

JOÃO ARTUR RICIERY BRITO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS microRNAs LET7a E MIR15a E SUA RELAÇÃO
COM A IMUNOLocalização DAS PROTEÍNAS RAS, C-MYC E BCL-2 NO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

BELO HORIZONTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO ARTUR RICIERI BRITO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS microRNAs LET7a E MIR15a E SUA RELAÇÃO
COM A IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RAS, C-MYC E BCL-2 NO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Farmacologia Bioquímica e
Molecular do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia Bioquímica
e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

BELO HORIZONTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Laura Alice e João Luiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Ricardo Santiago Gomez pela grande oportunidade e por acreditar em mim. Eternamente grato pela paciência, incentivo, amizade e grande exemplo profissional e pessoal.

Ao amigo e Prof. Leandro Napier de Souza, por me incentivar desde a graduação e acreditar sempre. Pelo apoio incondicional e pelos ensinamentos e à Prof. Diele Barreto por ter me iniciado no mundo científico e pelo constante incentivo.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Molecular (FO-UFMG), Érica Rivers, Jeane Correa, Renata Gonçalves, Ana Carolina Netto, Cláudia Pereira, Luciano Marques, André Guimarães, Fabiano Cardoso, Michelle, Lincoln Pierre e Danielle Ramalho pela companhia e ensinamentos. Em especial agradeço aos amigos Fabrício Amaral, Marina Gonçalves e Paula Rocha pela constante presença e amizade.

A grande amiga Carolina Cavaliéri Gomes por ter me recebido de braços abertos, pela grande paciência em me ensinar e pela constante presença e amizade.

Ao Dr. Alvimar e equipe do Hospital Luxemburgo pela disponibilidade.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim e mesmo com minha ausência permaneceram presentes, em especial a Ellen Vieira e Fabrício Madureira.

Agradeço aos meus pais pelo constante incentivo, pela presença e por acreditar sempre. Aos meus irmãos e irmã por torcerem e a minha cunhada Gisély por sempre valorizar.

A Deus eternamente grato pela vida!

"A ciência serve para nos dar uma idéia de quão extensa é a nossa
ignorância."

(Félicité Robert de Lamennais)

RESUMO

Os microRNAs mir15a e Let7a são importantes reguladores do Bcl-2, ras e c-myc. Considerando que esses miRNA estão comumente alterados em vários cânceres e que essas proteínas são reportadas como alteradas no carcinoma de células escamosas de boca (CCEB), nos propomos a investigar-los em um grupo de casos de CCEB. Os miRNAs e as proteínas foram avaliados no tumor e no sangue de 20 pacientes através do PCR quantitativo em tempo real e imuno-histoquímica respectivamente. Não foi observada associação entre a expressão do mir15a e a proteína Bcl-2 nos tumores assim como com o estágio do tumor. Por outro lado, foi encontrado uma expressão reduzida desse miRNA no sangue de pacientes com CCEB no estágio avançado e com metástase regional. A expressão do Let7a nos tumores e no sangue não apresentou associação com o tamanho do tumor, metástase regional, estágio tumoral e imunolocalização das proteínas ras e c-myc. Em conclusão o presente estudo mostra que a redução na expressão do mir15a está associado com o estadiamento do CCEB.

Palavras chaves: Câncer oral, carcinoma de células escamosas de boca, microRNA, mir15a, let7a

ABSTRACT

MicroRNA mir15a and let7a are important regulators of bcl2, ras and c-myc proteins. Considering that these miRNA are commonly altered in many human cancers and that these proteins are reported to be altered in oral squamous cell carcinoma (OSCC), we proposed to investigate them in a set of OSSC cases. The miRNA as well as the proteins were evaluated in the tumour and blood of 20 patients by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry, respectively. The expressions of mir15a and bcl-2 protein in the tumours were not associated with each other or with tumour staging. On the other hand, we found reduced expression of this miRNA in the blood of patients with advanced stage of OSCC and with lymph node metastasis. The expression of let7a in the tumour and blood was not associated with tumour size, lymph node metastasis, tumour staging, and immunoexpression of ras and c-myc proteins. In conclusion, the present study shows that reduced expression of mir15a is associated with OSCC staging.

Keywords: oral cancer, oral squamous cell carcinoma, microRNA, mir15a, let7a.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

miRNA – microRNA

bcl2 – B-cell CLL/lymphoma 2

ras - v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

c-myc – myelocytomatosis oncogene homolog

CCEB – carcinoma de células escamosas de boca

RNA – ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

cDNA – DNA complementar

PCR- polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

µL- microlitros

Seg.- segundos

Min.- minutos

hrs – horas

∞ - infinito

ml- mililitros

H₂O – Água

g – grama

x g – múltiplo da aceleração da gravidade no nível do mar

rcf – força centrífuga relativa

RT-PCR- reverse-transcription PCR

Eff% – Eficiência

Ct – Threshold cycle

q-PCR – PCR quantitativo em tempo real

HPV – Vírus do papiloma humano

CCE – carcinoma de células escamosas

TA – Temperatura ambiente

TEMED – Tetramethylethylenediamine

DNase – deoxyribonuclease

RISC – RNA-induced silencing complex

Ago2 – Proteína Arganauto 2

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

FO-UFMG- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) incluídas no estudo	31
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão dos miRNAs endógenos RNU44, RNU48 e U47...	39
Figura 2: Curva de amplificação do teste de eficiência	40
Figura 3: Eficiência de amplificação do miRNA endógeno RNU44	40
Figura 4: Eficiência de amplificação do miRNA endógeno U47	41
Figura 5: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do mir15a no CCEB	42
Figura 6: Gráfico de dispersão referente a quantificação relativa do microRNA mir15a relacionado com o estágio do tumor	43
Figura 7: Gráfico de dispersão referente a quantificação relativa do microRNA mir15a relacionado com presença de metástase regional ...	43
Figura 8: Imunolocalização da proteína Bcl-2	44
Figura 9: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do Let7a no CCEB relacionada com o tamanho do tumor	45
Figura 10: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do Let7a no CCEB	46
Figura 11: Imunolocalização da proteína c-myc	47
Figura 12: Imunolocalização da proteína ras	48

SUMÁRIO

1) Introdução	13
2) Revisão da Literatura	16
2.1. Carcinoma de Células Escamosas de boca	17
2.2. MicroRNA	19
2.2.1. Biogênese dos microRNAs	20
2.2.2. Ação dos microRNAs	20
2.2.3. microRNA e câncer	21
2.2.4. microRNA let-7a	22
2.2.5. microRNA mir15a	24
3) Objetivos	26
4) Metodologia	28
4.1. Amostras	30
4.2. Extração de RNA	31
4.3. Síntese de cDNA (Transcrição Reversa)	33
4.4. PCR em Tempo Real - qPCR	33
4.4.1. Padronização reações de PCR em tempo real	34
4.4.1.1. Escolha do endógeno	34
4.4.1.2. Teste de eficiência	34
4.4.2. Quantificação	35
4.5. Imuno-histoquímica	36
4.6. Análise estatística	37

5) Resultados	38
5.1. Eficiência (Eff%) e escolha dos endógenos	39
5.2. Expressão do miRNA mir15a	41
5.3. Imunolocalização da proteína Bcl-2	44
5.4. Expressão do miRNA Let7a	45
5.5. Imunolocalização das proteínas c-myc e ras	46
6) Discussão	49
7) Conclusão	53
8) Referências	55

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Caso

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Anexo D – Artigo científico referente aos resultados obtidos neste trabalho

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas é definido como uma neoplasia maligna derivada do epitélio escamoso. Apresenta-se como um estágio final de alterações no epitélio estratificado escamoso, culminando no rompimento da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo adjacente. O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) mostra aspectos clínicos variáveis, podendo apresentar-se como uma placa branca ou vermelha, úlceras, lesões vegetantes ou ulcerativas. O CCEB pode acometer principalmente lábios, língua, soalho da boca e orofaringe (Das et al., 2002; Tsantoulis et al., 2007). O CCEB é a 6ª neoplasia mais comum, e cerca de 90% de todos os carcinomas de boca são carcinomas de células escamosas, sendo diagnosticados 500.000 novos casos por ano no mundo (Das et al., 2002; Tsantoulis et al., 2007).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento do CCEB, dentre eles o tabaco, álcool, infecções virais e fatores genéticos (Das et al., 2002; Kannan et al., 2006, Warnasulasuriya, 2009). O processo de carcinogênese do CCEB ocorre devido ao acúmulo de danos genéticos, que leva à desregulação celular com alteração da sinalização, do reparo do DNA e ciclo celular. Muitas alterações moleculares têm sido descritas e relacionadas com o desenvolvimento do carcinoma, dentre elas as mutações nos genes supressores de tumor p53, p16, pRb e E-caderinas e em oncogenes RAS e MYC (Mithani, et al., 2007; Kannan et al., 2006; Ibrahim et al. 2003; Das et al.,2000).

Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de levantar os genes que apresentam expressão alterada no CCEB. Estudos recentes evidenciam 70 genes com expressão aumentada e 55 genes com expressão diminuída no CCEB (Leethanakul, 2003; Ha, 2003; Ginos, 2004; Tomioka, 2006; Kondoh, 2007).

Novos fatores genéticos relacionados ao câncer têm sido descritos. Estudos recentes tem relacionado o envolvimento de pequenos RNAs, conhecidos como microRNA (miRNA), na regulação do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular (Alvarez-Garcia, 2005; Calin et al., 2006; Bandrés et al., 2006). A primeira evidência de que os miRNAs estão envolvidos na carcinogênese veio da evidência da perda da expressão de dois conjuntos de miRNAs em leucemia linfocítica crônica e em câncer de próstata (Calin et al., 2002; Garzon et al., 2006). Posteriormente, estudos

demonstraram a ação oncogênica e supressora de tumor dos miRNAs desempenhando papel importante na carcinogênese.

O conhecimento sobre o genoma do CCEB não pode ser trabalhado apropriadamente no desenvolvimento de ferramentas moleculares para o tratamento da doença, sem uma compreensão detalhada dos mecanismos envolvidos na tradução das proteínas. Como os miRNAs podem alterar a expressão da proteína pós-transcricionalmente, o seu estudo poderá iniciar uma nova era no desenvolvimento de novos instrumentos moleculares a serem empregados no estadiamento e tratamento desta importante doença neoplásica que afeta a população brasileira.

O objetivo do presente estudo é avaliar a expressão dos miRNAs em amostra de CCEB comparado com amostras de mucosa oral saudável, assim como a expressão desses miRNAs em amostras de sangue desses pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

O carcinoma de células escamosas (CCE) é definido como uma neoplasia maligna derivada do epitélio escamoso, apresentando-se como um estágio final de alterações no epitélio estratificado escamoso, culminando no rompimento da camada basal e invasão do tecido conjuntivo adjacente. O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) mostra aspectos clínicos variáveis, podendo apresentar-se como uma placa branca ou vermelha, úlceras, lesões vegetantes ou ulcerativas (Das, 2002; OMS, 2005; Tsantoulis et al., 2007).

Histologicamente, o CCE pode apresentar células com alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, hiperchromatismo e pleomorfismo nuclear, além de alterações na relação núcleo/citoplasma, disceratose, pleomorfismo celular e número de mitoses elevadas e atípicas (Warnakulasuriya et al., 2008).

O CCEB tem como principais sítios de acometimento lábios, língua, soalho da boca e orofaringe, sendo que a sua incidência é maior em pacientes do sexo masculino e com idade acima de 40 anos (Das, 2002; OMS, 2005; Tsantoulis et al., 2007).

Devido a sua acentuada morbidade e alta taxa de mortalidade, o CCEB é considerado bem agressivo, apresentando uma sobrevida menor que 50% em longo prazo (Mork et al., 1998). O principal determinante para que a doença apresente um alto índice de mortalidade é o estágio avançado quando a doença é diagnosticada. Por ser assintomático o diagnóstico precoce do câncer é bastante difícil e as lesões iniciais são raramente identificadas pela maioria dos profissionais de saúde (Scully, 2000).

A patogênese do CCEB está relacionada a um acúmulo de fatores genéticos, como alterações em oncogenes e genes supressores de tumor além de fatores de risco como o consumo de tabaco e álcool, além de exposição à radiação, infecção viral e susceptibilidade genética (Das, 2002; OMS, 2005; Tsantoulis et al., 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), o tabaco e o álcool têm sido descritos como fatores de risco dominantes para o desenvolvimento de lesões malignas na região de orofaringe e boca. O uso abusivo de tabaco juntamente com o álcool tem sido responsável por 75% de lesões malignas na Europa, América e Japão (OMS, 2005).

O papel do vírus do papiloma humano (HPV) tem sido bastante investigado no CCEB. O HPV é encontrado especificamente nas células da camada basal do epitélio da mucosa. Diferentes tipos de HPV são descritos, dentre eles o HPV1 que está relacionado com infecção de células epiteliais cutâneas, já o HPV6, 11, 16 e 18 estão relacionados com infecção de células epiteliais da mucosa da cavidade oral, orofaringe e trato genital (Ragin et al., 2007). O genoma do HPV é composto por vários genes e regiões não codificantes que desempenham um importante papel na replicação viral, transcrição e carcinogênese. Algumas proteínas codificadas pelo HPV possuem importante ação oncogênica, assim como ação na regulação do ciclo celular e transformação. O HPV-16 tem sido associado com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, sendo identificado em 90% dos casos na região de cabeça e pescoço e em 50% dos casos da região de orofaringe (Ha, et al., 2002).

Apesar da importância dos fatores causais, a incidência do CCEB entre pessoas expostas a esses fatores é relativamente baixa, sendo que esta neoplasia surge após anos de exposição. O câncer de boca pode se desenvolver na ausência desses fatores de risco, evidenciando então a importância da susceptibilidade do hospedeiro e do acúmulo de fatores genéticos (Scully, 2000; Das et al., 2002).

O câncer de boca se origina como consequência de múltiplos eventos genéticos moleculares, com consequente distúrbio dos mecanismos de sinalização e regulação do ciclo celular e/ou alterações nos mecanismos de reparo do DNA e ciclo celular. Esses eventos moleculares geram instabilidade genética e aumentam a probabilidade de transformação neoplásica, podendo surgir em decorrência da ação de agentes químicos, físicos, biológicos e também, de alterações que surgem espontaneamente (Scully, 2000; Das et al., 2002).

Uma importante consequência desse acúmulo de eventos genéticos é o aumento da função de oncogenes e inibição da função dos genes supressores de tumor ou seus produtos que estão intimamente envolvidos na carcinogênese (Scully,

2000; Das et al., 2002). Muitas alterações moleculares têm sido descritas afetando o genoma do CCEB e relacionados com o seu desenvolvimento, como as mutações nos genes supressores de tumor p53, p16, pRb e E-caderinas e nos oncogenes h-ras e c-myc (Mithani, et al., 2007; Kannan, et al.; 2006; Ibrahim, et al. 2003; Das, et al.,2000).

2.2. MicroRNA (miRNA)

Os miRNAs foram descobertos primeiramente em *Caenorhabditis elegans* por Ambros e colaboradores (Ambros, 1993), e posteriormente em organismos multicelulares atuando com um papel crucial na regulação do desenvolvimento de plantas e animais (Lagos-Quintana, 2001; Rodriguez, et al., 2004; Ambros, 2004; Johnson et al., 2005; Harfe, 2005; Slack, et al. 2006; Plasterk, 2006; Loa, et al, 2007).

O miRNA faz parte de uma grande família de pequenos RNAs que não codificam proteínas, com aproximadamente 22 nucleotídeos. O miRNA age mediando a expressão do gene na fase pós-transcricional, por degradação ou inibição do RNA mensageiro (mRNA), através do pareamento parcial ou total de bases em sítios complementares, predominantemente na região não traduzida 3' (3'UTR) do mRNA (Bartel, 2004, Chen, 2005, Gartel, 2006, Zhang B, et al., 2007). Aproximadamente 50% de todos miRNAs estão encaixados dentro dos introns de genes que codificam proteínas ou RNAs transcritos que não codificam proteínas. Os miRNA estão mapeados em regiões genômicas específicas. Os genes de origem do miRNA podem estar localizados em regiões intergênicas, introns de outros genes, ou até mesmo exons, podendo algumas vezes um transcrito codificar mais de um miRNA. Isso sugere que um grande número de miRNA pode estar associado à expressão dos seus genes de origem (Garzon et al., 2006). Estudos mostram que os miRNAs possuem a capacidade de regular de 20 a 30% de todos os genes humanos (Ambros, 2004; Johnson et al., 2005; Harfe, 2005; Slack et al. 2006; Plasterk, 2006; Loa et al, 2007).

2.2.1. Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são transcritos inicialmente pela RNA polimerase II, formando o miRNA primário (pri-miRNA) com várias bases em seu comprimento. Esses RNAs são tamponados e subsequente clivados no núcleo pela enzima RNase III endonuclease (Drosha) que libera um miRNA precursor de 60-75 nucleotídeos (pre-miRNA) (Gregory et al., 2005; Haber et al., 2006; Slack et al., 2006; Huppi et al., 2007).

O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela *exportin-5* e é processado pela enzima *Dicer* (RNase III), resultando em um miRNA maduro de 10-24 nucleotídeos. O miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC e levado à região alvo do RNA mensageiro (mRNA), podendo então desempenhar sua função (Bartel, 2004; Haber et al., 2006; Garzon et al., 2006; Huppi et al., 2007).

2.2.2. Ação dos miRNAs

Muitos miRNAs são solitários, porém outros podem estar arrançados em conjuntos com grandes semelhanças em suas seqüências. Usualmente, verifica-se de dois a três miRNAs em um conjunto, no entanto, grandes conjuntos tem sido identificados (Ambros, 2004; Altuvia et al., 2005). Sendo assim, é possível que vários genes sejam regulados pelo mesmo conjunto.

O miRNA regula a expressão gênica através de uma clivagem direta do mRNA alvo ou inibindo sua tradução através de uma complementariedade com a região não-traduzida 3' (UTR) do mRNA alvo. No geral, os miRNAs não apresentam pareamento completo ao mRNA alvo, sendo que esse pareamento parcial não leva a clivagem do mRNA. Neste caso, ao invés do complexo RISC clivar o mRNA, irá ligar-se a ele impedindo sua tradução (Bartel 2004; Osada et al., 2007). A clivagem do mRNA se dá através da presença da proteína Arganauto 2 (Ago2) que se associa ao complexo RISC, sendo a única proteína humana capaz de clivar o mRNA (Pushparaj, et al., 2008). Para ocorrer apenas o silenciamento do mRNA impedindo

sua tradução o complexo RISC deve estar associado a qualquer outra proteína argonauta (Osada et al., 2007).

O miRNA, ao se incorporar ao complexo RISC associado à proteína Ago2, pode desempenhar um papel importante no processo de transcrição. Quando o miRNA associado a esse complexo (RISC + Ago2) se liga a uma região promotora, ele desempenha um papel de ativador da transcrição daquele gene (Li et al., 2006; Pushparaj et al., 2008). Porém, o exato mecanismo dessa mediação por miRNA no processo de transcrição ainda é desconhecido (Pushparaj et al., 2008)

2.2.3. miRNA e Câncer

Estudo desenvolvido por Calin e colaboradores (2004) demonstrou que mais de 50% dos genes de miRNA estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer ou em sítios de fragilidade, sugerindo que o miRNA pode desempenhar um papel importante na patogênese do câncer (Calin et al., 2004).

A primeira evidência de que os miRNAs estão envolvidos na carcinogênese vem da evidência da perda da expressão de dois miRNAs (mir-15a e mir-16) em leucemia linfocítica crônica e em câncer de próstata (Calin et al., 2002; Garzon et al., 2006). Posteriormente, estudos demonstraram a ação oncogênica e supressora de tumor dos miRNAs desempenhando então um papel importante na carcinogênese (Zhang et al., 2006; Hammond, 2006; Slake, 2006; Hebert, 2007, Tran, 2007).

Um miRNA oncogênico (oncomirs) promove a formação tumoral pela supressão negativa dos genes supressores de tumor e/ou genes que controlam a diferenciação celular ou apoptose. Por outro lado, os miRNAs supressores de tumor previnem a formação tumoral através da inibição negativa de oncogenes. Portanto, a alta expressão de miRNA oncogênicos pode reduzir a produção protéica dos genes supressores de tumor, assim como a perda da expressão dos miRNAs supressores de tumor pode causar elevadas taxas de proteínas oncogênicas (Zhang et al., 2006; Hammond, 2006; Slake, 2006; Hebert, 2007, Tran, 2007).

Estudos recentes tem avaliado a expressão de diferentes miRNAs em CCE da cabeça e pescoço. O miRNA-21 (mir-21) já tem sido identificado com uma ação

oncogênica em glioblastomas, câncer cerebral e pancreático. Mais recentemente tem sido demonstrado uma expressão aumentada do mir-21 em CCE de cabeça e pescoço, além da possível envolvimento do mir-21 na regulação da proteína bcl-2, alterações no desenvolvimento e proliferação celular em casos de CCE de cabeça e pescoço (Chang et al., 2008). O mir-21 está com expressão aumentada também em outros alterações malignas, sugerindo que o mir-21 pode ser um miRNA específico do câncer (Tran et al., 2007).

Expressão diminuída do mir-494 foi encontrada em casos de CCE de cabeça e pescoço, sendo que este mirRNA está localizado no cromossomo 14q32.31 que é uma região reconhecidamente deletada nestes tumores (Chang et al., 2008). Expressão diminuída do mir-184 foi encontrada no CCEB (Wong et al., 2008). Por outro lado, estes autores observaram nível aumentado deste mirRNA no plasma, com redução após a remoção do tumor.

Tran et al. (2007) evidenciaram alteração na expressão de 54 miRNAs no CCE de cabeça e pescoço, dentre eles 31 e 21 mostraram expressão aumentada ou diminuída, respectivamente. O mir-205 mostrou expressão aumentada no CCE de cabeça e pescoço quando comparado com outros tipos de câncer, evidenciando que o mir-205 pode estar superexpresso exclusivamente no CCE (Tran et al., 2007).

2.2.4. miRNA Let-7a

O miRNA Let-7a (let7a) foi o primeiro miRNA identificado em *Caenorhabditis elegans*. Esta família está altamente conservada em nematódeos, camundongos e humanos. O gene do mir-let7a está localizado no cromossomo 9q22.3, porém tem sido também evidenciada sua presença em diferentes cromossomos (Osada et al., 2007). Este miRNA está frequentemente relacionado com o desenvolvimento de diferentes tumores sólidos, como em câncer de pulmão, cérebro e gástrico, agindo como um gene supressor de tumor clássico (Osada et al., 2007; Zhang et al., 2007).

O let7a tem sido considerado como tendo importante papel na patogênese do câncer de pulmão. Evidências emergentes sugerem que o miRNA let-7 pode

controlar o desenvolvimento do câncer de pulmão (Zhang et al., 2007). A expressão do miRNA Let-7 está freqüentemente reduzida e essa redução está associada com a sobrevida, independente do estágio da doença. Além disso, a alta expressão do miRNA Let-7 inibe o desenvolvimento tumoral em casos de adenocarcinoma (Takamizawa et al., 2004).

A expressão do H-ras e c-myc é regulada negativamente pelo Let-7 através da ligação no mRNA impedindo sua tradução (Johnson et al., 2005). O H-ras e MYC são oncogenes importantes na patogênese do CCEB.

H-ras e c-myc estão entre as proteínas importantes relacionadas com a carcinogênese. No estágio inicial do carcinoma, é observado uma expressão alterada do c-myc, bem como de outras proteínas como p53, ciclina D1 e Ki-67. Com a progressão para estágios avançados, um aumento significativo da expressão do c-myc é observado, além de uma expressão alterada da H-ras. Estes dados sugerem que a desregulação do H-ras e c-myc contribui para o processo da carcinogênese oral (Shah et al., 2007).

Marcadores moleculares, dentre eles o c-myc, podem ser utilizados para predizer o risco para displasia. Dentre alguns marcadores o mais significativo para predizer um risco de progressão para um estágio avançado do câncer é o EGFR seguido do H-ras e c-myc. O aumento da expressão do fator de crescimento EGFR é sustentado pela expressão do c-myc e alterações na expressão de outros oncogenes, levando a uma transformação maligna. Já foi observada uma significativa correlação entre EGFR e c-myc em estágios avançados de tumores orais. Além do c-myc, o H-ras também está relacionado com o EGFR na progressão tumoral (Kalyankrishna et al., 2006; Shah et al., 2007).

A via EGFR-ras possivelmente pode inibir a expressão assim como estar envolvido na superexpressão da ciclina D1, o que sugere que o H-ras funciona como um oncogene em tumores malignos (Sathyan et al., 2006). Porém foi demonstrado que o oncogene ras só induz transformação em cooperação com outros oncogenes como o c-myc ou quando genes supressores de tumor como p53 ou p16 estão inativados (Serrano et al., 1997).

2.2.5. MicroRNA mir15a

O miR-15a (mir15a) faz parte de uma família de miRNAs que representam a primeira evidencia do envolvimento de miRNA no câncer. Este miRNA juntamente com o miR-16-1, que faz parte da mesma família, foi primeiramente evidenciado em casos de leucemia linfocítica crônica (LLC) e posteriormente em câncer de próstata (Calin et al., 2002; Zhang et al., 2007). Este miRNA está localizado no cromossomo 13q14.3, região deletada na maioria dos casos de LLC. Uma análise mais detalhada indica que o mir15a e o mir16-1 são os únicos miRNAs presentes nessa região perdida em LLC, sendo observada expressão ausente ou diminuída dos mesmos na maioria dos casos (Calin et al., 2002). Uma deleção e translocação desses dois miRNAs, bem como sua baixa expressão, é encontrada em 65% dos pacientes com LLC. Uma mutação germinativa no precursor primário do mir15a e mir16-1 está associada com os baixos níveis de expressão do miRNA e pode estar associada com a deleção do alelo normal (Cimmino et al., 2005).

Foi evidenciado que o bcl-2 é um alvo do mir15a, sendo que este miRNA regula negativamente o bcl-2 na fase pós-transcricional. Em casos de LLC, a expressão do mir15a é inversa à expressão do bcl-2. Isto sugere que o mir15a pode ser utilizado como ferramenta terapêutica em casos de tumores que apresentam uma superexpressão da bcl-2 (Cimmino et al., 2005; Zhang et al., 2007).

A proteína bcl-2 inibe morte celular e facilita a sobrevivência da célula. A expressão de bcl-2 em neoplasias humanas, como neuroblastoma, linfomas e carcinomas, sugere que essa oncoproteína possui um papel importante na patogênese de neoplasias. Alta expressão dessa oncoproteína em casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e de cavidade oral é relatada (Singh et al., 1998). O bcl-2 tem sido encontrado superexpresso em vários cânceres humanos e sua expressão aberrante pode estar relacionada com várias mudanças moleculares, além de inibição da apoptose, contribuindo assim para a carcinogênese (Zhang et al., 2009).

A bcl-2 está localizada no citoplasma de células do CCEB, sendo a sua imunoexpressão infreqüente na mucosa normal, podendo ocasionalmente ser

visualizada em células da camada basal (Zhang et al., 2009). Bcl-2 pode ser considerado como um marcador da transição para o câncer (Singh et al., 1998), sendo que a sua expressão tem sido relacionada com lesões mais agressivas, metastáticas e de prognóstico ruim (Zhang et al., 2009).

No presente trabalho escolhemos inicialmente estudar a expressão dos miRNAs Let7a e mir15a por estarem diretamente relacionados com diversas neoplasias e estarem localizados em sítios de fragilidade que frequentemente estão alterados no câncer. Além disso esses miRNAs estão diretamente relacionados com oncoproteínas envolvidas no CCEB, como H-ras, c-myc e bcl2.

3. OBJETIVO

Baseado na escassez de estudos com miRNA em CCEB e sua importância no controle de importantes proteínas envolvidas na carcinogênese dessa lesão, os objetivos do nosso trabalho são:

1. Comparar a expressão dos miRNAs let-7a e mir15a no CCEB com mucosa oral normal, relacionando com o estadiamento do tumor.
2. Comparar a expressão dos miRNAs let-7a, mir15a no sangue de pacientes com CCEB com sangue de pacientes saudáveis, relacionando com o estadiamento do tumor.
3. Comparar a expressão do miRNAs let-7a com a expressão das proteínas h-ras e c-myc, assim como a expressão do mir15a com a expressão da proteína bcl-2 em amostras de CCEB.

4. METODOLOGIA

O projeto foi primeiramente submetido e aprovado pela Câmara do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e, posteriormente, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, parecer nº ETIC518/07 (Anexo A).

Inicialmente, foi realizado um levantamento dos principais genes com expressão alterada e envolvidos com o crescimento, atividade supressora ou angiogênica, ação invasora ou atividade metastática no CCEB (Leethanakul, 2003; Ha, 2003; Ginos, 2004; Tomioka, 2006; Kondoh, 2007). Simultaneamente, foi realizado uma busca de todos os miRNAs já descritos em humanos através do banco de dados *miRBase:sequences release12.0* (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Em seguida, as informações foram cruzadas, levantando todos os miRNAs possivelmente relacionados com a expressão dos genes alterados no CCEB através de consulta ao banco de dados *TargetScan 4.0* (<http://www.targetscan.org>). Dentre os 263 miRNAs listados, selecionamos para o nosso estudo aqueles que estão associados com a regulação de 10 ou mais genes com expressão alterada em tumores localizados ao longo do trato digestivo superior e respiratório. Como critério adicional buscamos selecionar apenas miRNAs potencialmente relacionados com uma ou mais proteínas que apresentam expressão aumentada ou diminuída no CCEB. Após estas etapas, os seguintes miRNAs candidatos foram escolhidos: hsa-let-7 e hsa-miR-15.

Para avaliar a expressão dos miRNAs (let7a e mir15a) foi realizado um estudo do tipo transversal experimental. O grupo caso foi composto por indivíduos que apresentavam diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB e o grupo controle por indivíduos saudáveis não portadores de condições patológicas relevantes.

4.1. AMOSTRAS

Para a coleta das amostras o paciente e/ou responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e solicitados a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido para a participação na pesquisa (Anexo B / Anexo C). O paciente só participou da pesquisa após leitura e assinatura, de livre e espontânea vontade, desse documento.

Como critérios de elegibilidade foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB. Foram excluídos os indivíduos que não concordarem em participar do estudo, indivíduos debilitados pela doença e indivíduos portadores de outras doenças. Fragmentos de mucosa normal obtidos de indivíduos voluntários durante cirurgias de doenças não-neoplásicas foram utilizados como controle.

As amostras foram coletadas em RNAHolder (BioAgency Biotecnologia, SP, Brasil), divididas em dois fragmentos onde um fragmento foi colocado em formoldeído 10% e incluído em parafina, o outro fragmento mantido congelado a -80°C até a extração do RNA. Todos os casos foram analisados por dois patologistas bucais para confirmação do diagnóstico. As amostras de sangue foram coletadas no momento do procedimento cirúrgico em tubo contendo anticoagulante EDTA. Foram incluídas no estudo 20 amostras de CCEB e quatro amostras de mucosa oral saudável (Tabela 1).

Tabela1: Amostras de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) incluídas no estudo

	Gênero	Idade	Localização	TNM	Estadiamento
1	M	56	Trígono retromolar e tuber	T2N2M0	IV
2	M	55	Assoalho de Boca	T3N0M0	III
3	F	61	Língua	T4N2M0	IV
4	M	49	Assoalho de Boca	T3N0M0	III
5	M	51	Língua	T2N0M0	II
6	F	68	Língua	T4N1M0	IV
7	M	56	Trígono retromolar	T4N0M0	IV
8	F	41	Língua + trígono retromolar	T3N0M0	III
9	M	59	Gengiva + assoalho de boca	T4N0M0	IV
10	M	55	Trígono retromolar	T4N1M0	IV
11	M	44	Assoalho de Boca	T4N0M0	IV
12	M	37	Assoalho de Boca	T4N0M0	IV
13	M	59	Língua	T2N0M0	II
14	M	74	Gengiva	T4M0M0	IV
15	F	50	Assoalho de Boca	T2N0M0	II
16	M	73	Trígono retromolar	T2N0M0	II
17	M	72	Assoalho de Boca	T4N3M0	IV
18	M	61	Assoalho de Boca	T2N0M0	II
19	M	68	Língua + trígono retromolar	T3N0M0	III
20	M	73	Gengiva	T4N0M0	IV

4.2. EXTRAÇÃO DO RNA

O tecido foi macerado em recipiente específico com nitrogênio líquido e posteriormente com um Tissue Grinder (Kontes, Vineland, NJ, USA) em Trizol, e a extração realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA). Foi adicionado 200 µl de clorofórmio (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), sendo a mistura agitada em vortex por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente (TA), em seguida centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g (rcf) a 4°C. Após a centrifugação foi observada a separação de três fases: vermelha (fase orgânica)

composta pelo fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa incolor onde está presente o RNA. A fase aquosa foi removida cuidadosamente e transferida para outro tubo. Para precipitação do RNA presente na fase aquosa foi adicionado 500 µl de álcool isopropílico (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), sendo então homogenizada e incubada por 10 minutos a TA e centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g (rcf) a 4°C. Foi formado então um *pellet* contendo o RNA precipitado. O líquido sobrenadante foi eliminado e então o RNA foi lavado com a adição de 1 ml de álcool etílico 75% (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g (rcf) a 4°C, o sobrenadante foi eliminado e o RNA deixado secar por 5 a 10 minutos à TA. Após seco o RNA foi ressuscitado em 20 µl de água DEPC, aliquotado e armazenado a temperatura de -80°C.

O sangue foi processado com o objetivo de separar a parte celular do sangue. Posteriormente o material foi submetido a extração de RNA segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA), como descrito acima.

As amostras de RNA foram submetidas à quantificação através da espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,9 a 2,0 (leitura 260/280) (BANDRÉS et al., 2006). A concentração de RNA foi calculada da seguinte forma: $[\text{RNA (g/mL)}] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde, "A" é uma constante definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absorver luz em um determinado comprimento de onda, sendo para o RNA igual a 40. A_{260} é a leitura da amostra no comprimento de onda de 260 nm. A diluição aplicada foi de 50, que corresponde quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

O RNA (1µg) então foi aplicado em gel de acrilamida 15% para verificação da sua qualidade. O gel foi confeccionado respeitando as seguintes proporções: 7,2 g de Uréia, 1,5 ml de 10X TBE, 5,6 ml Acrilamida 40% (acrilamida:bis acrilamida = 19:1), H₂O livre de nuclease para 15 ml, 75 µl TAE (persulfato de amônio 10%) e 15 µl de TEMED. Foi adicionada à amostra *Gel Loading Buffer II* (Ambion, Foster city, CA, USA) em igual volume aquecido a 95°C por 5 minutos e submetido à eletroforese a 30-45 mA. Posteriormente, o gel foi revelado em solução brometo de etídio por 5 minutos, lavado por 5 minutos em 1x TBE e analisado em

transluminador de UV. Foram observadas duas bandas distintas representando o RNA ribossomal 28S e 18S, confirmando a integridade e qualidade do RNA.

4.3. SÍNTESE DE cDNA - TRANSCRIÇÃO REVERSA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído das amostras, via transcrição reversa utilizando um Kit específico para miRNA (TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Foram utilizados RT primers para cada microRNA estudado permitindo a conversão do fragmento específico correspondente ao miRNA de interesse. Esse método se baseia na utilização de um primer com estrutura do tipo *stem-loop* (Chen et al., 2005). Essa conformação foi a solução para solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu pequeno tamanho. O *stem-loop* do primer possui uma especificidade para apenas o miRNA maduro permitindo a formação de uma junção primer-miRNA, estendendo a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um amplicon maior, permitindo o uso de um TaqMan Assay™ para quantificar a expressão do miRNA por PCR quantitativo em Tempo Real. Além disso, o fato de o TaqMan Assay™ possuir dois primers e uma sonda para PCR faz também com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles. As condições de reação foram de 16º por 30 minutos, 42º por 30 minutos, 85º por 5 minutos e 4º - hold ∞, para volume final de 15 µl.

4.4. PCR EM TEMPO REAL – qPCR

A PCR quantitativo em tempo real é empregada para inferir a quantidade inicial de um determinado produto através do comportamento da cinética de amplificação. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação, sendo coletadas informações a cada ciclo. Para essa análise é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente. Para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras utiliza-se o valor de Ct (*Threshold cycle*) onde cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*.

Para que seja possível a detecção do aumento de produto de uma PCR ao longo de cada ciclo através da fluorescência é preciso marcar o fragmento amplificado com alguma molécula fluorescente. Para essa marcação utiliza-se basicamente dois sistemas de detecção, o SYBR™ Green e TaqMan™. O SYBR™ Green emite sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla-fita, enquanto que no TaqMan™ a fluorescência depende do anelamento de uma sonda específica entre os dois primers, sendo mais preciso.

Existem basicamente dois tipos de quantificação, a quantificação absoluta onde se obtêm valores numéricos como número de cópias ou nanogramas de DNA. A quantificação relativa consiste na comparação entre os Cts de cada amostra, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza. Essa técnica tem sido amplamente empregada em estudos de carga viral, transgênicos, expressão gênica e de miRNA.

4.4.1. PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

4.4.1.1. Escolha do endógeno

Para a escolha do endógeno foram testados três miRNAs (U47, RNU44 e RNU48) que apresentam expressão regular em diferentes tecidos, conforme sugestão do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Foi realizado um teste em amostras de carcinomas de células escamosas de boca e amostras de mucosa oral saudável. As amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa, e então realizado o PCR em tempo real para verificação da cinética de amplificação dos miRNAs endógenos nos diferentes tecidos.

4.4.1.2. Teste de eficiência

Após a seleção do endógeno, se torna necessário verificar a eficiência de amplificação do endógeno em relação ao miRNA alvo que será estudado. Para se

obter a eficiência de amplificação é utilizado o valor de *slope* que corresponde à inclinação da reta passando por diferentes pontos de diluição, sendo o valor ideal igual a -3,33 e o valor de R^2 que deve ser aproximadamente 0,99. O valor de eficiência tem que variar entre 88 e 105%.

Foram realizadas diluições seriadas de uma solução de estoque com concentração conhecida, onde se obtêm duas séries com 6 pontos, uma diluição seriada 1:2 (100 ng - 50ng - 25 ng - 12,5 ng - 6,25 ng) e diluição seriada 1:10 (100 ng - 10 ng - 0,1 ng - 0,01 ng - 0,001 ng) e a variação de Ct (Threshold cycle) esperada é de 1 e 3,3 respectivamente.

4.4.2. QUANTIFICAÇÃO

Para a detecção da expressão do miRNA foi utilizado o *Step-One Real-time PCR 48-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) através da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os resultados apresentados em Log10 (Livak & Schmittgen, 2008). Os miRNAs analisados foram hsa-let-7a e hsa-mir-15a (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems) e hsa-U47, hsa-RNU44 e hsa-RNU48 que são miRNAs controles recomendados pela Applied Biosystems.

A reação foi realizada utilizando *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições de reação foram estabelecidas seguindo as recomendações do fabricante (95°C por 10 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto) com volume final de 20 µl, e todas as amostras em triplicata.

O nível de expressão foi determinado baseando-se no Ct do endógeno que posteriormente era utilizada para normalizar o Ct da amostra estudada. Com o valor normalizado foi realizado então a comparação com o calibrador escolhido. Esse valor então foi aplicado à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2008). O calibrador foi composto por uma mistura de 4 amostras de mucosas orais coletadas de pacientes que não apresentavam nenhuma condição neoplásica.

O método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) é um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostra estudada, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de

referência (Applied Biosystems User Bulletin Nº2 – P/N 4303859 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Análises utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tem sido amplamente utilizadas em estudos de expressão gênica (Schmittgen, 2008).

4.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes foram desparafinizados em Xilol (C_8H_{10}) por 18 hrs. e reidratados gradativamente por 5 minutos em Etanol 100%, 95% e 80%. Posteriormente os cortes foram tratados com hidróxido de amônio 10% em etanol a 95% por 10 minutos e lavado 7 vezes em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com a solução recuperador de antígeno (DAKO® Target Retrieval Solution, pH 6,0 Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA). As amostras foram aquecidas na solução a 95°C por 30 minutos na panela elétrica a vapor, posteriormente resfriada vagarosamente em temperatura ambiente e lavada em 5 banhos de água destilada. Para bloqueio da peroxidase endógena foi realizado dois banhos de 5 minutos em solução de metanol + peróxido de hidrogênio 20 v (1:1). As amostras foram lavadas em água destilada e posteriormente em solução de TRIS-HCl (ph=7.4) em três banhos de 5 minutos.

A incubação primária foi realizada por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação leve, com os anticorpos bcl2, diluição 1:20 , Clone 124 (Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA), c-myc, diluição 1:75, Clone 3C117 (Santa Cruz® Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), e h-ras, diluição 1:20, Clone F235 (Santa Cruz® Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Após lavagem com TRIS-HCL, foi realizada incubação com o sistema Envision (Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação leve.

A revelação foi realizada com solução de diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO, USA) com peróxido de hidrogênio 10% e a contra coloração com hematoxilina de Mayers. Cortes sem o anticorpo primário foram utilizados como controle negativo. Apenas os cortes contendo áreas de tumor suficientes para avaliação foram considerados. Dois patologistas experientes avaliaram os cortes e classificaram as reações de acordo com o número de células positivas (0, marcação negativa; +1, 0-25% de células positivas; +2, 25-50% de células positivas; +3, mais de 50% de células positivas).

4.6. Análise estatística

Foram realizados os testes não paramétricos Mann-Whitney ou Correlação de Spearman quando aplicáveis, para investigar a possível relação ou correlação entre as variáveis. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada com ajuda do pacote estatístico BioEstat versão 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Eficiência (Eff%) e escolha dos endógenos

Ao verificar a expressão dos miRNAs endógenos (U47, RNU44 e RNU48) em amostras de CCEB, mucosa oral normal e sangue foi observada uma expressão homogênea dos endógenos RNU44 e U47 entre o grupo caso e controle, o que não foi observado para o endógeno RNU48 (Figura 1). Baseado nesses resultados, para o estudo foram utilizados os endógenos RNU44 para o tumor e U47 para o sangue.

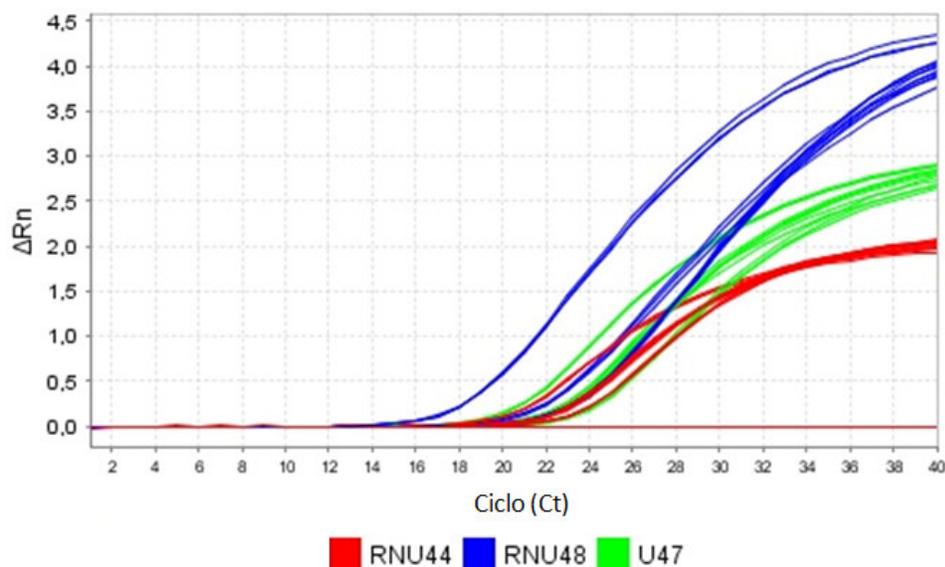


Figura 1 – Expressão dos miRNA endógenos RNU44, RNU48 e U47 em casos de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) e mucosa oral normal. O RNU48 não apresentou amplificação homogênea entre o grupo caso e controle.

A eficiência entre os endógenos escolhidos e o miRNA alvo mostrou-se próximo a 100%, revelando uma melhor dinâmica de amplificação e capacidade total do kit de transcrição reversa (Figura 2). A mesma eficiência foi observada no teste das diluições seriadas, onde foi observado uma diferença de aproximadamente 3,3 ciclos (CTs) para as diluições 1:10 para o endógeno RNU44 nos experimentos com tumor (Figura 3) e para o endógeno U47 para o experimento com sangue (Figura 4).

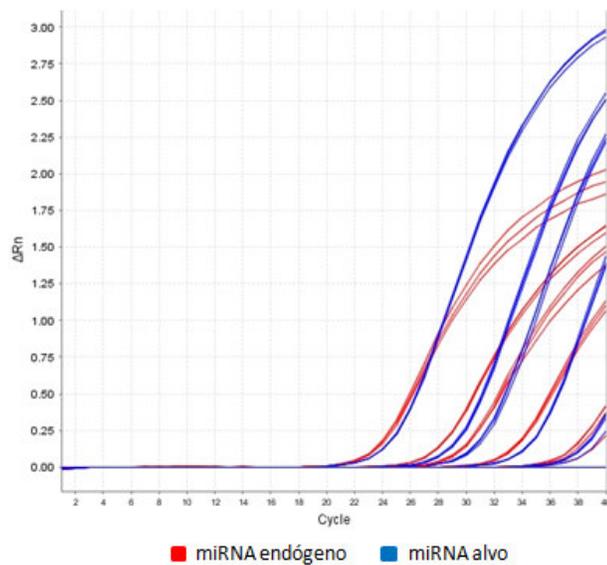


Figura 2 – Curva de amplificação do teste da eficiência do miRNA endógeno RNU44 e do mirRNA alvo let7a com diluições seriadas.

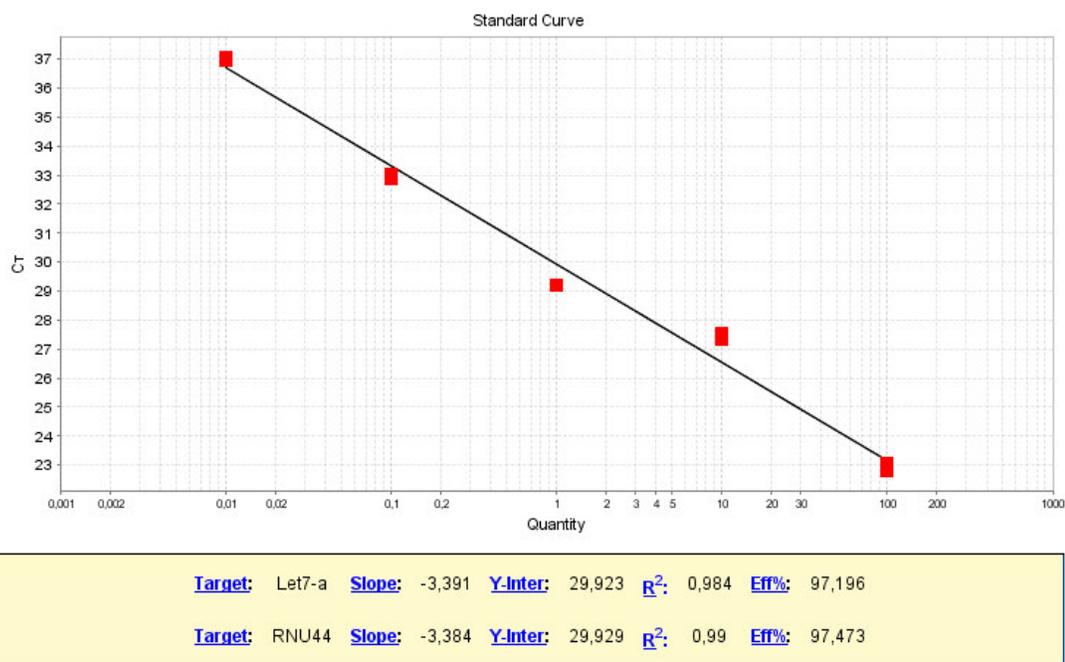


Figura 3 – Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do microRNA (miRNA) endógeno RNU44 com diluições seriadas (1:10).

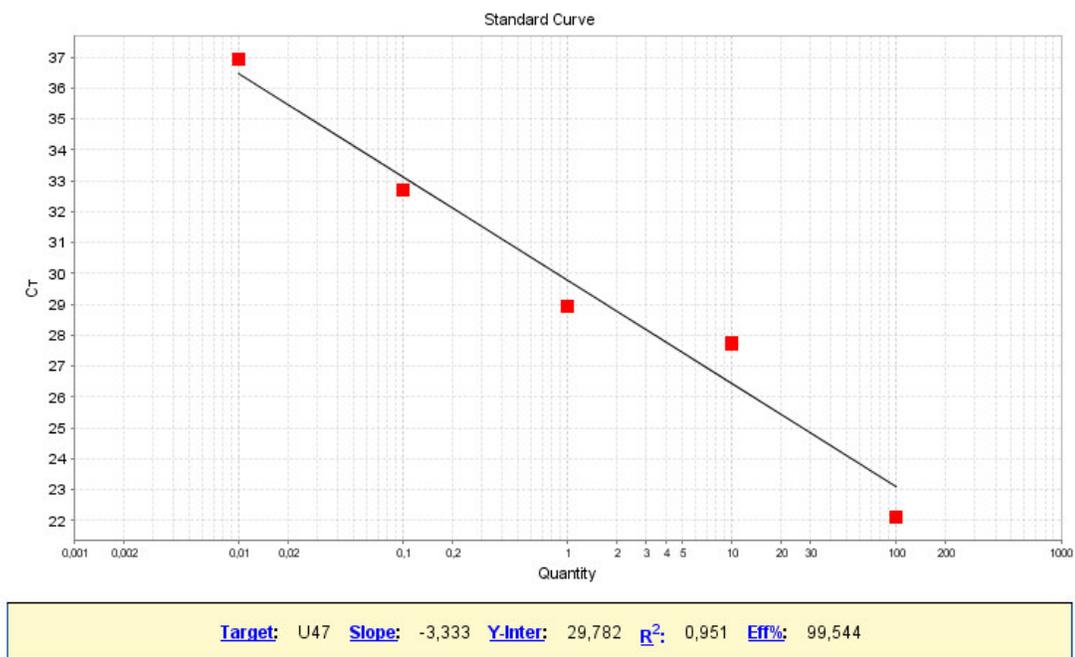


Figura 4 – Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do microRNA (miRNA) endógeno U47 com diluições seriadas (1:10).

5.2. Expressão do miRNA mir15a

Na figura 5 podemos observar o nível de expressão do mir15a no tumor e no sangue de pacientes com CCEB, comparado com mucosa normal e sangue de pacientes saudáveis, respectivamente. Nas amostras estudadas, a maioria das lesões (87,5%) apresentou expressão aumentada do mir15a e níveis baixos de expressão foram observados em algumas amostras de sangue de pacientes com CCEB (35,2%) (Figura 5).

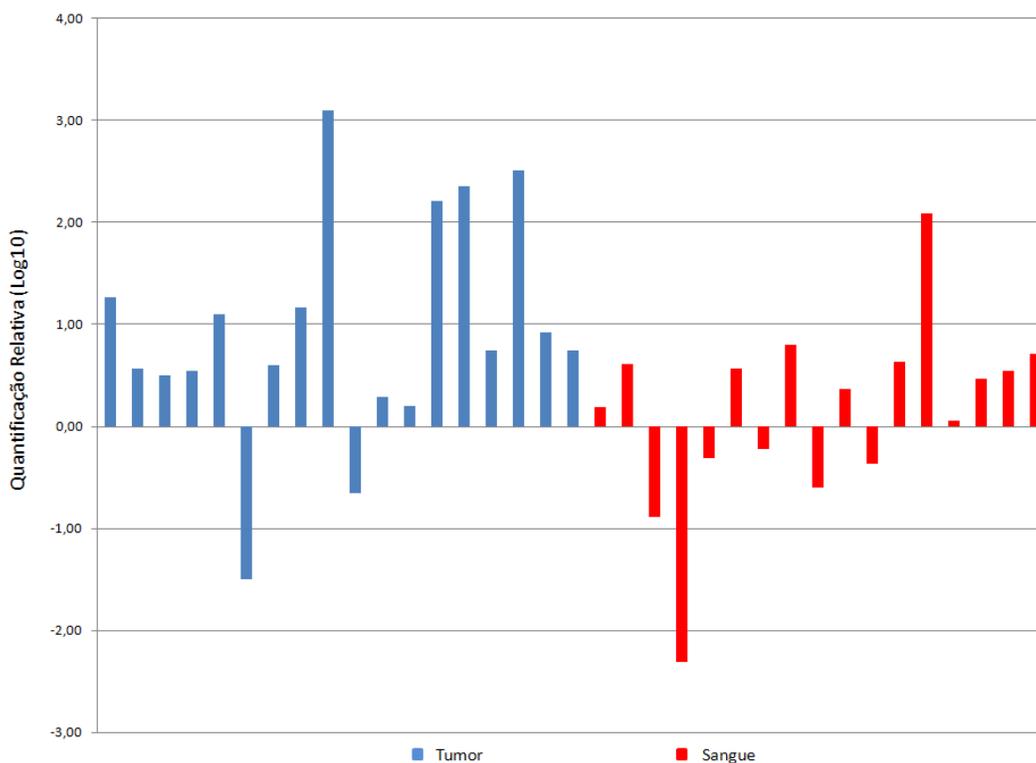


Figura 5: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do mir15a em carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Foi observada uma expressão diminuída do mir15a em algumas amostras de sangue e superexpressão na maioria das amostras do tumor.

A mediana da expressão do mir15a em tumores em estágio inicial (I, II, III) não se mostrou diferente quando comparada com o estágio avançado (IV) ($p=0,848$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada quando a expressão do mir15a foi avaliada em relação ao tamanho do tumor ($p=1,00$).

Todos os casos em estágio avançado (estágio IV) apresentaram expressão diminuída no sangue quando comparados com tumores em estágios iniciais (I, II e III) ($p=0,006$) (Figura 6), assim como naqueles que apresentavam metástase regional ($p=0,010$) (Figura 7). A expressão do mir15a no sangue foi mais baixa do que no tumor ($p=0,034$).

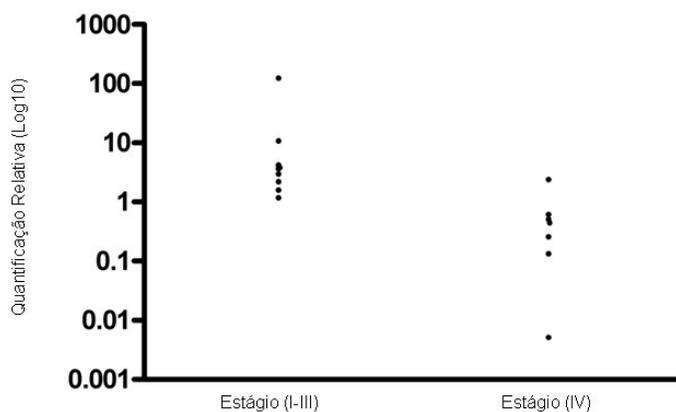


Figura 6 – Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do mir15a no carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) no estágio I-III comparado com estágio IV. Baixa expressão do mir15a foi observada no sangue de pacientes com tumores no estágio IV ($p=0,006$).

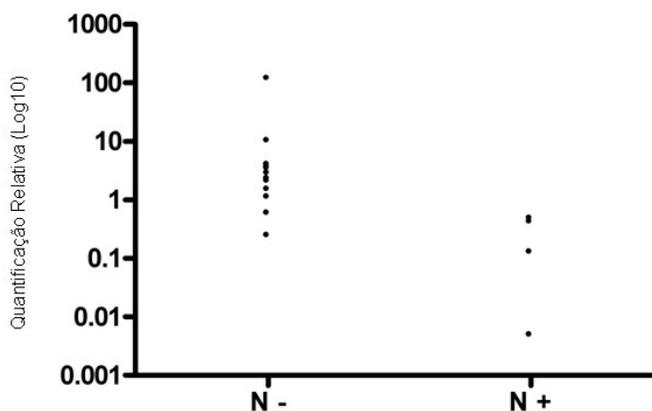


Figura 7 – Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do mir15a no carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) sem metástase regional (N-) comparado com metástase regional positiva (N+). Baixa expressão do mir15a foi observada nos casos com metástase regional ($p=0,010$).

5.3. Imunolocalização da proteína bcl-2

As reações de imuno-histoquímica para a proteína Bcl-2 mostraram poucas células neoplásicas e estromais com marcação nuclear (Figura 8). Na maioria dos casos estudados a imunopressão da oncoproteína Bcl-2 se mostrou negativa (escore=0), sendo positiva em apenas quatro casos com marcação fraca e focal (escore=1).

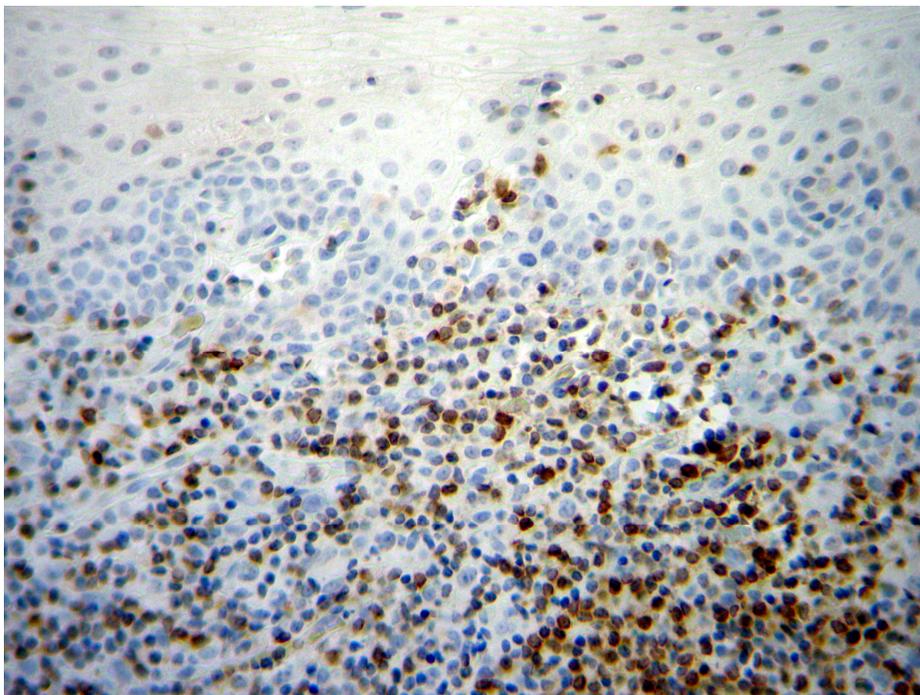


Figura 8: Imunolocalização da proteína Bcl-2. Observa-se marcação nuclear em algumas células tumorais e em linfócitos (Sistema Envision, aumento 400x)

A maioria dos casos que não apresentaram imunoreatividade para a Bcl-2 mostrou uma expressão aumentada do mir15a. Além disso, foi observada uma expressão diminuída do mir15a nos casos que apresentaram imunoreatividade positiva. Porém essa relação não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,624$).

5.4. Expressão do miRNA let7a

Expressão aumentada do miRNA let7a foi observada em 13 casos (61,9%), sendo diminuída em outros 7 casos (38,1%), quando comparados com mucosa oral normal. Apesar da maior expressão do let7a nos tumores maiores (T_3 e T_4) quando comparados com tumores menores (T_1 e T_2), esse resultado não se mostrou estatisticamente significativo ($p=0,05$) (Figura 9). A expressão do let7a também não teve associação com metástase regional e o estadiamento.

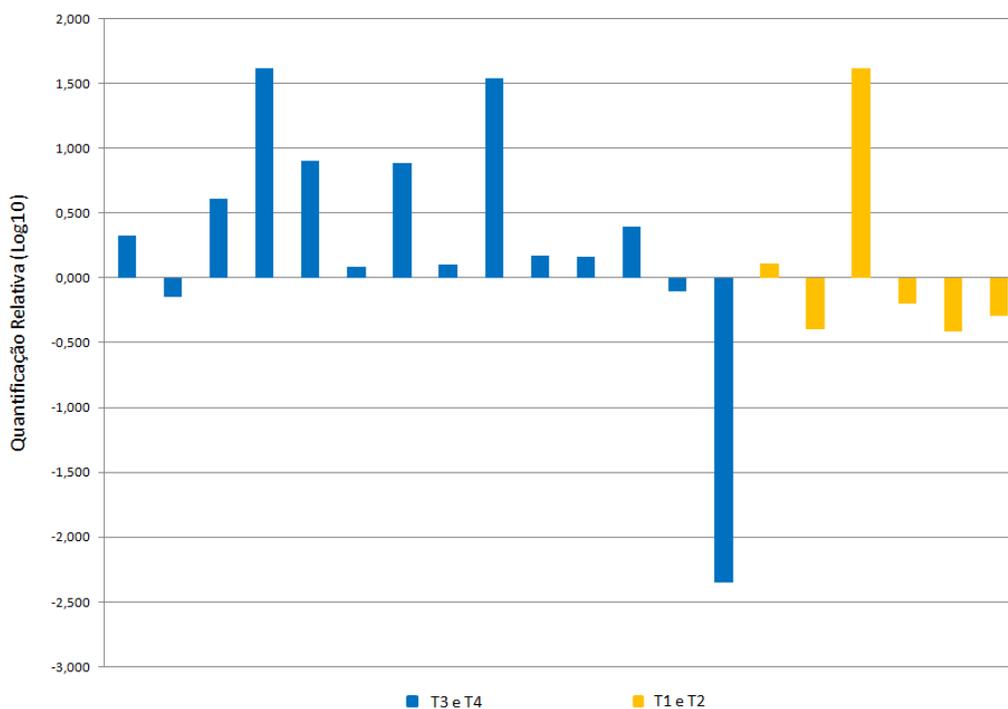


Figura 9 – Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do Let7a no CCEB. Foi observada uma tendência de maior expressão do Let7a em tumores maiores (T_3 e T_4) quando comparados com tumores menores (T_1 e T_2).

Foi observada uma expressão do let7a diminuída em amostras de sangue na maioria dos 18 casos analisados em relação ao sangue normal, mostrando uma expressão inversa ao resultado encontrado com as amostras de tumor (Figura 10). Apesar disso, não foi observada correlação entre a expressão do let7a no tumor com

o sangue ($p=0.643$). Não houve também associação entre a expressão do let7a e a presença de metástase ou estadiamento.

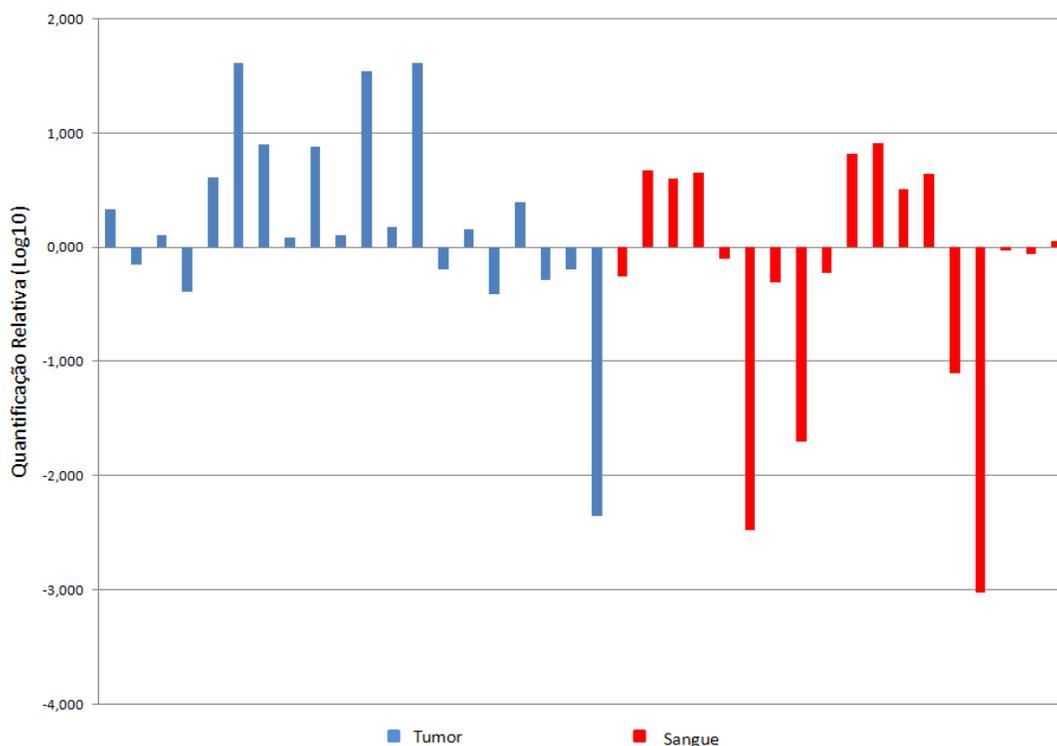


Figura 10 – Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do Let7a. Foi observada uma expressão diminuída do Let7a na maior parte das amostras de sangue e superexpressão no tumor.

Não foi observada uma relação significativa entre a expressão do mir15a e Let7-a nas amostras de sangue e tumor.

5.5. Imunolocalização das proteínas c-myc e ras

As reações de imuno-histoquímica para as proteínas c-myc e ras mostraram numerosas células neoplásicas e estromais com marcação citoplasmática, além de ocasionais células do tumor com marcação nuclear (Figura 11 e 12).

A maioria dos casos analisados apresentou imunoreatividade positiva para a oncoproteína c-myc, variando de um padrão de marcação moderado a forte (escore 3 e 2) (Figura 11). Nenhum caso apresentou imunoreatividade negativa. Os casos que apresentaram padrão de marcação fraca mostraram níveis altos de expressão do miRNA let7a, porém essa relação não se mostrou estatisticamente significativa ($p=1,000$).

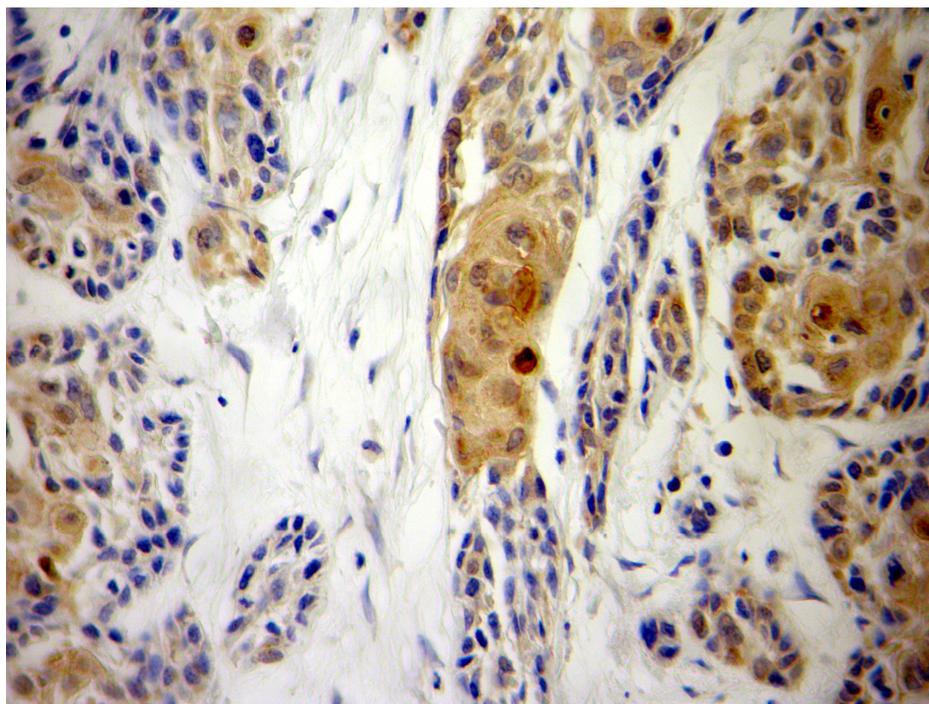


Figura 11: Imunolocalização da proteína c-myc. Nota-se marcação citoplasmática em numerosas células neoplásicas. Ocasionais células do tumor mostraram marcação nuclear. (Sistema Envision, aumento 400x)

A maioria dos casos apresentou imunomarcção para o ras variando do escore de 1 a 3 (Figura 12). A expressão do let7a nos casos com escore 1 comparado com escore 3 não mostrou diferença estatisticamente significativa.

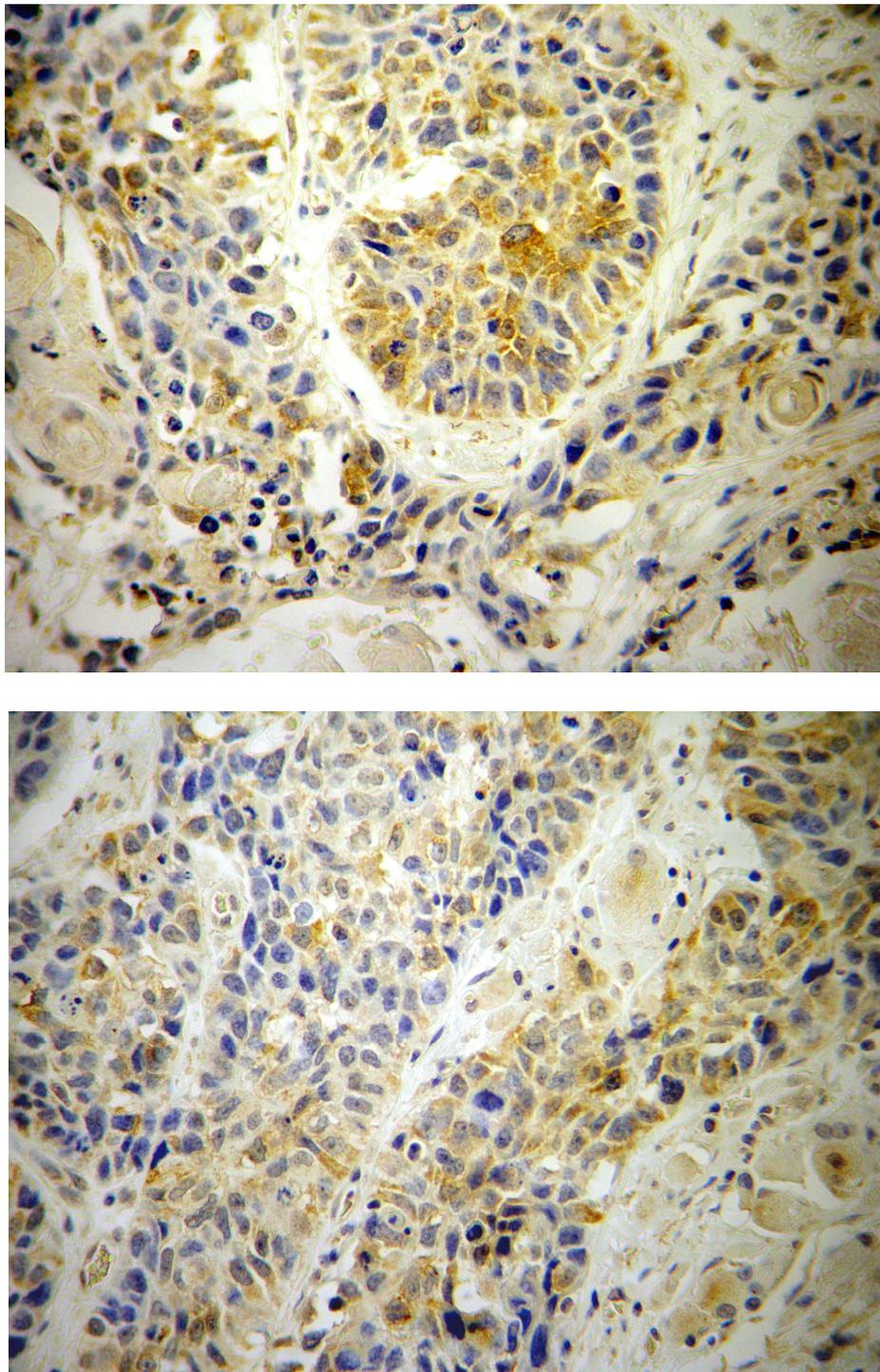


Figura 12: Imunolocalização da proteína ras. Nota-se marcação citoplasmática em numerosas células neoplásicas. Ocasionais células do tumor mostraram marcação nuclear. (Sistema Envision, aumento 400x)

6. DISCUSSÃO

Tran et al. (2007) investigaram 261 miRNA maduros em cultura de células de câncer de cabeça e pescoço utilizando a técnica de *Microarray*. Os autores encontram uma superexpressão de 33 miRNAs e 22 mostraram baixa expressão. Cultura de células cancerosas da cabeça e pescoço demonstraram superexpressão do miR-205r (Jiang et al., 2005). Uma importante limitação desses estudos é o uso de cultura de células para investigação, pois a expressão de um miRNA em uma cultura de células pode não demonstrar um mesmo padrão de um tumor original. De acordo com os mesmos autores, a condição de crescimento *in vitro* inclui a inclusão de soro bovino e substâncias sintéticas que podem afetar o padrão de expressão do miRNA em linhagem de células tumorais humanas (Gaur et al., 2007).

Evidências sugerem que os miRNAs podem controlar o desenvolvimento tumoral ou desempenhar um papel crítico na patogênese através da regulação da proliferação celular e apoptose. A associação de miRNA com a expressão de importantes oncogenes como bcl-2, c-myc e ras suporta um papel chave para essas pequenas moléculas no câncer humano.

Diminuição ou perda de expressão do mir15a foi demonstrada em leucemia linfocítica crônica (Calin et al., 2002). O Bcl-2 é um importante alvo do mir15a e mir16 e esses miRNAs possuem a habilidade de inibir a expressão dessa proteína antiapoptótica e conseqüentemente induzir apoptose em cultura de células (Cimmino et al., 2005). Considerando que o CCEB mostra expressão alterada do Bcl-2 (Camisasca et al., 2009), decidimos investigar a associação entre esse miRNA e a proteína alvo, juntamente com o seu impacto no estágio clínico. Foi observado um aumento na expressão do mir15a na maioria dos casos de CCEB, que poderia explicar a ausência de imunomarcagem para o Bcl-2. Porém, não foi observada uma associação entre este miRNA com o número de células positivas para esta proteína antiapoptótica. A ausência desta associação pode ser explicada por outras proteínas ou reguladores do Bcl-2, que não o miR15a, que podem ter uma influência na expressão do Bcl-2. Por exemplo, a expressão da Bcl-2 pode ser regulada pela tirosina quinase que pode regular a apoptose e inibir a expressão do Bcl-2. A fosforilação da Bcl-2 pode ser outro mecanismo regulatório da expressão da proteína (Ohigashi et al., 2000).

No presente estudo não foi encontrada nenhuma associação entre a expressão do mir15a em CCEB e o estágio do tumor, tamanho e metástase regional. Uma expressão reduzida do mir15a foi encontrada em amostra de sangue de pacientes com estágio clínico avançado do tumor (Estágio IV) quando comparados com os estágios iniciais (Estágio I-III) e em casos com metástase regional. Perda de heteroziguidade da região 13q.14.3, onde está localizado o mir15a, foi previamente descrita no CCEB e está relacionada com metástase regional (Ogawara et al., 1998). Essa evidência suporta a importância do cromossomo 13q na patogênese do CCEB. Esses achados sugerem que a expressão desse miRNA supressor de tumor no sangue de pacientes com CCEB pode estar associado com o estágio do tumor.

Considerando a metodologia utilizada no presente estudo, não é possível estabelecermos a origem do mir15a encontrado no sangue. Possíveis fontes secretoras deste miRNA incluem leucócitos circulantes, células tumorais circulantes ou produto de células neoplásicas que tenham alcançado a circulação. Uma possível consequência da queda na expressão do mir15a no sangue dos pacientes com CCEB pode ser o aumento na expressão de Bcl-2 nas células tumorais circulantes potencialmente metastáticas. Esta hipótese, entretanto, necessita ser comprovada por novos estudos.

Não foi encontrada uma associação entre a expressão do let7a e o estágio do CCEB. Expressão reduzida do let7a está significativamente associada com a sobrevida em pacientes com câncer de pulmão (Takamizawa et al., 2004). Posteriormente, foi evidenciado que a superexpressão do let7a resulta na inibição do desenvolvimento do câncer de pulmão (Takamizawa et al., 2004), assim como o desenvolvimento do câncer de colo (Akao et al., 2006). Estudos recentes tem mostrado uma associação entre a expressão de miRNAs, como o let7a e mir205, com a severidade e prognóstico ruim em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Childs et al., 2009; Chang et al., 2008). Nossos achados não confirmam o papel supressor de tumor do let7a na patogênese do CCEB.

O miRNA let7a regula negativamente a expressão da oncoproteínas ras e c-myc através da ligação ao mRNA resultando em repressão da tradução (Johnson et al., 2005). No câncer de pulmão, níveis reduzidos do let7a foram observados juntamente com um aumento na expressão da proteína ras (Takamizawa et al.,

2004). A presença de qualquer variante da *ras* pode estar significativamente associada com um prognóstico ruim do CCE da cabeça e pescoço, e esse prognóstico é pior em casos de câncer oral (Christensen et al., 2009). Estudos da expressão do *ras* em CCE da cabeça e pescoço têm indicado que o *ras* pode promover seu desenvolvimento, e a presença da proteína *ras* pode estar associado com um estágio avançado do tumor e aumento de tamanho (Perez-Ordoñez et al., 2006). A maioria dos casos de CCEB no presente estudo apresentou positividade para a proteína *ras*, porém, a expressão dessa proteína não esteve associada com a expressão do *let7a*, com o tamanho do tumor ou metástase regional.

Superexpressão do *c-myc* tem sido observada em 20-40% dos casos de CCEB. Este oncogene promove mudanças na regulação de vários genes e contribui para a transformação maligna (Hardisson, 2003). Em nosso estudo foi observada uma expressão de moderada a forte na maioria dos tumores estudados. O estatus de amplificação do gene *myc* tem sido estudado em paralelo com o *h-ras*. Mutações no *h-ras* têm sido descritas no CCEB, mas o mecanismo exato da superexpressão do *h-ras* é desconhecido e a associação com fatores prognósticos ainda não está claro. Um alto nível de expressão do *c-myc* está associado com sobrevida, tamanho do tumor e estágio clínico (Das et al., 2002; Hardisson et al., 2003). No nosso estudo não foi observado uma relação entre a proteína *c-myc* e o estágio do tumor. Não foi encontrada uma associação entre a expressão do *let7a* com a imunolocalização das proteínas *ras* e *c-myc*. Desta forma, outras alterações genéticas ou epigenéticas devem estar envolvidas na expressão desses oncogenes no CCEB.

Embora os achados desse estudo sejam informativos, o fenômeno de convergência genômica (adaptação clonal) deve ser considerado na análise crítica dos dados. De acordo com essa teoria, estágios iniciais do tumor são cariotipicamente mais heterogêneos, enquanto os estágios avançados mostram cariótipos mais homogêneos (Fukasawa, 2005). Portanto, não é possível saber qual das lesões incluídas no estudo está antes, durante ou depois da convergência gênica. Apesar do limitado número de amostras, o presente estudo mostra que a redução na expressão do *mir15a* em amostras de sangue está associada com o estágio do CCEB.

7. CONCLUSÕES

1. Não existe diferenças significantes entre a expressão do miRNA Let7a e mir15a no CCEB comparado com mucosa normal. Além disso, a expressão destes miRNAs nos tumores não tem relação com o estadiamento da lesão.
2. Pacientes com CCEB em estágio avançado ou com metástases regionais apresentam diminuição na expressão do mir15a no sangue.
3. Não há relação direta entre a expressão de miRNA mir15a e a expressão da proteína bcl-2 em casos de CCEB, assim como entre a expressão do let7a e a expressão das proteínas c-myc e ras.
4. Os mirRNAs podem ser utilizados como futuros marcadores para o estadiamento do CCEB.

8. REFERÊNCIAS

1. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(5):903-6.
2. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(8):2697-706.
3. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132:4653-62.
4. Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 1993; 75:843–54.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004; 431:350-5.
6. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárata R, Ramirez N, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer* 2006; 5(29):1-10.
7. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97.
8. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-Cancer Connection: The Beginning of a New Tale. *Cancer Res* 2006; 66(15):7390-4.
9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:15524-9.
10. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(9):2999-3004.

11. Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, Silva LE, Fonseca EC, Faria PAS, et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2009; 45:225-33.
12. Chang KW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, Hung PS, Hu WY, et al. Association between high mir-211 microRNA Expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J Dent Res* 2008; 87(11):1063-8.
13. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(20):1-9.
14. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353(17):1768-71.
15. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and mir-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009; 174(3):736-45.
16. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza S, McClean MD, et al. Let-7 microRNA binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009; 30(6):1003-7.
17. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(39):13944-9.
18. Das BR, Nagpal, JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8(11):258-67.
19. Das N, Majumder J, Dasgupta UB. ras Gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncology* 2000; 36:76-80.

20. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letter* 2005; 230(1):6-19.
21. Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer. *Biomolecular Engineering* 2006; 23:17-32.
22. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12(12):580-7.
23. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007; 67(6):2456-68.
24. Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a Gene Expression Signature Associated with Recurrent Disease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Research* 2004; 64(1):55-63.
25. Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(9):3509-12.
26. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* 2002; 9(8):3058-64.
27. Haber DA, Diederichs S. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. *Cancer Res* 2006; 66(12):6097-104.
28. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006; 16:4-9.
29. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck Oncology* 2003; 260:502-8.

30. Harfe BD MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:410-5.
31. Hebert C, Morris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer* 2007; 6(5):1-11.
32. Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007; 17:65-73.
33. Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, Kross KW, Heimdal JH, Aarstad JH, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncology* 2003; 39(1):37-48.
34. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(17):5394-403.
35. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* 2005; 120(5):635–47.
36. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(17):2666-72.
37. Sathyan KM, Sailasree R, Jayasurya R, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari KR, et al. Carcinoma of tongue and the bucal mucosa represent diferent biological subentities of the oral carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(9):601-9.
38. Kondoh N, Ohkura S, Arai M, Hada A, Ishikawa T, Yamazaki Y, et al. Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2007; 43(5):455-62.

39. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543):853-8.
40. Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, et al. Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the head and neck cancer genome anatomy project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncology* 2003; 39(3):248-58.
41. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(46):17337-42.
42. Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-8.
43. Lao K, Xu NL, Sun YA, Livak KJ, Straus NA. Real Time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J* 2007; 2(1):33-5.
44. miRBase Sequence Database. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences> (Versão Agosto 2007-2009)
45. Mithani SK, Mydlars WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Diseases* 2007; 13:126-33.
46. Mork J, Glatte E. Squamous cell carcinomas of the head and neck in Norway, 1953-92: an epidemiologic study of a low-risk population. *Cancer Causes and Control* 1998; 9:37-48.
47. Ogawara K, Miyakawa A, Shiba M, Uzawa K, Watanabe T, Wang XL, et al. Allelic loss of chromosome 13q14.3 in human oral cancer correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 1998; 79(4):312-7.

48. Ohigashi T, Ueno N, Novaka S, Nakanoma T, Furukawa Y, Deguchi N, et al. Tyrosine Kinase inhibitors reduce bcl-2 expression and induce apoptosis in androgen-dependent cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(1):C66-72.
49. OMS - Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO - World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon. 2005.
50. Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2007; 28(1):2-12.
51. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; 59:445-53.
52. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development. *Cell* 2006; 124:877-81.
53. Pushparaj PN, Aarthi JJ, Manikandan J, Kumar SD. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Den Res* 2008; 87(11):992-1003.
54. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Den Res* 2007; 86(2):104-14.
55. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genoma Research* 2004; 14(10A):1902-10.
56. Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. *Oral Oncol* 2006; 42(6):607-13.
57. Schmittgen T, Livak KJ. Analyzing real-time PCR by the comparative Ct method. *Nature Protocols*. 2008; 3(6):1101-8.

58. Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol* 2000; 1:37–42.
Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int J Biol Markers* 2007; 22(2):132-43.
59. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5):593-602.
60. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JA, Shah JS, Jetly DH, et al. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int J Biol Markers* 2007; 22(2):132-43.
61. Singh BB, Chandler FW Jr, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(6):692-8.
62. Slack FJ, Esquela-Kerscher A. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6:259-69.
63. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64:3753-6.
64. Target Scan. <http://www.targetscan.org> (Versão 4.0 Julho de 2007-2009).
65. Tomioka H, Morita K, Hasegawa S, Omura K. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:206-11.
66. Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358:12-7.

67. Tsantoulis PK, Kastinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoullis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology* 2007; 43:523-34.
68. Warnasulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(3):127-33.
69. Warnasulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45(4-5):309-16.
70. Wong TS, Liu XB, Wong BYH, Ng RWM, Yuen APW, Wei WI. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of Squamous Cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9):2588-92.
71. Zhang B, Pan X, Cobb, GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 2007; 302(1):1-12.
72. Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2883-8.
73. Zhang M, Zhang P, Zhang C, Sun J, Wang L, Li J, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(3):307-13.

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

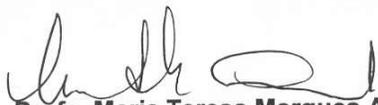
Parecer nº. ETIC 518/07

**Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
DCPCO
Faculdade de Odontologia-UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de novembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**miRNA no carcinoma de células escamosas de boca**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa "microRNA no carcinoma de células escamosas de boca". Existem alterações genéticas em outras lesões semelhantes a esta, presente na sua boca, por isso iremos pesquisar possíveis alterações também nessas lesões. Para esse estudo, preciso coletar um pedaço da lesão que será removida da sua boca que não irá interferir em nada no diagnóstico e na condução do caso. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde e nem terá custos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas destas doenças.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através de biópsia para conclusão do diagnóstico, neste projeto de pesquisa. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino. Será respeitado o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ No. _____

Pesquisadores: **Ricardo Santiago Gomez/ João Artur Ricieri Brito.**

Telefone: (31) 34992477 / 87435148.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP). Em caso de dúvida, você pode ligar para o COEP através do número (31) 3499-4592. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa "microRNA no carcinoma de células escamosas de boca". Para esse estudo, preciso coletar um pedaço de gengiva na região que foi realizado a extração do seu dente, esse procedimento não irá interferir em nada na sua recuperação e na condução do caso. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde e nem terá custos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas destas doenças.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através de biópsia para conclusão do diagnóstico, neste projeto de pesquisa. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino. Será respeitado o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ No. _____

Pesquisadores: **Ricardo Santiago Gomez/ João Artur Ricieri Brito.**

Telefone: (31) 34992477 / 87435148.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**). Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3499-4592. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901.

Reduced expression of mir15a in oral squamous cell carcinoma is associated with tumor staging

João Artur Ricieri Brito^a, Carolina Cavaliéri Gomes^a, Flávio Juliano Garcia Santos Pimenta^a, Alvimar Afonso Barbosa^b, Marco Antônio Máximo Prado^c, Vânia Ferreira Prado^c, Marcus Vinícius Gomez^d, Ricardo Santiago Gomez^a

^a Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^c Robarts Research Institute and Departments of Physiology and Pharmacology/Anatomy and Cell Biology, University of Western Ontario

^d School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author:

Dr. Ricardo Santiago Gomez

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627

Belo Horizonte-MG

Brasil CEP 31270 901

Tel: +55 31 34092477 Fax: +55 31 34092430

rsgomez@ufmg.br

Abstract

MicroRNA mir15a and let7a are important regulators of bcl2, ras and c-myc proteins. Considering that these miRNA are commonly altered in many human cancers and that these proteins are reported to be altered in oral squamous cell carcinoma (OSCC), we proposed to investigate them in a set of OSSC cases. The miRNA and the proteins were evaluated by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry, respectively. We found reduced expression of mir15a in the blood of patients with advanced stage of OSCC and with lymph node metastasis. In conclusion, the present study shows that mir15a expression is associated with OSCC staging.

Keywords: Oral Cancer, microRNA, mir15a, let7a

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding evolutionarily conserved RNA which mediates gene expression at the post-transcriptional level by degrading or repressing target messenger RNAs (mRNA) ^{1,2}. miRNAs are products of about 22 nucleotides long and regulate mRNA translational by base pairing to partially complementary sites, predominantly in the 3' untranslated region (3' UTR) ². Each miRNA has the potential to regulate many target genes in humans, modulating the levels of thousands of mRNAs, which implies that over one third to one half of all protein encoding genes in humans are regulated by miRNAs ³. Considering the important effect of miRNAs on gene expression, it is not surprising that these small RNAs have been implicated in the pathogenesis of cancer ⁴. The expression profiles of miRNAs are usually altered in many cancers. A reduction in miRNAs accelerates oncogenic transformation thorough the deregulation of target oncogenes ⁵. Oncogenic miRNAs are also described and were shown to be involved in the pathogenesis of some tumors. In this case, the increased transcription of the miRNA inactivates a tumor suppressor gene.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most frequent cancers in the world and its main risk factors are smoking and alcohol consumption. This neoplasia results from multiple genetic events, resulting in damage to signalling pathways and to the regulation of cell cycle. The five-year survival rates for cancers of the tongue, oral cavity and oropharynx are around 50% ⁶. Despite of the importance of miRNA in human cancer, few studies have attempted to evaluate their expression in oral cancer ⁷. In the present study, we selected two miRNAs (mir15a and let7a) that are commonly altered in different types of cancer. We also chose these miRNAs because they regulate the expression of proteins reported to be

altered in OSCC (Bcl-2, Ras, and cMyc). The results showed decreased expression of mir15a in the blood of patients with OSCC in advanced stage and with lymph node metastasis.

Material and methods

A total of 20 primary tumors and peripheral blood were obtained from 20 patients with OSCC immediately after surgical resection. The average age of the patients was 57 (range 37-90), and they were predominantly male. Histological classification was performed according to the International Histological Classification of Tumors⁸ and the TNM staging system according to the International Union Against Cancer (UICC).

The tissue samples were collected in RNAholder (BioAgency). All samples were collected at the time of surgery. A section of the lesion was immediately snap frozen and stored at -80°C. The other part was fixed in buffered formalin for histopathological diagnosis. Histopathological analysis confirmed that each tissue sample had more than 60% tumor cell content. The peripheral blood (4ml) was collected immediately after surgical resection of the primary tumor. The blood was collected in a tube with anticoagulant (EDTA) and stored at -80°C until processing. Fragments of normal oral mucosa and peripheral blood of healthy volunteers were collected during non neoplastic or preprosthetic surgical procedures and were used as control. The present study was approved by the local Ethics Committee and a signed informed consent was obtained from all patients as well as healthy volunteers.

Total RNA was isolated from 25 mg of human frozen samples in 1ml of Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA), according to the

manufacturer's instructions. The RNA was briefly treated with RNase-free DNAase I (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and the cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using gene specific stem-loop primers to microRNA⁹ (TaqMan MicroRNA RT , Applied Biosystems Foster City, CA,USA). The expression of microRNA was profiled using a real-time quantitative TaqMan assay (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems) in Step-One Real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems). The 20 µl total reaction included 2 µl of cDNA, 2x TaqMan Universal PCR master mix (no AmpErase UNG) and probe mix of the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems). The PCR triplicates reactions was performed in a 48-well optical plate at 95°C for 10 minutes, followed by 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C for 40 cycles. The mean of threshold cycle (Ct), defined as the fractional cycle number at which the fluorescence passes the fixed threshold, was determined using default threshold settings. Relative gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Applied Biosystems User Bulletin N°2) as previously described ¹⁰, and the expression data was normalized with endogenous microRNA RNU48, U47 and RNU44. The data were presented as log10 of relative quantity of target miRNA normalized to endogenous miRNA and relative to a calibrator sample. As calibrator we used a pool of oral normal tissues for the tumoral tissues, and blood samples of healthy individuals for the blood of patients with OSCC.

The total RNA input ranged from 6.25 ng to 100 ng. The results showed that the method could detect the microRNA as few as 10 ng or 100 ng of total RNA. As the amount of cDNA was decreased, the amplification started later, giving higher CT. We used 10 ng of RNA for all experiment to obtain a good balance between cDNA economy and an assay of good quality. For the let7a, the slope value was -3,329 and R2 was 0,979. The mir15a experiments showed a slope value of -3,28 and R2 of

0,987. The endogenous control RNU44, U47 and RNU48 showed similar values (slope= -3,33 and R2 = 0,981)

The following antibodies were used for immunohistochemical analysis: bcl2 (diluted 1:20 , Clone 124, Dako[®] Corporation, Carpinteria, CA, USA), c-myc (diluted 1:75, Clone 3C117, Santa Cruz[®] Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), and h-ras (diluted 1:20, Clone F235, Santa Cruz[®] Biotechnology). Immunohistochemical stains were performed using the high sensitive polymer-based system (EnVision, Dako[®] Corporation) with diaminobenzidine substrate solution as chromogen (Sigma, St Louis, MO, USA). In the immunohistological analysis, only sections containing sufficient neoplastic epithelium were used to assess the antibody reactivity. Two experienced independent pathologists examined multiple fields and scored tissue sections for extent of staining, regardless of staining intensity (score 0, negative staining; score 1, 0–25% of positive cells; score 2, 25–50% of positive cells; and score 3, greater than 50% of positive cells).

Results

Expression of mir15a in OSSC

Compared to normal oral tissues increased expression of mir15a was found in fourteen cases of OSCC (87.5%). The median of mir15 expression in the tumours of early stages (I, II, and III) was not different when compared with advanced stage. No statistical difference was found according to the size and lymph node metastasis.

Expression of mir15a in the blood samples

While decreased expression of mir15a was found in the blood samples of six patients with OSCC (35.2%), increased expression was observed in eleven cases (64.8%). All the cases with decreased expression of mir15a in the blood were OSCC cases in advanced stage with lymph node metastasis (Stage IV). Therefore, reduced expression of this miRNA in the blood was associated with an advanced stage of the tumour ($p=0.006$) (Figure 1) and with lymph node metastasis ($p=0.010$) (Figure 2). The levels of mir15a expression in the blood samples of patients with OSCC was clearly lower than the matched tumour samples ($p=0.034$).

mir15a and bcl-2 protein expression

Only sections containing sufficient neoplastic epithelium were examined. Positive labeling for bcl-2 protein was observed in 4 samples of OSCC (score 1). The expression of mir15a in the cases with negative immunostaining for bcl-2 was not statistically different compared to the lesions with positive labeling.

Expression of let7a in OSSC

While higher levels of let7a expression in OSSC compared to normal oral mucosa was found in thirteen cases (61.9%), decreased expression was found in eighteen cases (38.1%). The expression of let7a was not associated with tumour size, lymph node metastasis and stage tumour staging.

Expression levels of let7a in blood samples

Decreased expression of let7a was found in the majority (18 out of 20) of blood samples of patients with OSCC. The expression of let7a in the blood was significantly lower than in matched tumour. No statistical association was found regarding lymph

node metastasis and tumour's size. No statistical correlation was found between the expression of let7a and mir15a.

Let7a and c-myc or ras proteins expression in OSCC

Most of the samples (14 out of 20) presented moderate (score 2) or strong (score 3) c-myc expression. The expression of let7a in the cases with c-myc score 2 was not statistically different compared to score 3. All cases with decreased expression of let7 showed strong positive staining for c-myc, but this association was not statistically significant.

Most of the samples were positive ras protein. The expression of let7a in the cases with ras staining score 1 was not statistically different compared to score 3.

Expression of bcl-2, c-myc and ras regarding tumor staging

No relationship was observed between expression of bcl-2, c-myc and ras with tumor staging.

Discussion

Tran et al. ¹¹ investigated 261 mature miRNA genes in nine head and neck cancer cell lines using an oligonucleotide array platform. The cell lines were from carcinomas of hypopharynge, tongue, larynx and tonsil. The authors found overexpression of 33 miRNA and 22 showed low expression. Another study showed that cancer cell lines from head and neck overexpress miR-205r ¹². One important limitation of these studies was the use of cancer cell lines for investigation. miRNA from cancer cell lines may not show the same profile of the original tumor. According to some authors, *in vitro* growth conditions including the inclusion of synthetic medium and fetal bovine

serum may have effect on microRNA expression patterns in human tumor cell lines

13

Evidences suggest that microRNAs may control cancer development, or at least play a critical role in the pathogenesis through regulation of cell growth and apoptosis. The association of microRNAs with the expression of important oncogene such as bcl-2, c-myc and ras supports a key role for these small molecules in human cancer.

Diminished or lost of expression of miR-15a are demonstrated in chronic lymphocytic leukemia and in prostate cancer ¹⁴. The 3'UTR of the *Bcl2* transcript has potential binding sites for miR-15a and mi-R-16-1 and these miRNAs have the ability to downregulate the anti-apoptotic protein Bcl2 ¹⁵. Furthermore, the expression of this miRNA induces apoptosis in leukemia cell lines. Considering that OSCC shows altered expression of bcl-2 ¹⁶ we attempted to investigate the association between this microRNA and its target protein, together with its impact on clinical staging. We observed increased expression of mir15a in most of OSCC cases, which may be associated with negative staining found for bcl-2 in many samples studied. However, we did not observe any statistical significant association between this microRNA and this anti-apoptotic protein. The lack of association between both may be explained by other proteins or regulators of bcl-2 apart from mir15a which are also able to influence bcl-2 expression. For example, bcl-2 expression may be regulated by tyrosine kinase inhibitor that can regulate apoptosis and inhibit bcl-2 expression. The bcl-2 phosphorylation may be another regulatory mechanism of the bcl-2 protein expression ¹⁷.

We did not find association between mir15a expression in OSCC and tumour staging, tumour size, and lymph node metastasis. Interestingly, reduced expression of mir15a was found in the blood of patients with advanced clinical staging (Stage IV) compared to stages I, II and III and in the cases with lymph node metastasis. Loss of heterozygosity of 13q.14.3, the same locus of mir15a, was previously reported in OSCC and was correlated with lymph node metastasis¹⁸. These data give further support to the importance of chromosome 13q in the pathogenesis of OSCC. These findings also suggest that the expression of this tumor suppressor microRNA in the blood of patients with OSCC may also be useful in tumor staging.

We did not find association between let7a expression and OSCC staging. Reduced expression of let7a was significantly associated with shortened postoperative survival in patient with lung cancer. Furthermore, let7a overexpression results in the inhibition of lung cancer cell growth¹⁹, as well as the growth of human colon cancer cells²⁰. Recent studies have shown association between microRNAs expression, such as let7 and mir-205, and the severity and poor survival in patients with head and neck cancer^{21,22}. Our data does not confirm a tumor suppressor role for let7a in OSCC pathogenesis.

Let7 microRNA negatively regulates the expression of ras and c-myc by targeting their mRNAs for translation repression²³. In lung cancer reduced levels of let7 was observed together with increased expression of ras protein¹⁹. The presence of any ras variant was significantly associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck, and that prognosis was worst among cases of oral cancer²⁴. Studies of ras expression in squamous cell carcinoma of the head and neck have indicated that amplified ras promotes the growth and presence of ras protein has been associated with late stage tumors and increased tumor size²⁵. Most

of the OSCC in the present study were positive for ras protein but the expression of this protein was not associated with let7 expression or with the tumor size or lymph node metastasis.

Overexpression of c-myc has been observed in 20-40% of OSCC cases, which provides changes in the regulation of many genes and contributes to malignant transformation ²⁶. In our study we observed moderate or strong c-myc expression in most of the samples studied. The amplification status of the myc gene has often been studied in parallel with ras. H-ras mutations has been described in OSCC, but the exact mechanism accounting for ras overexpression is unknown and its association with existing prognostic factors is still unclear. A high level of c-myc expression is associated with shortened overall survival, tumor size and clinical stage ^{26,27}. In our study no relationship was found between c-myc protein and tumor staging. As we did not find association between let7a expression with ras or c-myc proteins immunolocalization, other genetic or epigenetic alterations may be more relevant to the expression of these oncogenes in OSCC.

Although the findings here reported are informative, the phenomenon of genomic convergence (clonal adaptation) should be considered in the critical analysis of the data. According to this theory early stage tumors are karyotypically heterogenous, while late stage tumors are often found to be karyotypically homogenous due to selection pressures ²⁸. Therefore, it is not possible to know which of the lesions included in the analysis were before, during or after genomic convergence. Despite the limited number of samples, the present study shows that reduced expression of mir15a in the blood is associated with OSCC staging.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from Milênio/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. R.S. Gomez and MV Gomez are research fellows of CNPq.

References

1. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; **353**(17):1768-71.
2. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 2007; **302**:1-12.
3. Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007; **17**:65-73.
4. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006; **25**(46):6188-96.
5. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; **39**(5):673-7.
6. Warnasulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; **45**(4-5):309-16.
7. Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer. *Oral Oncology* 2008; **44**:910-4.
8. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO - World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon. 2005.

9. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; **33**(20):1-9.
10. Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 2001; **25**:402-8.
11. Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **358**:12-7.
12. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(17):5394-403.
13. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007; **67**(6):2456-68.
14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**(24):15524-9.
15. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**(39):13944-9.
16. Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, Silva LE, Fonseca EC, Faria PAS, et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors

predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2009; **45**:225-33.

17. Ohigashi T, Ueno N, Novaka S, Nakanoma T, Furukawa Y, Deguchi N, et al. Tyrosine Kinase inhibitors reduce bcl-2 expression and induce apoptosis in androgen-dependent cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**(1):C66-72.
18. Ogawara K, Miyakawa A, Shiba M, Uzawa K, Watanabe T, Wang XL, et al. Allelic loss of chromosome 13q14.3 in human oral cancer correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 1998; **79**(4):312-7.
19. Takamizawa J, Konishi H, Yanagizawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; **64**:3753-6.
20. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**(5):903-6.
21. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and mir-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009; **174**(3):736-45.
22. Chang KW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, Hung PS, Hu WY, et al. Association between high mir-211 microRNA Expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J Dent Res* 2008; **87**(11):1063-8.
23. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; **120**(5):635-47.

24. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza S, McClean MD, et al. Let-7 microRNA binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009 [in press].
25. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; **59**:445-53.
26. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck Oncology* 2003; **260**:502-8.
27. Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; **8**(11):258-67.
28. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letter* 2005; **230**(1):6-19.

Legends

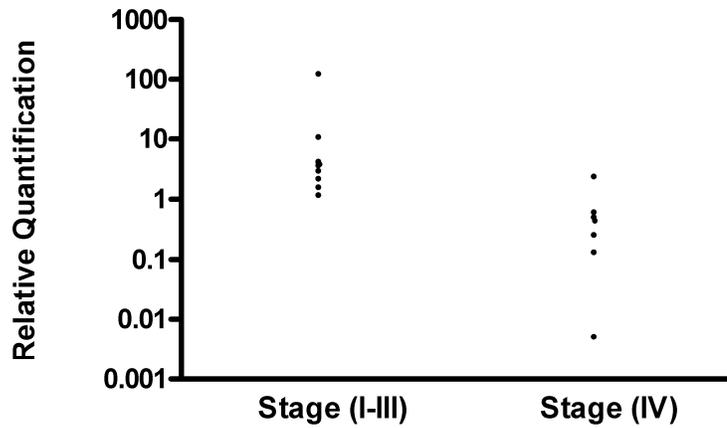


Figure 1 - Relative quantification ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) of mir15a in oral squamous cell carcinoma stage I-III compared to stage IV. Decreased mir15a expression was noted in the tumours with stage IV ($p=0.006$).

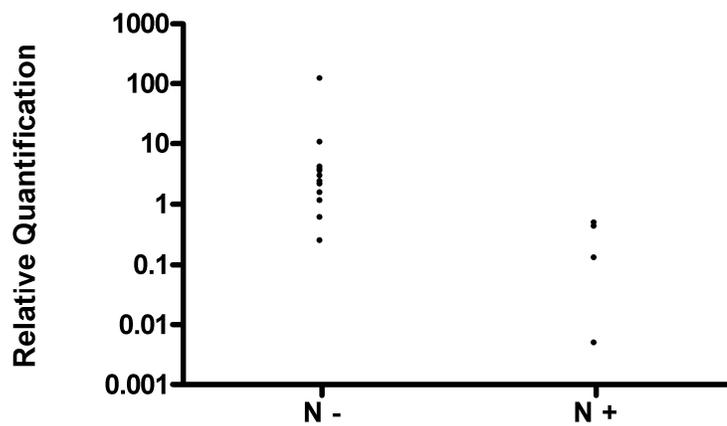


Figure 2 - Relative quantification ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) of mir15a in oral squamous cell carcinoma without lymph node metastasis (N-) compared with positive lymph node metastasis (N+). Decreased mir15a expression was noted in N+ cases ($p=0.010$).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)