer oral também apresentaram níveis aumentados desse microRNA (LIU, C. J. *et al.*, 2012). Os trabalhos mostram, ainda, aumento de sua expressão já em desordens potencialmente malignas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2016; DE SARKAR *et al.*, 2014; HUNG, K. F. *et al.*, 2016; HUNG, P.-S. *et al.*, 2014; MAIMAITI *et al.*, 2015; XIAO *et al.*, 2012), como o encontrado no presente estudo, no qual observou-se hiperexpressão de miR-31 em displasias orais assim como em carcinoma de células escamosas. Além disso, pôde-se correlacionar aumento gradual desse microRNA à medida que as displasias progrediam de leve, para moderada e severa.

Quanto ao miR-31, Hung, *et al.* (2016) e Chattopadhyay *et al.* (2016) sugerem que o aumento deste microRNA está associado à progressão de desordens potencialmente malignas para carcinomas. Outros autores associam o aumento na expressão de diversos outros microRNAs, como miRs-208b-3p, 204-5p, 129-2-3p e 3065-5p, em leucoplasias sem displasias ou displasias leves que evoluem para malignidade (PHILIPONE *et al.*, 2016). Os microRNAs miR-21, miR-181b, miR-345 e miR-375 também já foram relacionados com as leucoplasias progressivas (BRITO *et al.*, 2014; CERVIGNE *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2015). Entretanto, neste trabalho, encontraram-se níveis aumentados miR-31 tanto em displasias quanto em neoplasias, provavelmente, sem associação com a progressão de lesões displásicas para malignas.

Dentre as prováveis atuações de miR-31 na carcinogênese oral, pode-se relacionar a indução da imortalização de queratinócitos, liberação de fator induzido por hipóxia (aumentando a angiogênese, proliferação celular, migração e transição epitélio-mesênquima) e inibição de CXCL12 relacionada ao crescimento tumoral e metástase (HUNG, *et al.*, 2014; LIU, *et al.*, 2010).

O trabalho de Siow *et al.* (2014) relatou diferença na expressão de miR-31 em relação à localização, encontrando maiores níveis desse microRNA em CCE de mucosa jugal. Entretanto, variáveis como sexo, idade, tamanho do tumor, grau histológico e padrão de crescimento tumoral, assim como no presente estudo, não mostraram influência em relação à expressão de microRNAs. Não encontramos, também, diferença em relação à expressão de microRNAs em CCE e localização. Todavia, displasias originadas em língua apresentaram maior expressão de miR-29c. Existem trabalhos que sugerem a participação deste microRNA em eventos importantes para a carcinogênese como imortalização, iniciação de células malignas, angiogênese e apoptose (BAE *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; LIU, M. *et al.*, 2016; MATSUSHIMA; ISHIYAMA, 2016; SENGUPTA *et al.*, 2008)

Outras variáveis clínicas, histológicas ou de exposição a fatores de risco não influenciaram a expressão de microRNAs, mostrando que este pode ser considerado um fator de avaliação independente. Já foi reportado que o perfil de microRNAs expresso em carcinoma de células escamosas orais não é alterado por fatores de risco como o fumo, dados concordantes com nossos achados (KOLOKYTHAS *et al.*, 2015). Além disso, não se encontrou influência da expressão dos microRNAs estudados tanto em displasias como no CCE com a presença do achado microscópico de coloitose, alteração morfológica sugestiva de associação com o HPV.

No presente estudo, o microRNA-17 apresentou-se hiperexpresso em CCEs orais, assim como o encontrado por Wong, T.-S. *et al.* (2008) e Shi *et al.* (2015). Este miRNA também mostrou níveis séricos aumentados em pacientes portadores de câncer de boca (MACLELLAN *et al.*, 2012). Os níveis aumentados de expressão desse microRNA também estiveram presentes em displasias em relação ao tecido normal, como descrito por Shi *et al.* (2015). Interessantemente, observa-se um incremento estatisticamente significativo de miR-17 em CCEs orais em relação às displasias. Dos miRNAs avaliados, esse foi o único a apresentar comportamento diferente em relação às amostras da região perilesional, tendo exibido aumento de expressão em região adjacente (perilesão) de displasias em relação à própria displasia oral. Há provável associação entre microRNA-17 e supressão da atividade apoptótica por inibir p21, indicando sua atuação como oncomiR (WU; WU; LIU, 2016; WU, *et al.*, 2013). Diferentemente, Chang, *et al.* (2013) encontraram hipoexpressão de miR-17 em linhagens celulares com maior atividade migratória, sugerindo que esse microRNA teria como alvo a Integrina $\beta 8$ (ITG $\beta 8$), que é um receptor para fibronectina.

Há poucos trabalhos na literatura relacionando o microRNA-29c com as neoplasias orais. Já foi demonstrado que este microRNA está hiperexpresso em CCEs orais metastáticos em relação aos não metastáticos (SERRANO, *et al.*, 2012) e em carcinomas agressivos de língua ocorrendo em pacientes jovens (HILLY *et al.*, 2016). No câncer de nasofaringe, apresenta-se, frequentemente, hipoexpresso, estando associado com resistência dos tumores à radiação e à quimioterapia com cisplatina (ZHANG, *et al.*, 2013). No presente trabalho, verificou-se que o miR-29c está hiperexpresso em áreas perilesionais de displasias, havendo, no entanto, diminuição da expressão lesional, quando analisado o método de comparação entre os Δ Ct. Todavia, quando comparado ao tecido normal, esse microRNA permanece hiperexpresso. HUDCOVA *et al.*, (2016) também encontrou diferença entre a expressão de miR-29c em áreas lesionais em relação à região perilesional de carcinomas de cabeça e pescoço. Entretanto, contrariamente ao observado neste trabalho, miR-29c encontrava-se diminuído nos tecidos adjacentes ao tumor e esse achado esteve associado a piores prognósticos.

Identificou-se, no presente trabalho, aumento significativo da expressão dos microRNAs miR-17 e miR-29c entre displasias e CCEs. Sendo assim, o incremento desses microRNAs pode estar relacionado à progressão de desordens potencialmente malignas para CCEs orais. Os microRNAs miR-31 e miR-10a apresentaram grande variação na sua expressão e alto desvio padrão nos grupos, não sendo, portanto, obtida diferença estatisticamente significativa entre CCE e Displasia, mesmo havendo diferença no valor médio dos grupos.

Já foi reportada hiperexpressão de microRNA-10a em carcinoma de células escamosas oral, semelhantemente ao encontrado neste trabalho (KOZAKI *et al.*, 2008; LIU, C.-J. *et al.*, 2010). Entretanto, Hui *et al.* (2010) mostraram hipoexpressão desse microRNA em neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Carcinomas gástricos e uterinos também apresentaram perfil de hiperexpressão de miR-10a, relacionando-se ao risco aumentado de metástases (CHEN, *et al.*, 2012; ZENG; LI, 2014). No entanto, ainda não foi descrito alvo específico desse microRNA em neoplasias orais.

Até o momento, não é do nosso conhecimento a realização de pesquisas que avaliem a expressão de microRNAs 10a e 29c em displasias orais, sendo este o primeiro trabalho a demonstrar a hiperexpressão destes microRNAs nessas lesões. Ressalta-se, que miR-10a apresenta-se quantitativamente semelhante em displasias e CCEs orais, enquanto miR-29c apresenta aumento significativo quando a lesão displásica progride para a malignidade. O tecido presente na região de perilesão apresenta perfil desses microRNAs semelhante ao encontrado nas displasias. Levando em consideração a primeira análise estatística realizada, utilizando-se

a variação dos Δ Cts entre os grupos controle, displasia e CCE, pôde-se identificar hipereexpressão de miR-29c em área perilesional de displasias em relação à área lesional assim como miR-17.

O comportamento dos microRNAs em área adjacente ao tumor tem sido pouco estudado. Vários trabalhos utilizam o tecido perilesional como amostra controle, partindo do pressuposto de que não há alteração de microRNAs nessas áreas (DE SARKAR *et al.*, 2014; OUYANG *et al.*, 2013; RAMDAS *et al.*, 2009). Não obstante, Hudcova *et al.* (2016) encontraram diferença entre tecido perilesional e tumoral, correlacionando a alteração da expressão de microRNAs em áreas perilesionais à presença de metástases linfonodais. Para análise de microRNAs devem-se obter, inicialmente, amostras de tecidos normais originados de indivíduos livres de doença e não expostos aos fatores de risco para a neoplasia a ser estudada, pois o perfil de expressão de miRNAs é tecido-específico, observando-se comportamento semelhante em tecidos advindos de indivíduos diferentes (VOLINIA *et al.*, 2006). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com a teoria do campo de cancerização e mostram que o perfil de expressão desses microRNAs em amostras perilesionais já se encontra molecularmente alterado, apresentando perfil de expressão semelhante à área de lesão e diferente do tecido normal.

Este é o primeiro trabalho do qual se tem conhecimento que identificou correlação entre os microRNAs em desordens potencialmente malignas e no câncer bucal (CCE). Observou-se, em displasias orais, correlação positiva entre microRNAs miR-29c e miR-10a; miR-10a e miR-17; e miR-17 e miR-31 enquanto nos CCEs todos os microRNAs relacionaram-se positivamente entre si. Em áreas perilesionais, também é possível observar a correlação entre miR-10a e miR-29c em displasias, e entre miR-31 e miR-17; miR-10a e miR-29c em lesões malignas. A partir disso, pode-se inferir que a correlação entre miR-10a-miR29c é um dos primeiros eventos a ocorrer permanecendo até a transformação do tecido para malignidade e, finalmente, na célula cancerígena, identifica-se a correlação dos microRNAs 31 e 10a.

A alta expressão de STAT3 em neoplasias malignas de boca já foi descrita por vários autores (FASANARO *et al.*, 2015; KLOSEK *et al.*, 2004; PECTASIDES *et al.*, 2010; TRIVEDI *et al.*, 2011). A provável relação desse transdutor de sinais com o câncer de boca é reforçada pelo efeito inibitório de crescimento de células malignas acarretado pelo uso de fármacos inibidores diretos ou indiretos de STAT3 (ADACHI *et al.*, 2012; JIA, *et al.*, 2016; SEN *et al.*, 2015), podendo estar envolvido, também, na eficácia de tratamentos de quimio e radioterapia (KALIYAPERUMAL *et al.*, 2015).

Neste trabalho, STAT3 fosforilado mostrou alta imunomarcação em carcinomas de células escamosas orais e em desordens potencialmente malignas tanto em núcleo quanto em citoplasma, sendo o padrão de marcação mais frequentemente encontrado o citoplasmático com intensidade leve. A detecção de STAT3 ativado em região nuclear e citoplasmática sugere sua atuação tanto na sinalização quanto na indução da transcrição de genes (ZHAO *et al.*, 2012). Alguns autores relacionam a marcação nuclear de STAT3 com piores prognósticos em câncer de boca (SHAH, *et al.*, 2006), enquanto outro estudo avaliando lesões de cabeça e pescoço sugere comportamento oposto, associando esse padrão de marcação a melhores prognósticos (PECTASIDES *et al.*, 2010).

Variáveis clínicas de sexo, idade, história de uso de fumo e etilismo ou gradação histológica não influenciaram a expressão de STAT3, semelhante ao relatado por Pectasides *et al.* (2010) e Macha *et al.* (2011). O trabalho de Shah, *et al.* (2006), no entanto, encontrou intensidade e percentual de marcação diferente em relação ao estágio tumoral.

Carcinomas de células escamosas que apresentaram padrão de crescimento cordonal mostraram maior expressão citoplasmática de STAT3 do que aqueles que se organizam em ninhos ou em lençóis. Estudos recentes têm mostrado que tumores com padrão de crescimento mais infiltrativo ou com pequenas ilhas de células invasoras exibem maior risco de recidiva e pior prognóstico (ALMANGUSH *et al.*, 2015; STRIEDER *et al.*, 2017).

A expressão de STAT3 em desordens potencialmente malignas orais tem sido alvo de poucos estudos. Neste trabalho, demonstrou-se alto percentual de imunomarcação em displasias orais, semelhante ao encontrado em carcinomas e diferentemente da mucosa oral normal. Macha *et al.* (2011) encontraram positividade acima de 50% para leucoplasias orais com e sem displasias, sugerindo que o acúmulo de STAT3 nuclear ocorre desde a presença de desordens potencialmente malignas. Já Nagpal, Mishra e Das (2002) identificaram positividade citoplasmática em apenas uma das oito amostras de leucoplasia avaliadas em seu estudo. Este autor analisou ainda CCEs orais e encontrou maior expressão de STAT3 em tumores de pequenas proporções e que esta diminui com o aumento da lesão. Embora não haja consenso em relação ao comportamento de STAT3 em DPM, o presente estudo sugere que há alta ativação desse transdutor de sinais nessas lesões e que este pode estar envolvido no processo de alterações celulares que levam à transformação maligna.

Neste trabalho, identificou-se alta marcação de IL-6 (100%) nas amostras de displasias e de neoplasias malignas orais. Entretanto, não foi possível correlacionar a

imunomarcagem de IL-6 com STAT3 ou com as demais variáveis clínicas, estes dados são concordantes com o estudo de Shinagawa *et al.* (2016), que avaliou o comportamento desses marcadores em lesões malignas orais.

Várias publicações apontam para uma alta da expressão de IL-6 em carcinomas de células escamosas orais, seja em níveis séricos (DUFFY *et al.*, 2008; LOTFI *et al.*, 2015; ST JOHN *et al.*, 2004), salivares (JURETIĆ *et al.*, 2013; LISA CHENG *et al.*, 2014; PANNEER SELVAM; SADAKSHARAM, 2015) ou teciduais (CHEN, *et al.*, 2012; GUERRERA *et al.*, 2014). O aumento de IL-6 pode estar relacionado a pior prognóstico e radiorresistência (GAO; ZHAO; HALSTENSEN, 2016; JINNO *et al.*, 2015). Por ser uma citocina pleiotrópica, já foi relacionada a vários mecanismos importantes para aquisição do fenótipo maligno, como migração celular (CHUANG *et al.*, 2014), crescimento tumoral (WANG, *et al.*, 2002), angiogênese, metástase e infiltração tecidual (SUNDELIN *et al.*, 2005).

Assim como para STAT3, pesquisas sobre a avaliação do comportamento de IL-6 em desordens potencialmente malignas orais são escassas. Em saliva, há um aumento dessa citocina em pacientes portadores de displasias orais quando comparados a pacientes livres de doença (BAGAN *et al.*, 2016; BRAILO, V *et al.*, 2006; DINESHKUMAR *et al.*, 2016; JURETIĆ *et al.*, 2013; PANNEER SELVAM; SADAKSHARAM, 2015; SHARMA *et al.*, 2011). O único trabalho a realizar avaliação imunoistoquímica de IL-6 em displasias orais foi conduzido por Kamperos *et al.* (2016), que mostraram, também, alta positividade, em 55,6% dos casos.

Portanto, os nossos resultados evidenciam uma provável alteração epigenética na mucosa oral previamente exposta a carcinógenos, mesmo em áreas onde clinicamente não há lesão. Ressalta-se a correlação positiva entre os microRNAs miR-29c e miR-10a tanto em região perilesional das displasias e dos CCEs como no próprio CCE. A imunoexpressão de IL-6 e STAT encontrada em altos percentuais nas desordens potencialmente malignas pode sugerir que essas vias já se encontram alteradas antes mesmo da instalação das neoplasias malignas. O presente estudo foi de fundamental importância para a identificação de microRNAs que se encontram diferentemente expressos nas desordens potencialmente malignas e carcinomas de células escamosas orais. Estudos subsequentes são necessários para desvendar os alvos sobre os quais atuam e que, portanto, apresentam-se desregulados durante a progressão do câncer de boca. Há indícios de que o miR-29c possa atuar sobre o oncogene Mcl-1 (SAITO *et al.*, 2013) e regulação da metilação do DNA (MORITA *et al.*, 2013) enquanto miR-10a pode promover a

inibição do receptor tirosino-quinase EphA4, relacionando-se à transição epitélio-mesênquima (YAN, *et al.*, 2013), sendo estes possíveis alvos para futuros trabalhos.

7. CONCLUSÕES

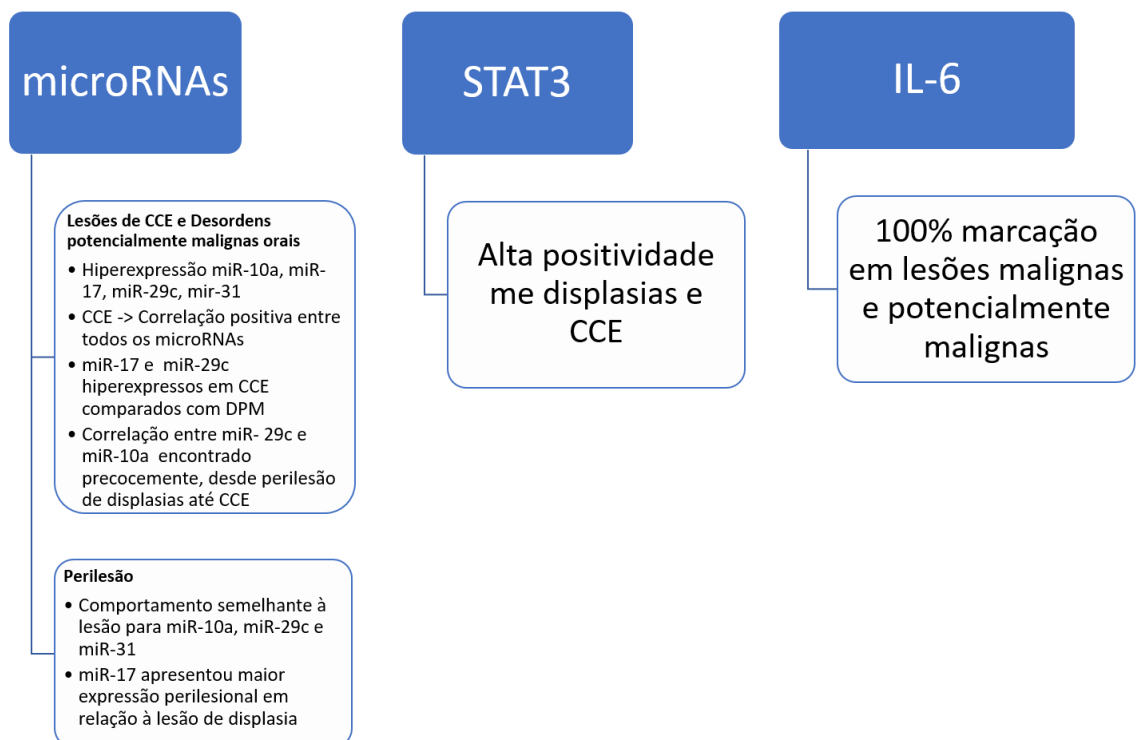
Os miR-10a, miR-17, miR-29c e miR-31 mostraram-se hiperexpressos em carcinomas de células escamosas e displasias orais quando comparados com o tecido normal. No carcinoma de células escamosas, observou-se correlação positiva entre os microRNAs 29c e o miR-10a, o miR-10a com o 31 e 17, e o miR-17 com o 29c. Já nas displasias, encontrou-se correlação positiva entre miR-29c com o 10a, o miR-10a com o 17 e o miR-17 com o 31.

Houve incremento da expressão dos miRNAs 17 e 29c, em carcinomas quando comparados com as desordens potencialmente malignas. Correlação positiva dos miRNAs 29c e 10a foi encontrada no CCE, nas displasias e áreas de perilesão do CCE e displasia.

Nas áreas perilesionais das displasias verificou-se maior expressão de miR-17 em relação ao tecido displásico, enquanto que, na região adjacente ao CCE, todos os microRNAs comportaram-se semelhante ao tecido lesional.

IL-6 e STAT3 apresentaram extensa e intensa imunomarcação nas displasias e no CCE independentemente das variáveis clínicas analisadas.

Figura 13 - Fluxograma final de resultados



REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. *et al.* PIAS3 expression in squamous cell lung cancer is low and predicts overall survival. *Cancer medicine*, v. 4, n. 3, p. 325–332, 2015.
- ADACHI, M. *et al.* Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 48, n. 12, p. 1220–1226, dez. 2012.
- AGIRRE, X. *et al.* Down-Regulation of hsa-miR-10a in Chronic Myeloid Leukemia CD34+ Cells Increases USF2-Mediated Cell Growth. *Molecular Cancer Research*, v. 6, n. 12, p. 1830–1840, dez. 2008.
- AKIRA, S. *et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, v. 77, n. 1, p. 63–71, abr. 1994.
- ALMANGUSH, A. *et al.* For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality. *Virchows Archiv*, v. 467, n. 1, p. 39–46, jul. 2015.
- ANGSTWURM, M. W.; GÄRTNER, R.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine*, v. 9, n. 5, p. 370–4, 1997.
- ARANTES, L. M. R. B. *et al.* Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncology*, v. 50, n. 6, p. 587–592, jun. 2014.
- ARDUINO, P. G. *et al.* Outcome of oral dysplasia: A retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 38, n. 6, p. 540–544, 2009.
- BABJI, D. V. *et al.* Histomorphometric Study to Compare Histological Changes Between Oral Squamous Cell Carcinoma and Apparently Normal Adjacent Oral Mucosa. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, v. 67, n. S1, p. 21–28, mar. 2015.
- BABU, J. M. *et al.* A miR-centric view of head and neck cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1816, n. 1, p. 67–72, ago. 2011.
- BAE, H. J. *et al.* MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, v. 33, n. 20, p. 2557–67, maio 2014.
- BAGAN, L. *et al.* Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. *Clinical Oral Investigations*, v. 20, n. 4, p. 737–743, maio 2016.
- BANDRÉS, E. *et al.* Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*, v. 5, p. 29, 19 jul. 2006.
- BARNES, L. *et al.* Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. *WHO Classification of Tumour*, n. 9, p. 163–175, 2005.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, v. 136, n. 2, p. 215–33, jan. 2009.
- BERINDAN-NEAGOE, I. *et al.* MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 64, n. 5, p. 311–336, set. 2014.

- BOSCOLO-RIZZO, P. *et al.* Telomere shortening in mucosa surrounding the tumor: Biosensor of field cancerization and prognostic marker of mucosal failure in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 51, n. 5, p. 500–507, maio 2015.
- BOUVARD, V. *et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncology*, v. 10, p. 321–322, 2009.
- BOWMAN, T. *et al.* STATs in oncogenesis. *Oncogene*, v. 19, n. 21, p. 2474–2488, maio 2000.
- BRAAKHUIS, B. J. M. *et al.* A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization. *Cancer Research*, v. 63, n. 8, 2003.
- BRAILO, V. *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 17, n. 1, 2012.
- BRAILO, V. *et al.* The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. *Oral oncology*, v. 42, n. 4, p. 370–3, 2006.
- BRITO, J. A. R. *et al.* Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 43, n. 3, p. 211–216, mar. 2014.
- BRYANT, A. *et al.* miR-10a is aberrantly overexpressed in Nucleophosmin1 mutated acute myeloid leukaemia and its suppression induces cell death. *Molecular cancer*, v. 11, n. 1, p. 8, 2012. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3306826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- CALIN, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 9, p. 2999–3004, mar. 2004.
- CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 11, p. 857–866, nov. 2006.
- CARPENTER, R. L.; LO, H.-W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*, v. 6, n. 2, p. 897–925, abr. 2014.
- CARTHEW, R. W. Gene regulation by microRNAs. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 16, n. 2, p. 203–208, 2006.
- CERVIGNE, N. K. *et al.* Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Human molecular genetics*, v. 18, n. 24, p. 4818–29, dez. 2009.
- CHANG, C.-C. *et al.* MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, v. 49, n. 9, p. 923–31, 2013.
- CHANG, K.-P. *et al.* Pretreatment interleukin-6 serum levels are associated with patient survival for oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, v. 148, n. 5, p. 786–91, 2013.
- CHANG, K.-W. *et al.* Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral

- cancer cells by targeting RhoA. *Oral Oncology*, v. 49, n. 1, p. 27–33, jan. 2013.
- CHATTOPADHYAY, E. *et al.* Expression deregulation of mir31 and CXCL12 in two types of oral precancers and cancer: importance in progression of precancer and cancer. *Scientific Reports*, v. 6, p. 32735, 6 set. 2016.
- CHEN, C.-J. *et al.* Gender Difference in the Prognostic Role of Interleukin 6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. e50104, nov. 2012.
- CHEN, W. *et al.* miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 3, n. 2, p. 351–356, dez. 2012.
- CHHER, T. *et al.* Prevalence of oral cancer, oral potentially malignant disorders and other oral mucosal lesions in Cambodia. *Ethnicity & Health*, p. 1–15, out. 2016.
- CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - An update. *CA Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, n. 5, p. 401–421, set. 2015.
- CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 1, p. 14–32, 2008.
- CHUANG, J.-Y. *et al.* Syk/JNK/AP-1 Signaling Pathway Mediates Interleukin-6-Promoted Cell Migration in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 1, p. 545–559, jan. 2014.
- CONNOR, J. Alcohol consumption as a cause of cancer. *Addiction*, v. 103, n. SUPPL. 8, p. 153–160, 2016.
- COUTINHO-CAMILLO, C. M. *et al.* Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics*, v. 208, n. 7–8, p. 382–389, 2015.
- CULIG, Z. Interleukin-6 as a therapy target in oral squamous carcinoma. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 17, n. 1, p. 53–9, jan. 2013.
- DARVIN, P. *et al.* Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. *International Journal of Oncology*, v. 47, n. 3, p. 1111–1120, 2015.
- DE CAMARGO CANCELA, M. *et al.* Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head & neck*, v. 32, n. 3, p. 357–67, 2010.
- DE SARKAR, N. *et al.* A quest for miRNA bio-marker: a track back approach from gingivo buccal cancer to two different types of precancers. *PloS one*, v. 9, n. 8, p. e104839, ago. 2014.
- DINESHKUMAR, T. *et al.* Salivary and Serum Interleukin-6 Levels in Oral Premalignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma: Diagnostic Value and Clinicopathologic Correlations. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 17, n. 11, p. 4899–4906, 2016.
- DONG, H. *et al.* Reciprocal androgen receptor/interleukin-6 crosstalk drives oesophageal carcinoma progression and contributes to patient prognosis. *The Journal of Pathology*, nov. 2016.
- DOOBAREE, I. U. *et al.* Head and neck cancer in South East England between 1995-1999 and 2000-2004: An estimation of incidence and distribution by site, stage and histological type. *Oral Oncology*, v. 45, n. 9, p. 809–814, 2009.

- DUFFY, S. A. *et al.* Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*, v. 113, n. 4, p. 750–757, 2008.
- DZIK, L. M. *A influência do microRNA miR-21 no câncer de tireóide*. 2013. 22 f. Universidade de São Paulo, 2013.
- EL-GAZZAR, R.; MACCLUSKEY, M.; OGDEN, G. R. Evidence for a field change effect based on angiogenesis in the oral mucosa? A brief report. *Oral Oncology*, v. 41, n. 1, p. 25–30, 2005.
- EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 342–348, 2001.
- FAN, Y. *et al.* Down-regulation of miR-29c in human bladder cancer and the inhibition of proliferation in T24 cell via PI3K-AKT pathway. *Medical Oncology*, v. 31, n. 7, 2014.
- FASANARO, E. *et al.* Prognostic Significance of Serine-Phosphorylated STAT3 Expression in pT1-T2 Oral Tongue Carcinoma. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, v. 8, n. 3, p. 275–80, set. 2015.
- FENG, Y.-H.; TSAO, C.-J. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical reports*, v. 5, n. 4, p. 395–402, out. 2016.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015.
- FERRARESI, A. *et al.* Resveratrol inhibits IL-6-induced ovarian cancer cell migration through epigenetic up-regulation of autophagy. *Molecular Carcinogenesis*, 3 nov. 2016.
- FURQAN, M. *et al.* STAT inhibitors for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, v. 6, p. 90, 2013.
- GAO, J.; ZHAO, S.; HALSTENSEN, T. Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, v. 35, n. 6, p. 3265–74, abr. 2016.
- GARCIA, R. *et al.* Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, v. 20, n. 20, p. 2499–2513, maio 2001.
- GARZON, R. *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 10, p. 3945–3950, 11 mar. 2008.
- GASCHE, J. A. *et al.* Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *International Journal of Cancer*, v. 129, n. 5, p. 1053–1063, 2011.
- GE, L. *et al.* Could stroma contribute to field cancerization? *Medical Hypotheses*, v. 75, n. 1, p. 26–31, 2010.
- GEE, H. E. *et al.* The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British journal of cancer*, v. 104, n. 7, p. 1168–77, 29 mar. 2011.
- GEIGER, J. L.; GRANDIS, J. R.; BAUMAN, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncology*, v. 56, p. 84–92,

2016.

GELETU, M. *et al.* Engaged for survival: From cadherin ligation to STAT3 activation. *Jak-Stat*, v. 2, n. 4, p. e27363, 2013.

GKOUVERIS, I. *et al.* Erk1/2 activation and modulation of STAT3 signaling in oral cancer. *Oncology Reports*, v. 32, n. 5, p. 2175–2182, 2014.

GÓMEZ, I. *et al.* Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? *Oral Diseases*, v. 16, n. 4, p. 333–342, maio 2010.

GOODSON, M. L. *et al.* Oral precursor lesions and malignant transformation – who, where, what, and when? *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 53, n. 9, p. 831–835, 2015.

GUAN, G.-F. *et al.* Gene expression profiling via bioinformatics analysis reveals biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma. *Molecular medicine reports*, v. 12, n. 2, p. 2457–64, ago. 2015.

GUERRERA, I. C. *et al.* Regulation of interleukin-6 in head and neck squamous cell carcinoma is related to papillomavirus infection. *Journal of Proteome Research*, v. 13, n. 2, p. 1002–1011, 2014.

GUO, Y. *et al.* Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 7, p. 904–910, nov. 2012.

GUPTA, P. C. *et al.* An epidemiologic assessment of cancer risk in oral precancerous lesions in India with special reference to nodular leukoplakia. *Cancer*, v. 63, n. 11, p. 2247–2252, jun. 1989.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 509–524, jul. 2014.

HAN, T.-S. *et al.* MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. *Gut*, p. 1–12, 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANDE, A. H. *et al.* Evidence based demonstration of the concept of “field cancerization” by p53 expression in mirror image biopsies of patients with oral squamous cell carcinoma - an immunohistochemical study. *Romanian journal of morphology and embryology*, v. 56, n. 3, p. 1027–33, 2015.

HEGARTY, A. M.; HUNTER, K. D. Oral malignancy and premalignancy. *British Journal of Hospital Medicine*, v. 77, n. 4, p. 232–239, abr. 2016.

HEINRICH, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, v. 374, n. Pt 1, p. 1–20, ago. 2003.

HEINZELMANN, J. *et al.* Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World Journal of Urology*, v. 29, n. 3, p. 367–373, jun. 2011.

HILLY, O. *et al.* Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients. *Oncology Letters*, jul. 2016.

- HOLLSTEIN, M. *et al.* p53 mutations in human cancers. *Science*, v. 253, n. 5015, p. 49–53, 1991.
- HOLMSTRUP, P. *et al.* Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncology*, v. 42, n. 5, p. 461–474, 2006.
- HU, Y. *et al.* Evaluation of miR-29c inhibits endotheliocyte migration and angiogenesis of human endothelial cells by suppressing the insulin like growth factor 1. *American Journal of Translational Research*, v. 7, n. 5, p. 866–877, jul. 2015.
- HUANG, W. J. *et al.* Interleukin-6 -572G/C polymorphism and prostate cancer susceptibility. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 15, n. 3, 16 set. 2016.
- HUDCOVA, K. *et al.* Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 37, n. 9, p. 12627–12633, set. 2016.
- HUI, A. B. Y. *et al.* Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 16, n. 4, p. 1129–39, fev. 2010.
- HUNG, K. F. *et al.* MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncology*, v. 53, p. 42–47, 2016.
- HUNG, P.-S. *et al.* miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 5, p. 1162–1171, maio 2014.
- IBORRA, M. *et al.* MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmunity Reviews*, v. 11, n. 5, p. 305–314, 2012.
- INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva*, p. 124, 2015.
- INCZE, J. *et al.* Premalignant changes in normal appearing epithelium in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *American journal of surgery*, v. 144, n. 4, p. 401–5, out. 1982.
- INOUE, N. *et al.* Down-regulation of microRNA 10a expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Oncology letters*, v. 1, n. 3, p. 527–531, maio 2010.
- IORIO, M. V *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, v. 65, n. 16, p. 7065–70, ago. 2005.
- IZZO, J. G. *et al.* Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*, v. 17, n. 18, p. 2313–22, 1998.
- JABLONSKA, E.; PIOTROWSKI, L.; GRABOWSKA, Z. Serum Levels of IL-1b, IL-6, TNF-a, sTNF-RI and CRP in Patients with Oral Cavity Cancer. *Pathology oncology research : POR*, v. 3, n. 2, p. 126–129, 1997.
- JAMADAR, S. *et al.* Comparative study of various grading systems in oral squamous cell carcinoma and their value in predicting lymph node metastasis. *Indian Journal of Dental Research*, v. 25, n. 3, p. 357, 2014.

- Ji, K. *et al.* The Role of p-STAT3 as a Prognostic and Clinicopathological Marker in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, v. 11, n. 8, p. e0160125, 2016.
- JIA, H. *et al.* MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e88057, 2014.
- JIA, L. *et al.* Dihydroartemisinin as a Putative STAT3 Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Targeting Jak2/STAT3 Signaling. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0147157, jan. 2016.
- JING, C. *et al.* MicroRNA-17/20a impedes migration and invasion via TGF- β /ITGB6 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *American journal of cancer research*, v. 6, n. 7, p. 1549–62, 2016.
- JINNO, T. *et al.* Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, v. 33, n. 5, p. 2161–2168, 2015.
- JOHNSTON, P. A. *et al.* HCS Campaign to Identify Selective Inhibitors of IL-6-Induced STAT3 Pathway Activation in Head and Neck Cancer Cell Lines. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 13, n. 7, p. 356–376, set. 2015.
- JUNG, H. M. *et al.* Keratinization-associated miR-7 and miR-21 Regulate Tumor Suppressor Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) in Oral Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 35, p. 29261–29272, ago. 2012.
- JUNQUEIRA; CARNEIRO. *Histologia Básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2013.
- JURETIĆ, M. *et al.* Salivary levels of TNF- α and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. *Folia biologica*, v. 59, n. 2, p. 99–102, 2013.
- KALAVREZOS, N.; SCULLY, C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. *Dental update*, v. 42, n. 9, p. 866–868,871–874,877, 2015.
- KALIYAPERUMAL, K. *et al.* S-nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Redox Biology*, v. 6, p. 41–50, dez. 2015.
- KAMPEROS, G. *et al.* Expression of NF- κ B and IL-6 in oral precancerous and cancerous lesions: An immunohistochemical study. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, v. 21, n. 1, p. e6-13, jan. 2016.
- KAMRAN, M. Z.; PATIL, P.; GUDE, R. P. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed research international*, v. 2013, p. 421821, 2013.
- KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, v. 11, n. 12, p. 849–64, dez. 2011.
- KATARZYNA STRZELCZYK, J. *et al.* Expression profiles of MGMT, p16, and APC genes in tumor and matching surgical margin from patients with oral squamous cell carcinoma. 2016.
- KAWAKITA, A. *et al.* MicroRNA-21 Promotes Oral Cancer Invasion via the Wnt/ β -Catenin Pathway by Targeting DKK2. *Pathology & Oncology Research*, v. 20, n. 2, p. 253–261, abr.

2014.

KAYAMORI, K. *et al.* Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *The American journal of pathology*, v. 176, n. 2, p. 968–980, 2010.

KESKI-NISULA, L. *et al.* Spontaneous and stimulated interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production at delivery and three months after birth. *European Cytokine Network*, v. 15, n. 1, p. 67–72, 2004.

KIJIMA, T. *et al.* STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, v. 13, n. 8, p. 355–62, ago. 2002.

KIM, H. S. *et al.* MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor by regulating cell cycle and epithelial-mesenchymal transition regulatory proteins in liver cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8089–8102, 4 abr. 2015.

KISHIMOTO, T. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Annual Review of Immunology*, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2005.

KLOSEK, S. K. *et al.* Constitutive activation of Stat3 correlates with increased expression of the c-Met/HGF receptor in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, v. 12, n. 2, p. 293–296, 2004.

KOLOKYTHAS, A. *et al.* Similar squamous cell carcinoma epithelium microRNA expression in never smokers and ever smokers. *PLoS ONE*, v. 10, n. 11, 2015.

KOSS, L. G.; DURFEE, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 63, n. 6, p. 1245–61, mar. 1956.

KOZAKI, K. *et al.* Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer research*, v. 68, n. 7, p. 2094–105, abr. 2008.

KRISHNA, A. *et al.* Molecular concept in human oral cancer. *National journal of maxillofacial surgery*, v. 6, n. 1, p. 9–15, 2015.

KUMARI, N. *et al.* Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology*, v. 37, n. 9, p. 11553–11572, set. 2016.

KURAGO, Z. B. *et al.* Lipopolysaccharide-squamous cell carcinoma-monocyte interactions induce cancer-supporting factors leading to rapid STAT3 activation. *Head and Neck Pathology*, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2008.

LAJER, C. B. *et al.* Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *British journal of cancer*, v. 104, n. 5, p. 830–40, mar. 2011.

LANGEVIN, S. M. *et al.* Novel DNA methylation targets in oral rinse samples predict survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 50, n. 11, p. 1072–1080, 2014.

LEE, J. J. *et al.* Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v.

101, n. 4, p. 472–480, 2006.

LEE, R. C. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 294, n. 5543, p. 862–864, out. 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 843–54, dez. 1993.

LEE, T. L. *et al.* Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 1, 2006.

LEVY, D. E. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, v. 55, n. 12, p. 1559–1567, out. 1999.

LI, Y. *et al.* Expression of p53, p21 and eIF4E in the adjacent tissues of oral squamous cell carcinoma: establishing the molecular boundary and a cancer progression model. *Int J Oral Sci*, n. 14, p. 161–168, 2015.

LIN, P.-C. *et al.* Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression. *Cancer research*, v. 73, n. 3, p. 1232–44, fev. 2013.

LINGEN, M. *et al.* Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research*. *Oral Diseases*, v. 17, n. s1, p. 7–22, abr. 2011.

LISA CHENG, Y.-S. *et al.* Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. *Journal of periodontology*, v. 85, n. 7, p. 956–65, jul. 2014.

LIU, C.-J. *et al.* miR-31 Ablates Expression of the HIF Regulatory Factor FIH to Activate the HIF Pathway in Head and Neck Carcinoma. *Cancer Research*, v. 70, n. 4, 2010.

LIU, C. J. *et al.* Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head and Neck*, v. 34, n. 2, p. 219–224, 2012.

LIU, M. *et al.* MicroRNA-29c overexpression inhibits proliferation and promotes apoptosis and differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *Gene*, v. 576, n. 1, p. 304–311, jan. 2016.

LIU, X. *et al.* MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer genomics & proteomics*, v. 6, n. 3, p. 131–9, 2009.

LOD, S. *et al.* The influence of epigenetics in relation to oral health. *International journal of dental hygiene*, v. 12, n. 1, p. 48–54, fev. 2014.

LOTFI, A. *et al.* Serum Level of Interleukin-6 in Patients with Oral Tongue Squamous cell Carcinoma. *Iranian journal of otorhinolaryngology*, v. 27, n. 80, p. 207–11, maio 2015.

LOU, W. *et al.* Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. *The Prostate*, v. 42, n. 3, p. 239–42, fev. 2000.

MACE, T. A. *et al.* IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour

- progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut*, p. gutjnl-2016-311585, out. 2016.
- MACHA, M. A. *et al.* Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head & Neck*, v. 33, n. 4, p. 482–489, abr. 2011.
- MACLELLAN, S. A. *et al.* Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer medicine*, v. 1, n. 2, p. 268–74, out. 2012.
- MAIMAITI, A. *et al.* MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets associated with the malignant transformation of oral leukoplakia. *Gene*, v. 558, n. 2, p. 271–277, 2015.
- MANE, D. *et al.* Establishment of field change by expression of cytokeratins 8/18, 19, and MMP-9 in an apparently normal oral mucosa adjacent to squamous cell carcinoma: A immunohistochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 16, n. 1, p. 10, 2012.
- MARKOPOULOS, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *The open dentistry journal*, v. 6, p. 126–30, 2012.
- MARTÍN-HERNÁN, F. *et al.* Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, v. 18, n. 3, p. e439-44, maio 2013.
- MATIKAINEN, S. *et al.* Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood*, v. 93, n. 6, p. 1980–91, mar. 1999.
- MATSUSHIMA, S.; ISHIYAMA, J. MicroRNA-29c regulates apoptosis sensitivity via modulation of the cell-surface death receptor, Fas, in lung fibroblasts. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, p. ajplung.00252.2016, out. 2016.
- MEHANNA, H. M. *et al.* Treatment and follow-up of oral dysplasia - A systematic review and meta-analysis. *Head and Neck*, v. 31, n. 12, p. 1600–1609, 2009.
- MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian journal of cancer*, v. 43, n. 2, p. 60–66, 2006.
- MENG, F. *et al.* MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology*, v. 133, n. 2, p. 647–658, ago. 2007.
- MIN, A. *et al.* MicroRNAs as Important Players and Biomarkers in Oral Carcinogenesis. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- MIRGHANI, H. *et al.* Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? *Oral Oncology*, v. 51, n. 3, p. 229–236, 2015.
- MOHAN, M.; JAGANNATHAN, N. Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncology Reviews*, v. 8, n. 1, p. 244, jun. 2014.
- MONTEBUGNOLI, L. *et al.* Ki-67 from Clinically and Histologically “Normal” Distant Mucosa as Prognostic Marker in Early-Stage (T1-T2N0) Oral Squamous Cell Carcinoma: A Prospective Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 69, n. 10, p. 2579–2584, out. 2011.
- MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the Oral Cavity. *Surgical Oncology Clinics of North America*, v. 24, n. 3, p. 491–508, jul. 2015.

- MORITA, S. *et al.* miR-29 Represses the Activities of DNA Methyltransferases and DNA Demethylases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 7, p. 14647–14658, jul. 2013.
- MURALIDHAR, B. *et al.* Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *The Journal of Pathology*, v. 224, n. 4, p. 496–507, ago. 2011.
- NAGADIA, R. *et al.* miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cellular Oncology*, v. 36, n. 1, p. 1–7, fev. 2013.
- NAGASAKI, T. *et al.* Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. *British Journal of Cancer*, v. 110, n. 2, p. 469–478, jan. 2014.
- NAGPAL, J. K.; MISHRA, R.; DAS, B. R. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer*, v. 94, n. 9, p. 2393–2400, 2002.
- NAKANO, Y. *et al.* Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Japanese journal of cancer research : Gann*, v. 90, n. 8, p. 858–66, 1999.
- NAKASHIMA, H. *et al.* Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. *BMC Cancer*, v. 16, p. 41, 2016.
- NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 37, n. 1, p. 1–10, 5 jul. 2007.
- NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 52, n. 4, p. 195–215, 2002.
- NING, Z. *et al.* Tumor suppression by miR-31 in esophageal carcinoma is p21-dependent. *Genes & cancer*, v. 5, n. 11–12, p. 436–44, nov. 2014.
- OGDEN, G. R. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*, v. 35, n. 3, p. 169–173, 2005.
- OGDEN, G. R. *et al.* Evidence for field change in oral cancer based on cytokeratin expression. *British journal of cancer*, v. 67, n. 6, p. 1324–30, jun. 1993.
- OUYANG, S. *et al.* Expression of microRNA-31 and its clinicopathologic significance in oral squamous cell carcinoma. *Chinese journal of stomatology*, v. 48, n. 8, p. 481–484, ago. 2013.
- PANNEER SELVAM, N.; SADAKSHARAM, J. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. *Asia Pac J Clin Oncol*, v. 11, n. 3, p. 236–241, 2015.
- PATEL, S. C. *et al.* Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 11, p. 1488–1494, 2011.
- PECTASIDES, E. *et al.* Nuclear localization of signal transducer and activator of transcription 3 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with a better prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 16, n. 8, p. 2427–34, abr. 2010.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology*, v. 45, n. 4–5, p. 340–350, abr. 2009.

PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncology*, v. 39, n. 8, p. 770–780, dez. 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. e45, maio 2001.

PHILIPONE, E. *et al.* MicroRNAs-208b-3p, 204-5p, 129-2-3p and 3065-5p as predictive markers of oral leukoplakia that progress to cancer. *American journal of cancer research*, v. 6, n. 7, p. 1537–46, 2016.

RADOI, L.; LUCE, D. A review of risk factors for oral cavity cancer: the importance of a standardized case definition. *Community dentistry and oral epidemiology*, v. 41, n. 2, p. 97–109, e78-91, 2013.

RAM, H. *et al.* Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, v. 10, n. 2, p. 132–7, jun. 2011.

RAMDAS, L. *et al.* miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head & neck*, v. 31, n. 5, p. 642–54, 2009.

REIBEL, J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 14, n. 1, p. 47–62, jan. 2003.

REIHMANE, D.; DELA, F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *European journal of sport science*, v. 14, n. 3, p. 242–50, 2014.

REIS, P. P. *et al.* Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, v. 9, n. 1, p. 238, 2010.

RHEE, J. C.; KHURI, F. R.; SHIN, D. M. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist*, v. 9, n. 3, p. 302–311, 2004.

RHODUS, N. L. *et al.* NF- κ B dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detection and Prevention*, v. 29, n. 1, p. 42–45, jan. 2005.

SA-NGUANRAKSA, D. *et al.* Association of Estrogen Receptor Alpha and Interleukin 6 Polymorphisms with Lymphovascular Invasion, Extranodal Extension, and Lower Disease-Free Survival in Thai Breast Cancer Patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 17, n. 6, p. 2935–40, 2016.

SAITO, Y. *et al.* The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. *International journal of cancer*, v. 132, n. 8, p. 1751–60, abr. 2013.

SATO, J. *et al.* Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 110, n. 3, p. 330–336, 2010.

SATO, J. *et al.* Differences in sequential posttreatment salivary IL-6 levels between patients with and patients without locoregional recurrences of oral squamous cell carcinoma: Part III of a cohort study. v. 120, n. 6, p. 751–760e2, 2015.

- SCHEPER, M. A.; NIKITAKIS, N. G.; SAUK, J. J. Survivin is a downstream target and effector of sulindac-sensitive oncogenic Stat3 signalling in head and neck cancer. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 36, n. 7, p. 632–639, 2007.
- SCHWAM, Z. G.; JUDSON, B. L. Improved prognosis for patients with oral cavity squamous cell carcinoma: Analysis of the National Cancer Database 1998–2006. *Oral Oncology*, v. 52, p. 45–51, jan. 2016.
- SEN, M. *et al.* JAK Kinase Inhibition Abrogates STAT3 Activation and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Growth. *Neoplasia*, v. 17, n. 3, p. 256–264, mar. 2015.
- SENGUPTA, S. *et al.* MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 15, p. 5874–5878, abr. 2008.
- SERRANO, N. A. *et al.* Integrative Analysis in Oral Squamous Cell Carcinoma Reveals DNA Copy Number-Associated miRNAs Dysregulating Target Genes. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery*, v. 147, n. 3, p. 501–508, 1 set. 2012.
- SERRANO, N. A. *et al.* Integrative analysis in oral squamous cell carcinoma reveals DNA copy number-associated miRNAs dysregulating target genes. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, v. 147, n. 3, p. 501–8, set. 2012.
- SEVERINO, P. *et al.* Small RNAs in metastatic and non-metastatic oral squamous cell carcinoma. *BMC medical genomics*, v. 8, p. 31, 2015.
- SHAH, A. Y.; DOHERTY, S. D.; ROSEN, T. Actinic cheilitis: a treatment review. *International journal of dermatology*, v. 49, n. 11, p. 1225–34, nov. 2010.
- SHAH, F. D. *et al.* A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, v. 26, n. 4, p. 326–34, out. 2011.
- SHAH, N. G. *et al.* Molecular alterations in oral carcinogenesis: Significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *International Journal of Biological Markers*, v. 22, n. 2, p. 132–143, 2007.
- SHAH, N. G. *et al.* Stat3 expression in oral squamous cell carcinoma: Association with clinicopathological parameters and survival. *International Journal of Biological Markers*, v. 21, n. 3, p. 175–183, 2006.
- SHARMA, M. *et al.* Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, v. 15, n. 5, p. 705–714, 2011.
- SHI, W. *et al.* Potential involvement of miR-375 in the premalignant progression of oral squamous cell carcinoma mediated via transcription factor KLF5. *Oncotarget*, v. 6, n. 37, p. 40172–85, nov. 2015.
- SHIKEEVA, A. A. *et al.* Expression of microRNA let-7a, miR-155, and miR-205 in tumor and tumor-adjacent histologically normal tissue in patients with non-small cell lung cancer. *Arkhiv patologii*, v. 78, n. 3, p. 3, 2016.
- SHINAGAWA, K. *et al.* Clinical Roles of Interleukin-6 and STAT3 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology & Oncology Research*, p. 1–7, 15 out. 2016.
- SHINRIKI, S. *et al.* Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Tumor

Angiogenesis and In vivo Growth of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 17, 2009.

SHINRIKI, S. *et al.* Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*, v. 225, n. 1, p. 142–150, 2011.

SHIU, M. N. *et al.* Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *British journal of cancer*, v. 82, n. 11, p. 1871–1874, 2000.

SINGH, N. *et al.* Epigenetics: A possible answer to the undeciphered etiopathogenesis and behavior of oral lesions. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 20, n. 1, p. 122, 2016.

SLOW, M. Y. *et al.* Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Diseases*, v. 20, n. 4, p. 345–351, 2014.

SIVEEN, K. S. *et al.* Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1845, n. 2, p. 136–54, abr. 2014.

SLABY, O. *et al.* Altered Expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 Is Related to Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer. *Oncology*, v. 72, n. 5–6, p. 397–402, jan. 2008.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, v. 6, n. 5, p. 963–8, set. 1953.

SO, K. A. *et al.* Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology*, v. 47, n. 4, p. 1451–9, out. 2015.

SQUARIZE, C. H. *et al.* Molecular Cross-Talk between the NFκB and STAT3 Signaling Pathways in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Neoplasia*, v. 8, n. 9, p. 733–746, set. 2006.

SRIURANPONG, V. *et al.* Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Research*, v. 63, n. 11, p. 2948–2956, 2003.

ST JOHN, M. A R. *et al.* Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, v. 130, n. 8, p. 929–935, 2004.

STRIEDER, L. *et al.* Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Diseases*, v. 23, n. 1, p. 120–125, jan. 2017.

SUNDELIN, K. *et al.* Effects of cytokines on matrix metalloproteinase expression in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Acta Oto-Laryngologica*, v. 125, n. 7, p. 765–773, 2005.

TABOR, M. P. *et al.* Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients Biological and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, v. 7, n. 6, p. 1523–1532, 2001.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated

- biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 11, n. 3, p. 199–207, set. 2000.
- TAMATANI, T. *et al.* Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappaB-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. *Int J Cancer*, v. 108, n. 6, p. 912–921, 2004.
- TAPIA, J. L.; GOLDBERG, L. J. The Challenges of Defining Oral Cancer: Analysis of an Ontological Approach. *Head and Neck Pathology*, v. 5, n. 4, p. 376–384, 2011.
- THOMSON, P. J. Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 31, n. 3, p. 262–266, 2002.
- TRIVEDI, T. I. *et al.* Identification of site-specific prognostic biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *Neoplasma*, v. 58, n. 3, p. 217–226, 2011.
- TSAY, J.-C. J. *et al.* Molecular Characterization of the Peripheral Airway Field of Cancerization in Lung Adenocarcinoma. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0118132, 23 fev. 2015.
- VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncology*, v. 46, n. 6, p. 423–425, jun. 2010.
- VAN DIJK, B. A. C. *et al.* Trends in oral cavity cancer incidence, mortality, survival and treatment in The Netherlands. *International journal of cancer*, v. 583, p. 574–583, 2016.
- VAN HOUTEN, V. M. M. *et al.* Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *Journal of Pathology*, v. 198, n. 4, p. 476–486, 2002.
- VAN TUBERGEN, E. *et al.* Tristetraprolin regulates interleukin-6, which is correlated with tumor progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 117, n. 12, p. 2677–2689, 2011.
- VARNHOLT, H. *et al.* MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 47, n. 4, p. 1223–1232, dez. 2007.
- VECCHIONE, L. *et al.* EGFR-targeted therapy. *Experimental Cell Research*, v. 317, n. 19, p. 2765–2771, nov. 2011.
- VOLINIA, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 7, p. 2257–2261, 2006.
- WANG, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer letters*, v. 295, n. 1, p. 110–23, set. 2010.
- WANG, Y.-F. *et al.* Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*, v. 24, n. September, p. 850–858, set. 2002.
- WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, v. 45, n. 4, p. 309–316, 2009.
- WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 36, n. 10, p. 575–580, jul. 2007.
- WEN, Z.; DARNELL, J. E. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and

- Stat3. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 11, p. 2062–7, jun. 1997.
- WOLFF, K.-D.; FOLLMANN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Ärzteblatt international*, v. 109, n. 48, p. 829–35, nov. 2012.
- WONG, P. *et al.* The miR-17-92 microRNA polycistron regulates MLL leukemia stem cell potential by modulating p21 expression. *Cancer research*, v. 70, n. 9, p. 3833–42, maio 2010.
- WONG, T.-S. *et al.* Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 9, p. 2588–2592, maio 2008.
- WOODS, K. V. *et al.* Interleukin-1 Regulates Interleukin-6 Secretion in Human Oral Squamous Cell Carcinoma in Vitro: Possible Influence of p53 but not Human Papillomavirus E6/E7. *Cancer Research*, v. 58, n. 14, 1998.
- WU, B. *et al.* MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene. *Oral Oncology*, v. 47, n. 5, p. 314–319, 2011.
- WU, C.-T. *et al.* The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation Oncology*, v. 8, n. 1, p. 159, 2013.
- WU, D. *et al.* p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, v. 7, n. 24, p. 36539–36550, 2016.
- WU, S.-Y.; WU, A. T. H.; LIU, S.-H. MicroRNA-17-5p regulated apoptosis-related protein expression and radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma caused by betel nut chewing. *Oncotarget*, 2016.
- WU, S. Y. *et al.* MicroRNA-17-5p post-transcriptionally regulates p21 expression in irradiated betel quid chewing-related oral squamous cell carcinoma cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, v. 189, n. 8, p. 675–683, 2013.
- XIAO, W. *et al.* Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS one*, v. 7, n. 6, p. e38648, 2012.
- YADAV, A. *et al.* IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular cancer research: MCR*, v. 9, n. 12, p. 1658–67, 2011.
- YAJIMA, Y. *et al.* Quantification of telomerase activity of regions unstained with iodine solution that surround oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 40, n. 3, p. 314–320, 2004.
- YAN, L.-X. *et al.* MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, v. 14, n. 11, p. 2348–2360, set. 2008.
- YAN, Y. *et al.* MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine kinase receptor A4-Mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells*. *Hepatology*, v. 57, n. 2, p. 667–677, fev. 2013.
- YAN, Y. *et al.* MiR-10a controls glioma migration and invasion through regulating epithelial-mesenchymal transition via EphA8. *FEBS Letters*, v. 589, n. 6, p. 756–765, 2015.
- YANG, J. *et al.* Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer research*, v. 65, n. 3, p. 939–47, fev. 2005.

YANG, X. *et al.* Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic acids research*, v. 41, n. 21, p. 9688–704, nov. 2013.

YU, T. *et al.* MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget*, v. 6, n. 30, p. 30239–30250, 2015.

YU, X.; LI, Z. MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 20, n. 1, p. 10–6, jan. 2016.

YUAN, Z. L. *et al.* Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science (New York, N.Y.)*, v. 307, n. 5707, p. 269–273, 2005.

ZENG, T.; LI, G. MicroRNA-10a enhances the metastatic potential of cervical cancer cells by targeting phosphatase and tensin homologue. *Molecular Medicine Reports*, v. 10, n. 3, p. 1377–82, jul. 2014.

ZHANG, J. X. *et al.* MicroRNA-29c enhances the sensitivities of human nasopharyngeal carcinoma to cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Letters*, v. 329, n. 1, p. 91–98, 2013.

ZHANG, X. *et al.* Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. *International Journal of Cancer*, v. 124, n. 12, p. 2855–2863, jun. 2009.

ZHAO, Y. *et al.* Stat3 is involved in the motility, metastasis and prognosis in lingual squamous cell carcinoma. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, n. 4, p. 340–346, 2012.

ZHOU, X. *et al.* WP1066 sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by targeting STAT3/miR-21 axis. *Scientific reports*, v. 4, p. 7461, 2014.

ZYGOGIANNI, A. G. *et al.* Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head & neck oncology*, v. 3, n. 1, p. 2, 2011.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO.”

Para tanto, necessitaremos de fragmentos de tecido de pacientes que possuam essas alterações, para que possamos compará-las. Durante o procedimento de biópsia, serão removidos dois fragmentos de tecido da região da lesão, sendo seguido de sutura local. Este procedimento não trará nenhum prejuízo à cicatrização nem trará qualquer desconforto adicional.

Neste estudo, não há benefício financeiro para o participante. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. Será guardado sigilo total sobre suas informações. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Carolina Rodrigues Teófilo, que pode ser encontrada no endereço: Rua Alexandre Baraúna S/N – UFC, no telefone 988041003.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações e concorde em participar, solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 2

Termo de Consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO”. Para tanto, necessitaremos de fragmentos de tecido de pacientes que não possuam essas alterações, para que possamos compará-los. Durante o procedimento de exodontia, será removido um fragmento de tecido da região que recobre o seu dente, sendo seguido de sutura local. Este procedimento não trará nenhum prejuízo à cicatrização nem trará qualquer desconforto adicional.

Neste estudo, não há benefício financeiro para o participante. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. Será guardado sigilo total sobre suas informações. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Carolina Rodrigues Teófilo, que pode ser encontrada no endereço: Rua Alexandre Baraúna S/N – UFC, no telefone 88041003.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações e concorde em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

APÊNDICE C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Eu, Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa, Chefe do Serviço Patologia Bucal, fiel depositário dos prontuários e da base de dados deste departamento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, campus Fortaleza, declaro que a aluna Carolina Rodrigues Teófilo está autorizada a realizar, nesta instituição, o projeto de pesquisa “INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS miRNAs 10a, 17, 29c e 31 E A EXPRESSÃO DE IL-6 E STAT3 EM LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS, NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO”, sob responsabilidade da pesquisadora Prof^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, cujo objetivo geral é realizar uma avaliação molecular de desordens potencialmente malignas e neoplasias malignas de cavidade oral.

Ressalto que estou ciente de que serão garantidos os direitos, dentre outros assegurados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de:

- 1) Garantia da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos outros.
- 2) Que não haverá riscos para o sujeito de pesquisa.
- 3) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa.
- 4) Retorno dos benefícios obtidos através deste estudo para as pessoas e a comunidade onde foi realizado.

Informo-lhe ainda, que a pesquisa somente será iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para garantir a todos os envolvidos os referenciais básicos da bioética, isto é, autonomia, não maleficência, benevolência e justiça.