

JOÃO ARTUR RICIERI BRITO

Associação entre nível de expressão de microRNAs e aspectos
histopatológicos de displasia em leucoplasia bucal

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2013

JOÃO ARTUR RICIERI BRITO

**Associação entre nível de expressão de microRNAs e aspectos
histopatológicos de displasia em leucoplasia bucal**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Odontologia – área de concentração
em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Santiago Gomez

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFMG

BELO HORIZONTE

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.
Em especial, meus pais, **João Luiz e Laura Alice** por sempre acreditar, investir e torcer pela minha vitória. À minha avó **Jandira**, por sempre valorizar, e ao meu avô **João Ricieri** que sempre desejou me ver doutor – onde estiver, receba este título.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Ricardo Santiago Gomez**, pelo ensinamento de todos esses anos, pelo profissionalismo demonstrado sempre, pelo exemplo de ética e dedicação.

À amiga e **Profa. Carolina Cavaliéri Gomes**, pelos anos de amizade e ensinamentos no laboratório e fora dele. Obrigado pelo incentivo e por sempre acreditar em mim.

Ao **Prof. José Eustáquio** pelas sabias palavras, incentivo e valorização constante.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de doutorado. À **CAPES**, coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa sanduiche (estágio de doutorado no exterior) na University of Michigan - USA.

Aos professores da área de Patologia Bucal e Estomatologia da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais – **Profs. Drs. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo, Maria Cássia Ferreira Aguiar, Ricardo Alves de Mesquita, Ricardo Santiago Gomez e Tarcília Aparecida da Silva**.

Aos funcionários e amigos da área de Patologia – **Heloísa Magalhães Visana, Maria Inês do Nascimento Ferreira e Daniele Ramalho**.

Aos meus queridos amigos de trabalho – **Kelma, Vanessa, Renata, Marina, Fabrício Amaral, Ana Carolina Neto e Paula Rocha** – pelos anos de convivência inenarráveis, amizade incomparável e apoio incondicional.

Aos amigos do Doutorado, Mestrado e Iniciação Científica – **Fabrício Tinoco, Gefter Thiago Batista Correa, Thiago Fonseca, Frederico Netto, Silvia Ferreira, Ivana Diniz, Alfonso Gala Garcia, Lucyana Farias, Florença Stefani, Fabiano Cardoso, Cláudia Maria, Elizete Maria, Telma Arão, Giovanna Souto, Patrícia Caldeira, Lissur, Flávia Mendes** – obrigada pela força, amizade, momentos de sorrisos e boas gargalhadas durante e após as aulas e os experimentos laboratoriais!

À banca de qualificação – **Dra. Vanessa Fátima Bernardes e Dra. Paolla de Freitas Perdigão**, pelas valiosas sugestões feitas a este trabalho com o objetivo de engrandecê-lo.

Aos meus amigos da *University of Michigan* – **Luciana Kauer Rosselli-Murai, Marcelo Rosselli-Murai, Chiara Zagni e Fernanda Giudice** – pelo apoio e amizade nesse momento tão marcante.

A todos meus amigos que sempre valorizaram e respeitaram meus momentos de ausência, em especial **Luciano Rodrigues Pereira de Oliveira, Fernanda Silva Chaves, Ellen Vieira Pereira, Fabrício Pinho Madureira, Monique Giorni e Victória Medeiros** por estarem sempre presentes transmitindo força e demonstrando orgulho e admiração.

A minha família pelo apoio incondicional e por sempre acreditar. Meus irmãos **Emmerson e Eric**, por nunca duvidar, irmã **Adriane**, pela valorização e incentivo, cunhadas **Gisély** pelo exemplo de força e determinação e **Rossana**, por acreditar e torcer sempre. Minhas sobrinhas **Isabela**, pela valorização e admiração, **Giulia** pelo exemplo de força e olhar contagiante, **Alice** e sobrinho **Nicolas** pelos momentos de descontração.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

EPÍGRAFE

“A grandeza não consiste em receber
honras, mas em merecê-las” Aristóteles

RESUMO

A leucoplasia bucal (LB) é a principal lesão cancerizável da boca. O diagnóstico deve ser confirmado pelos achados histológicos, para excluir qualquer outra alteração da mucosa bucal e verificar sinais de malignidade, além da gradação da displasia epitelial. microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas com função importante no processo de expressão gênica. Aumento da expressão de microRNAs (miRNAs) - miR-21, miR-345 e miR-181b - tem sido demonstrado em LB que evoluíram para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Este achado sugere um potencial valor prognóstico para os miRNAs. Com base nesses resultados, este estudo objetiva-se investigar a associação dos níveis de expressão desses 3 miRNAs com as características citológicas e histopatológicas que são usados para determinar o grau de displasia bucal. Além disso, comparar os níveis de expressão destes miRNAs em LB, mucosa bucal normal e CCEB. A expressão dos miRNAs foi avaliada por qPCR em 22 amostras de LB com diferentes graus de displasia, 17 casos de CCEB e 6 amostras de mucosa bucal normal. Casos de CCEB mostraram aumento da expressão de todas as três miRNAs quando comparado com LB e mucosa bucal normal. O aumento da expressão de miR-21 foi também observada em LB, quando comparado com a mucosa bucal normal. Encontramos uma maior expressão de miR-21 e miR-181b em LB que apresentou um maior número de figuras de mitose, aumento na proporção núcleo-citoplasma, ou hipercromasia. O aumento da expressão de miR-21 foi também detectada em LB com a mitose anormal superficial. Maior expressão de miR-345 foi observada em LB com um

aumento do número e tamanho dos nucléolos ou com proporção núcleo-citoplasma aumentada. Em conclusão, o presente estudo mostrou que alguns parâmetros citológicos e histopatológicos utilizados para gradação da displasia estão associadas com a expressão alterada de miRNA.

ABSTRACT

Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia

Increased expression of microRNAs (miRNAs), miR-21, miR-345, and miR-181b, has been demonstrated in oral leukoplakia (OL) that progresses to oral squamous cell carcinoma (OSCC), suggesting a miRNA signature with potential prognostic value. On the basis of these findings, this pilot study aimed to investigate the cytological and histopathological features that are used to grade oral dysplasia and determine associations with the expression of these 3 potentially cancer-related miRNAs. We also compared the expression levels of these miRNAs in OL with normal oral mucosa and OSCC. We evaluated miRNA expression by qPCR in 22 samples of OL demonstrating different grades of dysplasia, as well as 17 cases of OSCC, and 6 samples of normal oral mucosa. We associated the miRNAs expression profiles with cytological and histopathological features of OL. OSCC cases showed increased expression of all 3 miRNAs when compared with OL and normal oral mucosa. Increased expression of miR-21 was also observed in OL when compared with normal oral mucosa. We found a higher expression of miR-21 and miR-181b in OL that presented with an increased number of mitotic figures, increased nuclear-cytoplasmic ratio, or hyperchromasia. Increased expression of miR-21 was also detected in OL with abnormally superficial mitosis. Higher expression of miR-345 was observed in OL with an increased number and size of nucleoli or increased nuclear-cytoplasmic ratio. In conclusion, the present study shows that some cytological and

histopathological parameters used to grade dysplasia are associated with altered miRNA expression.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios morfológicos para gradação de displasia epitelial	19
Tabela 2: miRNAs com expressão aumentada e diminuída em leucoplasia bucal	25
Tabela 3: miRNAs com expressão aumentada e diminuída no CCEB e no CCE de cabeça e pescoço	26
Tabela 4: Critérios morfológicos para gradação de displasia epitelial	36
Tabela 5: Critérios de gradação histológica de displasia epitelial para leucoplasia	36
Tabela 6: Níveis de expressão dos miRNAs	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biogênese do microRNA	21
Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de transcrição reversa do miRNA utilizando o kit TaqMan MicroRNA RT – Applied Biosystem e interação da sonda e <i>primers</i> (TaqMan TM MicroRNA Assay)	33
Figura 3: Expressão do miR-21 em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas de boca	38
Figura 4: Expressão do miR-21 e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal	39
Figura 5: Expressão do miR-181b em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas de boca	40
Figura 6: Expressão do miR-181b e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal	41
Figura 7: Expressão do miR-345 em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas de boca.	42
Figura 8: Expressão do miR-345 e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal	42
Figura 9: Expressão dos miRNAs (miR-21, miR-181b e miR-345) e sítios de acometimento da leucoplasia bucal. Alto risco (palato mole, língua e soalho) e baixo risco (mucosa jugal, rebordo alveolar e palato duro)	43

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

∞: infinito;

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar (DNA complementar);

Ct: threshold cycle;

DEPC: pirocarbonato de dietila;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DNAse: desoxirribonuclease;

g: gravidade;

mg: miligramas;

MgCl₂: cloreto de magnésio;

ml: mililitros;

mM: milimolar;

mmol: milimol

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro;

n: número de casos;

ng: nanograma;

nm: nanômetro;

pb: pares de base;

PCR: reação em cadeia da polimerase;

qPCR: PCR quantitativo;

pH: potencial de hidrogênio;

pmol: picomol;

RNA: ácido ribonucleico;

RNAse: ribonuclease;

rpm: rotações por minuto;

TA: temperatura ambiente;

Taq: *Thermus aquaticus*;

TRIS HCl: hidroximetil amino metano cloreto de hidrogênio;

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;

µm: micrômetro;

µM: micromolar;

µg: micrograma;

µl: microlitro;

TPM1: *tropomyosin 1*;

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*;

LB: Leucoplasia Bucal

CCEB: Carcinoma de células escamosas de boca

ns: não significativo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
Leucoplasia Bucal	18
microRNA	20
microRNA e Câncer	22
microRNA e Leucoplasia Bucal	26
OBJETIVOS	28
Objetivo geral	28
Objetivos específicos	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
Desenho do Estudo e Aspectos Éticos	29
Pacientes e Amostras	29
Extração de RNA/microRNA	30
Transcrição Reversa	32
Escolha do microRNA endógeno e teste de eficiência de reação	33
Quantificação por PCR em tempo Real - qPCR	34
Gradação histológica e análise morfológica	35
Análise Estatística	37
RESULTADOS	38
Expressão do miR-21	38
Expressão do miR-181b	40
Expressão do miR-345	41
Expressão dos miRNAs versus localização	43

Informações sobre a evolução dos pacientes	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	58
Anexo A – Artigo	58
Anexo B – Atividades desenvolvidas durante o doutorado	74
Anexo C – Produção científica durante o doutorado	77
Anexo D – Parecer do comitê de ética	82
Anexo E – Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TLCE)	83

INTRODUÇÃO

A leucoplasia bucal (LB) é a principal lesão cancerizável da boca sendo predominantemente caracterizada por uma placa branca não destacável. Acredita-se que a etiologia da LB esteja relacionada com reações inespecíficas do epitélio, em resposta a fatores endógenos e exógenos, porém a exata influência desses fatores não está bem estabelecida (6).

O diagnóstico inicial da LB é feito quando uma lesão branca é clinicamente detectada e não pode ser diagnosticada como qualquer outra lesão de placa branca que possa acometer a cavidade bucal. (1,2). O diagnóstico deve ser confirmado pelos achados histológicos, para excluir qualquer outra alteração da mucosa bucal e verificar sinais de malignidade, além da gradação de displasia epitelial.

Embora essa gradação seja firmada em critérios histológicos até certo ponto subjetivos (10,11) e sujeita a variações intra e interexaminadores (2), o grau de displasia epitelial da LB pode ser considerado hoje como o indicador mais importante do potencial de transformação maligna da lesão, podendo interferir diretamente na conduta clínica do caso (1,6,12). Entretanto, o significado biológico de cada alteração morfológica ainda é desconhecido.

Observa-se que LBs com graus semelhantes de displasia podem ter cursos clínicos diferentes. Assim sendo, é necessário descobrir marcadores que reflitam o comportamento biológico das lesões, a fim de identificar características preditivas de transformação maligna, que contribuam para uma melhor abordagem dessas lesões e permitam sua melhor gradação. Um

estudo recente demonstrou a correlação entre um aumento da expressão de miRNAs — destacando-se entre eles o miR-21, miR-181b e miR-345 — em casos de LBs que progrediram para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) (13). Dessa forma, diversos biomarcadores relevantes são investigados (13,14), uma vez que a expressão e função aberrantes de moléculas são resultados dos múltiplos eventos genéticos e epigenéticos que ocorrem no processo de tumorigênese (14).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos miRNAs miR-21, miR-181b e miR-345 em LBs com diferentes graus de displasia e relacionar essa expressão com cada achado morfológico utilizado para essa gradação.

REVISÃO DA LITERATURA

Leucoplasia Bucal

Clinicamente, as LBs homogêneas aparecem como uma placa levemente elevada, fina, de coloração branco-acinzentada, uniforme, podendo apresentar bordas bem definidas ou que se fundem gradualmente à mucosa normal adjacente. Já as lesões não homogêneas podem ser nodulares, verrucosas ou eritroplásicas (1,6). A apresentação histológica de uma LB pode variar de lesões levemente hiperkeratóticas a lesões com acentuado grau de displasia (2).

O diagnóstico de LB deve ser confirmado com uma avaliação dos achados histológicos e baseado na gradação de displasia. Várias tentativas de se definir o melhor critério para graduar a displasia epitelial em LB têm sido exploradas. Inicialmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) (7) delimitou critérios histopatológicos para melhor caracterizar a displasia em LBs, levantando alterações histológicas importantes, que podem contribuir para um diagnóstico mais preciso.

Essas alterações foram inicialmente divididas em dois grupos: o primeiro, em que os achados histológicos estão relacionados com distúrbios na proliferação celular (perda de polaridade da camada basal, presença de mais de uma camada de células com aparência basalóide, projeções em forma de gota, aumento na proporção núcleo-citoplasma, hiperchromasia nuclear, nucléolos aumentados, aumento no número de figuras de mitoses, mitoses anormais e presença de mitoses superficiais) e um segundo grupo,

daquelas envolvidas com distúrbios na maturação epitelial (pleomorfismo nuclear e celular, alteração na estratificação do epitélio, perda de aderência intercelular e presença de pérolas de queratina) (8).

Posteriormente, um novo sistema de classificação foi proposto pela OMS (9), enfatizando que a displasia deve ter seu diagnóstico definido pela presença de características histológicas e citológicas específicas, podendo ser graduada em leve, moderada e intensa (2,6).

Em geral, a displasia leve é caracterizada por uma alteração arquitetural limitada no terço inferior do revestimento epitelial, acompanhada por uma atipia citológica mínima. A displasia moderada estende-se para o terço médio do epitélio, apresentando um grau maior de atipia citológica. A displasia severa acomete dois terços do epitélio, mostrando uma considerável alteração arquitetural associada a uma grande atipia citológica (2,4). As alterações utilizadas para essa gradação estão compiladas na Tabela 1.

Tabela 1: Critérios morfocitológicos para gradação de displasia epitelial (9)

Alterações da arquitetura	Alterações citológicas
Perda de polaridade da camada basal	Alteração do tamanho nuclear e celular
Projeções epiteliais em forma de gota	Pleomorfismo nuclear e celular
Aumento do número de mitoses	Aumento da proporção núcleo / citoplasma
Mitoses superficiais anormais	Núcleos aumentados de tamanho
Ceratinização celular prematura	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos numerosos e aumentados
	Hipercromasia

O risco de transformação maligna varia de 3,6 a 36%, sendo que fatores como presença e grau de displasia, gênero feminino, tempo de duração, tabagismo, localização em língua e soalho bucal, tamanho e apresentação clínica não homogênea parecem estar associados a pior prognóstico. (1-5)

MicroRNA

Os miRNAs foram descobertos primeiramente em *Caenorhabditis elegans* (15) e, depois, em organismos multicelulares, tendo papel crucial na regulação do desenvolvimento de plantas e animais (16-22,31).

O miRNA faz parte de uma grande família de pequenos RNAs que não codificam proteínas, com aproximadamente 22 nucleotídeos. Sua ação consiste em mediar a expressão do gene na fase pós-transcricional, por degradação ou inibição do RNA mensageiro (mRNA), pelo pareamento parcial ou total de bases em sítios complementares, predominantemente, na região não traduzida 3' (3' UTR) do mRNA (23-25). Aproximadamente 50% de todos miRNAs estão encaixados dentro dos íntrons de genes que codificam proteínas ou RNAs transcritos que não codificam proteínas. Os miRNAs estão mapeados em regiões genômicas específicas, e os seus genes de origem localizam-se em regiões intergênicas, íntrons de outros genes, ou até mesmo éxons, podendo algumas vezes um transcrito codificar mais de um miRNA. Isso sugere que um grande número de miRNAs pode estar associado à expressão dos seus genes de origem (26). Estudos

mostram que os miRNAs possuem a capacidade de regular de 20 a 30% de todos os genes humanos (18-22,27).

Os miRNAs são transcritos inicialmente pelo RNA polimerase II, formando o miRNA primário (pri-miRNA), que contém várias bases em seu comprimento. Esses RNAs são tamponados e subsequentemente clivados no núcleo pela enzima RNase III endonuclease (Drosha), que libera um miRNA precursor de 60-75 nucleotídeos (pre-miRNA) (Figura 1) (20,28-30).

O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportin-5 e é processado pela enzima Dicer (RNase III), resultando em um miRNA maduro, de 10-24 nucleotídeos. O miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC e levado à região alvo do RNA mensageiro (mRNA), quando então se mostra apto para o desempenho das suas funções (Figura 1) (23,26,29,30).

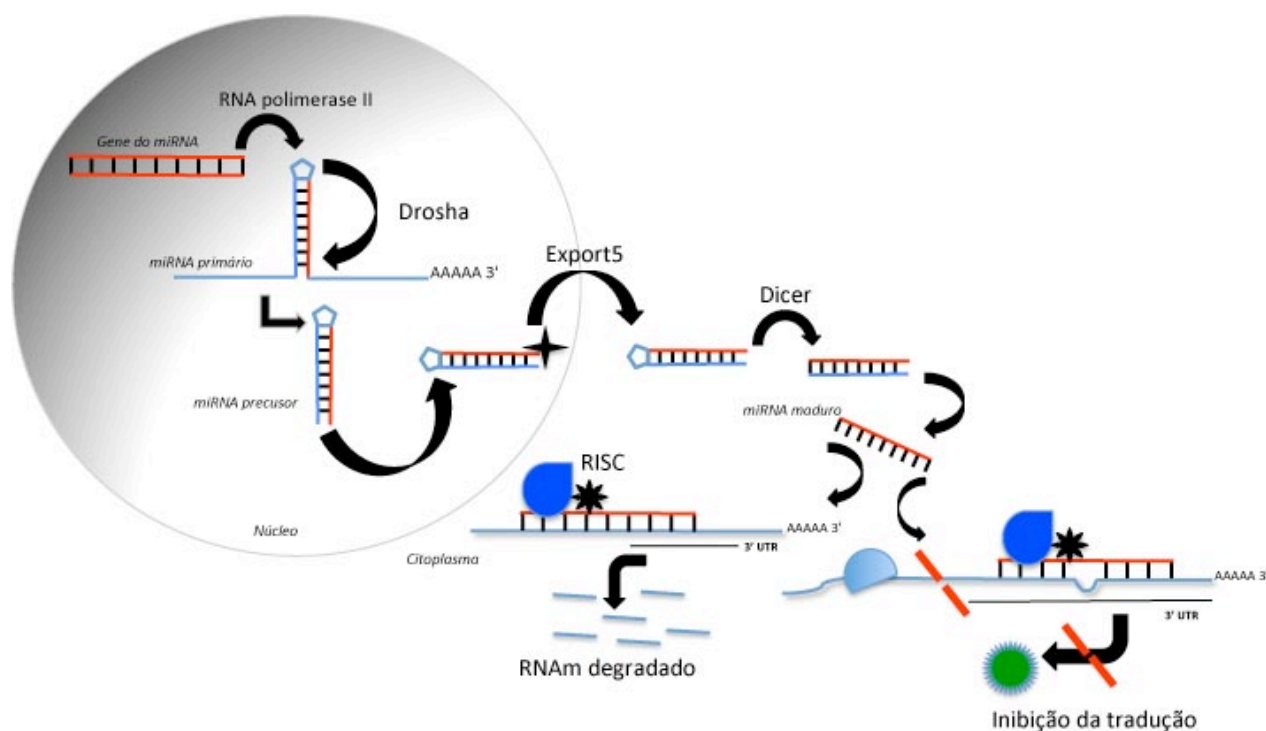


Figura 1: Biogênese do microRNA

O miRNA regula a expressão gênica por meio de uma clivagem direta do mRNA alvo ou inibindo sua tradução por uma complementariedade com a região não-traduzida 3' (UTR) do mRNA alvo. Em geral, os miRNAs não apresentam pareamento completo ao mRNA alvo, sendo que esse pareamento parcial não leva à clivagem do mRNA. Nesse caso, em vez do complexo RISC clivar o mRNA, irá ligar-se a ele, impedindo sua tradução. (23,32). A clivagem do mRNA se dá pela presença da proteína Argonauta 2 (Ago2), que se associa ao complexo RISC, sendo a única proteína humana capaz de clivar o mRNA (33). Para que ocorra apenas o silenciamento do mRNA, impedindo sua tradução, o complexo RISC deve estar associado a qualquer outra proteína Argonauta (32).

O miRNA, ao se incorporar ao complexo RISC associado à proteína Ago2, pode desempenhar um papel importante no processo de transcrição. Quando o miRNA, agregado a esse complexo (RISC + Ago2), se liga a uma região promotora, pode desempenhar um papel de ativador da transcrição daquele gene (33). No entanto, o exato mecanismo dessa atuação de miRNAs no processo de transcrição ainda não é totalmente conhecido.

microRNA e Câncer

Pesquisa desenvolvida por Calin (34) demonstrou que mais de 50% dos genes de miRNA estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer ou em sítios de fragilidade, sugerindo que o miRNA pode desempenhar um papel importante na patogênese do câncer (34).

A primeira evidência de que os miRNAs estão envolvidos na carcinogênese vem da comprovação da perda da expressão de dois conjuntos de miRNAs em leucemia linfocítica crônica e em câncer de próstata (26,35). Posteriormente, estudos demonstraram que a ação oncogênica e supressora de tumor dos miRNAs desempenham, então, um papel importante na carcinogênese (20,36-39).

Um miRNA oncogênico (oncomirs) promove a formação tumoral pela silenciamento dos genes supressores de tumor e/ou genes que controlam a diferenciação celular ou apoptose. Por outro lado, os miRNAs supressores de tumor previnem a formação tumoral pela inibição de oncogenes. Portanto, a alta expressão de miRNAs oncogênicos pode reduzir a produção proteica dos genes supressores de tumor, assim como a perda da expressão dos miRNAs supressores de tumor pode causar aumento na expressão de proteínas oncogênicas (20,36-39).

Estudos atuais têm avaliado a expressão de diferentes miRNAs em CCE de cabeça e pescoço. Ação oncogênica do miRNA-21 (miR-21) foi identificada em glioblastomas e câncer pancreático. Mais recentemente, expressão aumentada do miR-21 foi demonstrada também no CCE de cabeça e pescoço, além da sua possível associação com alterações no processo de proliferação celular (40). Alta expressão do miR-21 foi observada em casos de CCEB, principalmente em tumores localizados na língua e soalho bucal (70).

Novas pesquisas demonstram a forte interação do miR-21 com importantes genes envolvidos no desenvolvimento tumoral. A supressão do miR-21 inibe o crescimento tumoral por intermédio da sua interação com o

gene supressor de tumor tropomyosin I (TPM1) e o gene homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) (54-56). Por esse motivo, acredita-se que o miR-21 age no processo de proliferação celular e apoptose pela regulação desses genes alvos, e o aumento na expressão do miR-21 em diversas alterações malignas sugere a possibilidade de esse miRNA ser específico para o câncer (53-55; 57).

Evidências apontam que a família do miR-181 participa do controle da progressão do ciclo celular por meio da regulação de genes como o *bcl-2* (59), porém seu papel específico no CCEB ainda não está bem definido. O papel biológico do miR-345 e seus alvos também não está bem explicado na literatura específica, mas seu envolvimento no processo de proliferação celular e invasão já vem sendo levantado (58).

Pesquisas mostram o padrão de expressão de miRNAs no CCE de cabeça e pescoço e no CCEB (39, 68, 69), levantando importantes miRNAs com expressão aumentada e diminuída (Tabela 2). Contudo, importantes estudos funcionais ainda estão sendo realizados, na tentativa de estabelecer o real padrão de expressão de miRNAs no processo de carcinogênese do CCEB.

Tabela 2: miRNAs com expressão aumentada e diminuída no CCEB e no CCE de cabeça e pescoço

miRNAs já relatados com expressão aumentada	miR-24 (48)	• Possivelmente envolvido no processo de proliferação e apoptose
	miR-184 (49)	• Papel oncogênico e antiapoptótico
	miR-21 (13, 40, 47)	• Papel oncogênico e antiapoptótico; envolvimento na progressão tumoral
	miR-211 (50)	• Regulação de genes envolvidos na angiogênese e apoptose
	miR-31 (51; 52)	• Regulação de genes envolvidos na angiogênese e metástase
miRNAs já relatados com expressão diminuída	miR-15a (60,65)	• Proliferação e crescimento tumoral
	let-7 (61,65)	• Proliferação e crescimento tumoral
	miR-222 (62)	• Invasão tumoral e metástase
	miR-137(63)	• Papel de supressor de tumor; regulação de importantes genes envolvidos no ciclo celular
	miR-133(64)	• Proliferação e crescimento tumoral
	miR-125 (66, 67)	• Proliferação e metástase
	miR-100 (66)	• Invasão tumoral e metástase

Novos estudos estão sendo desenvolvidos para determinar a relação dessas pequenas moléculas em lesões cancerizáveis e, ainda, o seu papel na progressão para o câncer. Estudo recente identificou um aumento na expressão do miR-21, miR-181b e miR-345 em casos de LBs que progrediram para o CCEB (13). Esse achado representa a primeira evidência do papel dos miRNAs na progressão do câncer de boca.

Em outro estudo, mais recente, foi observada uma alta expressão de 79 miRNAs e baixa expressão de 50 miRNAs em casos de LBs que progrediram para o CCEB, sendo que alguns desses miRNAs tiveram uma expressão duas vezes maior (Tabela 3) (71).

Tabela 3: miRNAs com expressão aumentada e diminuída em leucoplasia bucal

	LB	LBs que progrediram para o CCEB
Expressão aumentada	miR-21 (13)	
	miR-146 (13)	
	miR-181b (13)	miR-21 (13,71)
	miR-518 (13)	miR-181b (13)
	miR-345 (13)	miR-345 (13)
	let-7 (71)	miR-142 (71)
	miR-200 (71)	miR-31 (71)
	miR-221 (71)	
Expressão diminuída	miR-16 (71)	
		miR-196 (13)
	miR-125 (71)	miR-206 (13)
	miR-302 (71)	miR-373 (71)

Apesar do grande potencial que o miRNA apresenta na regulação da expressão do genoma e a perspectiva de sua manipulação no tratamento do câncer humano, não se sabe até a presente data o perfil de expressão de miRNAs em LB e no CCEB. Trata-se de um dado muito importante, porque servirá de modelo para outros estudos com diferentes metodologias e que venham a utilizar terapia gênica no câncer bucal, além de facilitar o entendimento do processo de tumorigênese.

O conhecimento sobre o genoma no processo de carcinogênese não pode ser trabalhado apropriadamente no desenvolvimento de ferramentas

moleculares para o tratamento da doença, sem uma compreensão detalhada dos mecanismos envolvidos na tradução das proteínas.

Sendo os miRNAs descritos como importantes reguladores de genes envolvidos no processo de tumorigênese do CCEB, e o miR-21, miR-181b e miR-345 estarem previamente relacionados com a progressão da LB para o CCEB (13,71), torna-se importante estudar a associação da expressão dessas moléculas com a presença e ausência de alterações morfológicas na LB. Esta informação permitirá uma maior compreensão das alterações moleculares relacionadas a essas alterações e, consequentemente, a uma melhor gradação que contribua para a melhor avaliação morfológicas dessas lesões.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de miRNAs em casos de leucoplasia bucal com diferentes graus de displasia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a expressão de miRNAs relacionados à progressão do câncer – miR-21, miR-181b e miR-345 – em casos de leucoplasia bucal
- Relacionar a expressão desses miRNAs com cada alteração morfológica utilizada para gradação de displasia na leucoplasia bucal;
- Comparar a expressão desses miRNAs na leucoplasia bucal, no carcinoma de células escamosas e mucosa bucal normal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e aspectos éticos

Para avaliar a expressão de cada um dos miRNAs optou-se por um estudo do tipo transversal experimental. Um grupo foi composto por indivíduos que apresentaram diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB; o segundo grupo envolveu indivíduos portadores de diagnóstico de LB; o terceiro grupo abrangeu fragmentos de mucosa bucal normal, obtidos de indivíduos voluntários durante cirurgias de doenças não-neoplásicas.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 441/11 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, parecer nº ETIC518/07 (Anexo D).

Pacientes e Amostras

As amostras foram obtidas de pacientes com o diagnóstico clínico de LB e CCEB no momento da biópsia inicial ou remoção completa da lesão. Inicialmente, foram divididas em dois fragmentos. O primeiro fragmento foi acondicionado em formaldeído a 10% para processamento de rotina e confirmação do diagnóstico. O segundo fragmento foi colocado em

RNAHolder (BioAgency, São Paulo) e mantido congelado a -80°C até a extração do RNA.

As amostras de CCEB e de LB foram submetidas à microdissecção manual com o objetivo de selecionar a parte tumoral do CCEB e o componente epitelial da LB. Foram incluídas 22 amostras de LB, divididas após análise histopatológica em displasia leve (n=12), displasia moderada (n=9) e displasia acentuada (n=1), 17 amostras de CCEB e seis amostras de mucosa oral normal.

Extração de RNA/microRNA

O tecido foi macerado em recipiente específico com nitrogênio líquido e, posteriormente, com o motor Tissue Grinder (Kontes, Vineland, NJ) em Trizol, e a extração foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA). Adicionou-se 200 µl de Clorofórmio (Merk, GE) à mistura, agitada em vórtex por 15 segundos e incubada por três minutos, em temperatura ambiente (TA) e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Após a centrifugação observou-se a separação de três fases: vermelha (fase orgânica), composta pelo fenol-clorofórmio; uma interfase e uma fase aquosa incolor, onde está presente o RNA. A fase aquosa foi removida cuidadosamente e transferida para outro tubo. Para precipitação do RNA presente na fase aquosa, foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico (Merk, GE) à mistura, homogeneizada e incubada por 10 minutos, em TA, e centrifugada por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Com esse procedimento

formou-se um pellet contendo o RNA precipitado. O líquido sobrenadante foi eliminado e, então, o RNA foi lavado com a adição de 1 ml de álcool etílico 75% (Merk, GE) e centrifugado por cinco minutos a 12.000 g a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante e o RNA restante foi enxuto por cinco a 10 minutos, em TA. Depois disso, o RNA foi ressuspense em 20 µl de água DEPC/RNase *free*, aliquoteado e armazenado à temperatura de -80°C.

As amostras de RNA foram submetidas à quantificação por meio da espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,9 a 2,0 (leitura 260/280). A concentração de RNA foi calculada da seguinte forma: [RNA (g/ml)] = A x A_{260} x diluição, onde: “A” é uma constante definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absorver luz em um determinado comprimento de onda (RNA igual a 40) e “ A_{260} ” é a leitura da amostra no comprimento de onda de 260 nm. A diluição empregada foi de 50, que corresponde a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

O RNA (1µg) foi aplicado em gel de acrilamida 15% para verificação da sua qualidade. O gel foi confeccionado respeitando as seguintes proporções: 7,2 g de Ureia; 1,5 ml de 10X TBE; 5,6 ml de Acrilamida 40% (acrilamida/bis-acrilamida = 19:1); H₂O livre de nuclease para 15 ml; 75 µl de TAE (persulfato de amônio 10%) e 15 µl de TEMED. Adicionou-se à amostra Gel Loading Buffer II (Ambion) em igual volume, sendo então aquecidos a 95°C por cinco minutos e submetidos à eletroforese 30-45 mA. Em seguida, o gel foi revelado em solução de brometo de etídio por cinco minutos, lavado por cinco minutos em 1x TBE e analisado em transluminador de UV. Foi possível observar duas bandas distintas representando o RNA ribossomal 28S e 18S, o que confirma a integridade e qualidade do RNA.

Transcrição reversa

A síntese de cDNA foi efetuada a partir do RNA extraído das amostras, via transcrição reversa, utilizando um kit específico para microRNA (TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), onde foram utilizados RT primers para cada microRNA estudado, permitindo a conversão do fragmento específico correspondente ao microRNA de interesse (Figura 2). Esse método baseia-se na utilização de um primer com estrutura do tipo stem-loop. Tal conformação visa solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu pequeno tamanho. O stem-loop do primer possui uma especificidade apenas para o miRNA maduro, permitindo a formação de uma junção primer-miRNA, estendendo a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um amplicon maior, possibilitando o uso de um TaqMan AssayTM (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para quantificar a expressão do miRNA por PCR quantitativo em Tempo Real. Além disso, o fato de o TaqMan AssayTM possuir dois primers e uma sonda para PCR faz também com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles. As condições de reação foram de 16° por 30 minutos, 42° por 30 minutos, 85° por cinco minutos e 4° - hold ∞, para reação de 15 µl.

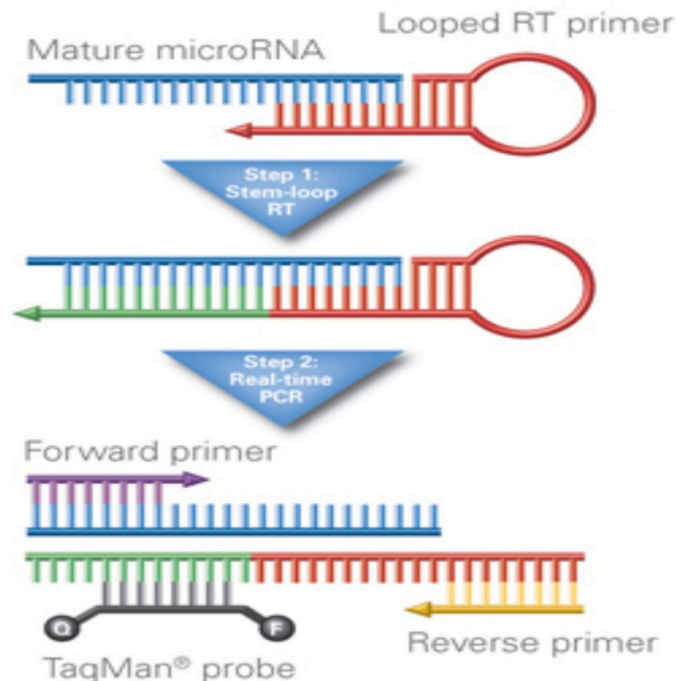


Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de transcrição reversa de miRNA utilizando o Kit TaqMan MicroRNA RT – Applied Biosystem e interação da sonda e primers (TaqMan™ MicroRNA Assay)

Escolha do endógeno e teste de eficiência de reação

Para a escolha do endógeno foram examinados três microRNAs (U47, RNU44 e RNU48) que apresentam expressão regular em diferentes tecidos. Foi realizado um teste em três amostras de CCEB, três amostras de mucosa bucal saudável e uma amostra de hiperplasia fibrosa inflamatória. As amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa e, então, realizou-se o Real-Time PCR (qPCR) para verificação da cinética de amplificação dos microRNAs endógenos nos diferentes tecidos. O miRNA RNU44 apresentou

uma cinética de amplificação idêntica nos três tecidos testados, por isso, foi escolhido para normalizar todas as reações do estudo.

Após a seleção do endógeno, verificou-se a eficiência de sua amplificação em relação aos microRNAs alvos. Foram executadas diluições seriadas de uma solução de estoque com concentração conhecida, em duas séries com seis pontos, diluídos duas vezes (100 ng - 50ng - 25 ng - 12,5 ng - 6,25 ng) e diluídos dez vezes (100 ng – 10 ng – 0,1 ng – 0,01 ng – 0,001 ng). A variação de Ct (Threshold cycle) esperada foi de 1 e 3,3, respectivamente, de acordo com a seguinte fórmula: $2^n = \text{fold dilution}$, onde: *2-fold dilution series: $n=1$ e 10-fold dilution series: $n=3,3$* . Analisando o resultado obtido chegou-se à concentração ideal, em que a eficiência do controle (endógeno) e do microRNA alvo foi próximo de 100%.

Quantificação por PCR em Tempo Real - qPCR

Para a detecção da expressão do miRNA foi utilizado o Step-One Real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mediante quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (45). O método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), de quantificação relativa, descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostra estudada, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de referência (Applied Biosystems User Bulletin Nº2 – P/N 4303859). Análises com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tem sido amplamente usadas em estudos de expressão gênica (46).

Os microRNAs avaliados, baseado em estudos que demonstraram seu envolvimento com a progressão da LB para o CCEB (13,71), foram hsa-miR-

21 (MIMAT0000076 - UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA), hsa-miR-181b (MIMAT0000257 - AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU), hsa-miR-345 (MIMAT0000772 - GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC) (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems).

A reação efetivou-se utilizando TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições de reação seguiram as recomendações do fabricante (95°C por dez minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto) com volume de 20 µl. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

A expressão de cada miRNA foi normalizada com o endógeno RNU44. Com o valor de Ct normalizado, comparou-se com o calibrador escolhido, de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O calibrador foi composto por uma mistura de quatro amostras de sangue coletadas de pacientes que não apresentavam nenhuma condição neoplásica.

Gradação histológica e análise morfológica

Os casos de LB foram graduados por dois patologistas independentes, segundo os critérios anteriormente descritos (5,7). A primeira gradação considerou a presença de alterações arquiteturais e citológicas em cada corte histológico, conforme parâmetros previamente estabelecidos (Tabela 4). A segunda avaliação foi baseada no número de camadas do epitélio acometidas com essas alterações (Tabela 5).

Tabela 4: Critérios morfocitológicos para gradação de displasia epitelial (9)

<i>Alterações da arquitetura</i>	<i>Alterações citológicas</i>
Perda de polaridade da camada basal	Alteração do tamanho nuclear e celular
Projeções epiteliais em forma de gota	Pleomorfismo nuclear e celular
Aumento do número de mitoses	Aumento da proporção núcleo / citoplasma
Mitoses superficiais anormais	Núcleos aumentados de tamanho
Disceratose	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos numerosos e aumentados
	Hipercromasia

Tabela 5: Critérios de graduação histológica de displasia epitelial para leucoplasias bucal (9)

<i>Graduação histológica</i>	<i>Parâmetros para classificação</i>
Ausência de atipia	Ausência de alterações estruturais e atipia citológica.
Atipia epitelial discreta	Presença de alterações estruturais e atipia citológica confinadas ao terço inferior do epitélio.
Atipia epitelial moderada	Presença de alterações estruturais e atipia citológica estendendo até o terço médio do epitélio.
Atipia epitelial severa	Presença de alterações estruturais e atipia citológica estendendo além do terço médio do epitélio.

Objetivando relacionar a expressão dos miRNAs miR-21, miR-18b e miR-345 com o grau de displasia e com a presença e ausência de alterações morfológicas na LB, após a gradação da displasia, as amostras de LB foram inicialmente divididas em três grupos (displasia leve, displasia moderada e displasia severa). Posteriormente, tais amostras foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo compreendeu os casos que apresentavam

alterações arquiteturais e citológicas e o segundo grupo, casos que não apresentavam essas alterações.

Análise Estatística

O padrão de normalidade das amostras foi verificado pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) foram usados para comparar dois e três grupos de casos em uma variável, respectivamente. Para realizar a análise estatística utilizou-se SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.), e o valor considerado estatisticamente significativo foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Expressão do miR-21

Verificou-se uma alta expressão do miR-21 nos casos de CCEB quando comparados com os casos de LB ($p=0.02$) e com a mucosa normal ($p=0.01$) (Figura 3). Uma expressão aumentada também foi observada nos casos de LB quando comparada com mucosa normal ($p=0.01$) (Figura 3).

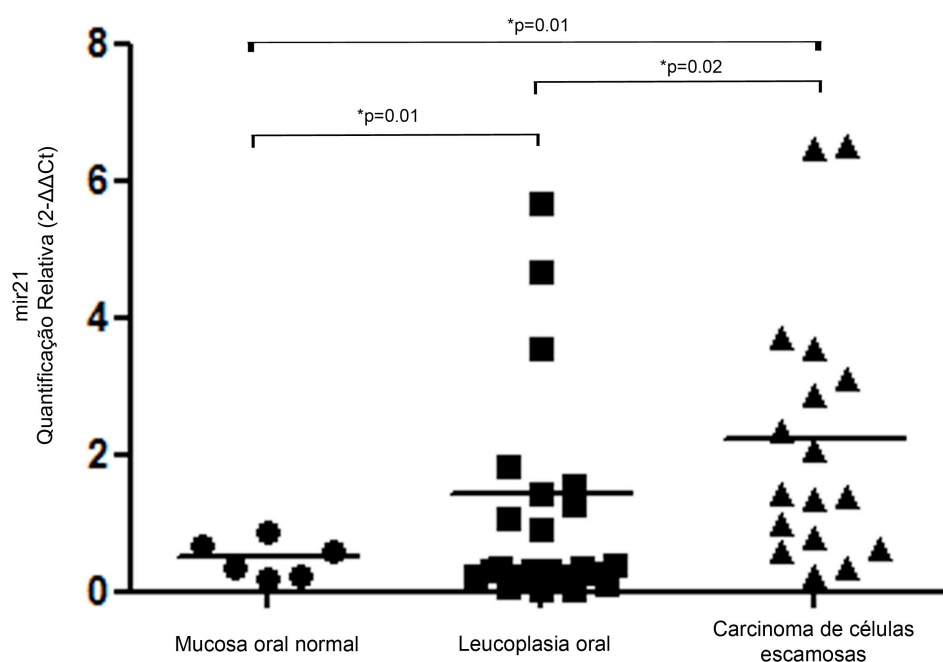


Figura 3: Expressão do miR-21 em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas.

Não se comprovou uma diferença significativa na expressão do miR-21 ao avaliar-se a severidade da displasia (Tabela 6), porém constatou-se uma expressão semelhante entre LB com grau elevado de displasia e CCEB.

Observou-se uma expressão aumentada em LBs que apresentavam alguma alteração arquitetural ou citológica quando comparadas com as que não apresentavam essas alterações (Tabela 6); significância estatística foi percebida em casos com aumento no número de figuras de mitoses ($p=0.01$), mitoses superficiais anormais ($p=0.02$), aumento na proporção núcleo-citoplasma ($p=0.03$) ou hiperchromasia ($p=0.02$) (Figura 4).

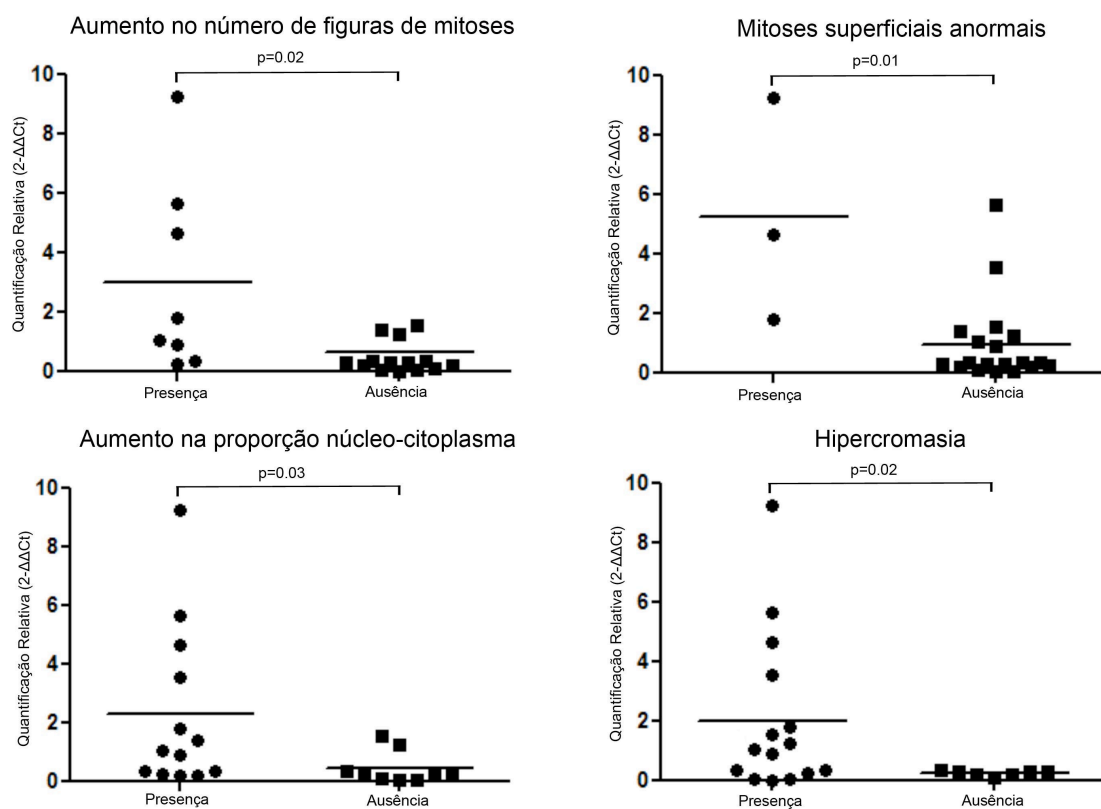


Figura 4: Expressão do miR-21 e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal.

Expressão do miR-181b

Percebeu-se um aumento na expressão do miR-181b no CCEB quando comparado com LB ($p=0.02$) e mucosa bucal normal ($p=0.05$) (Figura 5). Não foi observada diferença significativa quando avaliada a expressão do miR-181b com os distintos graus de displasia (Tabela 6).

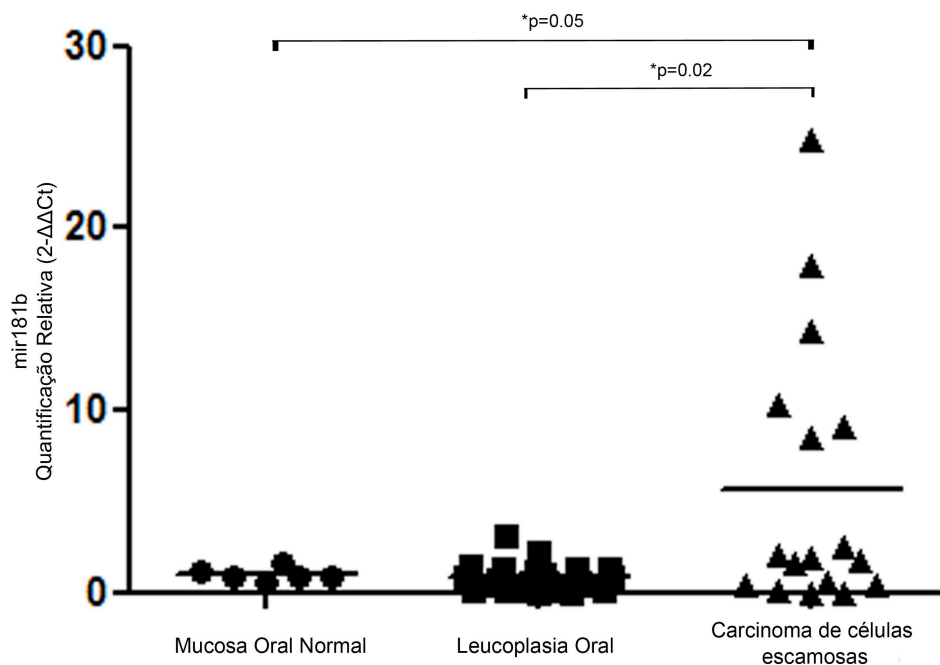


Figura 5: Expressão do miR-181b em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas de boca.

Um aumento na expressão do miR-181b foi verificado nos casos de LBs que apresentaram aumento no número de figuras de mitoses ($p=0.01$), aumento na proporção núcleo-citoplasma ($p=0.02$) ou hiper Cromasia ($p=0.02$) (Figura 6).

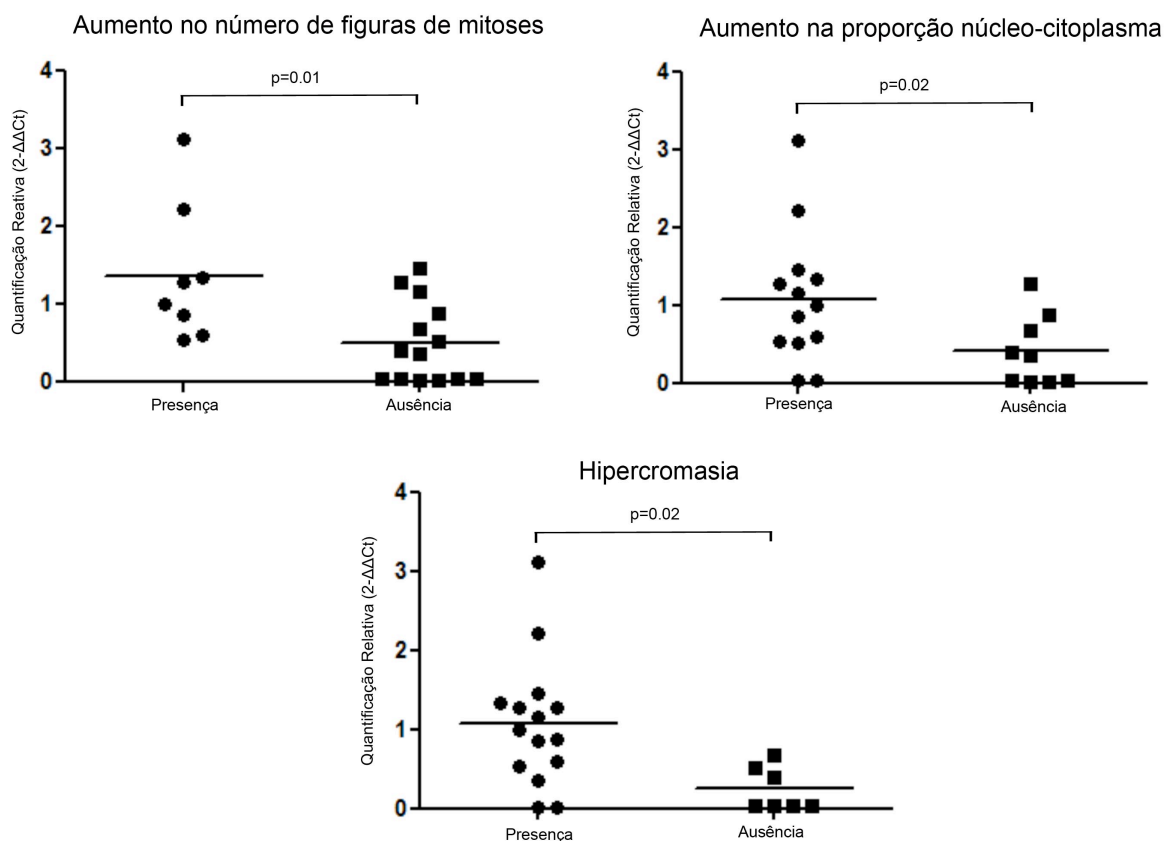


Figura 6: Expressão do miR-181b e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal.

Expressão do miR-345

Expressão aumentada do miR-345 foi notada em casos de CCEB quando comparados com LB ($p=0.0002$) e mucosa bucal normal ($p=0.005$) (Figura 7). O mesmo ocorreu em casos de LBs que apresentaram aumento no número e tamanho do nucléolo ($p=0.04$) ou aumento na proporção núcleo-citoplasma ($p=0.005$) (Figura 8).

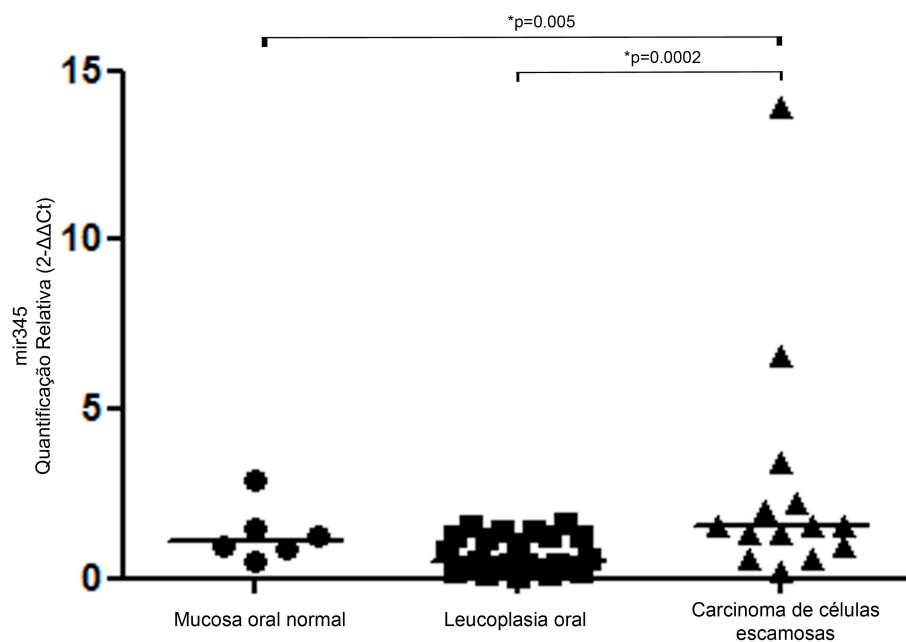


Figura 7: Expressão do miR-345 em casos de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas de boca

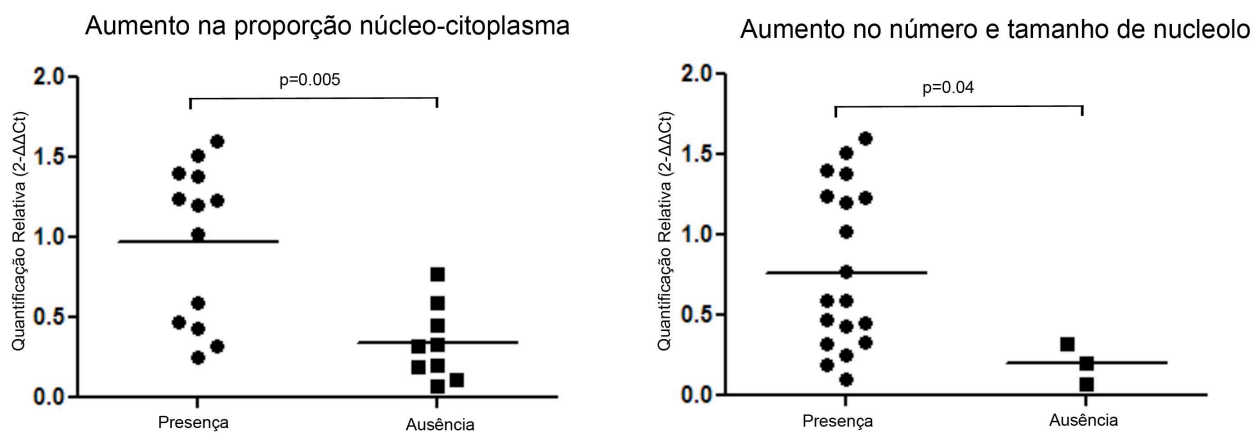


Figura 8: Expressão do miR-345 e alterações histopatológicas em leucoplasia bucal

Expressão dos miRNAs versus localização

Não foi observada diferença significativa quando considerada a expressão dos três miRNAs, relacionando sítios de acometimento de alto risco (língua, soalho e palato mole) e baixo risco (mucosa jugal, rebordo alveolar e palato duro) (Figura 9).

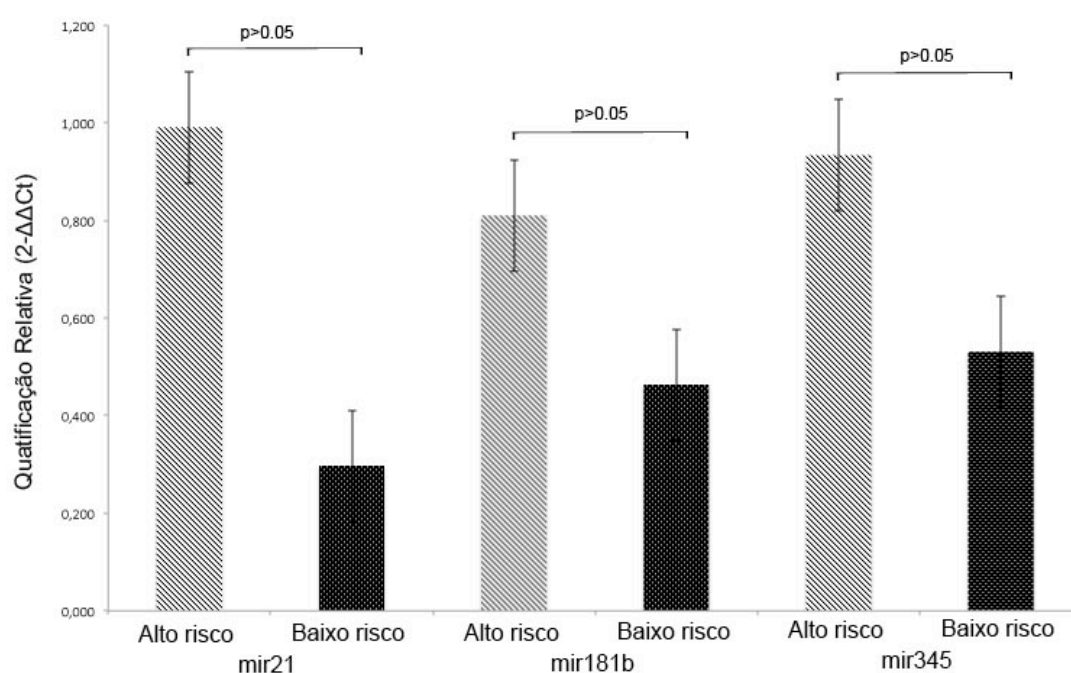


Figura 9: Expressão dos miRNAs (miR-21, miR-181b e miR-345) e sítios de acometimento da leucoplasia bucal. Alto risco (palato mole, língua e soalho) e Baixo risco (mucosa jugal, rebordo alveolar e palato duro).

Informações sobre a evolução dos pacientes

Este dado foi obtido de 12 pacientes e nenhum mostrou sinal de progressão para o CCEB.

Tabela 6: Níveis de expressão dos miRNAs

Grau de Displasia	Níveis de miR-21 ^a		<i>p value</i> *	Níveis de miR-345 ^a		<i>p value</i> *	Níveis de miR-181b ^a		<i>p value</i> *
Mucosa bucal normal	0,49		<i>ns</i>	1,33		<i>ns</i>	0,97		<i>ns</i>
Displasia leve	0,96		<i>ns</i>	0,66		<i>ns</i>	0,72		<i>ns</i>
Displasia moderada/severa	2,09		<i>ns</i>	0,70		<i>ns</i>	0,94		<i>ns</i>

	Presença Ausência			Presença Ausência			Presença Ausência		
Alterações arquiteturais									
Perda de polaridade	2,78	0,87	<i>ns</i>	0,98	0,45	<i>ns</i>	1,29	0,80	<i>ns</i>
Projeções em gota	3,67	1,09	<i>ns</i>	0,89	0,72	<i>ns</i>	1,47	0,89	<i>ns</i>
Aumento no número de mitoses	3,00	1,12	<i>p=0.02*</i>	1,00	0,57	<i>ns</i>	1,37	0,85	<i>p=0.01*</i>
Mitoses superficiais aumentadas	3,24	1,89	<i>p=0.01*</i>	0,76	0,79	<i>ns</i>	1,17	1,10	<i>ns</i>
Alterações citológicas									
Anisonucleose	2,56	0,56	<i>ns</i>	0,93	0,34	<i>ns</i>	1,28	0,59	<i>ns</i>
Pleomorfismo celular	5,82	1,19	<i>ns</i>	1,15	0,70	<i>ns</i>	1,56	1,01	<i>ns</i>
Aumento na proporção núcleo-citoplasma	2,66	0,75	<i>p=0.03*</i>	0,99	0,34	<i>p=0.005*</i>	1,28	0,73	<i>p=0.02*</i>
Aumento no tamanho do núcleo	2,66	0,75	<i>ns</i>	0,99	0,34	<i>ns</i>	1,28	0,73	<i>ns</i>
Figuras de mitoses atípicas	4,65	1,89	<i>ns</i>	0,32	0,88	<i>ns</i>	1,01	1,12	<i>ns</i>
Nucléolos alterados	2,46	0,32	<i>ns</i>	0,92	0,20	<i>p=0.04*</i>	1,25	0,49	<i>ns</i>
Hipercromasia	2,55	0,59	<i>p=0.02*</i>	0,95	0,28	<i>ns</i>	1,24	0,73	<i>p=0.02*</i>

^a $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Cada valor representa a mediana de expressão do miRNA sob a fórmula de quantificação relativa); **p-value* ≤ 0.05 foi considerado significativo estatisticamente.

DISCUSSÃO

Alteração na expressão de miRNAs tem sido relatada em várias doenças, incluindo o CCE de cabeça e pescoço e mais recentemente no CCEB (40,49-52,65,72). Os miRNAs podem desempenhar função de oncogenes ou de genes supressores, conseqüentemente, expressão alterada do miRNA pode contribuir para a progressão do câncer. (37,68,72)

Um aumento na expressão do miR-21, miR-345 e miR-181b tem sido demonstrado em LB que progrediram para o CCEB (13). No presente estudo, foi observado uma expressão aumentada do miR-21 em casos de LB e CCEB quando comparados com mucosa bucal normal, e uma alta expressão do miR-345 e miR-181b em casos de CCEB quando comparados com LB e mucosa bucal normal.

Esses achados sugere que os miRNAs desempenham um papel no desenvolvimento da LB e do CCEB. Isto é suportado por achados prévios desses miRNAs estarem envolvidos na regulação de importantes genes com função no processo de carcinogênese (TPM1, PTEN e bcl-2). (13,53,54,59) Entretanto, o papel desses miRNAs no diagnóstico precoce do CCEB e no processo de progressão da displasia deve ser melhor explorado.

O miR-21 é considerado um miRNA oncogênico envolvido na tumorigênese de diversos carcinomas. Esta evidência é sustentada pela forte relação do miR-21 na inibição do crescimento tumoral através do silenciamento de genes supressores de tumor, como o TPM1 e o PTEN (54-56). O gene PTEN está envolvido em múltiplos processos, incluindo a inibição da apoptose, na proliferação celular e no processo de reparo do

DNA. PTEN tem sido encontrado mutado ou deletado em CCEB (54-56). Acredita-se que o miR-21 inibe a apoptose e induz a proliferação pela regulação da expressão desses genes (53-55,57).

O miR-181 possui um papel importante na regulação da progressão do ciclo celular e apoptose através da regulação de genes como o *bcl-2* (59). Entretanto, a função do miR-181 no processo de carcinogênese do CCEB não está bem estabelecido. O papel biológico do miR-345 e seus genes alvos ainda não está bem estabelecido na literatura, porém, evidências indicam o seu papel na proliferação celular e invasão (58), além de sua expressão aumentada em LB que progrediram para o CCEB (13).

A atual gradação da displasia em LB ainda não possui um real papel preditor de transformação maligna. Convencionalmente, a displasia é graduada em leve, moderada e acentuada, porém, essa classificação é pobremente relacionada com a progressão maligna da LB. (2,5,11,73)

No processo de gradação da displasia em LB leva-se em consideração a presença ou ausência de alterações citológicas e arquiteturas, porém o perfil molecular de cada alteração ainda não é claro. No presente estudo, foi investigado a associação entre cada parâmetro utilizado nessa gradação e o nível de expressão de miRNAs possivelmente envolvidos com o desenvolvimento do CCEB. Foi encontrado uma alta expressão dos miRNAs miR-21, miR-345 e miR-181b em LB que apresentavam hipercromasia, aumento no número de figuras de mitose, aumento na proporção núcleo-citoplasma, mitoses superficiais anormais ou aumento no número e tamanho do nucléolo. Esses dados sugerem que determinadas alterações morfológicas devem ser avaliadas com pesos diferenciados no processo de

gradação de displasia. Novos estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

CONCLUSÃO

- Existe uma diferença significativa na expressão desses miRNAs entre mucosa bucal normal, LB e CCEB.
- Alguns parâmetros citológicos e histopatológicos utilizados para a gradação da displasia em LB estão associados com uma expressão alterada dos miRNAs miR-21, miR-181b e miR-345.
- Alta expressão do miR-21 está associada com aumento no número de figuras de mitoses, mitoses superficiais anormais, aumento na proporção núcleo citoplasma e hipercromasia.
- Alta expressão do miR-181b está associada com aumento no número de figuras de mitoses, aumento na proporção núcleo-citoplasma e hipercromasia.
- Alta expressão do miR-345 está associada com aumento na proporção núcleo-citoplasma e aumento no número e tamanho de nucléolos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I (2007) Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 36: 575-580.
2. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008) Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J Oral Pathol Med 37: 127-133.
3. Lodi G, Porter S (2008) Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. J Oral Pathol Med 37:63-69.
4. Napier SS, Speight PM (2008) Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. J Oral Pathol Med 37:1-10.
5. Speight PM (2007) Update on oral epithelial dysplasia and progression to câncer. Head Neck Pathol 1:61-66.
6. van der Waal I (2009) Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and presente concepts of management. Oral Oncology 45:317-323.
7. World Health Organization. In Histological Typing of cancer and precancer of the oral mucosa. (2nd edn), Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Wall I (eds). Springer-Verlag: Belim, 1997:21-31.

8. Warnakulasuriya S (2001) Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 194: 294-297.
9. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. Head and neck tumors. Lyon: IARC Press, 2005:177-80.
10. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P (1985) Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol* 14:698-708.
11. Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS (1977) A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 43:383-390.
12. Tilakaratne WM, Sherriff M, Morgan PR, Odell EW (2011) Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med* 40:533-540.
13. Cevigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, et al. (2009) Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 18:4818-4829.
14. Kondoh N (2007) Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 43:455-462.
15. Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.

16. Lagos-Quintana M et al. (2001) Identification of Novel Genes Coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-58.
17. Rodriguez A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and trascription units. *Genoma Research* 22:1902-10.
18. Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355.
19. Harfe BD (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15:410-415.
20. Slack FJ, Esquela-Kerscher A (2006) Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6: 259-269.
21. Plasterk RH (2006) Micro RNAs in animal development. *Cell* 124:877-881.
22. Loa K et al. (2007) Real Time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J* 2:1-3.
23. Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
24. Gartel AL, Kandel ES (2006) RNA interferente in cancer. *Biomolecular Enginering* 23:17-32.
25. Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM (2007) Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 13:2883-8.
26. Garzon R et al. (2006) MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med* 1:1-8.
27. Johnson SM et al. (2005) RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* 120:635–647.

28. Gregory RI, Shiekhattar R (2005) MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res* 65(9):3509-12.
29. Haber DA, Diederichs S (2006) Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. *Cancer Res* 66(12).
30. Huppi K, et al. (2007) MicroRNAs and genomic instability. *Seminars in Cancer Biology* 17:65-73.
31. Altuvia Y, et al. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 33(8):2697-2706.
32. Osada H, Takahashi T (2007) MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 28:2-12.
33. Pushparaj, P. N., et al. (2008). siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res* 87(11): 992-1003.
34. Calin GA, et al. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004.
35. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15524-9.
36. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 302:1-12.
37. Hammond SM (2006) MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development* 16:4-9.

38. Hebert C, Morris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ (2007) High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer* 6:1-11.
39. Tran, N., et al. (2007). "MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* 358(1): 12-17.
40. Chang, S. S., et al. (2008). "MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma." *Int J Cancer* 123(12): 2791-2797.
41. Leethanakul C, et al. (2003) Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the head and neck cancer genome anatomy project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncology* 39:248-258.
42. Ha PK, et al. (2003) A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* 9:3058-64.
43. Ginos MA, et al. (2004) Identification of a Gene Expression Signature Associated with Recurrent Disease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Research* 64:55-63.
44. Tomioka H, Morita K, Hasegawa S, Omura K (2006) Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol Med* 35: 206-11.
45. Livak KJ, Schmittgen T (2001) Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method *Methods* 25:402-408.
46. Schmittgen T, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3:1101-1108.

47. Li J, Huang H, Sun L, et al. (2009) MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. Clin Cancer Res 15:3998-4008.
48. Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS, Chang KW (2010) MiR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and *in vitro* analysis. Oral Oncol 46:204-8.
49. Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI (2008) Mature mir-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. Clin Cancer Res 14:2588-92.
50. Chang KW, Liu CJ, Chu TH, et al. (2008) Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. J Dent Res 87:1063-8.
51. Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, et al. (2010) Mir-31 ablates expression of the HIF regulatory factor HIF-1 to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. Cancer Res 70:1635-44.
52. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC (2010) Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. Oral Dis 16:360-4.
53. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, et al. (2010) MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). Clin Chim Acta 411: 846-852.
54. Qi L, Bart J, Tan LP, Platteeuw I, Sluis T, et al. (2009) Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the

- breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. BMC Cancer 9: 163.
55. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, et al. (2008) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. Cell Res 18: 350-359.
 56. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat Rev Mol Cell Biol 13: 283-296.
 57. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, et al. (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 133: 647-658.
 58. Tang JT, Wang JL, Du W, Hong J, Zhao SL, et al. (2011) MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. Carcinogenesis 32: 1207-1215.
 59. Yang CC, Hung PS, Wang PW, Liu CJ, Chu TH, et al. (2011) miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 40: 397-404.
 60. Cohen EE, Zhu H, Lingen MW, et al. (2009) A feed-forward loop involving protein kinase Calpha and microRNAs regulates tumor cell cycle. Cancer Res 69:65-74.
 61. Avissar M, McClean MD, Kelsey KT, Marsit CJ (2009) MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. Carcinogenesis 30:2059-63.

62. Liu C, Yu J, Jiang L, et al. (2009) MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 6:131-9.
63. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J (2008) Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 68:2094-105.
64. Wong TS, Liu XB, Ho ACW, Yuen APW, Ng RWM, Wei WI (2008) Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer* 123:251-7.
65. Brito JA, Gomes CC, Pimenta FJGS, et al. (2010) Reduced expression of mir15a in the blood of patients with oral squamous cell carcinoma is associated with tumor staging. *Exp Therapeutic Med* 1:217-221.
66. Henson BJ, Bhattacharjee S, O'Dee DM, Feingold E, Gollin SM (2009) Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Gene Chromosomes Cancer* 48:569-82.
67. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13556-61.
68. Gomes CC, Sousa SF, Gomez RS (2013) microRNAs: Small Molecules with a Potentially Role in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Curr Pharmaceutical Design* 19.
69. Wu B, Xiong X, Jia J, Zhang W (2011) MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol* 47:314-319.

70. Boldrup L, Coates PJ, Wahlgren M, Laurell G, Nylander K (2012) Subsite-based alterations in mir-21, mir-125b, and mir-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. *J Carcinog* 11:18-29.
71. Xiao W, Bao Z, Zhang C, Shi L, et al. (2012) Upregulation of mir-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PlosOne* 7:e38648.
72. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X: MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics* 2009:837514.
73. Lind PO: Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* 1987, 95(6):449-455.

ANEXOS

Anexo A: Artigo

(Aceito para publicação na revista “J Oral Pathol Med”)

Relationship between microRNA expression levels and histopathological
features of dysplasia in oral leukoplakia

Running title: microRNA expression and dysplasia in oral leukoplakia

Keywords: microRNA, oral leukoplakia, oral cancer, dysplasia

João Artur Ricieri Brito¹

Carolina Cavaliéri Gomes²

André Luiz Sena Guimarães³

Kelma Campos¹

Ricardo Santiago Gomez¹

¹Department of Oral Pathology, School of Dentistry, ²Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil. ³Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

Corresponding Author:

Prof Ricardo Santiago Gomez

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Odontologia,

Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil – E-mail: rsgomez@ufmg.br

Abstract

Background: Increased expression of microRNAs (miRNAs), miR-21, miR-345, and miR-181b, has been demonstrated in oral leukoplakia (OL) that progresses to oral squamous cell carcinoma (OSCC), suggesting a miRNA signature with potential prognostic value. On the basis of these findings, this pilot study aimed to investigate the cytological and histopathological features that are used to grade oral dysplasia and determine associations with the expression of these 3 potentially cancer-related miRNAs. We also compared the expression levels of these miRNAs in OL with normal oral mucosa and OSCC. **Methods:** We evaluated miRNA expression by qPCR in 22 samples of OL demonstrating different grades of dysplasia, as well as 17 cases of OSCC, and 6 samples of normal oral mucosa. We associated the miRNAs expression profiles with cytological and histopathological features of OL. **Results:** OSCC cases showed increased expression of all 3 miRNAs when compared with OL and normal oral mucosa. Increased expression of miR-21 was also observed in OL when compared with normal oral mucosa. We found a higher expression of miR-21 and miR-181b in OL that presented with an increased number of mitotic figures, increased nuclear-cytoplasmic ratio, or hyperchromasia. Increased expression of miR-21 was also detected in OL with abnormally superficial mitosis. Higher expression of miR-345 was observed in OL with an increased number and size of nucleoli or increased nuclear-cytoplasmic ratio. **Conclusion:** In conclusion, the present study shows that some cytological and histopathological parameters used to grade dysplasia are associated with altered miRNA expression.

Introduction

Oral leukoplakia (OL) is an important oral lesion with the potential for malignant transformation. OL presents as a white lesion in the oral mucosa and is diagnosed when all other possible causes of white oral lesions are excluded. (1,2) Histological examination should support the diagnosis. Grading of epithelial dysplasia in oral lesions, although subjective (3,4), is currently the reference method to predict their malignant transformation. (4,5)

Dysplastic features of stratified squamous epithelium are characterized by cellular atypia and loss of normal maturation and stratification. These features can be broadly categorized as changes to the architecture of the epithelium and those that manifest cellular atypia. (6,7) Conventionally, dysplasia is graded as mild, moderate, and severe. (8) However, the latest World Health Organization (WHO) classification recommends a grading method that takes into account the levels of involvement. Briefly, the grading of oral epithelial dysplasia can be defined as mild dysplasia, when architectural disturbance is accompanied by minimal cytological atypia limited to the lower third of the epithelium; moderate, when the architectural and cytological disturbance extends into the middle third of the epithelium; and severe, when the epithelial disturbance is observed in greater than two-thirds of the epithelium or when prominent cellular atypia is observed in all epithelium. (1,6,8,9)

Molecular biological alterations may be used for more accurate grading of oral lesions and to identify lesions more likely to transform into carcinoma. (10,11) In support of this hypothesis, it has been demonstrated that genetic and epigenetic alterations accumulate during malignant development.

However, molecular changes associated with each architectural and cytological alteration in OL have not yet been established.

Although gene expression changes are very important, there is increasing evidence for the causal involvement of microRNA (miRNAs) in cancer initiation and progression. (10,12) miRNAs are a class of small noncoding RNAs that regulate gene expression by repressing mRNA translation or cleaving target mRNA. (13,14) Some miRNAs have been associated with cancer progression. In particular, a recent report identified increased expression of miR-21, miR-345, and miR-181b in OL that had progressed to squamous cell carcinoma. (10) This finding represents the first evidence of a role of miRNAs in oral cancer progression.

Despite being the gold standard method to predict malignant potential, dysplasia grading correlates poorly with malignant transformation. (5,15) As the expression of miR-21, miR-345, and miR-181 gradually increases as lesions progress from OL to OSCC (10), the aim of the present study was to investigate whether associations can be made between the expression of these 3 potentially cancer-related miRNAs and the cytological and histopathological features that are used to grade oral dysplasia. Our main hypothesis is that distinct morphological aspects commonly used to grade dysplasia may not present the same molecular profile. Finally, we analyzed the expression of these miRNAs in OL, and compared them with normal oral mucosa and OSCC samples.

Materials and Methods

Ethics

The local ethics committee approved the present study according to the national regulations, and signed informed consent was obtained from all patients as well as healthy volunteers involved in this study.

Samples collection, histological analyses, and follow-up

Twenty-two OL samples and 17 OSCC samples were obtained immediately after surgical resection. The tissue samples were collected in a RNA holder (BioAgency, São Paulo, Brazil) and stored at -80°C until processing. Fragments of normal oral mucosa (n = 6) were collected during removal of impacted third molar and were used as controls. Peripheral blood from 4 healthy volunteers was used as calibrators.

Dysplasia was graded according to a consensus agreement by 2 pathologists according to the standard criteria of the World Health Organization. (6) The OL samples represented mild (n = 12), moderate (n = 9), and severe (n = 1) dysplasia. Twelve patients within the OL group were followed-up for 1 year after sample collection.

The histological classification of the OSCC samples was performed according to the International Histological Classification of Tumors (16) and the TNM staging system according to the International Union Against Cancer - UICC. The distribution of samples was stage I-II (n = 8) and III-IV (n = 9). Microdissection was performed for tumor cell enrichment (>80% tumor cells).

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from 25 mg of the frozen tissue samples and from 250 µl of peripheral blood samples in 1 ml of TRIzol® Reagent

(Invitrogen, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA integrity was analyzed before cDNA synthesis from 10 ng of total RNA using gene-specific stem-loop primers specific to each miRNA (miR-21, miR-345 and miR-181b) (TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems, Foster City CA, USA). (17) The conditions used were as follows: 30 min at 16°C; 30 min at 42°C; 5 min at 85°C.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Analyses of miRNA expression were performed using TaqMan MicroRNA Assay and individual TaqMan MicroRNA Assays (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) for has-miR-21, has-miR-345, and has-miR-181b in a Step-One Real Time PCR 48-well optical plate (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). The relative quantification ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method was employed as previously described. (18) Three endogenous miRNAs (RNU44, RNU48, and U47) were analyzed and, because RNU44 showed similar expression levels in OSCC, OL, and normal oral mucosa samples, the expression data were normalized against RNU44. The data were presented as the relative quantity of target miRNA normalized to endogenous miRNA and relative to a calibrator sample. The calibrator used was a pool of blood samples from healthy volunteers. The use of the calibrator ensured consistency across all reaction plates.

Statistical analysis

Data normality was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare

2 and 3 groups of cases for 1 variable, respectively. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.), and a p value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

miR-21 expression

Expression of miR-21 was higher in the OSCC group than in the OL ($p = 0.02$) and normal oral mucosa ($p = 0.01$) groups (Figure 1A). Increased expression of miR-21 was also observed in OL samples when compared with normal oral mucosa ($p = 0.01$) (Figure 1A). No statistically significant association was found in the expression of miR-21 and the severity of dysplasia. OL lesions with moderate/severe dysplasia showed similar expression to OSCC (data not shown). Although, overall, the OL lesions with architectural or cytological alterations exhibited higher expression of miR-21 than those without, statistical significance was only observed in the cases with increased number of mitotic figures ($p = 0.02$), abnormally superficial mitosis ($p = 0.01$), increased nuclear-cytoplasmic ratio ($p = 0.03$), or hyperchromasia ($p = 0.02$) (Figure 2).

miR-181b expression

The OSCC samples showed higher expression of miR-181b than OL ($p = 0.02$) and normal oral mucosa ($p = 0.05$) samples (Figure 1B). No statistical difference in miR-181b was observed among the OL group according to the severity of dysplasia. When the architectural and cytological alterations were

evaluated separately, higher expression of miR-181b was noted in OL with increased number of mitotic figures ($p = 0.01$), increased nuclear-cytoplasmic ratio ($p = 0.02$), or hyperchromasia ($p = 0.02$) (Figure 3).

miR-345 expression

Expression of miR-345 was higher in the OSCC group than in the OL ($p = 0.0002$) (Figure 1C) and normal oral mucosa ($p = 0.005$) groups (Figure 1C). No statistical difference was observed in the expression of this miRNA between OL cases and the normal oral mucosa, as well as among the OL samples with different grades of dysplasia. Higher expression of miR-345 was observed in OL samples with increased nuclear-cytoplasmic ratio ($p = 0.005$) or increased number and size of nucleoli ($p = 0.04$) than in those without these alterations (Figure 4).

High-risk versus low-risk sites

No statistical difference was found in any of the miRNAs measured between OL located in high-risk sites and OL located in low-risk sites (data not shown).

Follow-up analysis

Twelve patients with OL were followed-up for 1 year during which time no progression was observed in any case.

Discussion

Dysregulation of miRNAs has been reported in a number of diseases including OSCC. Some miRNAs may function as oncogenes or tumor suppressor genes, and therefore, aberrant expression of these miRNAs can contribute to cancer progression. (19,20) Increased expression of miR-21, miR-345, and miR-181b has been demonstrated in OL that had progressed to OSCC. (10)

In this pilot study, we observed increased expression of miR-21 in OL and OSCC cases when compared to normal oral mucosa, and higher expression of miR-345 and miR-181b in OSCC compared to both OL and normal oral mucosa. These findings provide further evidence that miRNAs play a role in OL development and transformation. This is supported by reports that these miRNAs may be involved in the regulation of target genes with important functions in carcinogenesis (*TPM1*, *PTEN*, and *bcl-2*). (10,12,21,22) The potential role of these microRNAs in early OSCC diagnosis as well as in dysplasia progression needs to be further explored.

miR-21 is a well-recognized oncogenic miRNA that is overexpressed in various carcinomas. miR-21 is thought to function as an oncogene, a hypothesis that has recently been strengthened by the discovery that suppression of miR-21 inhibits tumor growth by targeting the tumor suppressor genes tropomyosin I (*TPM1*) and phosphatase and tensin homolog (*PTEN*). (22-24) *PTEN* is involved in multiple downstream processes, including inhibition of apoptosis, tumor-cell proliferation, and DNA repair. *PTEN* has been found to be mutated or deleted in OSCC. (22-24) It is believed that miR-21 induces cell proliferation and inhibits apoptosis by regulating the expression of these target genes. (21-23,25)

The miR-181 family participates in cell cycle progression and cell survival by directly regulating important genes such as *bcl-2*. (12) However, the functions of miR-181 in OSCC remain elusive. The biological role of miR-345 and its target genes have not been well characterized in the literature yet. However, this miRNA may be involved in cell proliferation and invasion. (26)

Conventionally, dysplasia is graded as mild, moderate, and severe. However, dysplasia grading correlates poorly with malignant transformation and even non-dysplastic lesions may transform. Therefore, dysplasia grading is not a reliable predictor of malignant transformation. (5,6,9,15) When pathologists are grading OL dysplasia they take into consideration the presence or absence of cytological and architectural changes, but the molecular basis of each of these alterations is not clear. In the present study, we investigated the association between each parameter and the expression of miRNAs potentially related to OSCC development. We found higher expression of the miRNAs miR-21, miR-181b, and miR-345 in OL that showed hyperchromasia, increased number of mitotic figures, increased nuclear-cytoplasmic ratio, abnormally superficial mitosis, or increased number and size of nucleoli. Because every OL lesion presented with more than one morphological alteration, some overlap of the molecular data is expected. Even so, we found that not all histological parameters are associated with significant molecular alterations. As a number of the morphological parameters used to grade OL dysplasia are associated with a different molecular profile, the question is whether these parameters should be equally weighted by pathologists when grading OL. This is preliminary data, and therefore, further investigations evaluating additional genetic or epigenetic

alterations are necessary to confirm this hypothesis. In conclusion, the present study shows that some cytological and histopathological parameters used to grade dysplasia are associated with altered miRNA expression.

Acknowledgements

All authors of this research paper participated in the planning and execution of the study as well as the analysis of the results. This work was supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento a Pesquisa (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MS/SCTIE/Decit, Brazil. Professor RS Gomez is a research fellow at CNPq.

References

- (1) WARNAKULASURIYA S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 2001; 194(3):294-7.
- (2) LODI G, PORTER S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(2):63-9.
- (3) PINDBORG JJ, REIBEL J, HOLMSTRUP P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol* 1985; 14(9):698-708.
- (4) TILAKARATNE WM, SHERRIFF M, MORGAN PR, ODELL EW. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med* 2011; 40(7):533-40.
- (5) PINDBORG JJ, DAFTARY DK, MEHTA FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; 43(3):383-90.
- (6) WARNAKULASURIYA S, REIBEL J, BOUQUOT J, DABELSTEEN E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(3):127-33.
- (7) NAPIER SS, SPEIGHT PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(1):1-10.

- (8) WARNAKULASURIYA S, JOHNSON NW, VAN DER WAAL I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(10):575-80.
- (9) SPEIGHT PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol* 2007; 1(1):61-6.
- (10) CERVIGNE NK, REIS PP, MACHADO J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 2009; 18(24):4818-29.
- (11) TABOR MP, BRAAKHUIS BJ, VAN DER WAL JE, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol* 2003; 199(3):354-60.
- (12) YANG CC, HUNG PS, WANG PW, et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; 40(5):397-404.
- (13) AMBROS V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006):350-355.
- (14) ZHANG B, PAN X, COBB GP, ANDERSON TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302(1):1-12.
- (15) LIND PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* 1987; 95(6):449-55.
- (16) BARNES L, EVERSON JW, REICHART P, SDRANSKY D. WHO - World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
- (17) CHEN C, RIDZON DA, BROOMER AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(20):e179.
- (18) LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402-08.
- (19) LIU X, CHEN Z, YU J, XIA J, ZHOU X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics* 2009; 837514.
- (20) GOMES CC, GOMEZ RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. *Oral Oncol* 2008; 44(10):910-14.
- (21) ZHANG JG, WANG JJ, ZHAO F, LIU Q, JIANG K, YANG GH. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 2010; 411(11-12):846-52.
- (22) QI L, BART J, TAN LP, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9:163.
- (23) ZHU S, WU H, WU F, NIE D, SHENG S, MO YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18(3):350-59.
- (24) SONG MS, SALMENA L, PANDOLFI PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(5):283-96.
- (25) MENG F, HENSON R, WEHBE-JANEK H, GHOSHAL K, JACOB ST, PATEL T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133(2):647-58.

- (26) TANG JT, WANG JL, DU W, et al. MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32(8):1207-15.

Figure Legends

Figure 1: Expression of miRNAs miR-21, miR-345, and miR-181b in normal oral mucosa, oral leukoplakia (OL), and oral squamous cell carcinoma (OSCC). A - High expression of miR-21 was observed in OSCC and OL. B and C - Increased expression of miR-181b and miR-345 was also observed in OSCC samples. *Statistically different, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests.

Figure 2: Histopathological alterations showed a statistically significant association with miR-21 expression in oral leukoplakia (OL). Increased expression of miR-21 was observed in OL samples that harbored these alterations (present) compared to those that did not (absent) (Mann-Whitney test).

Figure 3: Histopathological alterations showed a statistically significant association with miR-181b expression in oral leukoplakia (OL). Increased expression of miR-181b was observed in OL samples that harbored these alterations (present) compared to those that did not (absent) (Mann-Whitney test).

Figure 4: Histopathological alterations showed a statistically significant association with miR-345 expression in oral leukoplakia (OL). Increased expression of miR-345 was observed in OL samples that harbored these alterations (present) compared to those that did not (absent) (Mann-Whitney test).

Figures:

Figure 1:

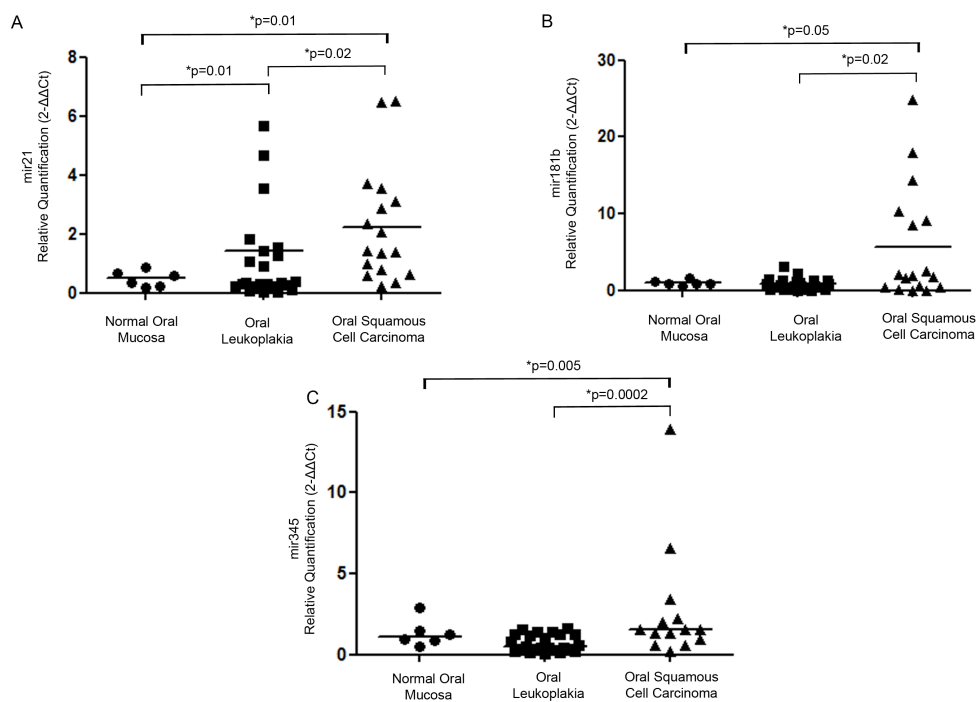


Figure 2:

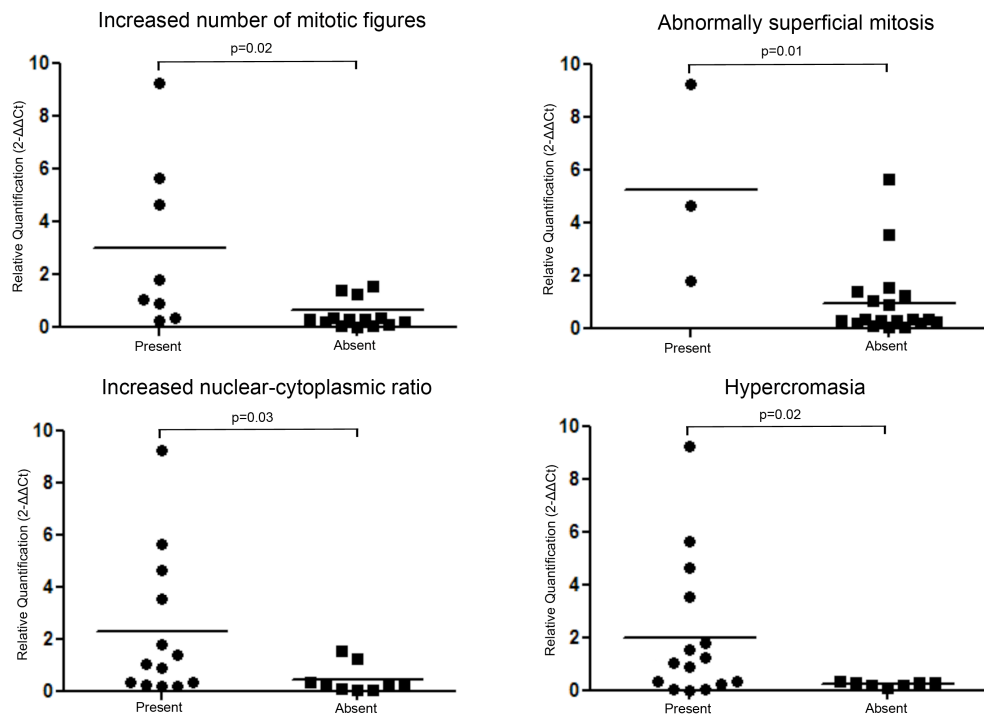


Figure 3:

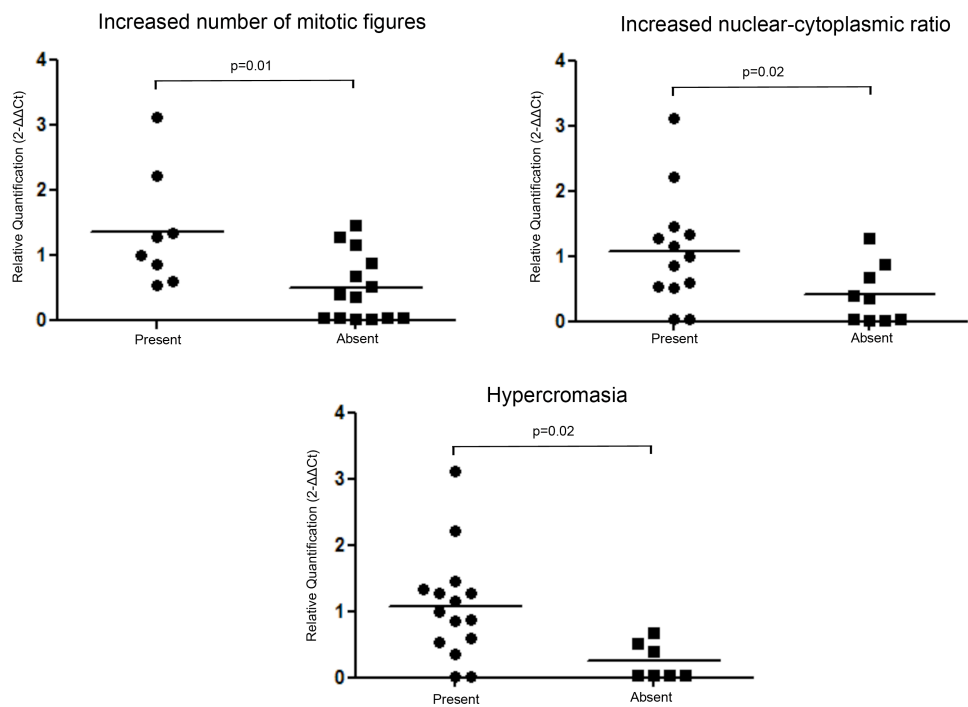
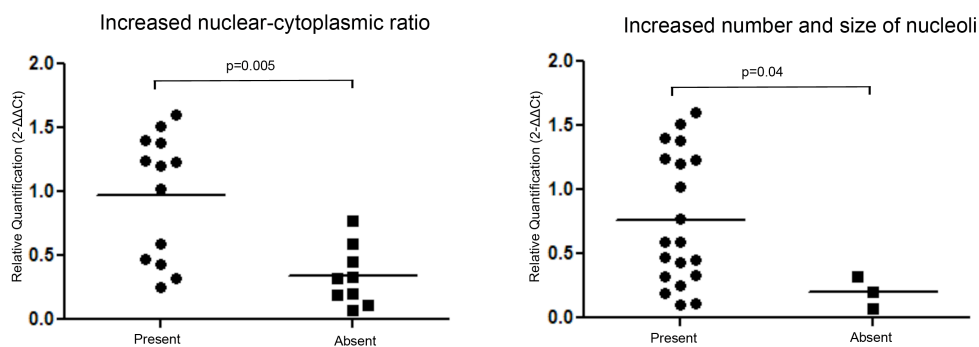


Figure 4:



Anexo B: Atividades desenvolvidas durante o doutorado

Disciplinas cursadas:

Disciplinas obrigatórias cursadas durante o curso de Doutorado

Relação de Atividades no Histórico

Período	Turma	Nome Atividade	Freq	Nota	Conc	Sit Final	Créd	Integr ?
2009/2	DIP CPC832	PESQUISA EM PATOLOGIA BUCAL I				4	06	Sim
2009/2	DIP EST855 A	ESTATISTICA EM PESQUISA ODONTOLOGICA II	S	90	A	A	04	Sim
2009/2	DIP FAO802 PB4	ESTAGIO DOCENTE I	S	100	A	A	03	Sim
2009/2	DIP OPO813 A	EPIDEMIOLOGIA II	S	90	A	A	03	Sim
2010/1	DIP CPC833 A	PESQUISA EM PATOLOGIA BUCAL II	S	95	A	A	06	Sim
2010/1	DIP FAO803 PB4	ESTAGIO DOCENTE II	S	100	A	A	03	Sim
2010/1	DIP FAO806 A	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA III	S	100	A	A	03	Sim
2010/2	DIP FAO807 A	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA IV	S	100	A	A	03	Sim
2012/2	ETF GER000	ELABORACAO DE TRABALHO FINAL					0	Sim
2013/1	EQP ODO005	EXAME DE QUALIFICAÇÃO				A	0	Sim
2013/1	ETF GER000	ELABORACAO DE TRABALHO FINAL					0	Sim

Créditos exigidos para integralização

(Créditos em Atividades Acadêmicas)	
Exigidos	31
Cursados/Dispensados	31
Aproveitamento de Créditos	00
Utilizados para Integralização	31
Em Curso	00
Situação Curricular	INTEGRALIZADO

Atividades no exterior:

Estágio de Doutorado no Exterior - Doutorado Sanduíche

University of Michigan – School of Dentistry

Department of Oral Pathology and Medicine

Orientador: Prof. Dr. Rogério Castilho

Ann Arbor – Michigan - USA

Programa/Bolsa: CAPES/PDEE

Período: Outubro/2011 - Abril/2012

Trabalho desenvolvido:

- PTEN regulates epithelial stem cell population
- Conditional knockout animal model for upper GI tumors

Cursos:

Curso de curta duração em Sequenciamento e Análise de Fragmento.
Life Technologies , LIFE TEC, São Paulo, Brasil

Curso de curta duração em Diagnóstico por imagem e discussão de casos.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Docência:***Professor Substituto***

Carga horária: 20 horas semanais
Departamento de Clínica, Cirurgia e Patologia Bucal
Faculdade de Odontologia – UFMG
Disciplina de Patologia e Semiologia Odontológica I e II
Período: Março – Setembro/2011

Professor Assistente

Carga horária: 8 horas semanais
Departamento de Clínica, Cirurgia e Patologia Bucal
Faculdade de Odontologia – UFMG
Disciplina de Patologia e Semiologia Odontológica II
Período: Agosto/2009 – Dezembro/2010

Projetos de pesquisa paralelos:

Perda de Heterozigotidade do gene PTCH e transcrição de Gli1 em
ameloblastomas

Expressão de microRNAs no Carcinoma de células escamosas de boca

Estudo epigenético em Líquen Plano Oral

Prêmios:

Menção Honrosa na XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da
UFMG, Faculdade de Odontologia - UFMG

Melhor Trabalho de Pós-Graduação Encontro de Pesquisa da UFMG,
Faculdade de Odontologia – UFMG

Menção Honrosa - Encontro de Pesquisa da UFMG, Faculdade de
Odontologia - UFMG

Menção Honrosa Sessão de Poster de Pesquisa, International Association of Oral Pathologist - IAOP

Participação em eventos:

16th International Congress on Oral Pathology and Medicine and 20th Congress of Oral Medicine and Pathology, 2012 (Congresso)

Research Day 2012 - School of Dentistry, 2012 – University of Michigan. (Simpósio)

102nd Meeting of American Association for Cancer Research, 2011. (Congresso)

XIII Pathology Meeting of the Hospital A.C. Carmargo, 2010. (Congresso)

III International Meeting on Investigative Pathology, 2010. (Congresso)

XVIII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Bucal, 2010. (Congresso)

XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010. (Congresso)

IAOP - Seção Latinoamericana e Caribenha, 2009. (Congresso)

Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2009. (Encontro)

Organização de evento:

XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010. (Congresso)

Bancas julgadoras e examinadoras:

Avaliação de trabalhos no XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011
Universidade Federal de Minas Gerais

Avaliação de trabalhos na XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2010
Universidade Federal de Minas Gerais

Avaliação de trabalhos na XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010
Centro Universitário Newton Paiva

Anexo C: Produção científica durante o doutorado

Artigos completos publicados em periódicos

Asymptomatic nodule in the tongue.

BRITO, JA; SOUZA, FTA; LACERDA, JCT; BERNARDES, VF; GOMES, CC; GOMEZ, RS

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics. , v.114(3), p.281-283, 2012.

Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues.

Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JA, Gomez RS, da Costa JE, Moreira PR.

Immunobiology. 2012 Dec 13. pii: S0171-2985(12)00539-6. doi: 10.1016/j.imbio.2012.12.001.

Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma.

FARIAS, LC; GOMES, CC; BRITO, JA; GALVÃO, CF; DINIZ, MG; DE CASTRO, WH; BERNARDES, VF; DE MARCO, L; GOMEZ, RS

Human Pathology (Print). , v. 43, p.1229-33, 2012.

Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma.

MOREIRA, PR; CARDOSO, FP; BRITO, JA; BATISTA, AC; GOMES, CC; GOMEZ, RS

Brazilian Dental Journal, v.22, p.422 - 427, 2011.

Oral cGVHD screening tests in the diagnosis of systemic chronic graft-versus-host disease.

RESENDE, RG; CORREIA-SILVA, JF; ARÃO, TC; BRITO, JA;

BITTENCOURT, H; GOMEZ, RS; ABREU, MHNG

Clinical Oral Investigations, v.16, p.565 - 570, 2011.

Peripheral Calcifying Odontogenic Cyst: A Case Report and Review of the Literature.

RESENDE, RG; BRITO, JA; SOUZA, LN; GOMEZ, RS; MESQUITA, RA

Head and Neck Pathology. , v.5, p.76 - 80, 2011.

DNA methyltransferase expression in odontogenic cysts and tumours.

GOMES, CC; BRITO, JA; ANDRADE, CI; GOMEZ, RS

Oncology Letters. , v.1, p.143 - 146, 2010.

Methylation Pattern of the IFN- γ Gene in Human Dental Pulp.

CARDOSO, FP; VIANNA, MB; SOBRINHO, AP; DINIZ, MG; BRITO, JA;

GOMES, CC; MOREIRA, PR; GOMEZ, RS

Journal of Endodontics. , v.36, p.642 - 646, 2010.

NFATc1 and TNF α expression in giant cell lesions of the jaws.

AMARAL, FR; BRITO, JA; PERDIGÃO, PF; CARVALHO, VM; SOUZA, PEA;
GOMEZ, MV; DE MARCO, L; GOMEZ, RS
Journal of Oral Pathology and Medicine. , v.39, p.269 - 274, 2010.

Reduced expression of mir15a in the blood of patients with oral squamous cell carcinoma is associated with tumor staging.

BRITO, JA; GOMES, CC; PIMENTA, FJ; BARBOSA, AA; PRADO, MA;
PRADO, VF; GOMEZ, MV; GOMEZ, RS
Experimental and Therapeutic Medicine., v.1, p.217 - 221, 2010.

Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours.

MOREIRA, PR; GUIMARÃES, MM; GOMES, CC; DINIZ, MG; BRITO, JA;
CASTRO, WH; GOMEZ, RS
Archives of Oral Biology. , v.54, p.893 - 897, 2009.

Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts.

MOREIRA, PR; GUIMARÃES, MM; GUIMARÃES, ALS; DINIZ, MG; GOMES, CC; BRITO, JA; GOMEZ, RS
Journal of Oral Pathology and Medicine. , v.38, p.99 - 103, 2009.

Artigos aceitos para publicação

Artigos submetidos para publicação

Quantification of cytokines and periodontal pathogens in alcohol dependente individuals with periodontitis

Journal of Periodontology

Trabalhos publicados em anais de eventos:

Association between expression levels of microRNAs and histopathologic features of dysplasia in oral leukoplakia

BRITO, JA, GOMES, CC, SILVA, TF, DE PAULA, AMB, GOMEZ, RS.
16th International Congress on Oral Pathology and Medicine and 20th Congress of Oral Medicine and Pathology, 2012.

Relationship between expression levels of miRNAs and histopathologic features of dysplasia in oral leukoplakia

BRITO, JA, SOUZA, SF, GOMES, CC, GOMEZ, RS
Abstracts of microRNA 2012 International Symposium

Clonal nature of benign and malignant salivary gland neoplasms

BRITO, JA, GOMES, CC, Pereira, CM, AMARAL, FR, BARBOSA, AA, DE MARCO, L, GOMEZ, RS
In: 102nd Meeting of American Association for Cancer Research, 2011, Orlando.

Proceedings of 102nd Meeting of American Association for Cancer Research. Orlando: , 2011. v.52. p.1 - 2

Expressão dos microRNAs let7a, mir15a e mir21 no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, AMARAL, FR, GOMEZ, RS

In: XVIII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral, 2010, Belém - PA.

Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Bucal. , 2010. v.1. p.128 - 128

Padrão de Metilação e Expressão do Gene IFN- γ em Polpa Dental Humana

CARDOSO, FP, GOMES, CC, GOMEZ, RS, BRITO, JA, DINIZ, MG, VIANNA, MB, MOREIRA, PR, SOBRINHO, AP

In: 27 Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Aguas de Lindóia.

Brazilian Oral Research. , 2010. v.24. p.288 – 288

Estudo Molecular e Imuno-histoquímico das neoplasias de glândulas salivares

GOMES, CC, DINIZ, MG, BRITO, JA, BORGES, ER, BARBOSA, AA, MORGAN, P, ODELL, E, GOMEZ, RS, DE MARCO, L

In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG, 2009, Belo Horizonte.

Arquivos em Odontologia. , 2009. v.45.

Expressão de NFATC1 e TNF em lesões de células gigantes dos maxilares

AMARAL, FR, BRITO, JA, GOMEZ, MV, DE MARCO, L, BORGES, ER, GOMEZ, RS

In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG, 2009, Belo Horizonte.

Arquivos em Odontologia. , 2009. v.45.

Expressão dos microRNAs Let7a e mir15a no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, PIMENTA, FJ, BARBOSA, AA, GOMEZ, RS

In: IAOP - Seção Latinoamericana e Caribenha 2009, 2009, São Pedro.

Anais da IAOP - Seção Latinoamericana e Caribenha 2009. , 2009. p.58

Expressão dos microRNAs let7a e mir15a no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, PIMENTA, FJ, BARBOSA, AA, GOMEZ, RS

In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG, 2009, Belo Horizonte.

Arquivos em Odontologia. , 2009. v.45.

Impacto das alterações do WWOX na expressão de p73, Δ NP73, p53, ki67 e ploidia em neoplasias de glândula salivar

GOMES, CC, DINIZ, MG, BRITO, JA, GOMEZ, RS, ODELL, E, DE MARCO, L

In: IAOP - Seção Latinoamericana e Caribenha 2009, 2009, São Pedro.

Anais da IAOP - Seção Latinoamericana e Caribenha 2009. , 2009. p.55 -

Perfil de Metilação dos genes p16, p21, p27, RB1 e p53 nos tumores odontogênicos epiteliais

MOREIRA, PR, GUIMARÃES, MM, GOMES, CC, DINIZ, MG, BRITO, JA, GOMEZ, RS

In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG, 2009, Belo Horizonte.

Arquivos em Odontologia. , 2009. v.45.

Quantificação da Eikenella Corrodens e Prevotella Intermedia através de qPCR em pacientes em tratamento ortodôntico com aumento gengival

PRETTI, H, BRITO, JA, GOMEZ, RS

In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG, 2009, Belo Horizonte.

Arquivos em Odontologia. , 2009. v.45.

Apresentação de Trabalhos:

Association between expression levels of microRNAs and histopathologic features of dysplasia in oral leukoplakia

BRITO, JA, GOMES, CC, SILVA, TF, DE PAULA, AMB, GOMEZ, RS.

16th International Congress on Oral Pathology and Medicine and 20th Congress of Oral Medicine and Pathology, 2012.

Conditional knockout animal model for upper GI tumors

BRITO, JA, Castilho RM, SQUARIZE, CH

Local: School of Dentistry; Cidade: Ann Arbor; Evento: Research Day 2012 - School of Dentistry; Inst.promotora/financiadora: University of Michigan - School of Dentistry

PTEN regulates epithelial stem cell population

ZAGNI, C, BRITO, JA, Castilho RM, SQUARIZE, CH

Local: School of Dentistry; Cidade: Ann Arbor - MI; Evento: Research Day 2012 - School of Dentistry; Inst.promotora/financiadora: University of Michigan - School of Dentistry

Relationship between expression levels of miRNAs and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia

BRITO, JA, SOUZA, S. F., GOMES, CC, GOMEZ, RS

Local: Golden Tulip Park Plaza; Cidade: São Paulo; Evento: microRNA 2012 International Symposium

Clonal nature of benign and malignant salivary gland neoplasms

BRITO, JA, GOMES, CC, Pereira, CM, AMARAL, FR, BARBOSA, AA, DE MARCO, L, GOMEZ, RS

Local: Orange County International Convention Center; Cidade: Orlando - Flórida - USA; Evento: 102nd Meeting of American Association for Cancer Research; Inst.promotora/financiadora: American Association for Cancer Research - AACR

Expressão dos microRNAs let7a, mir15a e mir21 no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, AMARAL, FR, GOMEZ, RS

Local: Estação das Docas; Cidade: Belém; Evento: XVIII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Estomatologia e Patologia Bucal

Expressão dos microRNAs let7a e mir15a no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, PIMENTA, FJ, BARBOSA, AA, GOMEZ, RS

Local: Faculdade de Odontologia - UFMG; Cidade: Belo Horizonte; Evento: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Odontologia – UFMG

Expressão dos microRNAs let7a e mir15a no carcinoma de células escamosas de boca

BRITO, JA, GOMES, CC, BARBOSA, AA, PIMENTA, FJ, GOMEZ, RS

Local: São Pedro; Cidade: São Pedro - SP; Evento: IAOP - Seção LatinoAmericana e Caribenha 2009; Inst.promotora/financiadora: International Association of Oral Pathologist – IAOP

Anexo D: Parecer do comitê de ética

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

Parecer nº. ETIC 518/07

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

DECISÃO

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

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo E: Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TLCE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “**microRNA no carcinoma de células escamosas de boca**”. Para esse estudo, preciso coletar um pedaço de gengiva proveniente da cirurgia de extração do seu dente. O material coletado será utilizado como controle do estudo de alterações genéticas em carcinoma de células escamosas de boca. Esse procedimento não irá interferir em nada na sua recuperação e na condução do caso. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde e nem terá custos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas destas doenças.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / ____

NOME DO PACIENTE
RESPONSÁVEL

NOME DO

ASSINATURA DO PACIENTE
RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO

DOCUMENTO APRESENTADO: _____
No. _____

Pesquisadores: **Ricardo Santiago Gomez/ João Artur Ricieri Brito**.
Telefone: (31) 34992477 / 87435148.

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