



UNIGRANRIO

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES AMARO

**ASSOCIAÇÃO DA FAMÍLIA MIR-181 COM A VIA TGF-
β, SHH E A MMP7 E SEU PAPEL NO CARCINOMA
DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL E NO
GLIOBLASTOMA**

DUQUE DE CAXIAS

AGOSTO

2022

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES AMARO

**ASSOCIAÇÃO DA FAMÍLIA MIR-181 COM A VIA TGF- β , SHH E A MMP7 E SEU
PAPEL NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL E NO
GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) da Universidade do Grande Rio como requisito à obtenção do Título em Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira

Prof. Dr. Rômulo Sperduto Dezone

DUQUE DE CAXIAS

AGOSTO

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

A485a Amaro, Hadassa de Almeida Almenara Rodrigues.
 Associação da família MIR-181 com a via TGF- β , SHH e a MMP7 e seu papel no carcinoma de células escamosas oral e no glioblastoma / Hadassa de Almeida Almenara Rodrigues. – Duque de Caxias, 2022.
 100 f. : il. ; color.

 Dissertação (Mestrado em Biomedicina Traslacional) - UNIGRANRIO. Escola de Ciências da Saúde, 2022.
 “Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Maria Pereira; Dr. Rômulo Sperduto Dezone.
 Referências: f. 59.

 1. MicroRNA. 2. Câncer. 3. Glioblastoma. 4. MMP7. 5. TGF- β . I.Pereira, Cláudia Maria. II. Dezone, Rômulo Sperduto. III. Título.

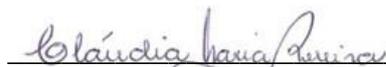
CDD - 570

TERMO DE APROVAÇÃO

HADASSA DE ALMEIDA ALMENARA RODRIGUES AMARO

ASSOCIAÇÃO DA FAMÍLIA MIR-181 COM A VIA TGF- β , SHH E A MMP7 E SEU PAPEL NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL E NO GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) da Universidade do Grande Rio como requisito à obtenção do Título em Mestre em Ciências Biomédicas, pela banca examinadora:



Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira (UFRJ)

Orientadora

Profa. Adjunto de Estomatologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof. Dr. Rômulo Sperduto Dezone (UNIGRANRIO)

Orientador

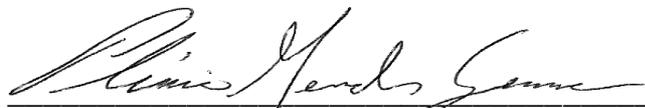
Prof. Colaborador do Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) e Coordenador do Laboratório de Genética Molecular do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN)



Profa. Dra. Juliana de Noronha Santos Netto (UFRJ)

Banca

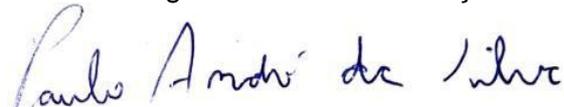
Profa. Adjunto de Estomatologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof. Dr. Plínio Senna (UNIGRANRIO)

Banca

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



Prof. Dr. Paulo André da Silva (UNIGRANRIO)

Banca

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

Duque de Caxias, 26 de agosto de 2022

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

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e capacitação.

Aos meus orientadores Cláudia Maria Pereira e Rômulo Sperduto Dezone que durante todo o desenvolvimento do programa me acompanharam e contribuíram para meu aprimoramento acadêmico, e me proporcionaram todo o auxílio necessário para a realização desse projeto.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS – UNIGRANRIO, UEZO e INMETRO).

A universidade do Grande Rio que investe em pesquisas e nos profissionais das ciências para contribuir com o desenvolvimento científico do nosso país.

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

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

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

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

C. S. Lewis

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas que participam de diferentes processos fisiológicos e quando desregulados podem favorecer o desenvolvimento de diversas doenças como o carcinoma de células escamosas oral (CCEO) e o glioblastoma (GBM). Alterações na família miR-181 já foram descritas em diversos tipos de cânceres, incluindo o CCEO e o GBM. Além disso, alterações em outras vias como a via de TGF- β , de MMP7 e de Sonic Hedgehog (Shh) que já foram associadas ao desenvolvimento, invasão, agressividade e resistência no CCEO, e no GBM. Portanto, o objetivo do estudo foi de avaliar a relação entre a família miR-181 e as vias de TGF- β e MMP7 no CCEO e Shh no GBM. Primeiramente avaliamos a expressão da família miR-181 e de seus alvos TGFBR2 e MMP7 por PCR quantitativo (qPCR) em duas linhagens de CCEO (SCC9, SCC25), comparadas a uma linhagem de queratinócitos normal (HaCat). Em seguida a expressão destes miRNAs foi avaliada em 12 amostras de pacientes portadores de CCEO comparadas a 11 amostras de mucosa oral normal. Posteriormente, realizamos um ensaio *in vitro* para avaliar por qPCR a expressão do miR-181a/181c, utilizando uma linhagem de astrócitos normal e uma linhagem de GBM (GBM11) tratadas com Shh exógeno e com GANT-61 (um inibidor da via). Como resultados, não encontramos diferença significativa na expressão de TGFBR2 e MMP7 no CCEO comparado às amostras normais. TGFBR2 mostrou correlação com metástase em linfonodos regionais, nos pacientes CCE3 e CCE4. Além disso, TGFBR2 apresentou correlação positiva com miR-181a. Não houve correlação entre MMP7 e os dados clinicopatológicos dos pacientes. Nas análises do GBM, observamos hipoexpressão do miR-181a/c na linhagem GBM11 quando comparada com a linhagem de astrócitos ($p < 0,0001$). Após o tratamento, observou-se a hiperexpressão do miR-181a no grupo de GBM tratado com Shh quando comparado com o grupo controle ($p = 0,013$), mas não houve diferença na expressão desse miRNA quando as células foram tratadas com GANT-61, indicando que a modulação de Shh sobre esse miRNA não ocorre através da via canônica de Shh. Dessa forma, os dados gerados nesse estudo parecem apontar para um importante papel da família miR-181 na regulação do processo de carcinogênese no CCEO e no GBM.

Palavras-chave: microRNAs, Câncer oral, Glioblastoma, Sonic Hedgehog, TGF- β

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are molecules that participate in different physiological processes and when unregulated they can favor the development of several diseases such as oral squamous cell carcinoma (OCC) and glioblastoma (GBM). Changes in the miR-181 family have already been described in several types of cancers, including CCEO and GBM. In addition, alterations in other pathways such as the TGF- β , MMP7 and Sonic Hedgehog (Shh) pathways that have already been associated with development, invasion, aggressiveness, and resistance in CCEO and GBM. Therefore, the aim of the study was to evaluate the relationship between the miR-181 family and the TGF- β and MMP7 pathways in CCEO and Shh in GBM. We first evaluated the expression of the miR-181 family and its targets TGFBR2 and MMP7 by quantitative PCR (qPCR) in two strains of CCEO (SCC9, SCC25), compared to a normal keratinocyte strain (HaCat). Then the expression of these miRNAs was evaluated in 12 samples from patients with OSCC compared to 11 samples from normal oral mucosa. Subsequently, we performed an in vitro assay to evaluate the expression of miR-181a/181c by qPCR, using a normal astrocyte lineage and a GBM lineage (GBM11) treated with exogenous Shh and with GANT-61 (a pathway inhibitor). As a result, we found no significant difference in the expression of TGFBR2 and MMP7 in CCEO compared to normal samples. TGFBR2 showed a correlation with regional lymph node metastasis in patients CCE3 and CCE4. In addition, TGFBR2 was positively correlated with miR-181a. There was no correlation between MMP7 and the clinicopathological data of the patients. In the GBM analyses, we observed a hypoexpression of miR-181a/c in the GBM11 lineage when compared to the astrocyte lineage ($p < 0.0001$). After treatment, there was an overexpression of miR-181a in the GBM group treated with Shh when compared to the control group ($p = 0.013$), but there was no difference in the expression of this miRNA when the cells were treated with GANT-61, indicating that the modulation of Shh on this miRNA does not occur through the canonical Shh pathway. Thus, the data generated in this study seem to point to an important role of the miR-181 family in the regulation of the carcinogenesis process in CCEO and GBM.

Keywords: microRNAs, Oral cancer, Glioblastoma, Sonic Hedgehog, TGF- β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biogênese dos miRNAs	16
Figura 2	Via de Sinalização TGF- β	23
Figura 3	Incidência de Câncer no Mundo.....	26
Figura 4	Via Canônica de Shh.....	28
Figura 5	Análise de MMP7 e TGFBR2 nas linhagens tumorais SCC9 e SCC25	38
Figura 6	Análise do miR-181a/b nas linhagens tumorais SCC9 e SCC25.....	39
Figura 7	Análise de MMP7 e TGFBR2 nas amostras normais e de CCEO	42
Figura 8	Comparação entre miR-181a e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	43
Figura 9	Comparação entre miR-181b e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	44
Figura 10	Comparação entre miR-181a e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	45
Figura 11	Comparação entre miR-181b e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.....	46
Figura 12	Hipoexpressão de miR-181a/181c na linhagem GBM11.....	47
Figura 13	Análise de miR-181a/181c na linhagem GBM11 após tratamento com Shh.....	48
Figura 14	Análise de miR-181a/181c na linhagem GBM11 após inibição da via Shh.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da expressão de MMP7 e TGFBRII e miR-181a/b.....	39
Tabela 2	Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO-	Proteína Argonauta
BHE -	Barreira Hematoencefálica
CCEO -	Carcinoma de células escamosas oral.
CCECP -	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.
DANT -	Doenças e agravos não transmissíveis.
GBM -	Glioblastoma.
Hh -	Hedgehog.
HPV-	Papilomavírus humano, do inglês <i>Human papillomavirus</i>
IARC -	Agência Internacional de pesquisa em Câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA -	Instituto Nacional do Câncer
miRNA -	MicroRNA.
MGMT -	O6-metilguanina-DNA Transferase.
MMPs -	Metaloproteinases de matriz.
pré-miRNA -	miRNA precursor
pri-miRNA -	miRNA primário
Ptch-1 -	Receptor Transmembrana Patched-1.
PTEN-	Fosfatase homóloga à tensina, do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i> .
RISC -	Complexo Indutor de Silenciamento de RNA do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>

SNC -	Sistema Nervoso Central.
RNA_m -	RNA mensageiro
TEM -	Transição epitélio mesenquimal.
TGFBRI -	Receptor beta I do fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>transforming growth factor beta receptor I</i> .
TGFBRII -	Receptor beta II do fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>transforming growth factor beta receptor II</i> .
TMZ -	Temezolomida.
SiRNA -	RNAs de interferência, do inglês <i>small interfering RNA</i> .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Revisão de literatura	15
1.1.1	MicroRNA.....	15
1.1.2	MicroRNA e Câncer.....	17
1.1.3	miR-181.....	19
1.1.4	Carcinoma de Células Escamosas Oral.....	20
1.1.4.1	Eventos moleculares relacionados à carcinogênese oral.....	22
1.1.5	Glioblastoma.....	25
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Casuística	33
4.2	Extração de RNA das amostras	34
4.3	Cultura de células	34
4.4	Extração do RNA total das linhagens.....	35
4.5	Desenho dos <i>primers</i>	35
4.6	Confecção dos cDNAs para TGFBR2/MMP7	35
4.7	Confecção dos cDNAs para miR-181a/181c.....	36
4.8	Análise por qPCR	36
4.9	Análise estatística	36
5	RESULTADOS	38

5.1	Análise de MMP7 e TGFBRII nas linhagens celulares de CCEO.....	38
5.2	Padrão de expressão de miR-181a/b em linhagens de CCEO.....	38
5.3	Comparação entre a expressão de MMP7 e TGFBRII com miR-181a/b.....	39
5.4	Avaliação de MMP7, TGFBRII e miR-181a/b em pacientes portadores de CCEO.....	40
5.4.1	Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO.....	40
5.4.2	Análise de TGFBRII e MMP7 nas amostras normais e de CCEO.....	42
5.4.3	5.4.3. Comparação da expressão de miR-181a/b com MMP7 e TGFBRII.....	43
5.5	Avaliação do miR-181a/c nas linhagens celulares.....	46
5.5.1	Padrão de expressão de miR-181a e miR-181c no glioblastoma.....	46
5.5.2	Papel da via de Sonic na expressão de miR-181a e miR181c.....	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	79
	ANEXO I Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio...	79
	ANEXO II Ficha Clínica	83
	ANEXO III Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95

1. INTRODUÇÃO

A epigenética consiste em diversos mecanismos de regulação da expressão gênica em que não há alteração das sequências de nucleotídeos da molécula de DNA (ESTELLER, 2008.). As alterações epigenéticas permitem a estimulação ou inibição de vias de sinalização e moléculas associadas a manutenção da homeostase ou ao desenvolvimento de doenças (RIDEOUT III et al., 2001; ZHANG et al., 2020). Dentre os diferentes mecanismos epigenéticos destaca-se a regulação desempenhada pelos microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA que não codificam proteínas, com importante papel na regulação pós-transcricional (MOHR ; MOTT, 2015). A expressão dessas moléculas foi associada a progressão, invasão e metástase em diversos tipos de cânceres e foram associadas a regulação da via de Shh e TGF- β (AKHTAR et al., 2015; BUTZ et al., 2012; GUAN et al., 2011; GUO et al., 2016; LIU et al., 2016). Apesar do perfil de expressão dos miRNAs ser tecido específico, é possível observar que em certas doenças o mesmo grupo de miRNAs apresenta-se alterado, como ocorre no carcinoma de células escamosas oral (CCEO) e no glioblastoma (GBM) (IORIO ; CROCE, 2009).

O câncer corresponde a mais de 100 doenças malignas caracterizadas pela proliferação desordenada das células, perda de diferenciação e escape do processo de apoptose (INCA, 2020). As alterações observadas durante a progressão dessa doença abrangem mutações genéticas, modificação do perfil epigenético e desregulação de vias de sinalização (HANAHAN ; WEINBERG, 2011). A via de Shh e TGF- β são importantes vias embrionárias, mas que já foram descritas desreguladas durante o processo de carcinogênese favorecendo a proliferação, invasão e indiferenciação das células tumorais (AKHURST et al., 2017; COCHRANE et al., 2015). A interação da via de Shh e TGF- β ocorre durante processos fisiológicos como a embriogênese, mas também foi descrito durante o desenvolvimento tumoral (ALVAREZ et al., 2002; GUO ; WANG, 2009; JOHNSON et al., 2011). Na carcinogênese essa interação ativa processos importantes para a agressividade dos tumores como a transição epitélio mesenquimal (TEM) que favorece a migração das células tumorais (JAVELAUD et al., 2011; JAVELAUD et al., 2012).

O CCEO é o tipo histológico mais frequente de câncer da cavidade oral, corresponde a 90% de todos os casos e acomete na sua maioria homens acima de 40 anos (Barasch et al., 1998; IARC, 2020). Além disso, o CCEO é considerado um tumor altamente agressivo e invasivo com altas taxas de recidivas e metástase mesmo quando o diagnóstico é feito nos estágios iniciais da doença (CHATTERJEE et al., 2019). Esse comportamento pode ser explicado pela heterogeneidade do CCEO desencadeada pelas alterações genéticas e epigenéticas que se observa nesse tumor (BAVLE et al., 2016). Além disso, o tratamento do CCEO que abrange cirurgias mutilantes afeta a qualidade de vida e o prognóstico do paciente, e faz dessa doença um problema de saúde pública (SHRIDHAR *et al.*, 2016).

O GBM é o tipo histológico mais frequente de tumor cerebral em adultos e o mais agressivo, e corresponde aproximadamente a 50% dos tumores malignos do SNC. O GBM se desenvolve a partir de células gliais e apresenta rápido crescimento infiltrativo, proliferação microvascular, indiferenciação celular e necrose. A necrose diferencia histologicamente o GBM dos gliomas de baixo grau e reduz consideravelmente a taxa média de sobrevivência dos pacientes (LOUIS et al., 2016; NØRØXE et al., 2016). Os sintomas variam de acordo com a localização e o tamanho do tumor, os mais frequentes incluem náuseas, cefaleia e déficit neurológico.

Portanto, o objetivo do estudo é avaliar como as alterações na expressão da família miR-181 modulam a via de TGF- β e Shh, e, conseqüentemente, influencia no desenvolvimento do CCEO e do GBM. Dessa forma, o estudo das alterações no perfil de expressão da família miR-181 e das vias de Shh e TGF- β , é essencial para a melhor compreensão da carcinogênese no CCEO e no GBM, bem como para identificação de moléculas como alvo terapêutico e biomarcadores para diagnóstico dessas doenças.

REVISÃO DE LITERATURA

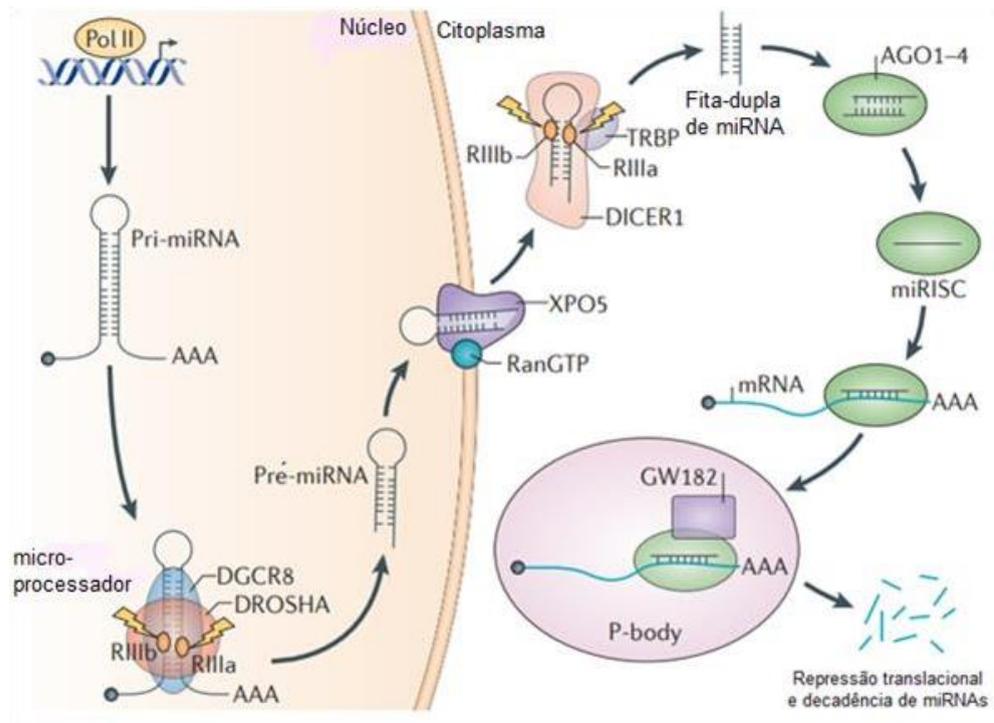
miRNAs

Os miRNAs fazem parte de um grupo de RNAs não codificantes que possuem funções regulatórias (AMBROS, 2004). Essas moléculas variam de 18 a 22

nucleotídeos e regulam a expressão gênica ao se parearem ao seu RNA mensageiro alvo, na região não traduzida da extremidade 3' (UTR 3', do inglês, *untranslated region* 3'), induzindo a clivagem e/ou repressão da tradução (BARTEL, 2004). Os miRNAs possuem importante papel em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, imunidade, apoptose e carcinogênese (COWLAND *et al.*, 2007).

A biogênese do miRNA se inicia com a sua transcrição no núcleo celular pela polimerase II, majoritariamente, e o posterior processo de clivagem do miRNA primário (pri-miRNA) pelo complexo Drosha, que gera o miRNA precursor (pré-miRNA), estrutura em forma de *hairpin* (**Figura 1**). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma através da Ran-GTPase exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pelo complexo formado pela enzima *Dicer*, dando origem a uma dupla fita com aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas origina o miRNA maduro, que é incorporado ao complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), que apresenta como um dos seus componentes a proteína Argonata (AGO) (BARTEL, 2004; WINTE *et al.*, 2011; NAVEED *et al.*, 2017).

Figura 1: Biogênese dos miRNAs.



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

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

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

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

MICRORNA E CÂNCER

O câncer, também denominado de neoplasia maligna, faz parte das Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT) e corresponde a segunda maior causa de morte no mundo (OPAS, 2018). No ano de 2018, foram responsáveis por 9,6 milhões das mortes registradas nesse período. Dos 18 milhões de novos casos no ano de 2018, 52,3% corresponderam ao sexo masculino e 47,7% ao sexo feminino (IARC, 2018). As neoplasias malignas representam um problema de saúde pública devido às altas taxas de incidência e mortalidade associada a essas doenças, e por se constituírem uma das principais causas de morte prematura (INCA, 2020). Cerca de 70% dos casos de morte por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, e esses países são os mais vulneráveis às complicações socioeconômicas

desencadeadas pelo câncer visto que apenas 26% apresentam serviços de patologia e menos de 30% apresentam serviços de tratamento disponíveis para os pacientes (OPAS, 2018).

A neoplasia maligna é caracterizada pela proliferação celular descontrolada e desordenada, com perda de diferenciação celular e do mecanismo de apoptose. Essas alterações ocorrem devido a mutações genéticas e epigenéticas que propiciam um ambiente favorável para o desenvolvimento do câncer. Dessa forma, essas células possuem capacidade de invadir tecidos vizinhos e de migrar para outros órgãos, levando ao processo denominado de metástase (PEREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2006). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer estão associados principalmente a causas comportamentais e alimentares e incluem tabagismo; etilismo; infecção viral; baixo consumo de frutas e legumes; sedentarismo; e exposição à radiação (ISLAMI *et al.*, 2018).

O câncer se desenvolve a partir de mutações no DNA, que desencadeiam alterações genéticas e epigenéticas, resultando na inativação de genes supressores tumorais ou ativação de proto-oncogenes, ou ambos (PEREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2006). Após a fase inicial da carcinogênese, para o tumor se desenvolver e alcançar potencial de invasão, cascatas moleculares associadas a proliferação celular, apoptose, angiogênese e metástase, deverão ser ativadas para garantir um microambiente favorável (ARGIRIS *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado a importância da transição epitélio-mesenquimal (TEM) na agressividade de diversos tipos de câncer, como em osteossarcomas, gliomas e tumores de mama (ZHAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; CANTINI *et al.*, 2019).

Dentre os principais eventos epigenéticos envolvidos na carcinogênese, destaca-se a alteração no perfil de expressão dos miRNAs, moléculas envolvidas na iniciação, promoção, invasão, metástase e resistência à quimioterapia (ZHANG *et al.*, 2012; ALI SYEDA *et al.*, 2020). Os miRNAs atuam sobre vias de sinalização e moléculas que durante a carcinogênese induzem processos como o estresse celular, o suprimento limitado de oxigênio, a inflamação e a TEM, e conseqüentemente, favorecem o microambiente tumoral (JEFFRIES *et al.*, 2019; LIN, 2019; LIU *et al.*, 2021). Dentre os miRNAs que se destacam no desenvolvimento tumoral, a família miR-181 já foi descrita com expressão aberrante em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, próstata, CCEO e GBM, onde podem atuar como

supressores tumorais ou oncomiR (SLABY et al., 2010; YANG et al., 2011; JI et al., 2014; YOO et al., 2016; ZHIPING et al., 2017; INDRIERI et al., 2020).

1.1.3 miR-181

A família miR-181 é composta por seis diferentes genes (miR-181a1, miR-181a2, miR-181b1, miR-181b2, miR-181c e miR-181d) que dão origem a quatro sequências maduras (miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d) (JI *et al.*, 2009). A família miR-181, segundo CHEN e colaboradores (2004), possui importante papel na regulação da resposta imune e possuem importante função na miogênese (NAGUIBNEVA *et al.*, 2006).

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

O miR-181b atua como supressor tumoral no câncer colorretal e em malignidades hematopoiéticas, como a leucemia mielóide aguda (ZHAO *et al.*, 2016, LI *et al.*, 2012). Apesar de ser considerado um supressor em diversos tipos tumorais, foi descrito hiperexpresso no carcinoma papilar de tireóide (LI *et al.*, 2014). Além disso, no câncer de estômago, o miR-181b também foi descrito como um oncomiR, pois sua expressão foi induzida pela via de TGF- β favorecendo o processo de metástase tumoral através da TEM (ZHOU et al, 2016). Também é apontado como bom biomarcador no CCEO, visto que sua hiperexpressão está associada à progressão de leucoplasias para o CCEO invasivo atuando como um oncogene nesse tipo de tumor (CERVIGNE *et al.*, 2009).

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

O miR-181d possui importante papel no desenvolvimento de diferentes tipos tumores. No osteossarcoma, a hipoexpressão do miR-181d foi associada a um pior prognóstico, o que indica uma função de supressor tumoral nesse tipo de câncer (CHEN *et al.*, 2018). No GBM, o miR-181d também atua como um supressor tumoral ao inibir a expressão da proteína MGMT tornando os GBMs mais suscetíveis à temezolomida (TMZ), um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento desse tumor (ZHANG *et al.*, 2012). No câncer de mama, foram identificadas vesículas derivadas de fibroblastos associados ao câncer contendo miR-181d que favorece o ambiente tumoral e aumenta a agressividade das células cancerígenas (WANG *et al.*, 2020). No câncer oral associado ao HPV, o miR-181d foi descrito hipoexpresso com função de supressor tumoral ao inibir a expressão do oncogene K-ras, além disso, se apresentou como um potencial biomarcador de diagnóstico nesse tumor (LEE *et al.*, 2015).

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

O CCEO é o tipo histológico mais frequente de câncer que acomete a cavidade oral, correspondendo a 90% dos casos (BARASCH, 1998). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) para o ano de 2020, foram estimados 377.713 casos novos de câncer de lábio e cavidade oral no mundo (IARC,

2020). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2020/2022 apontam para o surgimento de 15.190 novos casos de câncer oral, sendo 11.180 dos casos em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2020). O CCEO é considerado um problema de saúde pública no mundo inteiro, em virtude do impacto físico e psicossocial causado ao paciente, tanto pela doença, quanto por seu tratamento, que envolve na maioria dos casos, cirurgias extensas e mutilantes. Tais fatores irão influenciar diretamente no prognóstico e na sobrevida do paciente (SHRIDHAR *et al.*, 2016).

O CCEO se desenvolve a partir de uma desordem potencialmente maligna como as leucoplasias e eritroplasias, causadas pela exposição a agentes cancerígenos (SHRIDHAR *et al.*, 2016), que se desenvolvem, principalmente no assoalho bucal e na língua, mas podem acometer outros sítios anatômicos, como palato duro, trígono retromolar, gengivas e mucosa labial (SHAH ; LYDIATT, 1995; AKANUMA *et al.*, 1999; SCULLY ; PORTER, 2000). A exposição à carcinógenos, como álcool e tabaco são os principais fatores etiológicos do CCEO, que levam a alterações genéticas e epigenéticas, responsáveis por transformar a lesão potencialmente maligna no carcinoma *in situ* (SASAHIRA *et al.*, 2014).

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

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

Atualmente, a grande barreira para o acompanhamento da progressão do câncer oral é o fato de não existirem biomarcadores genéticos e epigenéticos que

auxiliem no diagnóstico precoce da doença, apesar do fácil acesso à cavidade oral para detecção das desordens potencialmente malignas. Dessa forma, a descoberta de novos marcadores, para detecção precoce e para avaliação de respostas a terapias serão extremamente úteis, com a finalidade de estabelecer tratamentos menos invasivos, implicando em uma menor morbimortalidade e uma melhor qualidade de vida para este paciente.

Na carcinogênese oral, estudos têm demonstrado alterações genéticas relacionadas a *breakpoints* em regiões cromossômicas, a mutações na família do oncogene *Ras* e *C-myc*, além de alterações nos genes supressores de tumor *p53* e *E-caderina* (CALIFANO *et al.*, 2000). Além disso, as alterações epigenéticas são consideradas eventos precoces no desenvolvimento do câncer oral, incluindo modificação de histonas, hipermetilação e regulação pós-transcricional por miRNAs (KULKARNI ; SARANATH, 2004; SHAW *et al.*, 2006).

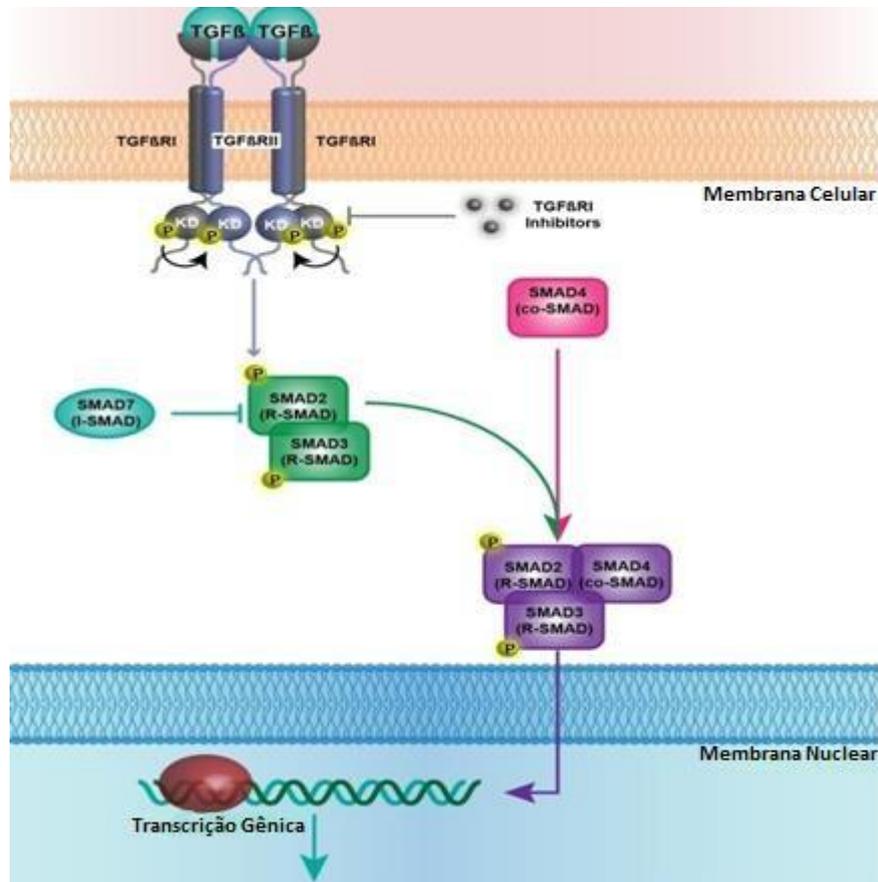
EVENTOS MOLECULARES RELACIONADOS À CARCINOGENESE ORAL

Estudos têm demonstrado que os miRNAs desempenham um papel crítico na regulação da TEM no câncer oral (LIU *et al.*, 2013; MIN *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016). A TEM é um processo fisiológico caracterizado pela transformação das células epiteliais em células mesenquimais (KALLURI ; WEINBERG, 2009). Este fenótipo migratório está envolvido no desenvolvimento embrionário, no processo de cicatrização de feridas, reparo tecidual, e também contribui patologicamente para a fibrose e favorece o desenvolvimento tumoral (OHTA *et al.*, 2007; NAKAYA *et al.*, 2008; RASOOL *et al.*, 2017; VALD-NIELSEN *et al.*, 2019). As vias moleculares que estão envolvidas neste processo incluem, além da alteração na expressão de miRNAs, a perda de adesão célula-a-célula, reorganização dos microfilamentos de actina e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (KRISANAPRAKORNKIT ; IAMAROON, 2012).

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

A via de TGF- β possui um importante papel na homeostase das células epiteliais. A ação canônica de TGF- β consiste na ligação de TGF- β aos seus receptores de membrana específicos do tipo I (TGFBR1) e do tipo II (TGFBR2) que possuem atividade serina treonina-quinase (**Figura 2**) (FENG ; DERYNK, 2005). A ligação ao TGFBR2 leva à fosforilação de TGFBR1 e consequentemente à ativação de proteínas denominadas de SMADs, que irão se deslocar para o núcleo, e por sua vez, regular a expressão de genes-alvo (FENG ; DERYNCK, 2005).

Figura 2: Via de Sinalização TGF- β .



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

Já foi demonstrado em linhagens de CCEO que a desregulação na via de TGF- β pode induzir a migração e invasão nestas células, por ativação do fenótipo TEM (QUAN *et al.*, 2013). A perda de expressão de TGFBR2 pode promover a metástase no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP). A perda de TGFBR2 observada por imunohistoquímica foi correlacionada com a redução nos

níveis de RNA mensageiro de TGFBR2, sugerindo que esta perda de expressão no CCECP poderia estar ocorrendo em nível pré-traducional (LU *et al.*, 2006).

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

A via de TGF- β também foi descrita com importante papel na indução e ativação das MMPs, contribuindo para o processo de TEM (KANOAKA *et al.*, 2018; KILARI *et al.*, 2018). As MMPs fazem parte de uma família de enzimas zinco dependentes que degradam os componentes da matriz extracelular e da membrana basal (CURRAN ; MURRAY, 2000). As MMPs possuem papel importante em processos fisiológicos, como: cicatrização, angiogênese, morfogênese, remodelação óssea e comunicação celular (NAGASE *et al.*, 2006).

A MMP7, também chamada de Matrilisina, desempenha um papel importante na remodelação tecidual, visto que, possui ampla atividade proteolítica e ativa outras MMPs (MÄKINEN *et al.*, 2014). Essa molécula também possui hiperexpressão em diversos tipos de tumores incluindo o CCEO, estando associada com invasão e metástase (TAKAHARA *et al.*, 2017).

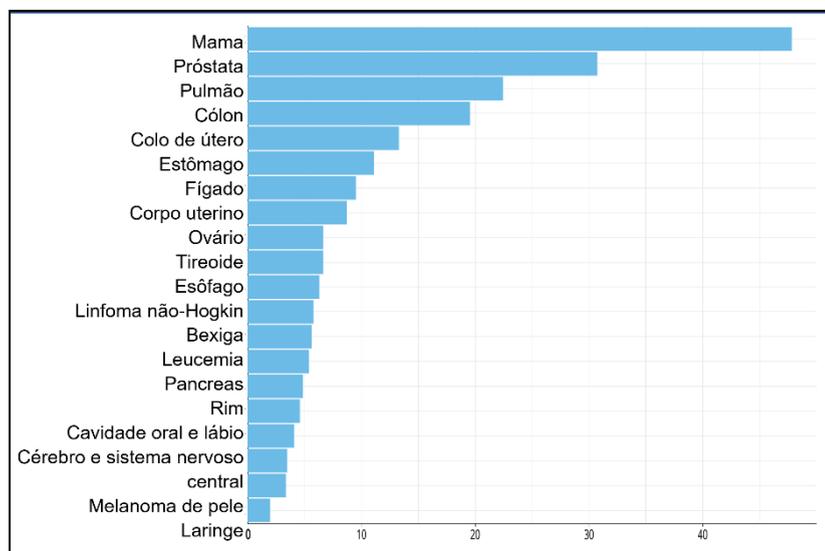
A MMP7 também está sujeita a regulação epigenética, especialmente pelos miRNAs. Essa correlação já foi descrita no câncer gástrico por infecção pela *Helicobacter pylori*, em que os miRNAs miR-128 e miR-146a diminuíram a expressão da MMP3 e da MMP7 (YANG *et al.*, 2018). A MMP7 também demonstrou ser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

O CCEO é uma doença que acomete pessoas idosas como mais jovens, apresenta um mal prognóstico, quando diagnosticado em estágios mais avançados, e possui altas taxas de mortalidade (WARNAKULASURIYA ; KERR, 2021). Dessa forma, o CCEO se caracteriza como um problema relevante de saúde pública. Como descrito na literatura, o desenvolvimento desse tumor está associado a alterações específicas em vias moleculares e no perfil de miRNAs (LU *et al.*, 2006; CERVIGNE *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2011; QUAN *et al.*, 2013). Portanto, a melhor compreensão dos mecanismos associados ao seu desenvolvimento é de extrema importância para o aprimoramento de intervenções terapêuticas mais específicas, com menor impacto para a recuperação do paciente e a descoberta de novos marcadores para rastreamento e progressão do CCEO.

GLIOBLASTOMA

De acordo com os dados do Globocan/IARC no ano de 2018, o câncer de SNC ocupou a 18ª posição dentre os cânceres mais incidentes no mundo, com um total de 296.851 novos casos (IARC, 2022) (**Figura 3**). Os tumores do SNC correspondem a 1,4 a 1,8% de todos os cânceres no mundo sendo mais comum em homens do que em mulheres (FARMANFARMA *et al.*, 2019; INCA, 2020). O GBM é uma neoplasia maligna primária do sistema nervoso central (SNC) e se desenvolve a partir de uma célula não neuronal denominada de células da glia (PAW *et al.*, 2015).

Figura 3: Incidência de Câncer no Mundo



Legenda: Taxas de incidência padronizadas por idade estimadas em 2020, em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades. (IARC, 2022)

Existem 3 diferentes tipos de células gliais, os oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização, as microgлияis, que são as células de defesa do SNC, e os astrócitos, as células gliais mais abundantes. Os astrócitos possuem a função de manter a homeostase metabólica e no caso de lesões ou resposta a patógenos eles podem ser ativados e mudarem seu fenótipo. Esse processo de ativação do astrócito é altamente regulado, no entanto, em casos de desregulação, estudos demonstraram sua associação com a promoção de malignidade dessas células (YANG et al., 2013).

Os gliomas são classificados de acordo com as semelhanças histológicas com as células gliais, com a localização do tumor e com a agressividade das células neoplásicas. Os astrocitomas são os tumores mais semelhantes aos astrócitos e são classificados em astrocitomas de grau I à IV, sendo os de grau I e II menos agressivos e considerados na sua maioria tumores benignos. Os astrocitomas de grau III e IV são mais agressivos e classificados como tumores malignos (LOUIS ; CAVENEE, 1997). Os GBMs são astrocitomas de grau IV e de todos os gliomas, são os mais agressivos (INCA,2020).

O GBM corresponde ao 3º tumor mais frequente na histopatologia do SNC sendo o tumor maligno mais comum. A incidência do GBM aumenta com a idade sendo mais comum em pessoas mais velhas com idade entre 75 e 84 anos, na faixa etária de 0-19 anos representa 3% de todos os tumores cerebrais. Apesar do avanço das abordagens terapêuticas, o GBM continua a ser um tumor incurável com tratamento complexo que consiste na ressecção cirúrgica, seguida por radioterapia e quimioterapia concomitante (TAMIMI et al., 2017).

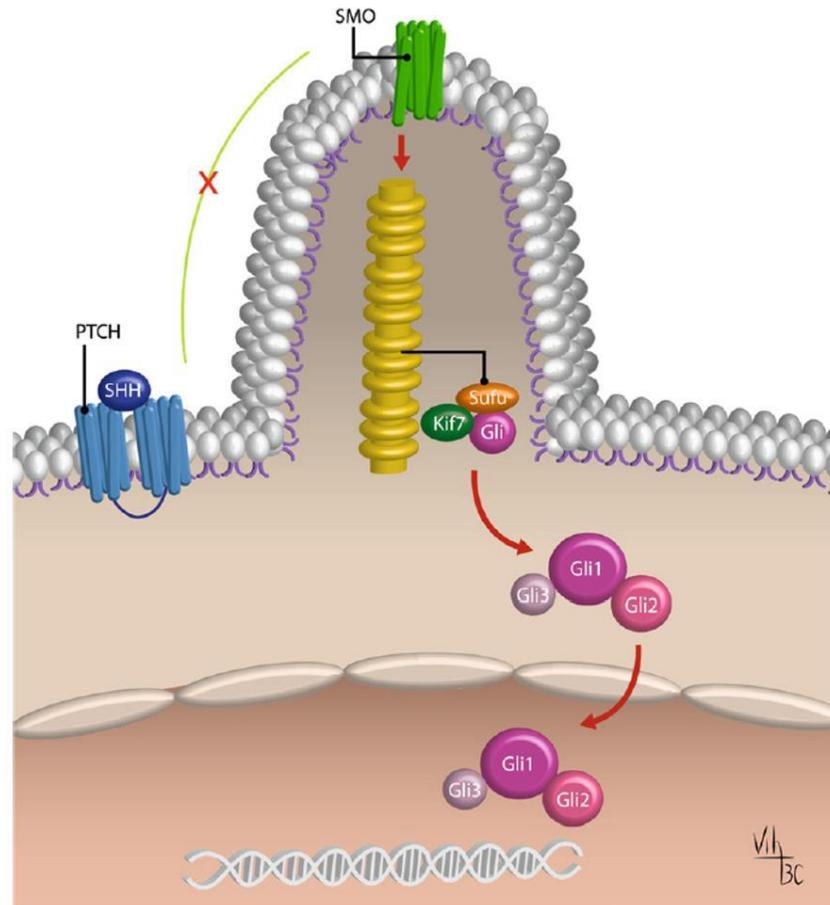
Apesar do avanço no tratamento de diversos tipos de cânceres, o tratamento do GBM ainda representa um desafio para a neuro-oncologia. Isso se deve ao rápido desenvolvimento de metástases acompanhadas por recorrências rápidas após sessões de tratamento desse tumor. Além disso, a estrutura anatômica do SNC dificulta o acesso para administração de medicamentos. Apesar do tratamento incluir ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida de 5 anos desses pacientes não passa de 10% (LOUIS et al., 2016). Além disso, mesmo com a introdução do TMZ em 2005, um alquilante que atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e leva a apoptose das células tumorais no GBM, não houve melhora na sobrevida total dos pacientes (WOEHRER et al., 2014).

A carcinogênese no GBM é um processo complexo e multifatorial que se desenvolve a partir de alterações que desencadeiam ganho de função dominante em oncogenes e perda de função em genes supressores tumorais que são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do câncer (HANAHAN ; WEINBERG, 2000). Dessa forma, as células humanas normais são transformadas em células com alto grau de malignidade. Essa transformação é desencadeada pelas alterações genéticas e epigenéticas que alteram vias de sinalização e modificam a progressão do ciclo celular, os mecanismos de reparo do DNA, a diferenciação celular e a apoptose (RAMDASI, 2016).

Dentre as alterações epigenéticas observadas no GBM destaca-se a modificação de histonas, metilação do DNA e regulação pelos miRNAs. A regulação dos miRNAs no GBM pode ocorrer direta ou indiretamente em oncogenes ou em genes supressores tumorais e desencadear alterações no processo de proliferação, diferenciação e agressividade das células tumorais. Estudos demonstraram que a hipossupressão do miRNA let-7 e miR-134 está associado a um pior prognóstico no GBM por atuarem como supressor do oncogene K-ras que promove o crescimento das células tumorais (ZHANG et al., 2014). Os miR-181a/b/c também são importantes supressores tumorais descritos em gliomas, além de interagirem com a via de sinalização de Shh, que se encontra desregulada favorecendo o processo de TEM, resultando em um fenótipo mais agressivo das células cancerígenas (GIBERT et al., 2014; HE et al., 2016; RUAN et al., 2015; WANG et al., 2015).

A via de *Hedgehog* (Hh) possui importante papel na comunicação intercelular durante o desenvolvimento, além de ser essencial para organogênese, homeostase e regeneração em mamíferos. A sinalização de Hh depende de uma organela sensorial muito especializada chamada de cílio primário, encontrada em quase todos os tipos celulares (CARBALLO et al., 2018).

A via canônica de Shh depende da ligação direta dessa proteína no receptor transmembrana Patched-1 (ptch1) que regula Smoothened (Smo), uma proteína semelhante ao receptor acoplado a proteína G (BLOTTA et al., 2012). Patch1 ao ser ativado deixa de inibir Smo que transloca e se acumula na membrana do cílio primário. Smo regula a ativação das proteínas GLI (GLI do inglês, *Glioma-associated oncogene homolog*) que são recrutadas e deslocadas para o núcleo da célula para ativar a transcrição gênica (**Figura 4**) (ANDERSON, 2010; DENEFF et al., 2000; GOETZ ; RIMIKUS et al., 2016).

Figura 4: Via canônica de Shh.

Legenda: Na ausência do ligante Shh, ptch1 impede a localização e ativação de Smo na membrana ciliar. Nesse contexto, há a formação de um complexo associado a microtúbulos composto por SUFU e Kif7 que sequestram GLI e impedem seu deslocamento para o núcleo da célula para ativar a transcrição gênica. No entanto, na presença de Shh ptch1 deixa de inibir Smo que por sua vez interrompe o complexo inibitório liberando as proteínas GLI (CARBALLO et al., 2018).

A desregulação das vias de sinalização importantes na embriogênese, incluindo a via de Hh, são associadas ao desenvolvimento de tumores cerebrais. Mutações específicas nos principais componentes da via de Hh, como o receptor Ptc1, Smo e o fator de transcrição GLI1 possuem diferentes funções no desenvolvimento tumoral, além de serem essenciais na manutenção das células-tronco cancerígenas (COCHRANE et al., 2015; WICKING ; MCGLINN, 2001). A correlação entre os processos da tumorigênese e embriogênese, como a proliferação, diferenciação e migração, torna relevante a compreensão dos papéis que essas vias desempenham durante a progressão do câncer (MA et al., 2010).

O uso de inibidores da via de Shh constitui uma abordagem terapêutica promissora uma vez que essa via está desregulada em diversos tipos de câncer,

incluindo o GBM. Muitos esforços têm sido empregados no desenvolvimento de drogas que inibem Smo, e apesar de alguns já estarem em fase de ensaio clínico, os diversos efeitos colaterais e as mutações que levam a resistência dessas drogas, limitam seu uso (ATWOOD et al., 2015; GHIRGA et al., 2018; INFANTE et al., 2016). Além disso, os inibidores de Smo parecem ser ineficazes em tumores que a ativação aberrante de Shh está associada a mutações genéticas a jusante de Smo, ou em tumores que ativação dos fatores de transcrição GLI é independente de Smo (ATWOOD et al., 2015; INFANTE et al., 2016).

Dessa forma, novas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas para contornar essas limitações, como o desenvolvimento de drogas capazes de antagonizar a forma resistente de Smo, e até mesmo o desenvolvimento de inibidores de GLI1 e GLI2 (ALFONSI et al., 2017; HOCH et al., 2015). Nesse contexto, destaca-se o composto GANT-61, um inibidor eficaz de GLI1/2 que regula negativamente a proliferação celular e suprime a formação de diversos tipos de tumores (LAUTH et al., 2007; VON HOFF et al., 2009). Além disso, GANT-61 afeta diversas características do câncer, como viabilidade celular, apoptose, autofagia, marcadores do processo de TEM e das células tronco associadas ao tumor (BENVENUTO et al., 2016; GONNISEN et al., 2016). No GBM, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que GANT61 foi capaz de induzir a apoptose e autofagia ao aumentar a expressão de LC3 II e de caspases 3 e 9 clivadas (CARBALLO et al., 2018).

A via não canônica de Hh geralmente é independente das proteínas GLI e ocorre através de dois mecanismos distintos: tipo I, independente de Smo e associado a proliferação e sobrevivência das células, e o tipo II, dependente de Smo que modula os níveis de cálcio (Ca^{2+}) e o citoesqueleto de actina (ROBBINS et al., 2012). A via não canônica do tipo I, na ausência do ligante Shh, possui efeito antiproliferativo e pró-apoptótico, ou seja, regula o ciclo celular assim como a via canônica através da modulação da ciclina B1. A via não canônica do tipo II regula a formação do citoesqueleto de actina, além de estar envolvida na orientação axonal dos neurônios. Essa via é dependente de Smo, independente de GLI e mediada pela ativação de pequenas GTPases (Rac1 e RhoA).

As vias de sinalização intracelular são reguladas por diversos mecanismos incluindo processos epigenéticos como a regulação pelos miRNAs, pequenas moléculas de RNA que não codificam proteínas. Além disso, a desregulação dessas

moléculas afeta o destino celular e implica no desenvolvimento de diversas doenças incluindo o câncer (CALIN et al., 2002; SAYE ; ABDELLATIF, 2011). A interação dos miRNAs e a via de Shh foi descrita no retinoblastoma, câncer de esôfago e no GBM (GU et al., 2014; YANG et al., 2020; ZHAO et al., 2019).

Estudos em diversos tipos de câncer têm demonstrado a importância de vias de sinalização alteradas na progressão, invasão e agressividade tumoral, incluindo as vias de Shh e TGF- β . Além disso, essas vias interagem entre si e desencadeiam respostas essenciais para o desenvolvimento tumoral (JAVELAUD et al., 2011; JAVELAUD et al., 2012). Estudos também apontam a importância da regulação de diversos miRNAs nessas vias de sinalização incluindo a família miR-181 que foi descrita com perfil de expressão alterado no GBM e no CCEO (AYALA-ORTEGA et al., 2016; GIBERT et al., 2014; HE et al., 2016; HUANG et al., 2017; LIU et al., 2013; SHIN et al., 2011; TAYLOR et al., 2013;).

Portanto, uma melhor compreensão sobre vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do GBM e do CCEO, e principalmente sobre a conexão existente entre a via de Shh, TGF- β e os miRNAs se faz importante para auxiliar na identificação de novos alvos diagnósticos e terapêuticos, bem como avaliar a prognose dos portadores de GBM e CCEO.

2. JUSTIFICATIVA

A regulação epigenética mediada pelos miRNAs possui um papel significativo na divisão, diferenciação e desenvolvimento celular (O'CARROLL et al., 2007; KUMARSWAMY et al., 2011). No entanto, alterações no seu perfil de expressão estão associadas ao desenvolvimento de diversos tipos de doenças, incluindo o câncer (CALIN et al., 2002). Os miRNAs podem se apresentar com função de supressor tumoral ou oncomiR, atuando sobre diferentes vias de sinalização e moléculas (ZHANG *et al.*, 2007).

O câncer do SNC ocupou a 17ª posição entre as neoplasias malignas mais frequentes no mundo no ano de 2018, com um total de 296.851 novos casos (IARC, 2018). No Brasil, essa neoplasia ocupa a 11ª posição entre todos os cânceres e foram estimados 11.100 novos casos para cada ano do triênio 2020/2022, sendo 5.870 em homens e 5.230 em mulheres (INCA, 2020).

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

Apesar do avanço no diagnóstico e no tratamento de diversos tipos de cânceres, o glioblastoma ainda apresenta sobrevida de 5 anos de apenas 6,7% apesar da citorredução cirúrgica, radio e quimioterapia. A baixa eficácia das terapias atuais ocorre devido à heterogeneidade molecular dos tumores e a penetração limitada dos agentes terapêuticos através da barreira hematoencefálica (BHE) que leva a recorrência do GBM (SZOPA et al., 2017). Quanto ao CCEO, a natureza agressiva e invasiva, e ainda, em virtude da dificuldade no diagnóstico diferencial entre esta doença e outras lesões bucais, as taxas de mortalidade ainda se mantêm elevadas (IARC, 2018; INCA, 2018). Além disso, a cirurgia, considerada o tratamento padrão-ouro do CCEO, é na maioria das vezes extensa e mutilante, afetando a qualidade de vida do paciente.

3. OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Avaliar a correlação da família miR-181 com a via de TGF- β e MMP7 no CCEO, e coma via Shh no GBM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de TGFBRII e MMP7 em linhagens e amostras de CCEO por qPCR;
- Correlacionar os resultados da expressão de TGFBRII e MMP7 com miR-181a/b, com os dados clinicopatológicos dos pacientes, já obtidos pelo nosso grupo.
- Avaliar a expressão do miR-181a/181c numa linhagem de GBM (GBM11), comparada com uma linhagem astrogliial humana;
- Analisar os níveis de miR-181a/181c na linhagem GBM11 tratada com Shh;
- Averiguar o efeito da inibição da via canônica de Shh, com GANT-61 nos níveis de miR-181a, na linhagem GBM11;

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este é um estudo piloto que foi realizado utilizando amostras de pacientes que buscaram atendimento na Clínica de Estomatologia e na Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO, Duque de Caxias-RJ, Brasil) no período de (2015 a 2018). A amostra foi composta por 23 pacientes, sendo 12 pacientes portadores de CCEO e 11 pacientes apresentando mucosa oral saudável. Os pacientes portadores de CCEO foram recrutados de acordo com a demanda da clínica, e foram avaliados inicialmente através de anamnese e exame físico para a coleta dos dados clínicopatológicos e posteriormente submetidos ao procedimento de biópsia incisional com finalidade diagnóstica. Durante a biópsia diagnóstica foram coletados dois fragmentos de tecido. Um fragmento foi armazenado em formol a 10% e destinado às análises histopatológicas no laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal Fluminense (UFF Niterói-RJ, Brasil). O segundo fragmento coletado foi acondicionado em um criotubo contendo *RNA Later* e armazenado a -80°C para análises moleculares. Foram também coletadas amostras de mucosa oral normal, provenientes de pacientes da Clínica de Periodontia, submetidos a cirurgias periodontais, ou cirurgias pré-implantares, seguindo protocolo de coleta semelhante ao das amostras de CCEO.

Neste estudo foram incluídos somente os pacientes com confirmação histopatológica de CCEO, ou seja, CCEOs primários e que não sofreram tratamento prévio de câncer (cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia). Como critérios de exclusão não foram incluídos nesse estudo, pacientes portadores de recidivas de câncer oral ou outro tipo histológico de câncer, pacientes que já haviam sido tratados anteriormente por câncer, ou outro tipo histológico de câncer de cavidade oral. A utilização das amostras foi autorizada como demonstra o Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO (nº do parecer: 1.753.202) **(ANEXO I)**. Os dados da população foram levantados através da Ficha Clínica **(ANEXO II)** e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para utilização das amostras foram devidamente assinados por todos os pacientes **(ANEXO III)**.

Extração de RNA das amostras

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

Cultura de células

Foram utilizadas neste estudo uma linhagem tumoral derivada de CCEO de língua (SCC-9) e uma linhagem de queratinócitos normais (HaCaT), provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC -www.atcc.org), a linhagem tumoral de GBM (GBM11) e os astrócitos humanos (AST) foram caracterizados no laboratório conforme descrito para outras linhagens celulares (FARIA et al., 2006). As células de GBM11 foram obtidas através de biópsia cirúrgica de um homem de 57 anos com GBM primário recorrente tratado com TMZ e radioterapia concomitantemente. O astrócitos humano foram obtidos do lobo temporal de um paciente epilético que foi submetido a cirurgia. Ambos pacientes deram consentimento por escrito para o estudo.

Estas linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco suplementado com F2 (DMEN/F12) (Gibco-Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, E.U.A.), suplementado com glicose 3,5 mg/mL, penicilina 0,1mg/mL, estreptomicina 0,14mg/mL e soro fetal bovino (FBS) a 10%. As células cultivadas foram mantidas a 37°C e 5% de CO_2 . Para a linhagem tumoral de GBM e AST, em todas as condições, foi utilizado uma concentração de 20 μM de GANT-61 (Tocris Bioscience – Bistol, UK) e a concentração de 2ng/mL de rh-Shh (Peprotech – São Paulo, BR), N-terminus em DMEN/F12 a 5% de FBS. As células foram tratadas durante 48 horas em duas

condições distintas: com 2ng/mL de rh-Shh diluído em MWS 5% ou com 20µM de GANT-61 diluído em MWS 5%. As células controle foram cultivadas apenas com MWS 5%.

Após este período, o RNA destas células foi extraído, confeccionados os cDNAs e posteriormente foi realizada a avaliação da expressão dos genes e dos miRNAs por qPCR.

Extração do RNA total das linhagens

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas com 1000 µL de Trizol e 1,0 µL de glicogênio (20 µg / µL) e incubadas por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados a este homogenato e submetidos à centrifugação a 12.000 rcf por 5 min para separação de fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo e lavada com isopropanol 100% e etanol 70%. Ao final desse processo, o pellet de RNA foi ressuspensionado em 15 µL de água livre de nuclease e quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, EUA).

Desenho dos *Primers*

Para as análises da expressão de TGFBR2 e MMP-7 foram desenhados *primers* utilizando as ferramentas *in silico* Nucleotide (NCBI), University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser e Gene Runner. O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador da reação de qPCR.

Confecção dos cDNAs para TGFBR2/MMP7

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

reação, o produto da síntese foi diluído 10 X pela adição de 180 µL de água livre de RNase.

Confecção de cDNAs para miR-181a/181b/181c

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

Análise por qPCR

Para a avaliação da expressão de TGFBR2/MMP7 foi utilizado o sistema *Sybr Green por qPCR*. As reações foram realizadas em triplicata, em presença de um controle negativo com volume total 20 µL para cada reação e o método da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak e Schmittgen, 2001), no aparelho QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O gene GAPDH foi utilizado com controle da reação.

Para a avaliação da expressão do miR-181a, miR-181b e miR181c por qPCR foi utilizado o sistema de detecção Taqman (Thermo Fisher Scientific) que consiste na utilização de dois primers e uma sonda específicos para o transcrito em análise. As reações foram realizadas em triplicata com um controle negativo e foi utilizado o cálculo da expressão relativa de acordo com o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK ; SCHMITTGEN, 2001). O volume total de cada replicada foi de 20 µL que consistiu em 2 µL de cDNA, 7 µL de água, 10µL 2 X TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 1,0 µL de cada ensaio TaqMan. As reações foram realizadas no aparelho QuantStudio 7 (Thermo Fisher Scientific) e as condições para a amplificação foram: 50 °C por 2min, 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1min. O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes.

Análise Estatística

Os registros das informações referentes aos dados demográficos, clínicos, e histopatológicos foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha

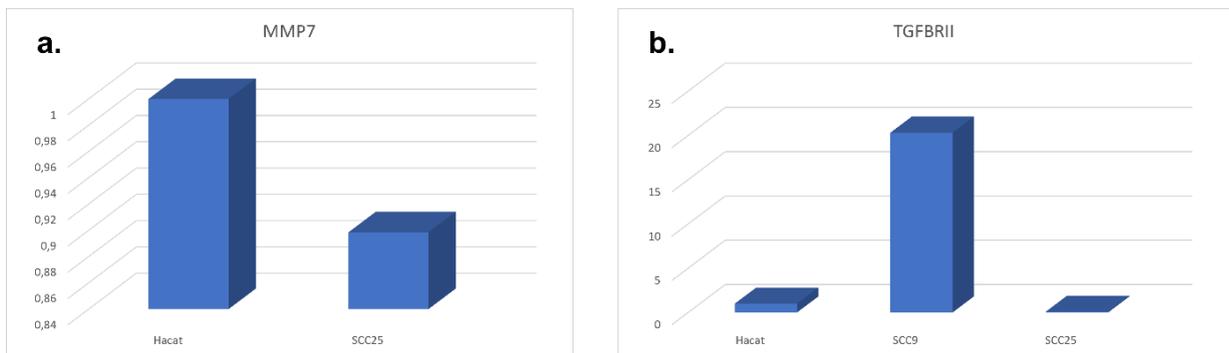
do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para computador SPSS *version* 22.0. A análise entre da expressão dos miRNAs, dos genes alvo, bem como, a associação com os dados clínicopatológicos coletadas foram realizados utilizando o teste estatístico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

5. RESULTADOS

Análise de MMP7 e TGFBR2 nas linhagens celulares de CCEO

Inicialmente foram realizadas as análises de MMP7 e TGFBR2 nas linhagens celulares SCC9 e SCC25, por qPCR, e comparamos com a linhagem Hacat (**Figura 5**). Nesta análise, observamos uma redução de aproximadamente 1,5 vezes na expressão de MMP7 na linhagem SCC25, no entanto, não houve amplificação desse gene durante a qPCR para a linhagem SCC9 (**Figura 5a**). Observamos um aumento de aproximadamente 20 vezes de TGFBR2 na linhagem SCC9, no entanto, observamos redução de aproximadamente 10 vezes da expressão deste gene, na linhagem SCC25 em relação à linhagem de queratinócitos normais (**Figura 5b**).

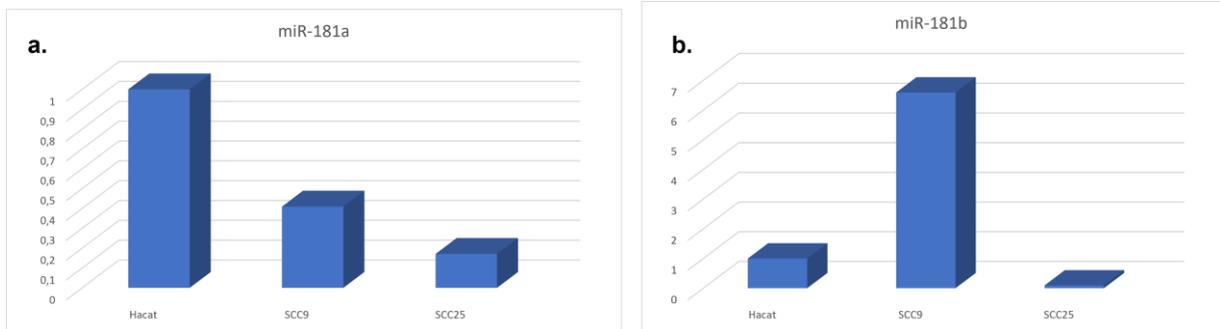
Figura 5: Análise de MMP7 e TGFBR2 nas linhagens tumorais SCC9 e SCC25



Legenda: (a) Avaliação de MMP7 e de (b) TGFBR2 nas linhagens SCC9 e SCC25 comparadas com a linhagem Hacat. As reações foram feitas em triplicata. GAPDH foi utilizado como normalizador da reação.

Padrão de expressão de miR-181a e miR-181b em linhagens de CCEO

Em seguida, foram analisadas a expressão do miR-181a e miR181b nas linhagens tumorais SCC9 e SCC25, por qPCR, e comparamos com a linhagem Hacat (**Figura 6**). Nesta análise, observamos uma redução de aproximadamente 2,5 vezes na expressão de miR181a na linhagem SCC9, e redução de aproximadamente 5 vezes desse miRNA na linhagem SCC25 (**Figura 6a**). Na análise do miR-181b, observamos perfil de expressão heterogêneo entre as duas linhagens, com aumento de aproximadamente 6,5 vezes desse miRNA na linhagem SCC9 e redução de aproximadamente 11 vezes na linhagem SSC25 (**Figura 6b**).

Figura 6: Análise do miR-181a/b nas linhagens tumorais SCC9 e SCC25

Legenda: (a) Avaliação de miR-181a e de (b) miR-181b nas linhagens SCC9 e SCC25 comparadas com a linhagem Hcat. As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação.

Comparação entre as expressões de MMP7 e TGFBR2 e miR-181a/b

Em seguida, comparamos a expressão de MMP7 e TGFBR2 com a expressão do miR-181a e miR-181b nas linhagens celulares (**Tabela 1**). Na linhagem SCC9, observamos uma relação inversamente proporcional entre a expressão de TGFBR2 (hiperexpresso) e miR-181a (hipoexpresso). Uma relação diretamente proporcional a entre TGFBR2 e miR-181b foi observada na linhagem SCC9, pois ambos se apresentaram aumentados nessa linhagem. Não foi possível comparar a expressão desses miRNAs com o gene MMP7 em SCC9, visto que não houve amplificação desse gene durante a qPCR nessa linhagem. Na linhagem SCC25, observamos uma relação diretamente proporcional de TGFBR2, miR-181a e miR-181b, que se apresentaram todos com expressão reduzida nessa linhagem. MMP7 não apresentou diferença de expressão na linhagem SCC25.

Tabela 1: Comparação da expressão de MMP7 e TGFBR2 e miR-181a/b

	TGFBR2	MMP7	miR-181a	miR-181b
SCC9	20,308	#	0,409	6,592
SCC25	0,101	0,898	0,170	0,093

Legenda: #, indetectável

Avaliação de TGFBRII, MMP7, miR-181a/b em pacientes portadores de CCEO

Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO

Foram analisadas 12 amostras de pacientes portadores de CCEO, sendo 8 do sexo masculino (66,6%) e 4 do sexo feminino (33,3%), com idades variando de 58 a 86 anos (média de idade = 73 anos).

Quando os pacientes foram questionados sobre hábitos importantes para o desenvolvimento da carcinogênese oral como etilismo e tabagismo, 41,6% dos pacientes declararam-se tabagistas e 66,6% etilistas. Foi observada uma exposição concomitante ao álcool e tabaco em 41,6% dos pacientes.

Quanto ao sítio anatômico, neste estudo, a região de maior acometimento foi a língua (58,33%), seguida do assoalho bucal (16,67%). A análise histopatológica revelou que 83,34% (n=10) dos pacientes apresentavam CCEO com grau moderadamente-diferenciado, 8,33% (n=1) bem-diferenciado e 8,33% (n=1) pouco-diferenciado.

Tabela 2: Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO

Amostra	Localização	Tabaco	Álcool	Gênero	Idade (anos)	Diferenciação histológica
OSCC2	AB	S	S	M	73	MD
OSCC3	L-CO	N	N	M	69	MD
OSCC4	L-CO	N	S	F	81	BD
OSCC7	AB	N	S	M	81	PD
OSCC12	L-CO	S	S	M	58	MD
OSCC14	L-CO	N	N	F	86	MD
OSCC15	FV	N	N	M	74	MD
OSCC16	L-CO	S	S	M	62	MD
OSCC17	L-CO	S	S	M	84	MD
OSCC20	L-CO	N	S	M	70	MD
OSCC22	FV	N	N	F	67	MD
OSCC23	RA	S	S	F	75	MD

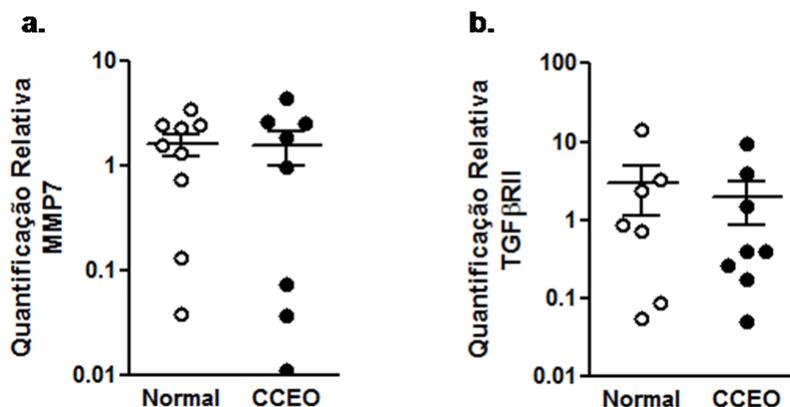
Legenda: OSCC, paciente portador de CCEO; Localizações: L-CO, língua-cavidade oral; AB, assoalho de boca; ORO, orofaringe; FV, fundo de vestíbulo; GEN, gengiva; RA, rebordo alveolar. Diferenciação: BD, bem-diferenciado; MD, moderadamente diferenciado; PD, pouco diferenciado.

Análise de TGFBR2 e MMP7 nas amostras normais e de CCEO

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

Nestas análises, observamos hiperexpressão de MMP7 (**Figura 7a**) em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 37,5% (3 amostras de 8) das amostras de CCEO. Já a hipoexpressão de MMP7, foi encontrada em 22,2% (2 amostras de 9) das amostras normais, e em 37,5% (3 amostras de 8) das amostras de CCEO. TGFBR2 apresentou-se hiperexpresso em 42,85% (3 amostras de 7) das amostras normais e 25% (2 amostras de 8) nas amostras de CCEO (**Figura 7b**). A hipoexpressão de TGFBR2 foi observada em 28,5% (2 amostras de 7) das amostras normais e 62,5% (4 amostras de 8) das amostras tumorais. Entretanto, de forma geral, não encontramos diferenças significativas na expressão de MMP7 e TGFBR2 nas amostras de CCEO comparado às amostras de mucosa oral normal (**Figura 7**). Contudo, na análise de *Spearman* encontramos uma tendência de correlação inversa entre a expressão de TGFBR2 e MMP7 ($r = -0,600$ e $p = 0,08$) nas amostras analisadas.

Figura 7: Análise de MMP7 e TGFBR2 nas amostras normais e de CCEO.

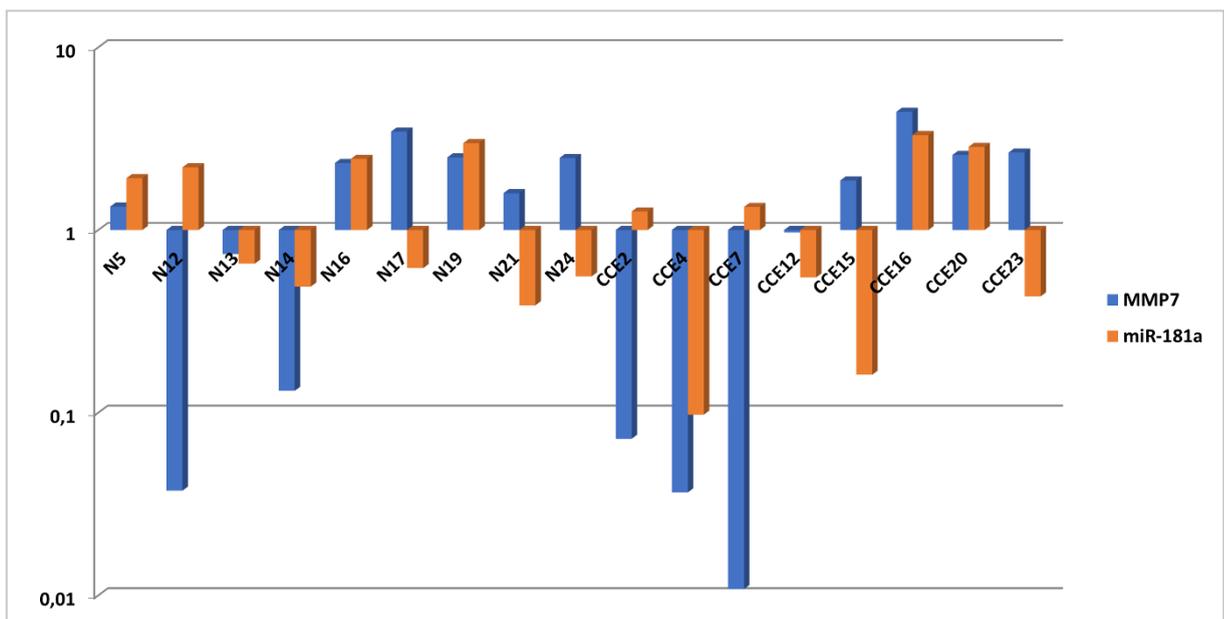


Legenda: (a) Avaliação de MMP7 e de (b) TGFBR2 nas amostras de CCEO comparadas com as amostras normais. As reações foram feitas em triplicata. GAPDH foi utilizado como normalizador da reação. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão de MMP7 e TGFBR2 entre o grupo normal e o CCEO.

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

Em seguida, avaliamos a expressão dos miR-181a/b juntamente com a expressão dos genes alvos (**Figura 8 a Figura 11**). Ao comparar a expressão de miR-181a com MMP7 (**Figura 8**), observamos expressão diretamente proporcional em 55,6% (5 amostras de 9) das amostras normais e 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. Contudo, encontramos expressão inversamente proporcional em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO.

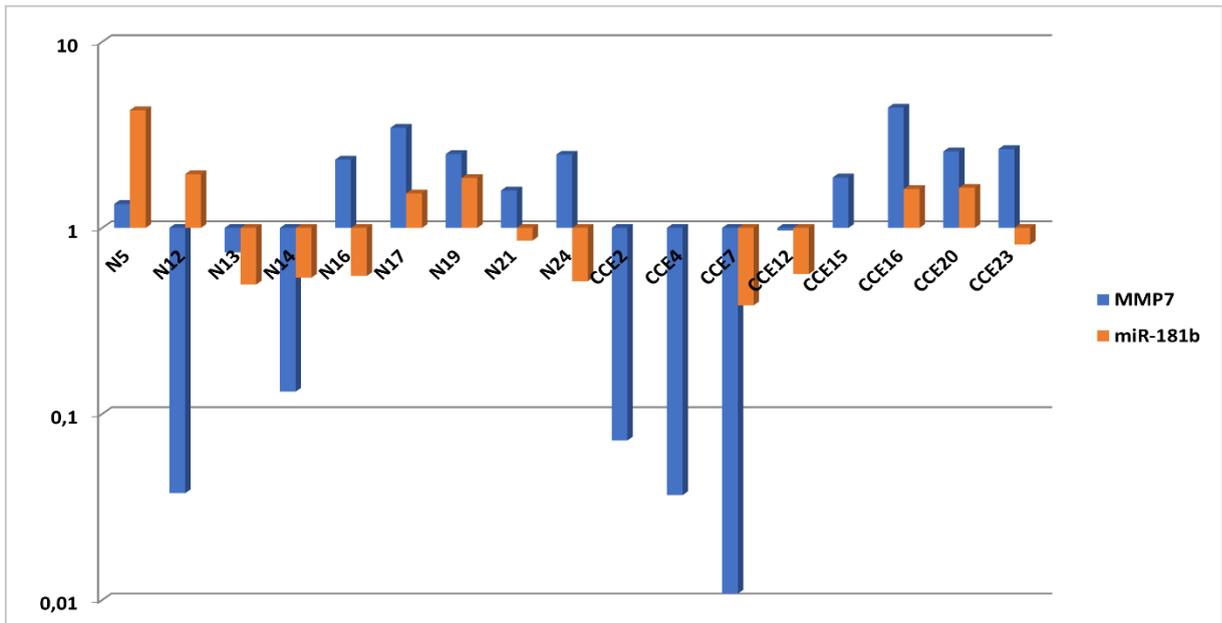
Figura 8: Comparação entre miR-181a e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável



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

Na comparação entre miR-181b e MMP7 (**Figura 9**), observamos expressão diretamente proporcional em 55,6% (5 amostras de 9) das amostras normais e 80% (4 amostras de 5) das amostras de CCEO. Por outro lado, notamos expressão inversamente proporcional em 44,4% (4 amostras de 9) das amostras normais e 20% (1 amostra de 5) das amostras de CCEO.

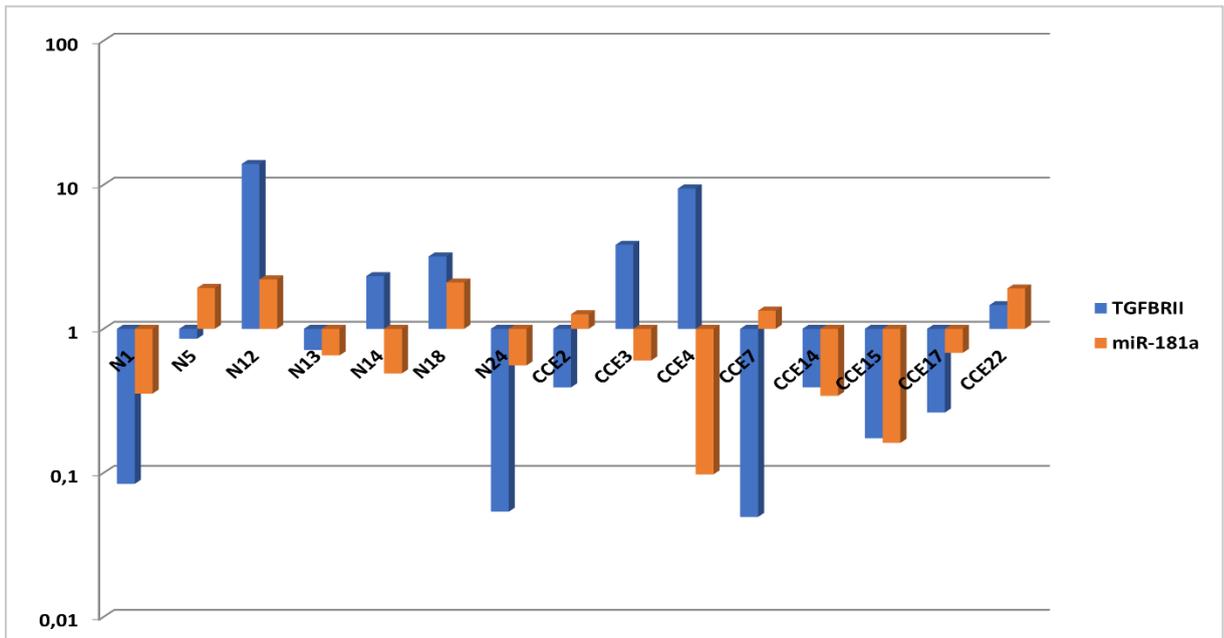
Figura 9: Comparação entre miR-181b e MMP7, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável



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

Na análise da correlação dos miR-181a com TGFBR11 (**Figura 10**), encontramos expressão diretamente proporcional em 71,4% (5 amostras de 7) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras de CCEO. Por outro lado, observamos expressão inversamente proporcional em 28,6% (2 amostras de 7) das amostras normais e em 50% (4 amostras de 8) das amostras de carcinoma.

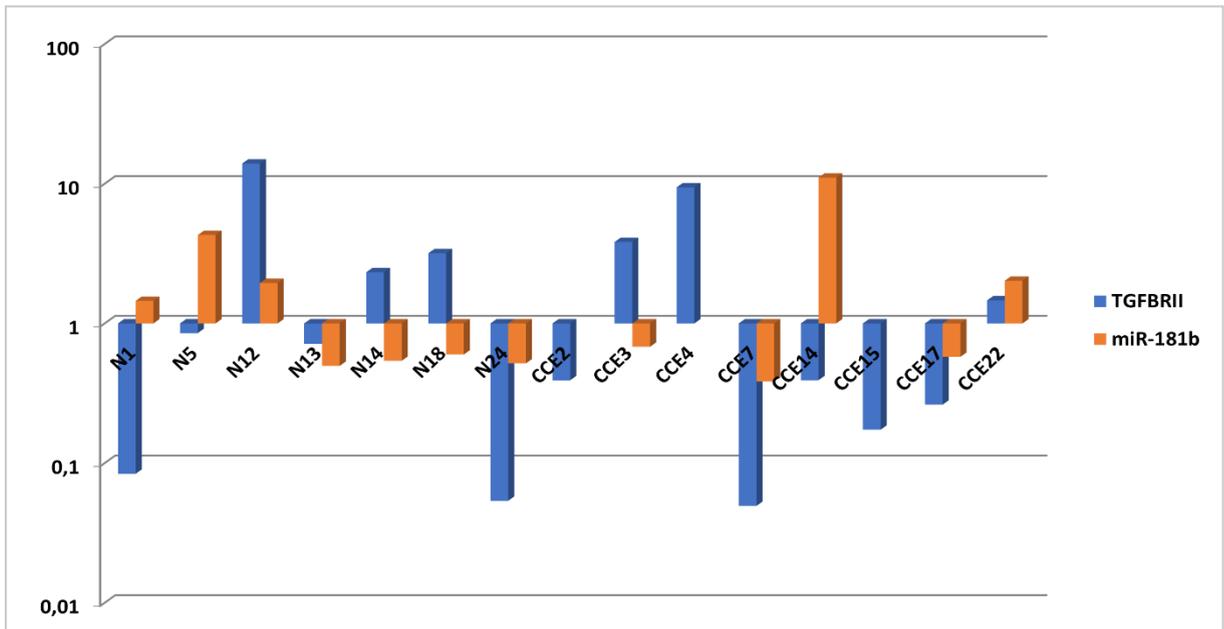
Figura 10: Comparação entre miR-181a e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável.



Legenda: As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras apresentou expressão diretamente proporcional entre TGFBR2 e miR-181a.

Na análise do miR-181b e TGFBR2 (**Figura 11**), observamos expressão diretamente proporcional em 42,8% (3 amostras de 7) das amostras normais e em 60% (3 amostras de 5) das amostras de CCEO. No entanto, notamos expressão inversamente proporcional em 57,2% (4 amostras de 7) das amostras normais e 40% (2 amostras de 5) das amostras tumorais.

Figura 11: Comparação entre miR-181b e TGFBR2, em amostras de CCEO e de mucosa oral saudável



Legenda: As reações foram feitas em triplicata. RNU48 foi utilizado como normalizador da reação. Amostras de mucosa oral saudável foram utilizadas como comparação para o cálculo da expressão relativa. A maioria das amostras apresentou expressão diretamente proporcional entre TGFBR2 e miR-181b.

Baseados nesses resultados bastante heterogêneos entre as amostras, não é possível inferir se miR-181a e/ou miR-181b participa(m) da regulação de MMP7 ou de TGFBR2 nas amostras analisadas. Entretanto, na análise de *Spearman* encontramos correlação positiva moderada entre a expressão de TGFBR2 e o miR-181a nas amostras analisadas ($r=0,629$, $p=0,012$).

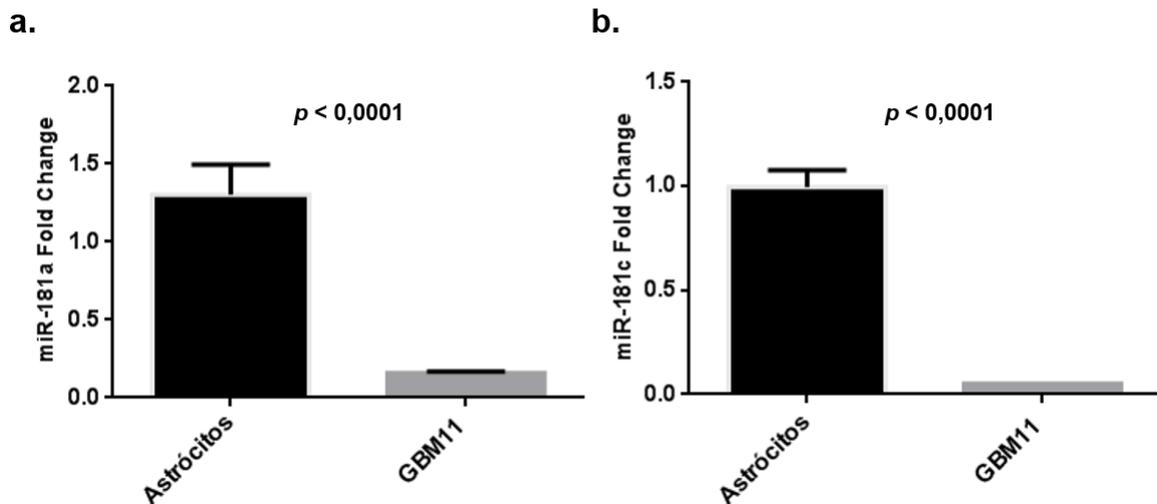
Avaliação do miR-181a/c nas linhagens celulares

Padrão de expressão de miR-181a e miR-181c no glioblastoma

miR-181a e miR-181c podem se apresentar tanto como supressores tumorais quanto como oncogenes, dependendo do tipo tumoral. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que em gliomas, miR-181a e miR-181c atuam como supressores tumorais (RUAN et al., 2015; SHI et al. 2008). Portanto, averiguamos os níveis destes miRNAs na linhagem GBM11, por qPCR, e comparamos com a cultura de astrócitos humanos. Nesta análise foi observada uma redução significativa de 87,72% de miR181a (**Figura 12**) e de 95% de miR-181c (**Figura 12**) quando comparados com a linhagem astrogliol

humana ($p < 0,0001$) (**Figura 12**), indicando uma hipoexpressão destes miRNAs na linhagem de GBM.

Figura 12: Hipoexpressão de miR-181a/181c na linhagem GBM11

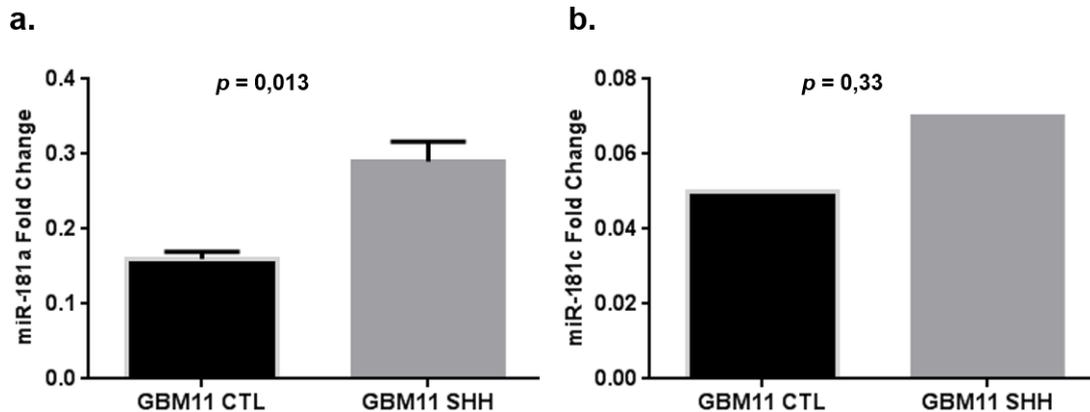


Legenda: Cultura de GBM11 e astrócitos humanos mantida até semiconfluência *in vitro*. A expressão dos miRNAs 181a e c foi realizada por PCR quantitativo e comparados com os astrócitos humanos. (a) níveis do miR-181a ($p < 0,0001$); (b) níveis do miR181c ($p < 0,0001$). Em ambas as condições observamos uma hipoexpressão dos miRNAs, nas células da linhagem GBM11. N=3.

Papel da via de *Sonic* na expressão de miR-181a e miR-181c

A ativação da via de Shh está associada ao desenvolvimento de alguns tumores cerebrais e manutenção das células-tronco tumorais (COCHRANE et al., 2015; WICKING; MCGLINN, 2001). Por esta razão, avaliamos a expressão do miR-181a e 181c, por qPCR, na linhagem de GBM11 tratadas com 2 ng/mL de Shh comparada com grupo controle (**Figura 13**). Observamos um aumento significativo ($p=0,013$) de 81,25% de miR-181a, no tratamento com Shh (**Figura 13**). Entretanto, na avaliação da expressão do miR-181c não observamos diferença significativa após o tratamento com Shh (**Figura 13**). A ativação da via de SHH aumenta o nível de 181a, na linhagem GBM11.

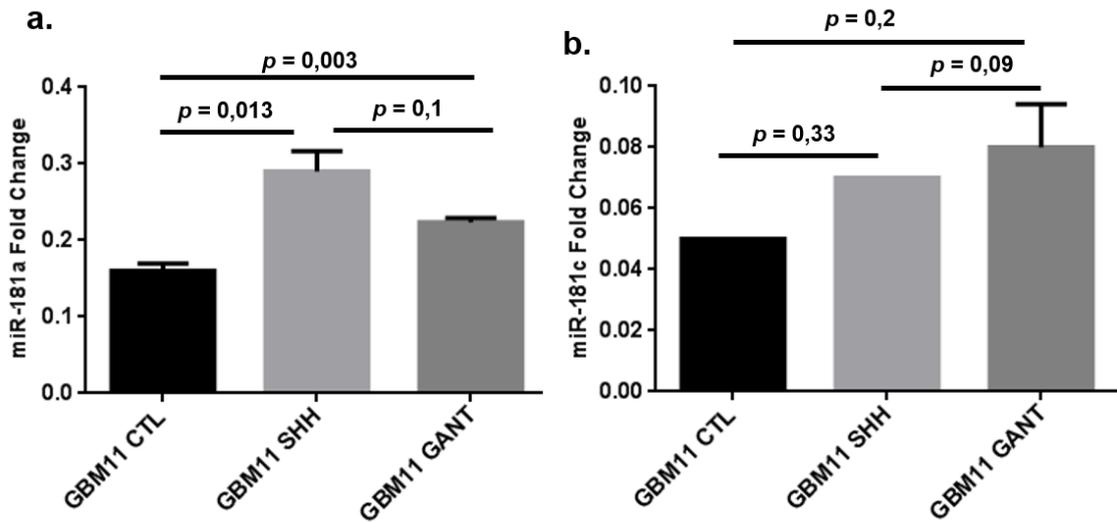
Figura 13: Análise de miR-181a/181c na linhagem GBM11 após tratamento com Shh



Legenda: Cultura de GBM11 mantida até semiconfluência *in vitro*, tratada com [2ng/mL] de Shh por 48h. (a) avaliação do miR-181a ($p=0,013$); (b) avaliação do miR181c. O tratamento com Shh induz um aumento de mir-181a, entretanto, não foi observado diferença significativa do miR-181c na linhagem GBM11 tratada com Shh ($p=0,33$). N=3.

A ação canônica de Shh depende da ativação da proteína GLI1 (ANDERSON, 2010; DENEFF et al., 2000; GOETZ; RIMIKUS et al., 2016). Portanto, para analisar uma possível ação da via canônica de Shh na expressão de miR181a, em GBM11, tratamos as células com 20 μ M de GANT-61, um inibidor eficaz de GLI1/2 (LAUTH et al., 2007; VON HOFF et al., 2009). O tratamento foi mantido por 48 horas, em seguida, analisamos os níveis de miR181a e miR-181c por qPCR (**Figura 14**). Embora tenhamos observado um ligeiro aumento de 37,5% nos níveis de miR-181a, esta não foi significativa (**Figura 14**). Não observamos diferença significativa na expressão do miR-181c após o tratamento com GANT-61 (**Figura 14**). Este resultado sugere uma possível participação de vias independentes de GLI, no evento observado.

Figura 14: Análise de miR-181a/181c na linhagem GBM11 após inibição da via de Shh



Legenda: Cultura de GBM11 mantida até semiconfluência *in vitro*, tratada com [2ng/mL] de Shh ou [20µM] de GANT-61, por 48h. (a) expressão de miR-181a e (b) miR181c. não foi observado diferença significativa do miR-181a ($p=0,1$) ou miR-181c ($p=0,09$) no grupo tratado com GANT-61. Indicando que a inibição de GLI não afeta significativamente os dois miRNAs. N=3.

6. DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, a regulação epigenética desempenha um importante papel no processo de carcinogênese (CALIN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2007). Apesar do perfil de expressão dos miRNAs depender do tipo celular e da diferenciação e desenvolvimento de um tecido específico, é possível observar determinados miRNAs aberrantemente expressos em diferentes tipos de cânceres, como por exemplo, no CCEO, no GBM e no câncer de mama (IORIO ; CROCE, 2009).

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a correlação da família miR-181 com a via de TGF- β e a MMP7 no CCEO, uma vez que são processos importantes no desenvolvimento da carcinogênese oral, contribuindo para a agressividade nesse tipo de tumor (QUAN *et al.*, 2013; TAKAHARA *et al.*, 2017). Além disso, o estudo avaliou a correlação da família miR-181 com a via de Shh no GBM, visto que a via de Shh é capaz de promover a sobrevivência, invasão e angiogênese das células cancerígenas (CHEN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

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

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

Quanto ao sítio anatômico, neste estudo, a região de maior acometimento foi a língua (58,33%), seguida do assoalho bucal (16,67%). Esse resultado corrobora com estudos que demonstraram a língua como sítio anatômico de maior incidência do CCEO (SHAH ; LYDIATT, 1995; AKANUMA *et al.*, 1999). Muitos estudos têm descrito a relevância da localização do tumor no prognóstico e na sobrevida do paciente (MASSANO *et al.*, 2006; SILVERMAN ; GORSKY, 1990). Um estudo de Leite e Koifman, (1998) demonstrou altas taxa de mortalidade em pacientes com CCEO localizados na língua e assoalho bucal, isso pode ser explicado pela facilidade de disseminação dos tumores nessas regiões, o que leva ao desenvolvimento de metástases regionais.

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

Muitos fatores moleculares estão associados ao processo de carcinogênese, dentre eles a desregulação da via TGF- β e da expressão das MMPs. A via TGF- β possui importante papel na homeostasia das células epiteliais, mas já foi associada ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores, como o CCECP (LU *et al.*, 2004). Dessa forma, esse estudo se propôs a analisar TGFBR2, receptor de membrana de TGF- β , que já foi apresentado como um importante fator na carcinogênese oral. Na avaliação de TGFBR2 nas linhagens tumorais, nossos resultados apresentaram perfil de expressão heterogêneo, aumentado na linhagem SCC9 e diminuído na linhagem SCC25. Estudos têm demonstrado que a via de TGF- β no CCEO apresenta função tanto de supressor tumoral, inibindo a proliferação das células cancerígenas, como de promotor tumoral, induzindo a TEM (PIEK ; ROBERTS, 2001; MINCIONE *et al.*, 2008; ANDL *et al.*, 2014; TAKAHASHI *et al.*, 2020). Dessa forma, nosso resultado na linhagem SCC25 corrobora com a literatura que descreve a perda da expressão de TGFBR2 como a alteração mais comum nessa via durante a progressão do CCEO, o que leva à

diminuição da apoptose mediada por esse receptor (MENG et al., 2011). Em nossos resultados, o aumento da expressão de TGFBRII na linhagem SCC9 não corrobora com a literatura, no entanto, estudos descrevem a ação de TGF- β no estroma tumoral induzindo a TEM favorecendo os processos de invasão e metástase das células cancerígenas (CIRILLO et al., 2017; LI et al., 2018; HAGA et al., 2021).

Em nossas amostras, observamos hipoexpressão de TGFBRII em 62,5% (n=5) dos pacientes portadores de CCEO e hiperexpressão em 25% (n=2). Esse resultado corrobora com os dados da literatura que correlacionaram a diminuição da expressão de TGFBRII com o aumento da angiogênese e inflamação no CCECP (LU et al., 2006). Outro estudo que avaliou 86 amostras de CCEO demonstrou que 70,1% delas apresentaram hipoexpressão de TGFBRII e a sua diminuição estava associada com um pior índice de sobrevida (p= 0,012), dessa forma, constituindo-se um fator prognóstico promissor para o CCEO (SIVADAS et al., 2015).

Observamos nos pacientes CCE3 e CCE4, a correlação da hiperexpressão de TGFBRII com a presença de metástase nos linfonodos regionais. Esse resultado não corrobora com um estudo em modelo animal de CCEO, que demonstrou a associação da perda de TGFBRII com o desenvolvimento de metástase nos linfonodos regionais em 35% de sua amostra (LU et al., 2006). Os autores descreveram que a perda desse receptor permitia o acúmulo de múltiplas alterações moleculares que são descritas no CCEO, assim como hiperexpressão do receptor de crescimento epidermal (do inglês *epidermal growth factor receptor* - EGFR), ativação de STAT3 e de ciclina D1 e a perda do alelo p53 (MASUDA et al., 2002; OPITZ et al., 2002; GRANDIS ; SOK, 2004). Além disso, a perda de TGFBRII aumentou os níveis endógenos de TGF- β 1, secretados pelas células epiteliais ou células estromais, indicando um *feedback* negativo após a perda desse receptor. Dessa forma, a hiperexpressão de TGF- β 1 aumentou seus efeitos no estroma tumoral, como a angiogênese e a inflamação (LI et al., 2004; CHEN et al., 2005).

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

moleculares da perda de TGFBR2, que incluem aumento da expressão de EGFR e STAT3, podem contribuir para a TEM no CCEO (GRANDIS ; SOK, 2004; LU *et al.*, 2006).

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

A MMP7 já foi descrita em diversos tipos de tumores e associada ao pior prognóstico. No CCECP a expressão da MMP7 foi relacionada à profundidade de invasão, estágio avançado do tumor, recidivas e na recorrência no primeiro ano pós-operatório (YAMAMOTO *et al.*, 1999). No CCEO, inúmeros autores têm demonstrado que a MMP7 se encontra aumentada. Um estudo realizado em 73 pacientes nos estágios I e II do CCEO de língua sugeriu que a expressão elevada da MMP7 está associada à metástase nos estágios iniciais desse tipo de tumor (MÄKINEN *et al.*, 2014). De Vicente e colaboradores também relataram expressão aumentada da MMP7 no CCEO, e sua correlação com a metástase linfonodal. Na avaliação da MMP7 nas linhagens tumorais, não houve amplificação desse gene durante a PCR na linhagem SCC9, e na linhagem SCC25 observamos diminuição de expressão, resultado que não corrobora com a literatura que descreve a MMP7 hiperexpressa no CCEO (CHUANG *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2011). Nas amostras de CCEO, observamos hiperexpressão em 37,5% (n=3) e hipoexpressão em 37,5% (n=3), e não houve diferença significativa entre o grupo normal e os pacientes portadores de CCEO. Esse resultado pode estar associado ao pequeno número amostral do estudo.

Em nossas análises, encontramos uma tendência de correlação inversa entre a expressão de TGFBR2 e MMP7 ($p= 0,08$). Esse resultado pode ser explicado pela função inversa que os dois desempenham no CCEO, TGFBR2 parece apresentar função de supressor tumoral, enquanto a MMP7 parece apresentar função oncogênica. Contudo, no câncer colorretal com Síndrome de Lynch, expressão de TGFBR2 teve correlação positiva com a MMP7, e estavam relacionados com a profundidade de invasão de metástase linfonodal (GU *et al.*, 2014). No entanto, existem poucos estudos avaliando a expressão de TGFBR2 e MMP7.

No processo de carcinogênese, além da desregulação da via TGF- β e das MMPs, os miRNAs despontam como importantes reguladores epigenéticos e já foram

descritos em diversos tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2007). O desequilíbrio da expressão do miR-181a/b já foi associado com a progressão e metástase em muitos tumores, dentre eles o CCEO (SHI *et al.* 2008; CHEN *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2011; CERVIGNE *et al.*, 2009). Nossa avaliação da expressão do miR-181a na linhagem SCC9 e SSC25 corrobora com os dados da literatura que descrevem esse miRNA diminuído no CCEO e com função de supressor tumoral (SHIN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011). No entanto, as análises do miR-181b nas linhagens apresentou expressão heterogênea. Na linhagem SCC9 o aumento desse miRNA corrobora com os estudos que descrevem o miR-181b hiperexpresso no CCEO, com função de oncomiR e como um bom biomarcador de progressão de tumor (CERVIGNE *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2021). Em um estudo prévio, realizado pelo nosso grupo, observamos que 30% das amostras de CCEO apresentaram hipoexpressão do miR-181a e 25% apresentaram hiperexpressão (MACHADO *et al.*, 2016). Resultado que se assemelha com os descritos na literatura que sugerem um papel de supressor tumoral desse miRNA no CCEO (SHIN *et al.*, 2011). Para o miR-181b, observamos hiperexpressão de 41,17% das amostras, dado confirmado pelos achados na literatura que descrevem miR-181b com ação oncogênica nesse câncer (CERVIGNE *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2016).

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

Ao avaliarmos a expressão de miR-181a/b com os níveis do gene TGFBR2 nas amostras de CCEO, encontramos correlação positiva entre o miR-181a e TGFBR2. Esse resultado pode estar associado à função de supressor tumoral que eles dois exercem, dessa forma, podemos inferir que miR-181a não tem como alvo direto

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

Muitos miRNAs foram descritos como importantes reguladores das MMPs no nível pós-transcricional, e têm sido alvos de pesquisas quanto a importância dessa correlação na invasão e metástase no câncer (WAN *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2015; RAK *et al.*, 2017). Quanto a relação da expressão de miR-181a com as MMPs, um estudo em linhagem de câncer de mama, demonstrou que a MMP14 é diretamente inibida pelo miR-181a-5p, resultando na diminuição da migração celular, invasão e angiogênese (LI *et al.*, 2015). Já o miR-181b foi associado a supressão de TIMP3, um inibidor de MMPs, tanto na hepatocarcinogênese quanto na estenose aórtica, favorecendo a progressão do carcinoma hepatocelular e da calcificação da válvula aórtica (WANG *et al.*, 2010; HEATH *et al.*, 2018). Até o momento, não existe na literatura, nenhum estudo descrevendo a ação do miR-181a/b sobre a MMP7. Em nossas amostras e nas linhagens tumorais também não observamos correlação entre esses miRNAs e MMP7.

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

Dessa forma, concluímos que a perda da função da via de TGF- β possui importante papel no desenvolvimento do CCEO, e que alterações nos seus componentes desencadeiam desajustes em outras vias de sinalização, que associadas aumentam a agressividade e o potencial de invasão das células tumorais. Além disso, averiguamos a importância dos miRNAs na regulação do processo de carcinogênese oral.

Quanto a avaliação da família miR-181 no GBM, nossos resultados até o momento corroboraram com os achados da literatura que descrevem o miR-181a/c aumentada nos astrócitos e diminuída hipoexpressos na linhagem de GBM (RUAN et al., 2015; YANG et al., 2018). A hiperexpressão desses miRNAs na linhagem astrogliol é esperada visto que possui importante papel na ativação da apoptose e na função mitocondrial dessas células. Um estudo demonstrou que a hiperexpressão do miR-181a em astrócitos inibiu a expressão de membros da família Bcl2 que têm função pró-sobrevivência, e conseqüentemente, ativou a apoptose dessas células (OUYANG et al., 2012). Dessa forma, essa função de ativar a apoptose em células normais corresponde com a hipoexpressão que observamos na linhagem de GBM que garante a sobrevivência das células tumorais. Um estudo que induziu a expressão do miR-181a em células de GBM demonstrou que esse miRNA aumenta a apoptose *in vitro* e a transfecção em camundongos aumentou a sobrevivência desses animais (MARISSETTY et al., 2020).

Além disso, quando a linhagem de GBM foi tratada com Shh demonstra a modulação dessa via sobre esse miRNA específico. No entanto, quando as células foram tratadas com GANT-61 não observamos alteração na expressão dos miRNAs, indicando que a regulação de Shh sobre o miR-181a não ocorre através da ativação canônica da via. Um estudo demonstrou que a transfecção de miR-181a em células de glioma foi capaz de inibir a atividade de ciclina B1, um componente da via não canônica de Shh, revelando a interação entre essa via alternativa com a expressão do miR-181a (WANG et al., 2014). Os nossos resultados de expressão de miR-181a não corroboram com um achado da literatura que o descrevem com expressão inversamente proporcional ao componente da via de Shh (WANG et al., 2014). No entanto, é possível que a via esteja ativando um mecanismo de *feedback* negativo, um processo de autorregulação, para manter a homeostase da célula.

A ciclopamina pertence à família dos alcaloides esteroides e possui atividades teratogênicas e antitumorais por bloquear as repostas celulares à sinalização de *Hedgehog* nos vertebrados. A ciclopamina interage com a proteína Smo e causa uma mudança conformacional inibindo sua atividade mesmo na presença do ligante Shh (CHEN et al., 2002; HERETSCH et al., 2010). Desta maneira, além de servir como um alvo terapêutico, a ciclopamina poderá ser utilizada em nosso estudo para posterior avaliação da via não canônica de Shh na linhagem GBM11.

A desregulação da via Shh no GBM foi associada à um perfil mais agressivo da doença por ativar a proliferação e migração das células tumorais (CHANG et al., 2015). Além disso, a interação de diferentes vias de sinalização contribui juntamente para a regulação do microambiente tumoral ativando fatores de transcrição que favorecem o processo de invasão e metástase. Nesse contexto, destaca-se o processo de TEM, ativado tanto pela via de Shh como por outras vias que interagem com Shh, como TGF- β e WNT (ZHANG et al., 2016). Os miRNAs são outras moléculas associadas a regulação dessas vias e contribuem para a alteração dos processos de proliferação e migração das células tumorais (HE et al., 2016; RUAN et al., 2015; SHI et al. 2008).

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a família miR-181 desempenha um papel importante no processo de carcinogênese. Resultados parecem sugerir uma correlação da família miR-181 com a via de TGF- β e Shh.

- Não houve diferença significativa na expressão da MMP7 e TGFBR2 das amostras de CCEO quando comparadas com as amostras de mucosa oral normal. Contudo, a maior parte das amostras de CCEO apresentou hipoexpressão de TGFBR2, como o descrito na literatura;
- Encontramos correlação positiva entre a expressão de TGFBR2 e do miR-181a nas amostras de CCEO, e pode estar associado a função supressora tumoral que os dois apresentam no CCEO;
- Não encontramos correlação entre a expressão de MMP7 com as variáveis demográficas e clinicopatológicas. A expressão de TGFBR2 mostrou correlação com a presença de metástase linfonodal nas amostras CCE3 e CCE4. Esse resultado pode estar associado ao sítio anatômico em que o tumor estava localizado. No entanto, posteriores ensaios de migração e mobilidade celular serão realizados para confirmar se a via de TGF- β está ou não associada ao processo de metástase nos linfonodos regionais dos pacientes portadores de CCEO;
- O miR-181a/181c se encontram aumentados na linhagem astrogliar e hipoexpressos na linhagem de GBM como descrito na literatura;
- O tratamento com Shh alterou a expressão do miR-181a, mas não houve diferença significativa na expressão do miR-181c;
- No tratamento com GANT 61 não houve diferença significativa na expressão dos miRNAs indicando que a regulação desses miRNAs não ocorre apenas pela via canônica de Shh.

REFERÊNCIA

- AKANUMA, D et al. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncology*, v. 35, n. 5, p. 476-483, 1999.
- AKHTAR et al. MicroRNA-602 and microRNA-608 regulate sonic hedgehog expression via target sites in the coding region in human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*, v. 67, n. 2, p. 423-434, 2015.
- AKHURST, Rosemary J. Targeting TGF- β signaling for therapeutic gain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 9, n. 10, p. a022301, 2017.
- ALFONSI, et al. Design, Palladium-catalyzed synthesis, and biological investigation of 2-substituted 3-arylquinolin-4 (1 H)-ones as inhibitors of the Hedgehog signaling pathway. *Journal of medicinal chemistry*, v. 60, n. 4, p. 1469-1477, 2017.
- ALI SYEDA, Zainab, et al. "Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer." *International journal of molecular sciences* 21.5 1723, 2020.
- ALVAREZ, et al. TGF β 2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development*, v. 129, n. 8, p. 1913-1924, 2002.
- AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- ANDL, Thomas et al. Concerted loss of TGF β -mediated proliferation control and E-cadherin disrupts epithelial homeostasis and causes oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 11, p. 2602-2610, 2014.
- ARCHER, Tenley C.; WEERARATNE, Shyamal D.; POMEROY, Scott L. Hedgehog-Gli pathway in medulloblastoma. *J Clin Oncol*, v. 30, n. 17, p. 2154-2156, 2012.
- ARGIRIS, Athanassios et al. Head and neck cancer. *The Lancet*, v. 371, n. 9625, p. 1695-1709, 2008.
- ATWOOD, Scott X. et al. Smoothed variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer cell*, v. 27, n. 3, p. 342-353, 2015.
- AYALA-ORTEGA, Erandi et al. Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in cell lines. *BMC cancer*, v. 16, n. 1, p. 226, 2016.
- BABA, Osamu et al. Micro RNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 45, n. 4, p. 248-255, 2016.
- BARASCH, Andrei; SAFFORD, Monika; EISENBERG, Ellen. Oral cancer and oral effects of anticancer therapy. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, v. 65, n. 5-6, p. 370-377, 1998.
- BARROS, Simone Souza Lobão Veras et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Archives of oral biology*, v. 56, n. 8, p. 752-760, 2011.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BAVLE, Radhika Manoj et al. Molecular classification of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, v. 10, n. 9, p. ZE18, 2016.

- BELGACEM, Yesser H.; BORODINSKY, Laura N. Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 11, p. 4482-4487, 2011.
- BENVENUTO, Monica et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget*, v. 7, n. 8, p. 9250, 2016.
- BERGHOFF, Anna S. et al. Assessing MGMT methylation status and its current impact on treatment in glioblastoma. *CNS oncology*, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2015.
- BLOTTA, Simona et al. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 120, n. 25, p. 5002-5013, 2012.
- BRENNAN, Donna et al. Noncanonical hedgehog signaling. In: *Vitamins & Hormones*. Academic Press, 2012. p. 55-72.
- BRIONNE, Thomas C. et al. Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, v. 40, n. 6, p. 1133-1145, 2003.
- BRITO, João AR et al. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 43, n. 3, p. 211-216, 2014.
- BRUNA, Alejandra et al. High TGF β -Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer cell*, v. 11, n. 2, p. 147-160, 2007
- BRANDES, Alba A. et al. Role of MGMT methylation status at time of diagnosis and recurrence for patients with glioblastoma: clinical implications. *The oncologist*, v. 22, n. 4, p. 432, 2017.
- BRISCOE, James; ERICSON, Johan. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current opinion in neurobiology*, v. 11, n. 1, p. 43-49, 2001.
- BRITO, João AR et al. Relationship between micro RNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 43, n. 3, p. 211-216, 2014.
- BUTOVSKY, Oleg et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 131-143, 2014.
- BUTZ, Henriett et al. Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *Trends in pharmacological sciences*, v. 33, n. 7, p. 382-393, 2012.
- CALIFANO, Joseph et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clinical Cancer Research*, v. 6, n. 2, p. 347-352, 2000.
- CALIN, George Adrian et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.
- CANTINI, Laura et al. Identification of microRNA clusters cooperatively acting on epithelial to mesenchymal transition in triple negative breast cancer. *Nucleic acids research*, v. 47, n. 5, p. 2205-2215, 2019.

- CARBALLO, Gabriela Basile et al. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling*, v. 16, n. 1, p. 11, 2018.
- CARRELLA, Sabrina et al. TGF- β controls miR-181/ERK regulatory network during retinal axon specification and growth. *PLoS one*, v. 10, n. 12, p. e0144129, 2015.
- CAO, Liangqi et al. MiR-324-5p suppresses hepatocellular carcinoma cell invasion by counteracting ECM degradation through post-transcriptionally downregulating ETS1 and SP1. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. e0133074, 2015.
- CERVIGNE, Nilva K. et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Human molecular genetics*, v. 18, n. 24, p. 4818-4829, 2009.
- CHANDRA, Vikas et al. Hedgehog signaling pathway is active in GBM with GLI1 mRNA expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0116390, 2015.
- CHANG, Cheng-Chi et al. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, v. 49, n. 9, p. 923-931, 2013.
- CHANG, Liang et al. Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and-9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma *Corrigendum in/mmr/12/5/7815*. *Molecular medicine reports*, v. 12, n. 5, p. 6702-6710, 2015.
- CHARLES, Nikki A. et al. The brain tumor microenvironment. *Glia*, v. 60, n. 3, p. 502-514, 2012.
- CHATTERJEE, Debajyoti et al. Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated With Poor Survival in Early-Stage Tumors. *Ear, Nose & Throat Journal*, v. 98, n. 7, p. E112-E119, 2019.
- CHEN, James K. et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes & development*, v. 16, n. 21, p. 2743-2748, 2002.
- CHEN, Chang-Zheng et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *science*, v. 303, n. 5654, p. 83-86, 2004.
- CHEN, Shuzhen et al. Transforming growth factor- β 1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1 α -stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages. *Immunology*, v. 114, n. 4, p. 565-574, 2005.
- CHEN, Hailan et al. miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 394, n. 4, p. 921-927, 2010.
- CHEN, Weiwei et al. Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 23, p. 9589-9594, 2011.
- CHEN, I.-Chieh et al. Role of SIRT1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis. *Molecular cancer*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2014.

- CHEN, Haojie et al. miR-181d-5p-FOXP1 feedback loop modulates the progression of osteosarcoma. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 503, n. 3, p. 1434-1441, 2018.
- CHEN, Keyan et al. Epigallocatechingallate attenuates myocardial injury in a mouse model of heart failure through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Molecular medicine reports*, v. 17, n. 6, p. 7652-7660, 2018.
- CHUANG, Hui-Ching et al. Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*, v. 21, n. 12, p. 1444-1450, 2008.
- CIRILLO, N. et al. Cancer-associated fibroblasts regulate keratinocyte cell-cell adhesion via TGF- β -dependent pathways in genotype-specific oral cancer. *Carcinogenesis*, v. 38, n. 1, p. 76-85, 2017.
- COCHRANE, Catherine R. et al. Hedgehog signaling in the maintenance of cancer stem cells. *Cancers*, v. 7, n. 3, p. 1554-1585, 2015.
- COCKETT, Mark I. et al. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. In: *Biochemical Society Symposium*. v. 63, p. 295-313, 1998.
- CONSTAM, D. B. et al. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *The Journal of Immunology*, v. 148, n. 5, p. 1404-1410, 1992.
- COWLAND, Jack B.; HOTHER, Christoffer; GRØNBAEK, Kirsten. MicroRNAs and cancer. *Apmis*, v. 115, n. 10, p. 1090-1106, 2007.
- CURRAN, Stephanie; MURRAY, Graeme Ian. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European journal of cancer*, v. 36, n. 13, p. 1621-1630, 2000.
- DAI, Bingbing et al. FoxM1B regulates NEDD4-1 expression, leading to cellular transformation and full malignant phenotype in immortalized human astrocytes. *Cancer research*, v. 70, n. 7, p. 2951-2961, 2010.
- DAVIS, Brandi N.; HATA, Akiko. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2009.
- DENEF, Natalie et al. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell*, v. 102, n. 4, p. 521-531, 2000.
- DENNLER, Sylviane et al. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor- β : Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer research*, v. 67, n. 14, p. 6981-6986, 2007.
- DENNLER, Sylviane et al. Cloning of the human GLI2 promoter transcriptional activation by transforming growth factor- β via Smad3/ β -catenin cooperation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 46, p. 31523-31531, 2009.
- DESSAUD, Eric; MCMAHON, Andrew P.; BRISCOE, James. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*, v. 135, n. 15, p. 2489-2503, 2008.
- DIANATOOLS. Disponível em << <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index&mirnas=hsa-miR-181a-2-3p>>> Acesso em: 04/02/2021.

- DOMINGUES, Cátia Sofia da Costa et al. Epithelial-mesenchymal transition and microRNAs: Challenges and future perspectives in oral cancer. *Head & Neck*, v. 40, n. 10, p. 2304-2313, 2018.
- DROPE, Jeffrey; SCHLUGER, Neil W. The tobacco atlas. American cancer society, 2018.
- ECKEL-PASSOW, Jeanette E. et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 26, p. 2499-2508, 2015.
- ELSTON, Rebecca; INMAN, Gareth J. Crosstalk between p53 and TGF- β Signalling. *Journal of signal transduction*, v. 2012, 2012.
- ESTELLER, Manel. Epigenetics in evolution and disease. *The Lancet*, v. 372, p. S90-S96, 2008.
- FAN, Hai-Xia et al. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. *Medical Oncology*, v. 31, n. 7, p. 41, 2014.
- FAROOQI, Ammad Ahmad et al. TRAIL, Wnt, sonic hedgehog, TGF β , and miRNA signalings are potential targets for oral cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 7, p. 1523, 2017.
- FARMANFARMA, K. K. et al. Brain cancer in the world: an epidemiological review. *World Cancer Research Journal*, v. 6, p. 5, 2019.
- FENG, Xin-Hua; DERYNCK, Rik. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu.Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 21, p. 659-693, 2005.
- FERRARI, Giovanni et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of cellular physiology*, v. 219, n. 2, p. 449-458, 2009.
- FUXE, Jonas; VINCENT, Theresa; GARCIA DE HERREROS, Antonio. Transcriptional crosstalk between TGF β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell cycle*, v. 9, n. 12, p. 2363-2374, 2010.
- GIBERT, Benjamin et al. Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 106, n. 11, 2014.
- GHIRGA, Francesca; MORI, Mattia; INFANTE, Paola. Current trends in Hedgehog signaling pathway inhibition by small molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 28, n. 19, p. 3131-3140, 2018.
- GHOSH, Ruma Dey et al. MicroRNA profiling of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features. *Scientific reports*, v. 6, p. 23932, 2016.
- GOETZ, Sarah C.; ANDERSON, Kathryn V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 5, p. 331-344, 2010.
- GONNISSEN, Annelies; ISEBAERT, Sofie; HAUSTERMANS, Karin. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget*, v. 6, n. 16, p. 13899, 2015.

GONNISSEN, Annelies et al. The hedgehog inhibitor GANT61 sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation both in vitro and in vivo. *Oncotarget*, v. 7, n. 51, p. 84286, 2016.

GRANDIS, Jennifer Rubin; SOK, John C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & therapeutics*, v. 102, n. 1, p. 37-46, 2004.

GU, Wentao et al. Identifying hedgehog signaling specific microRNAs in glioblastomas. *International journal of medical sciences*, v. 11, n. 5, p. 488, 2014.

GUAN, Ying-Jie et al. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 12, p. 4457-4466, 2011.

GUERRA M, GALLO C, MENDONÇA G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol* 51(3):227-34, 2005.

GUPTA, Kirti; SALUNKE, Pravin. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 138, n. 12, p. 1971-1981, 2012.

GUO, Xing; WANG, Xiao-Fan. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell research*, v. 19, n. 1, p. 71-88, 2009.

GUO, Lingling et al. MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. *Tumor Biology*, v. 37, n. 1, p. 115-125, 2016.

HAGA, Kenta et al. Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- β /SOX9 axis in cancer progression. *Translational oncology*, v. 14, n. 12, p. 101236, 2021.

HAN, Sung-Pil et al. SNAIL1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 31, n. 3, p. 489-496, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARTONG, Dyonne T. et al. Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nature genetics*, v. 40, n. 10, p. 1230-1234, 2008.

HE, Jing et al. Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 47, p. 35598-35602, 2006.

HE, Xin et al. MicroRNA-181c inhibits glioblastoma cell invasion, migration and mesenchymal transition by targeting TGF- β pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 469, n. 4, p. 1041-1048, 2016.

HEATH, Jack M. et al. Mechanosensitive microRNA-181b regulates aortic valve endothelial matrix degradation by targeting TIMP3. *Cardiovascular engineering and technology*, v. 9, n. 2, p. 141-150, 2018.

HELDIN, Carl-Henrik; VANLANDEWIJCK, Michael; MOUSTAKAS, Aristidis. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS letters*, v. 586, n. 14, p. 1959-1970, 2012.

HENEGHAN, Helen M.; MILLER, Nicola; KERIN, Michael J. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current opinion in pharmacology*, v. 10, n. 5, p. 543-550, 2010.

HERETSCH, Philipp; TZAGKAROULAKI, Lito; GIANNIS, Athanassios. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 49, n. 20, p. 3418-3427, 2010.

HEUBERGER, Julian; BIRCHMEIER, Walter. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 2, p. a002915, 2010.

HIROTA, Silvio K.; MIGLIARI, Dante A.; SUGAYA, Norberto N. Carcinoma epidermóide oral em paciente jovem: relato de caso e revisão da literatura. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 81, p. 251-254, 2006.

HOCH, Lucile et al. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 5, p. 1817-1829, 2015.

HUANG, Shi-Xiong et al. Upregulation of miR-181a suppresses the formation of glioblastoma stem cells by targeting the Notch2 oncogene and correlates with good prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 486, n. 4, p. 1129-1136, 2017.

I ALTABA, Ariel Ruiz; MAS, Christophe; STECCA, Barbara. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology*, v. 17, n. 9, p. 438-447, 2007.

IARC."Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwid in 2022."2022. Disponível em:<<<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>>> Acesso em: 07/08/2022.

IARC."Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwid in 2020."2020. Disponível em:<< <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf> >> Acesso em: 20/01/2021.

INCA, Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 07/06/2018.

INCA, Estimativa 2020. Disponível em:<< <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>>> Acesso em: 30/12/2020.

INCA, O que é Câncer. Disponível em: <<<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20%C3%A9%20um%20termo%20que,adjacentes%20ou%20%C3%B3rg%C3%A3os%20a%20dist%C3%A2ncia>>> Acesso em: 18/01/2021.

INCA, Câncer do Sistema Nervoso Central. Disponível em:<< <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>>> Acesso em: 18/01/2021.

INDRIERI, Alessia et al. The pervasive role of the miR-181 family in development, neurodegeneration, and cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 6, p. 2092, 2020.

- INFANTE, Paola et al. Inhibition of Hedgehog-dependent tumors and cancer stem cells by a newly identified naturally occurring chemotype. *Cell Death & Disease*, v. 7, n. 9, p. e2376-e2376, 2016.
- INMAN, Gareth J. Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumorpromoter. *Current opinion in genetics & development*, v. 21, n. 1, p. 93-99, 2011.
- IKUSHIMA, Hiroaki; MIYAZONO, Kohei. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nature reviews cancer*, v. 10, n. 6, p. 415-424, 2010.
- IORIO, Marilena V.; CROCE, Carlo M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of clinical oncology*, v. 27, n. 34, p. 5848, 2009.
- JAVELAUD, Delphine et al. TGF- β /SMAD/GLI2 signaling axis in cancer progression and metastasis. *Cancer research*, v. 71, n. 17, p. 5606-5610, 2011.
- JAVELAUD, Delphine; PIERRAT, Marie-Jeanne; MAUVIEL, Alain. Crosstalk between TGF- β and hedgehog signaling in cancer. *FEBS letters*, v. 586, n. 14, p. 2016-2025, 2012.
- JEFFRIES, Jacob et al. miRNA-223 at the crossroads of inflammation and cancer. *Cancer letters*, v. 451, p. 136-141, 2019.
- JERJES, Waseem et al. Prospective evaluation of outcome after transoral CO2 laser resection of T1/T2 oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 112, n. 2, p. 180-187, 2011.
- JI, Zhenyu et al. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 19, p. 14048-14055, 2007.
- JI, Junfang et al. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*, v. 50, n. 2, p. 472-480, 2009.
- JI, Dengbo et al. MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Molecular cancer*, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2014.
- JIN, Yuesheng et al. Frequent rearrangement of chromosomal bands 1p22 and 11q13 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 2, n. 3, p. 198-204, 1990.
- JOHANSSON, Nina et al. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of cell science*, v. 113, n. 2, p. 227-235, 2000.
- JOHNSON, Newell W.; JAYASEKARA, Prasanna; AMARASINGHE, AA Hemantha K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology 2000*, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.
- JOHNSON, Rachelle W. et al. TGF- β promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer research*, v. 71, n. 3, p. 822-831, 2011.
- JONES, Lucie E. et al. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 8, p. 2832-2845, 2004.

- KALLURI, Raghu et al. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, v. 112, n. 12, p. 1776-1784, 2003.
- KALLURI, Raghu et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
- KANAOKA, Miwa et al. Pro-fibrotic phenotype of human skin fibroblasts induced by periostin via modulating TGF- β signaling. *Journal of dermatological science*, v. 90, n. 2, p. 199-208, 2018.
- KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Current molecular medicine*, v. 9, n. 7, p. 873-886, 2009.
- KAWAMATA, Hitoshi et al. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *International journal of cancer*, v. 63, n. 4, p. 568-575, 1995.
- KENNEY, Anna Marie; ROWITCH, David H. Sonic hedgehog promotes G1 cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Molecular and cellular biology*, v. 20, n. 23, p. 9055-9067, 2000.
- KHAMMISSA, R. A. et al. Oral squamous cell carcinoma in a South African sample: Race/ethnicity, age, gender, and degree of histopathological differentiation. *Journal of cancer research and therapeutics*, v. 10, n. 4, p. 908, 2014.
- KHAN, Qalb-E.-Saleem et al. Expression of Clu and Tgfb1 during murine tooth development: effects of in-vivo transfection with anti-mi R-214. *European journal of oral sciences*, v. 121, n. 4, p. 303-312, 2013.
- KILARI, Sreenivasulu et al. Increased transforming growth factor beta (TGF- β) and pSMAD3 signaling in a murine model for contrast induced kidney injury. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- KINZLER, Kenneth W. et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, v. 236, n. 4797, p. 70-73, 1987.
- KJELLMAN, Christian et al. Expression of TGF- β isoforms, TGF- β receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *International Journal of Cancer*, v. 89, n. 3, p. 251-258, 2000.
- KOGERMAN, Priit et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature cell biology*, v. 1, n. 5, p. 312-319, 1999.
- KRISANAPRAKORNKIT, Suttichai; IAMAROON, Anak. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *International Scholarly Research Notices*, v. 2012, 2012.
- KULKARNI, Viraj; SARANATH, Dhananjaya. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology*, v. 40, n. 2, p. 145-153, 2004.
- KUMARSWAMY, R. et al. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA biology*, v. 8, n. 5, p. 706-713, 2011.
- LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.

- LAUTH, Matthias et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 20, p. 8455-8460, 2007.
- LEITE, I. C. G.; KOIFMAN, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral oncology*, v. 34, n. 5, p. 347-352, 1998.
- LEWIS, Benjamin P.; BURGE, Christopher B.; BARTEL, David P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.
- LEE, Sung Hee et al. Human papillomavirus 16 (HPV16) enhances tumor growth and cancer stemness of HPV-negative oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma cells via miR-181 regulation. *Papillomavirus research*, v. 1, p. 116-125, 2015.
- LI, Allen G. et al. Latent TGF β 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *The EMBO journal*, v. 23, n. 8, p. 1770-1781, 2004.
- LI, Xingnan et al. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene*, v. 25, n. 4, p. 609-621, 2006.
- LI, Zejuan et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 119, n. 10, p. 2314-2324, 2012.
- LI, Dengfeng et al. Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 7, n. 11, p. 7672, 2014.
- LI, Yiyi et al. miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14 Regulation of MMP-14 by miR-181a-5p. *Cancer research*, v. 75, n. 13, p. 2674-2685, 2015.
- LI, Hui et al. MicroRNA-17-5p inhibits proliferation and triggers apoptosis in non-small cell lung cancer by targeting transforming growth factor β receptor 2. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 13, n. 6, p. 2715-2722, 2017.
- LI, Yao-yin; ZHOU, Chuan-Xiang; GAO, Yan. Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- β 1 mediated by podoplanin. *Experimental cell research*, v. 369, n. 1, p. 43-53, 2018.
- LI, Liu et al. Demethylzeylasteral (T-96) inhibits triple-negative breast cancer invasion by blocking the canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 392, n. 5, p. 593-603, 2019.
- LIN, Shuibin; GREGORY, Richard I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*, v. 15, n. 6, p. 321-333, 2015.
- LIN, Yixiong et al. microRNA-489 plays an anti-metastatic role in human hepatocellular carcinoma by targeting matrix metalloproteinase-7. *Translational oncology*, v. 10, n. 2, p. 211-220, 2017.
- LIN, Yang-Hsiang. MicroRNA networks modulate oxidative stress in cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 18, p. 4497, 2019.

- LINDHOLM, Dan et al. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *The Journal of cell biology*, v. 117, n. 2, p. 395-400, 1992.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LIU, Mingguang et al. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer research*, v. 66, n. 7, p. 3593-3602, 2006.
- LIU, Xiangrong et al. β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Medical Oncology*, v. 28, n. 2, p. 608-614, 2011.
- LIU, Mo et al. miR-181a–Twist1 pathway in the chemoresistance of tongue squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 441, n. 2, p. 364-370, 2013.
- LIU, Xuehua et al. miR-30c regulates proliferation, apoptosis and differentiation via the Shh signaling pathway in P19 cells. *Experimental & molecular medicine*, v. 48, n. 7, p. e248-e248, 2016.
- LIU, HuiJuan; YE, Hui; LI, Xinzheng. Effect of microrna-138 on epithelial-Mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells by targeting semaphorin 4C. *Bioengineered*, v. 12, n. 2, p. 10117-10125, 2021.
- LO, Hui-Wen et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*, v. 67, n. 19, p. 9066-9076, 2007.
- LOUIS, D. N.; CAVENEE, W. K. Molecular biology of central nervous system tumors. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 2013-22, 1997.
- LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.
- LU, Shi-Long et al. Overexpression of transforming growth factor β 1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer research*, v. 64, n. 13, p. 4405-4410, 2004.
- LU, Shi-Long et al. Loss of transforming growth factor- β type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes & development*, v. 20, n. 10, p. 1331-1342, 2006.
- ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC, Marta et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in pancreatic cancer (PC). *Oncotarget*, v. 10, n. 3, p. 395, 2019.
- MA, Yanlei et al. The relationship between early embryo development and tumourigenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 14, n. 12, p. 2697-2701, 2010.
- MAEDA, Osamu et al. Enhancement of GLI1-transcriptional activity by β -catenin in human cancer cells. *Oncology reports*, v. 16, n. 1, p. 91-96, 2006.

- MÄKINEN, Laura K. et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-25 in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head & neck*, v. 36, n. 12, p. 1783-1788, 2014.
- MARISSETTY, Anantha et al. Mir-181 family modulates osteopontin in glioblastoma multiforme. *Cancers*, v. 12, n. 12, p. 3813, 2020.
- MASUDA, Muneyuki et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, v. 62, n. 12, p. 3351-3355, 2002.
- MASSANO, J.; REGATEIRO, F.S.; JANUÁRIO, G. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 102, p. 67-76, 2006.
- MCFADDEN, David G. et al. Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing. *Cell*, v. 156, n. 6, p. 1298-1311, 2014.
- MENG, Xianwang et al. Suppressor of fused negatively regulates β -catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 43, p. 40113-40119, 2001.
- MENG, W., XIA, Q., WU, L., CHEN, S., HE, X., ZHANG, L., & ZHOU, H. Downregulation of TGF-beta receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts. *BMC cancer*, 11(1), 1-13, 2011.
- MEULMEESTER, Erik; TEN DIJKE, Peter. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *The Journal of pathology*, v. 223, n. 2, p. 206-219, 2011.
- MIN, Anjie et al. MicroRNAs as important players and biomarkers in oral carcinogenesis. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.
- MINCIONE, Gabriella et al. Loss of expression of TGF- β 1, T β RI, and T β RII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *International journal of oncology*, v. 32, n. 2, p. 323-331, 2008.
- MOHR, Ashley M.; MOTT, Justin L. Overview of microRNA biology. In: *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, p. 003-011, 2015.
- MOUSTAKAS, Aristidis; HELDIN, Carl-Henrik. Mechanisms of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Journal of clinical medicine*, v. 5, n. 7, p. 63, 2016.
- My cancer genome, TGF- β Signaling. Disponível em: <<<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/TGF-beta-signaling>>> Acesso em: 05/03/2019.
- NADAF, Afreen et al. Analysis of the invasive edge in primary and secondary oral squamous cell carcinoma: An independent prognostic marker: A retrospective study. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, v. 20, n. 2, p. 239, 2016.
- NAGASE, Hideaki; VISSE, Robert; MURPHY, Gillian. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.
- NAGUIBNEVA, Irina et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature cell biology*, v. 8, n. 3, p. 278-284, 2006.

- NAKAYA, Yukiko et al. RhoA and microtubule dynamics control cell–basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nature cell biology*, v. 10, n. 7, p. 765-775, 2008.
- NAVEED, Ahsan et al. A concise review of MicroRNA exploring the insights of MicroRNA regulations in bacterial, viral and metabolic diseases. *Molecular biotechnology*, v. 59, n. 11, p. 518-529, 2017.
- NÉMETH, Christopher G. et al. Recurrent chromosomal and epigenetic alterations in oral squamous cell carcinoma and its putative premalignant condition oral lichen planus. *PloS one*, v. 14, n. 4, p. e0215055, 2019.
- NGUYEN, Hoang-Lan et al. MT1-MMP activation of TGF- β signaling enables intercellular activation of an epithelial-mesenchymal transition program in cancer. *Current cancer drug targets*, v. 16, n. 7, p. 618-630, 2016.
- NIU, Guilian et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, v. 21, n. 13, p. 2000-2008, 2002.
- NØRØXE, Dorte Schou; POULSEN, Hans Skovgaard; LASSEN, Ulrik. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO open*, v. 1, n. 6, 2016.
- O'CARROLL, Dónal et al. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development*, v. 21, n. 16, p. 1999-2004, 2007.
- OHTA, Sho et al. Cessation of gastrulation is mediated by suppression of epithelial-mesenchymal transition at the ventral ectodermal ridge. *Development*, v. 134, n. 24, p. 4315-4324, 2007.
- OLIVEIRA-NUNES, Maria Cecília et al. The availability of the embryonic TGF- β protein Nodal is dynamically regulated during glioblastoma multiforme tumorigenesis. *Cancer cell international*, v. 16, n. 1, p. 46, 2016.
- OPITZ, Oliver G. et al. A mouse model of human oral-esophageal cancer. *The Journal of clinical investigation*, v. 110, n. 6, p. 761-769, 2002.
- OUYANG, Yi-Bing et al. miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *Mitochondrion*, v. 12, n. 2, p. 213-219, 2012.
- PANG, Bo et al. EZH2 promotes metabolic reprogramming in glioblastomas through epigenetic repression of EAF2-HIF1 α signaling. *Oncotarget*, v. 7, n. 29, p. 45134, 2016.
- PAULUS, Werner et al. Effects of transforming growth factor- β 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 54, n. 2, p. 236-244, 1995.
- PAW, Ivy et al. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer letters*, v. 362, n. 1, p. 1-7, 2015.
- PEDERSEN, Irene; DAVID, Michael. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*, v. 43, n. 3, p. 391-394, 2008.
- PEREZ-ORDONEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R. C. K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical pathology*, v. 59, n. 5, p. 445-453, 2006.

PERRY, James R. et al. Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 11, p. 1027-1037, 2017.

PIEK, Ester; ROBERTS, Anita B. Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor- β and its signaling pathways in tumorigenesis. 2001.

POLIZIO, Ariel H. et al. Heterotrimeric G α proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 22, p. 19589-19596, 2011.

QUAN, Taihao et al. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 3, p. 658-667, 2013.

RAK, Beata et al. Post-transcriptional regulation of MMP16 and TIMP2 expression via miR-382, miR-410 and miR-200b in endometrial cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, v. 14, n. 5, p. 389-401, 2017.

RAMDASI, Sushilkumar. Normal Cell Signaling Pathways Maintains 'Stemness' in Stem Cells But Aberrant Pathways Causes Cells to Transform Into Cancer Cells—A Review. *International Journal of Healthcare Sciences*, p. 77-91, 2016.

RASOOL, Reyaz Ur et al. Differential regulation of NM23-H1 under hypoxic and serum starvation conditions in metastatic cancer cells and its implication in EMT. *European journal of cell biology*, v. 96, n. 2, p. 164-171, 2017.

RAZUMILAVA, Nataliya et al. Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology*, v. 60, n. 3, p. 599-605, 2014.

REDSHAW, Nicholas et al. TGF- β /Smad2/3 signaling directly regulates several miRNAs in mouse ES cells and early embryos. *PLoS One*, v. 8, n. 1, p. e55186, 2013.

RIDEOUT III, William M.; EGGAN, Kevin; JAENISCH, Rudolf. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1093-1098, 2001.

RIMKUS, Tadas K. et al. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothed and GLI inhibitors. *Cancers*, v. 8, n. 2, p. 22, 2016.

RIVERA, César. Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 9, p. 11884, 2015.

ROHR, Klaus B. et al. The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron*, v. 29, n. 2, p. 341-351, 2001.

RUAN, Jian et al. Tumor suppressor miR-181c attenuates proliferation, invasion, and self-renewal abilities in glioblastoma. *Neuroreport*, v. 26, n. 2, p. 66-73, 2015.

RUFF, Michael W.; UHM, Joon H.; BENARROCH, Eduardo E. Neuro-oncology: Implications of the molecular era. *Neurology*, v. 92, n. 12, p. 568-574, 2019.

ROBBINS, David J.; FEI, Dennis Liang; RIOBO, Natalia A. The Hedgehog signal transduction network. *Science signaling*, v. 5, n. 246, p. re6-re6, 2012.

SAITO, Daishi et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial–mesenchymal transition and integrin α 3 β 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell

- carcinoma cells through Slug. *The Journal of Biochemistry*, v. 153, n. 3, p. 303-315, 2013.
- SALIHU, Sami et al. Analysis of potential oral cleft risk factors in the Kosovo population. *International surgery*, v. 99, n. 2, p. 161-165, 2014.
- SAMUELS, V. et al. Immunocytochemical study of transforming growth factor expression in benign and malignant gliomas. *The American journal of pathology*, v. 134, n. 4, p. 894, 1989.
- SARANATH, D. et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *British journal of cancer*, v. 63, n. 4, p. 573-578, 1991.
- SASAHIRA, Tomonori et al. Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, v. 9, n. 3, p. e92534, 2014.
- SASAKI, Hiroshi et al. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, v. 126, n. 17, p. 3915-3924, 1999.
- SASSEN, Stefanie; MISKA, Eric A.; CALDAS, Carlos. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*, v. 452, n. 1, p. 1-10, 2008.
- SAYED, Danish; ABDELLATIF, Maha. MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews*, v. 91, n. 3, p. 827-887, 2011.
- SCHNIDAR, Harald et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer research*, v. 69, n. 4, p. 1284-1292, 2009.
- SCULLY, Crispian; PORTER, Stephen. Oral cancer. *Bmj*, v. 321, n. 7253, p. 97-100, 2000.
- SHAH, Jatin P.; LYDIATT, William. Treatment of cancer of the head and neck. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 45, n. 6, p. 352-368, 1995.
- SHAUKAT, Z. et al. Chromosomal instability causes sensitivity to metabolic stress. *Oncogene*, v. 34, n. 31, p. 4044-4055, 2015.
- SHAW, Richard J. et al. Promoter methylation of P16, RAR β , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *British journal of cancer*, v. 94, n. 4, p. 561-568, 2006.
- SHELTZER, Jason M. A transcriptional and metabolic signature of primary aneuploidy is present in chromosomally unstable cancer cells and informs clinical prognosis. *Cancer research*, v. 73, n. 21, p. 6401-6412, 2013.
- SHI, Lei et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain research*, v. 1236, p. 185-193, 2008.
- SHIN, Ki-Hyuk et al. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 404, n. 4, p. 896-902, 2011.
- SHRIDHAR, Krithiga et al. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. *Oral oncology*, v. 53, p. 1-9, 2016.

SILVERMAN JR, Sol; GORSKY, Meir. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data—1973 to 1985. *The Journal of the American Dental Association*, v. 120, n. 5, p. 495-499, 1990.

SIVADAS, Vadakke Peringode et al. Novel mutations and expression alterations in SMAD3/TGFBR2 genes in oral carcinoma correlate with poor prognosis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 52, n. 11, p. 1042-1052, 2013.

SIVADAS, V. P. et al. Prognostic implication of the loss of TGFBR2 expression in oral carcinoma. *Neoplasma*, v. 62, n. 3, p. 398-404, 2015.

SLABY, O. et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma*, v. 57, n. 3, p. 264, 2010.

SPENDER, L. C. et al. TGF- β induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-X L. *Cell Death & Differentiation*, v. 16, n. 4, p. 593-602, 2009.

SPENDER, Lindsay C. et al. Transforming growth factor- β directly induces p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) during the rapid induction of apoptosis in myc-driven B-cell lymphomas. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 7, p. 5198-5209, 2013.

STILES, Jeffrey D. et al. Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor β 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 56, n. 4, p. 435-439, 1997.

SUAREZ-CUERVO, Catalina et al. Breast cancer cells with inhibition of p38 α have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clinical & experimental metastasis*, v. 21, n. 6, p. 525, 2004.

SUN, Lanying et al. Micro RNA-137 suppresses tongue squamous carcinoma cell proliferation, migration and invasion. *Cell proliferation*, v. 49, n. 5, p. 628-635, 2016.

SZCZEPNY, Anette et al. The role of canonical and non-canonical Hedgehog signaling in tumor progression in a mouse model of small cell lung cancer. *Oncogene*, v. 36, n. 39, p. 5544-5550, 2017.

TAKABATAKE, Kiyofumi et al. The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 22, p. 5779, 2019.

TAKAHARA, Toshikazu et al. SIPA1 promotes invasion and migration in human oral squamous cell carcinoma by ITGB1 and MMP7. *Experimental cell research*, v. 352, n. 2, p. 357-363, 2017.

TAKAHASHI, Kazuki et al. Targeting all transforming growth factor- β isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 36, p. 12559-12572, 2020.

TAMIMI, Ahmad Faleh; JUWEID, Malik. Epidemiology and outcome of glioblastoma. *Exon Publications*, p. 143-153, 2017.

TARGETSCAN HUMAN. Disponível em: <<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-181a-2-3p>> Acesso em: 04/02/2021.

- TAYLOR, Michael D. et al. Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling. *Oncogene*, v. 23, n. 26, p. 4577-4583, 2004.
- TAYLOR, Molly A. et al. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*, v. 123, n. 1, p. 150-163, 2013.
- TEGLUND, Stephan; TOFTGÅRD, Rune. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1805, n. 2, p. 181-208, 2010.
- TIAN, Fang et al. Smad-binding defective mutant of transforming growth factor β type I receptor enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer research*, v. 64, n. 13, p. 4523-4530, 2004.
- TIAN, Maozhen; NEIL, Jason R.; SCHIEMANN, William P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cellular signalling*, v. 23, n. 6, p. 951-962, 2011.
- VAD-NIELSEN, Johan et al. Cause-and-Effect relationship between FGFR1 expression and epithelial-mesenchymal transition in EGFR-mutated non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, v. 132, p. 132-140, 2019.
- VON HOFF, Daniel D. et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 12, p. 1164-1172, 2009.
- WAN, Yi et al. Expression of miR-125b in the new, highly invasive glioma stem cell and progenitor cell line SU3. *Chinese journal of cancer*, v. 31, n. 4, p. 207, 2012.
- WANG, Bo et al. TGF β -mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, v. 29, n. 12, p. 1787-1797, 2010.
- WANG, X. et al. Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene*, v. 31, n. 2, p. 187-199, 2012.
- WANG, Yi-Fen et al. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*, v. 34, n. 11, p. 1556-1561, 2012.
- WANG, Fei et al. MicroRNA-181 inhibits glioma cell proliferation by targeting cyclin B1. *Molecular medicine reports*, v. 10, n. 4, p. 2160-2164, 2014.
- WANG, Hongjun et al. Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.
- WANG, Ligang et al. Kaiso (ZBTB33) downregulation by mirna-181a inhibits cell proliferation, invasion, and the epithelial-mesenchymal transition in glioma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 3, p. 947-958, 2018.
- WANG, Hongbin et al. MicroRNA-181d-5p-containing exosomes derived from CAFs promote EMT by regulating CDX2/HOXA5 in breast cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, v. 19, p. 654-667, 2020.
- WARNER, Dennis R. et al. Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 324, n. 1, p. 70-76, 2004.
- WARNAKULASURIYA, S.; KERR, A. R. Oral cancer screening: Past, present, and future. *Journal of dental research*, v. 100, n. 12, p. 1313-1320, 2021.

- WELLER, Michael et al. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *The lancet oncology*, v. 14, n. 9, p. e370-e379, 2013.
- WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.
- WICK, Wolfgang et al. Lomustine and bevacizumab in progressive glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 20, p. 1954-1963, 2017.
- WICKING, Carol; MCGLINN, Edwina. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer letters*, v. 173, n. 1, p. 1-7, 2001.
- WINTER, Julia; DIEDERICHS, Sven. MicroRNA biogenesis and cancer. *MicroRNA and Cancer*, p. 3-22, 2011.
- WOEHRER, Adelheid; BAUCHET, Luc; BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Current opinion in neurology*, v. 27, n. 6, p. 666-674, 2014.
- WONG, Thian-Sze et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 9, p. 2588-2592, 2008.
- YAMAMOTO, Hiroyuki et al. Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research*, v. 59, n. 14, p. 3313-3316, 1999.
- YANG, Yongmei et al. Involvement of microRNAs-MMPs-E-cadherin in the migration and invasion of gastric cancer cells infected with *Helicobacter pylori*. *Experimental cell research*, v. 367, n. 2, p. 196-204, 2018.
- YAN, Hai et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England journal of medicine*, v. 360, n. 8, p. 765-773, 2009.
- YANAI, Kosuke et al. Crosstalk of hedgehog and Wnt pathways in gastric cancer. *Cancer letters*, v. 263, n. 1, p. 145-156, 2008.
- YANG, Cheng-Chieh et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 40, n. 5, p. 397-404, 2011.
- YANG, Cheng-Chieh et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 40, n. 5, p. 397-404, 2011.
- YANG, Chunzhang et al. Regulation and dysregulation of astrocyte activation and implications in tumor formation. *Cellular and molecular life sciences*, v. 70, n. 22, p. 4201-4211, 2013.
- YANG, Liu et al. Role of the microRNA 181 family in glioma development. *Molecular medicine reports*, v. 17, n. 1, p. 322-329, 2018.
- YANG, Chengliang et al. miR-135a Inhibits the Invasion and Migration of Esophageal Cancer Stem Cells through the Hedgehog Signaling Pathway by Targeting Smo. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, v. 19, p. 841-852, 2020.

- YAO, Lijuan et al. MiR181c inhibits ovarian cancer metastasis and progression by targeting PRKCD expression. *International journal of clinical and experimental medicine*, v. 8, n. 9, p. 15198, 2015.
- YAO, Wang et al. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *Journal of cellular physiology*, v. 233, n. 9, p. 6807-6821, 2018.
- YOO, Je-Ok et al. miR-181b-3p promotes epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells through Snail stabilization by directly targeting YWHAG. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 7, p. 1601-1611, 2016.
- YU, Bing; LIU, Xuezhong; CHANG, Hong. MicroRNA-143 inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting MMP7. *Minerva medica*, v. 108, n. 1, p. 13-19, 2016.
- YUE, Chia-Herng et al. Cetyltrimethylammonium Bromide Disrupts Mesenchymal Characteristics of Human Tongue Squamous Cell Carcinoma SCC4 Cells Through Modulating Canonical TGF- β /Smad/miR-181b/TIMP3 Signaling Pathway. *Anticancer Research*, v. 41, n. 12, p. 6095-6104, 2021.
- ZENG, Ye et al. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- β autocrine loop. *Oncotarget*, v. 7, n. 39, p. 63324, 2016.
- ZHANG, Baohong et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2007.
- ZHANG, Wei et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro-oncology*, v. 14, n. 6, p. 712-719, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Multiple receptor tyrosine kinases converge on microRNA-134 to control KRAS, STAT5B, and glioblastoma. *Cell Death & Differentiation*, v. 21, n. 5, p. 720-734, 2014.
- ZHANG, Wen-Long; ZHANG, Jian-Hua. miR-181c promotes proliferation via suppressing PTEN expression in inflammatory breast cancer. *International journal of oncology*, v. 46, n. 5, p. 2011-2020, 2015.
- ZHANG, Jingyu; TIAN, Xiao-Jun; XING, Jianhua. Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- β , SHH, and WNT and their crosstalks. *Journal of clinical medicine*, v. 5, n. 4, p. 41, 2016.
- ZHANG, Lian; LU, Qianjin; CHANG, Christopher. Epigenetics in health and disease. *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity*, p. 3-55, 2020.
- ZHAO, Lun-De et al. Epigenetic silencing of miR-181b contributes to tumorigenicity in colorectal cancer by targeting RASSF1A. *International journal of oncology*, v. 48, n. 5, p. 1977-1984, 2016.
- ZHAO et al, miR-17-5p-5p promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human osteosarcoma cells by targeting SRC kinase signaling inhibitor 1, 2018.
- ZHAO, Dan; CUI, Zhe. MicroRNA-361-3p regulates retinoblastoma cell proliferation and stemness by targeting hedgehog signaling. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 17, n. 2, p. 1154-1162, 2019.

ZHIPING, C. et al. MiR-181a promotes epithelial to mesenchymal transition of prostate cancer cells by targeting TGIF2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 21, n. 21, p. 4835-43, 2017.

ZHOU, Qi et al. Smad2/3/4 pathway contributes to TGF- β -induced miRNA-181b expression to promote gastric cancer metastasis by targeting Timp3. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 39, n. 2, p. 453-466, 2016.

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Cláudia Maria Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59423416.2.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.753.202

Apresentação do Projeto:

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

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.753.202

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

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

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2572-7733 Fax: (21)2572-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.753.202

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

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

Cordialmente,

CEP/Unigranrio

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
 Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-302
 UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
 Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.753.202

Básicas do Projeto	ETO_569296.pdf	22:42:37		Aceito
Outros	Ficha_clinica.pdf	29/08/2016 22:41:45	Claudia Maria Pereira	Aceito
Cronograma	CRONOLOGIA_mgmt.pdf	29/08/2016 22:39:59	Claudia Maria Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_MGMT.pdf	11/08/2016 20:50:56	Claudia Maria Pereira	Aceito
Outros	usoinagem_MGMT009.pdf	11/08/2016 19:45:34	Claudia Maria Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1_MGMT011.pdf	11/08/2016 19:44:41	Claudia Maria Pereira	Aceito
Outros	risco_confidencial_MGMT008.pdf	11/08/2016 19:43:42	Claudia Maria Pereira	Aceito
Orçamento	orcamento_MGMT010.pdf	11/08/2016 19:41:16	Claudia Maria Pereira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_MGMT007.pdf	11/08/2016 19:41:02	Claudia Maria Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_MGMT006.pdf	11/08/2016 19:37:18	Claudia Maria Pereira	Aceito

Situação do

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 29 de Setembro de 2016

Assinado por:

Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2572-7733 Fax: (21)2572-7733 E-mail: cnp@unigranrio.com.br

ANEXO II



Ficha de Atividades Clínicas Data: ___/___/___

Nome do aluno examinador: _____ Matrícula: _____

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome do paciente: _____

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

Pai: _____ Mãe: _____

CPF: _____ RG: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Estado Civil: _____ Religião do paciente: _____

Profissão: _____ Ocupação: _____

Endereço: _____

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

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

INFORMAÇÕES PESSOAIS DO PACIENTE**2. MORADIA/FAMÍLIA/RENDA/ATENDIMENTO MÉDICO:**

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

3. HÁBITOS E VÍCIOS:

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

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

4. DIETA

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

5. HÁBITOS DE HIGIENE/MOTIVAÇÃO:

- Quantas vezes escova os dentes ao dia? _____ vezes. Quando? _____
Quanto tempo dura em média uma escova de dentes para o seu uso? _____
O que o leva a trocar sua escova de dentes? _____
- Como você escolhe sua pasta de dentes? () pela marca () pelo sabor () por apresentar flúor () pelo preço () por indicação do seu dentista
- Já lhe ensinaram a escovar os dentes? () não () sim. Quem? _____
Com que idade? _____ anos.
- Faz uso de fio dental? () não () sim. Com que frequência? _____
- Faz uso de bochechos? () não () sim. Por quê? _____
Qual? _____ Com que frequência? _____

6. PREFERÊNCIAS E PRÁTICAS SEXUAIS:

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

7. CIRURGIAS/TRANSFUSÕES DE SANGUE:

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

8. EXCLUSIVO PARA MULHERES:

- Estupro: () não () sim. Quando? _____ anos. Número de vezes? _____. Por quem?
-
- Menstruação: Idade da 1º vez _____ anos. Data da última: ____/____/_____
 - Tempo de permanência do fluxo _____. Tempo médio do ciclo _____.
 - Gravidez: () sim () não. Quantas? _____.
 - Partos: Normais: _____. Cesarianas: _____. Abortos: () sim () não. Quantos? _____. () espontâneo (s) () provocado (s).
 - Quando fez o último exame preventivo? _____.
 - Faz ou fez uso de alendronato para osteoporose? () não () sim
-

ROTEIRO A SER SEGUIDO PARA REALIZAÇÃO DO EXAME CLÍNICO**9. QUEIXA PRINCIPAL:**

10. HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL:

11. HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA:

12. HISTÓRIA FAMILIAR:

13. EXAME FÍSIO

• **13.1 – SINAIS VITAIS:**

Pressão arterial: Sistólica _____ mm Hg. Diastólica _____ mm Hg.

Pulso: Quantidade: _____. Qualidade: _____

Temperatura corporal: _____.

Frequência respiratória: _____.

– INSPEÇÃO GERAL DO PACIENTE/ECTOSCOPIA:

– INPEÇÃO LOCO-REGIONAL:

– EXAME DA ARTICULAÇÃO TEMPORO-MANDIBULAR: _____

B – DENTES:

UTILIZANDO AS SIGLAS ABAIXO DURANTE O EXAME, ANOTE AO LADO DO NÚMERO DE CADA DENTE AS OBSERVAÇÕES CLÍNICAS:

AMG	Amálgama (faces)	NF	Núcleo Fundido
AU	Ausente	NU	Núcleo de Preenchimento
C	Cáries (faces)	RE	Restauração Estética (faces)
CP	Coroa Provisória	RMF	Restauração Metálica Fundida
EI	Extração Indicada	RP	Restauração Provisória
HIG	Dente Hígido	RR	Resto Radicular
MBA	Mancha Branca Ativa (faces)	SB	Selamento biológico
MBI	Mancha Branca Inativa (faces)	SE	Selante
CT	Coroa total	HIP	Hipoplasia do esmalte

PARA AS FACES DOS DENTES CONSIDERE:

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

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

EXAME DENTÁRIO – DATA: _____ / _____ / _____

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

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

ESTOMATOLOGIAProfissional Examinador: _____ Data: _____

1. Queixa principal:

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

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

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

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

6. Pressão arterial:

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

7. Diagnóstico clínico provável:

8. Diagnóstico diferencial:

9. Plano de tratamento:

Anexo III



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Análise do perfil de expressão de MGMT e da família miR-181 no câncer oral”. Você foi selecionado durante o exame clínico nas clínicas de Estomatologia e Periodontia da UNIGRANRIO e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

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

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

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

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO:

cep@unigranrio.com.br

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal