

Catarina Alexandre da Rocha Rodrigues

**microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2018



Catarina Alexandre da Rocha Rodrigues

**microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2018

Catarina Alexandre da Rocha Rodrigues

**microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral**

*“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa,  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
grau de Mestre em Medicina Dentária.”*

---

(Catarina Alexandre da Rocha Rodrigues)

Porto, 2018

## RESUMO

O cancro oral representa o sexto tipo de cancro mais frequente a nível mundial, estando associado a índices de mortalidade elevados, que se devem, em parte, ao seu diagnóstico tardio. Para contrariar este facto, novas formas de diagnóstico e de prognóstico desta patologia têm sido estudadas.

Os microRNAs, que se encontram desregulados no cancro oral, têm despertado interesse enquanto biomarcadores da carcinogénese oral.

O presente trabalho teve como objetivo analisar o papel dos microRNAs no cancro oral, indicando alguns dos mais desregulados e verificar o seu potencial como biomarcadores de diagnóstico precoce e prognóstico nesta doença.

Para tal, recorreu-se às bases *PubMed*, *SciELO* e *Elsevier*, para pesquisa de artigos pertinentes e disponíveis em Inglês, Português e Espanhol, publicados entre 2007 e 2018.

Foi possível concluir que os microRNAs constituem bons biomarcadores de deteção precoce e prognóstico do cancro oral, podendo vir a ser uma ferramenta bastante útil na prática clínica.

**PALAVRAS-CHAVE:** “*microRNA*”; “*biomarcadores*”; “*carcinogénese*”; “*cancro oral*”; “*diagnóstico e prognóstico*”; “*carcinoma oral espinocelular*”.

## **ABSTRACT**

Oral cancer is the sixth most common type of cancer worldwide. It's associated with high mortality rates, due in part to its late diagnosis. For this reason, new tools for diagnostic and prognostic have been studied.

MicroRNAs, which are deregulated in oral cancer, have recently gained significant attention due to its potential as biomarkers of early diagnosis and prognosis in this disease.

The aim of this research was to investigate the role of microRNAs in oral cancer, showing some of the most deregulated, as well its potential as biomarkers of early diagnosis and prognosis in this malignancy.

This study was based on a research in PubMed, SciELO and Elsevier databases, limited to complete articles in English, Portuguese and Spanish, published since 2007.

It's possible to conclude that microRNAs are effective biomarkers of early diagnosis and prognosis of oral cancer and can be a useful tool in clinical practice.

**KEY WORDS:** *“microRNA”; “biomarkers”; “carcinogenesis”; “oral cancer”; “diagnostic and prognostic”; “oral squamous cells carcinoma”.*

## DEDICATÓRIA

À minha irmã, *Clara*, pelo carinho, compreensão, cumplicidade e amor incondicional. Obrigada por seres a minha força motriz e por me mostrares o mais puro amor, mesmo nas coisas mais singelas.

Aos meus pais, *Paula e Paulo*, por todos os sacrifícios feitos em prol da minha educação e dos meus estudos. Pelo apoio irrestrito, por me ensinarem os valores certos e por me incentivarem a nunca desistir, mesmo nos momentos de incerteza, dúvidas e luta. São o meu grande pilar.

Aos meus avós maternos, *José e Cidália*, por me auxiliarem a concretizar o início do meu percurso profissional.

*“Segue o teu destino,  
Rega as tuas plantas,  
Ama as tuas rosas.  
O resto é a sombra  
De árvores alheias.”*

Ricardo Reis

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Doutor Carlos Palmeira, pela orientação, interesse e dedicação demonstrados durante a elaboração deste trabalho, bem como pelas valiosas sugestões. Por me ter incentivado a fazer sempre mais e melhor.

À minha coorientadora, Mestre Joana Santos, por toda a ajuda, disponibilidade, dedicação e profissionalismo. Pelos esclarecimentos e conselhos prestados na realização deste projeto, pois, sem a sua contribuição, não teria sido possível alcançar esta conquista.

Ao Ricardo Jacinto, meu amigo e eterno binómio, pela amizade, cumplicidade e paciência. Por ter sido o meu braço direito (e, por vezes, o esquerdo também), por me ter suportado nas alturas insuportáveis e por me ter acompanhado, desde o primeiro dia, nesta jornada, onde partilhamos momentos inolvidáveis, que levo para a vida.

À minha Joana, pela longa e duradoura amizade, bem pelo carinho, apoio e compreensão. Pelas gargalhadas e situações que partilhamos, mas, acima de tudo, pelo alento e coragem nos momentos mais complicados. Pela paciência e perdão das minhas ausências para estudar e trabalhar. Embora tenhamos tomado caminhos diferentes, a tua presença é constante. Obrigada, tu sabes!

Aos meus amigos de curso: Rita Moreira, Inês Neves, Paula Correia, Ana Castro, Beatriz Cunha, Miguel Magalhães, Sara Moreira, Sara Leite, Micaela Ferreira, Sílvia Lopes, Adriana Salgueiro e Eva Aguiar. Pela amizade, companhia, entreajuda, sessões de estudo e galhofa destes cinco anos.

A todos os docentes do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, pela formação e encorajamento para a obtenção de novos conhecimentos. E ainda por incentivarem ao meu crescimento, não só profissional, mas também pessoal.

Aos funcionários da Universidade Fernando Pessoa, pela simpatia, prontidão e carinho prestados ao longo de cinco anos.

Aos restantes que influenciaram, direta ou indiretamente, o meu percurso, o meu obrigada.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO .....	1
1. Materiais e métodos .....	1
II. DESENVOLVIMENTO .....	2
1. Cancro Oral: ponto de situação.....	2
2. Breves noções sobre biomarcadores .....	4
3. Contextualização dos microRNAs.....	5
i. Biogénese dos microRNAs .....	6
ii. Função e mecanismo de ação dos microRNAs .....	6
4. microRNAs no cancro oral .....	7
i. Desregulação dos microRNAs na carcinogénese oral: oncogenes ou supressores tumorais .....	7
5. Uso dos microRNAs enquanto biomarcadores no Cancro Oral .....	9
i. microRNAs: biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no Cancro Oral .....	9
ii. Tipos de amostras usadas para análise dos microRNAs no Cancro Oral.....	10
iii. Limitações dos microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral .....	11
6. Novas perspetivas: Terapêutica baseada em microRNAs .....	11
III. DISCUSSÃO.....	12
IV. CONCLUSÃO .....	14
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
VI. ANEXOS.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Categorias dos biomarcadores (adaptado de Santosh, Jones e Harvey, 2016) .....	24
<b>Figura 2.</b> Esquema da biogénese do microRNA (adaptado de Melo e Esteller, 2011).....	24
<b>Figura 3.</b> Ação do microRNA nas moléculas-alvo (adaptado de Iorio e Croce, 2012) .....	25
<b>Figura 4.</b> Alguns microRNAs desregulados nas diferentes etapas da carcinogénese oral (adaptado de Irimie et al., 2017) .....	25

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais vantagens do uso da saliva e da citologia esfoliativa como amostras para análise dos microRNAs .....	10
<b>Tabela 2.</b> Principais limitações do uso de microRNAs como biomarcadores do Cancro Oral. ....	11
<b>Tabela 3.</b> Revisão dos estudos recentes que avaliam a expressão dos microRNAs em amostras humanas de OSCC (de acordo com os critérios de inclusão mencionados) .....	26
<b>Tabela 4.</b> Ação dos microRNAs no OSCC (de acordo com os critérios de inclusão mencionados) .....	27

## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

AGO2 – *Argonaute 2 protein* (proteína Argonauta 2)

AntagomiR – Antagonista do microRNA

CO – Cancro Oral

DCT – *Dictionary of Cancer Terms* (Dicionário de Termos do Cancro)

DGCR8 – *DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein* (Proteína de ligação da Região Crítica da Síndrome de DiGeorge 8)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

FSMO – Fibrose Submucosa Oral

HNC – *Head and Neck Cancer* (Cancro da Cabeça e Pescoço)

HNSCC – *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* (Carcinoma Espinocelular da Cabeça e Pescoço)

HPV – *Human Papillomavirus* (Papiloma Vírus Humano)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa no Cancro)

IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor 1* (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

IGFR-1 – *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* (Recetor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

LPO – Líquen Plano Oral

MALAT1 – *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1* (Transcrito 1 Associado a Metástases do Adenocarcinoma do Pulmão)

miR/miRNA – MicroRNA

miRbase – Base de dados de microRNA

miRNA\* – MicroRNA complementar

mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

NCI – *National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Cancro – EUA)

ncRNA – *Non-coding RNA* (RNA não-codificante)

OMD – Ordem dos Médicos-Dentistas

OncomiR – *Oncogenic miRNA* (microRNA oncogénico)

OSCC – *Oral Squamous Cell Carcinoma* (Carcinoma Espinocelular Oral)

PACT – *Protein Activator of the Interferon-induced Protein Kinase* (Ativador Proteico da Proteína-quinase Induzida por Interferão)

pH – Potencial de Hidrogénio

pN+ – Presença de metástases nos gânglios linfáticos verificada pela análise anátomo-patológica

Pré-miRNA – *Precursor-miRNA* (microRNA precursor)

Pri-miRNA – *Primary miRNA* (microRNA primário)

qRT-PCR – *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (Transcriptase Reversa quantitativa da Reação em Cadeia da Polimerase)

Ran-GTP – *Ras-related Guanosine Triphosphate binding nuclear protein* (Proteína nuclear relacionada com a Ras ligada à Guanosina trifosfato)

RISC – *RNA-Induced Silencing Complex* (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNAi – *RNA interference* (RNA interferência)

TRBP – *Transactivation Response RNA-binding Protein* (Proteína de ligação ao RNA de Resposta à Transativação)

UTR – *Untranslated Region* (Região não traduzida)

UV – Ultravioleta

XPO-5 – *Exportin-5 protein* (Proteína Exportina-5)

# microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

## I. INTRODUÇÃO

O cancro oral (CO) é uma forma de cancro da cabeça e pescoço (HNC) que representa o sexto tipo de cancro mais frequente em todo o Mundo. Anualmente, são diagnosticados cerca de 300.000 novos casos de tumores nesta localização, a nível mundial. O tipo histológico mais comum é o Carcinoma Espinocelular Oral (OSCC) (Troiano *et al.*, 2016; Irimie *et al.*, 2017).

Apesar do permanente progresso no diagnóstico, no conhecimento do mecanismo molecular e na terapia do cancro, o número de mortes anuais tem-se mantido dentro dos mesmos valores ao longo das últimas três décadas (Irimie *et al.*, 2017). Verifica-se que o diagnóstico precoce assume um papel fulcral no prognóstico do cancro oral (Manasa e Kannan, 2017). Desta forma, a investigação direcionada para a identificação de biomarcadores para um diagnóstico precoce do OSCC e de indicadores de prognóstico são inegavelmente essenciais (Manikandan *et al.*, 2016).

Desde a sua descoberta, os microRNAs têm despertado grande interesse, principalmente na vertente da Oncologia (Almeida, Reis e Calin, 2011). Inúmeros estudos têm demonstrado que os microRNAs possuem um importante papel na carcinogénese oral e podem funcionar como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico do OSCC, e que também aparentam ter potencial para serem utilizados, no futuro, como ferramenta-alvo na terapêutica anti-tumoral (Min *et al.*, 2015).

No entanto, ainda é necessário haver uma padronização, por exemplo, na forma de colheita, processamento e quantidade das amostras, de modo a minimizar as diferenças nos resultados obtidas na quantificação de microRNAs (Cheng, Rees e Wright, 2014; Troiano *et al.*, 2016).

O presente trabalho tem como objetivo analisar o papel dos microRNAs no cancro oral, indicando alguns dos que têm expressão mais desregulada, e verificar o potencial destas moléculas como biomarcadores de diagnóstico precoce e prognóstico nesta patologia.

### 1. Materiais e métodos

Para a elaboração deste projeto, procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos com recurso às bases de dados informáticos *SciELO*, *PubMed* e *Elsevier*. Foram utilizadas as

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

seguintes palavras-chave e combinações entre elas: “*microRNA*”, “*biomarkers*”, “*oral cancer*”, “*oral squamous cell carcinoma*”, “*OSCC*”, “*miRNA AND oral cancer*”, “*microRNA AND OSCC*” e “*microRNA AND oral carcinogenesis*”. Na metodologia de pesquisa, foram considerados artigos publicados desde 2007 até maio de 2018, que estivessem integralmente disponíveis, e redigidos em Inglês, Espanhol ou Português. Nos artigos referentes a estudos *in vivo*, foi, ainda, aplicado o filtro “*human*”, excluindo artigos que não utilizassem amostras biológicas humanas. Foram encontrados 255 artigos que, após a aplicação dos critérios de inclusão anteriormente referidos e análise dos resumos, se descartaram 190 artigos, por não fornecerem informação pertinente para o desenvolvimento deste trabalho ou não respeitarem os critérios de inclusão. Foi realizada, igualmente, uma pesquisa adicional em livros pedagógico-científicos e nos locais eletrônicos de entidades pertinentes, como a Ordem dos Médicos-Dentistas (OMD) e a base de dados eletrônica de microRNAs (miRbase), entre outras, para completar a informação descrita. Adicionalmente, foram consultadas e incluídas referências bibliográficas individuais, retiradas dos artigos inicialmente pesquisados, perfazendo, assim, um total de 83 referências bibliográficas utilizadas neste trabalho.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. Cancro Oral: ponto de situação

O cancro oral (CO) é uma forma de cancro da cabeça e pescoço (HNC), definido pela Classificação Internacional de Doenças como o “*conjunto de tumores malignos que afetam qualquer localização da cavidade oral, dos lábios à garganta, incluindo as amígdalas e a faringe*”. A sua localização mais frequente é no pavimento da boca, bordo lateral da língua e palato mole (OMD, 2017). Representa o sexto tipo de cancro mais frequente em todo o Mundo e, anualmente, são diagnosticados cerca de 300.000 novos casos de tumores localizados na cavidade oral e lábios, sem discriminação do género, a nível mundial (Radhika *et al.*, 2016; Troiano *et al.*, 2016; Irimie *et al.*, 2017).

A forma histológica mais comum do cancro oral é o carcinoma espinocelular (OSCC) – também denominado carcinoma epidermóide, carcinoma escamocelular ou carcinoma das células escamosas –, que se desenvolve a partir de alterações no epitélio escamoso estratificado da mucosa oral (Brener *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2016).

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

O carcinoma espinocelular representa entre 84-87% de todos os casos de cancro oral (Chang *et al.*, 2018). Afeta predominantemente o sexo masculino (em proporções de 2,7:1 na incidência e 3,8:1 na mortalidade em relação ao sexo feminino) e indivíduos com idade superior a 45 anos (Irimie *et al.*, 2017; OMD, 2017). No entanto, tem-se vindo a verificar um aumento na incidência e mortalidade no sexo feminino e em indivíduos mais jovens. De acordo com a literatura, este aumento deve-se, em parte, a uma alteração nos hábitos tabágicos, etílicos e sexuais nos grupos referidos, principalmente nos países desenvolvidos (Santos e Teixeira, 2011b; Gupta *et al.*, 2016).

O cancro oral tem etiologia multifatorial. Porém, o uso de tabaco e consumo de álcool acentuados são os principais fatores etiológicos do cancro oral a nível global. Outros fatores associados ao risco de desenvolvimento de cancro oral são, por exemplo: a má higiene oral, as infeções por HPV de alto risco (principalmente pelos subtipos 16 e 18), a exposição a radiação UV, o trauma recorrente (por próteses desajustadas e dentes fraturados) e as deficiências nutricionais. A predisposição genética e os fatores ambientais estão, também, envolvidos na etiologia do cancro oral. Existe, ainda, evidência de que o hábito de mascar betel relaciona-se com o desenvolvimento desta patologia, sobretudo nos países asiáticos (Petti, 2009; Santos e Teixeira, 2011b; Montero e Patel, 2015; Gupta *et al.*, 2016).

Apesar do permanente progresso no diagnóstico, no conhecimento do mecanismo molecular e na terapia do cancro, o número de mortes anuais causadas por esta malignidade tem-se mantido dentro dos mesmos valores ao longo das últimas três décadas (Irimie *et al.*, 2017). Embora a cavidade oral seja de fácil acesso visual e operacional, o cancro oral ainda é diagnosticado tardiamente, quando já atingiu estádios avançados, muitas vezes com metástases, o que contribui para a baixa taxa de sobrevivência (valores inferiores a 50%) a 5 anos (Cheng, Rees e Wright, 2014; Manikandan *et al.*, 2016; Troiano *et al.*, 2016). Segundo Zahra *et al.*, (2018), a taxa de sobrevivência dos pacientes com CO ronda os 80% se estes forem diagnosticados em estádios iniciais (estádios 0-II), ao passo que esta taxa desce para os 20-40% se diagnosticados em estádios mais avançados (estádio IV).

Estádios primários do OSCC são facilmente controlados através da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, enquanto estádios mais avançados são responsáveis por taxas de mortalidade mais altas e chances mais baixas de os pacientes receberem tratamentos eficazes (Manasa e Kannan, 2017).

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Verifica-se que o diagnóstico precoce assume um papel fulcral no prognóstico do cancro oral (Manasa e Kannan, 2017). Desta forma, e de acordo com Manikandan *et al.*, (2016), a investigação direcionada para a identificação de biomarcadores para um diagnóstico precoce do OSCC, de indicadores de prognóstico e de medidores da resposta ao tratamento e sobrevivência global são inegavelmente essenciais.

### 2. Breves noções sobre biomarcadores

Segundo o Dicionário de Termos do Cancro do Instituto Nacional do Cancro (2018), um biomarcador é “uma molécula biológica encontrada no sangue ou noutros fluidos ou tecidos corporais, que é um sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma condição ou doença”.

Os biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de diagnóstico, biomarcadores de prognóstico e biomarcadores preditivos. Os biomarcadores de diagnóstico permitem encontrar e reconhecer uma certa patologia; os biomarcadores de prognóstico são utilizados para verificar o estado da doença, indicando, ainda a probabilidade de recorrência; já os biomarcadores preditivos permitem avaliar a resposta a um determinado agente terapêutico (Kulasingam e Diamandis, 2008).

Os biomarcadores são amplamente organizados em genómicos, proteómicos ou metabólicos, e podem ser ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, alterações enzimáticas, anticorpos, metabolitos, lípidos e hidratos de carbono, produzidos pelas células patológicas ou devido a outros processos que ocorrem derivados da patologia inicial (**figura 1 – em anexo**). Estes podem ser colhidos de um ou da combinação dos seguintes fluidos biológicos: sangue, soro, plasma, secreções corporais (expetoração e saliva) ou excrementos (urina e fezes) (Kulasingam e Diamandis, 2008; Santosh, Jones e Harvey, 2016).

Um dos maiores desafios na investigação do cancro é a identificação de biomarcadores estáveis, que possam ser rotineiramente medidos em amostras facilmente colhidas (Wang *et al.*, 2014). As amostras de fluidos biológicos para a investigação podem ser obtidas através de métodos não invasivos, minimamente invasivos ou invasivos (Henry e Hayes, 2012).

### 3. Contextualização dos microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas endógenas de cadeia simples de RNA não-codificante (ncRNA), com cerca de 18-25 ribonucleótidos de comprimento, que pertencem a uma classe abundante de moléculas reguladoras filogeneticamente conservadas e que regulam negativamente a expressão génica ao nível pós-transcricional (Manasa e Kannan, 2017; El-Sakka, Kujan e Farah, 2018). Atualmente, já foram descritos cerca de 1917 miRNAs no genoma humano (miRbase, 2018).

Até há cerca de três décadas, a existência e importância dos miRNAs eram completamente desconhecidas. Até essa data, a comunidade científica estava focada apenas nos genes codificantes de proteínas. O dogma clássico (em que o DNA é transcrito em RNA, que por sua vez é traduzido em proteínas) deixou de parte o estudo das sequências não codificantes de proteínas (Almeida, Reis e Calin, 2011). Apenas em 1993, num estudo em *Caenorhabditis elegans*, dirigido por Lee *et al.*, se descobriu o primeiro miRNA, o *lin-4*, e, em 2000, Slack *et al.* descobriram o *let-7*. Ambos os miRNAs regulavam o tempo de divisão e diferenciação das células estaminais daqueles animais. No entanto, só em 2001, a biogénese do miRNA foi compreendida, através dos estudos de Grishok *et al.* e de Hutvagner *et al.*, que sugeriram o envolvimento de componentes da via do RNAi, como a enzima Dicer, na maturação dos miRNAs, permitindo compreender a biogénese e o mecanismo de ação destas moléculas, abrindo, assim, portas para uma contínua investigação dos miRNAs (Almeida, Reis e Calin, 2011).

Desde a sua descoberta, os miRNAs têm despertado grande interesse, principalmente na vertente da Oncologia. Relativamente aos miRNAs no cancro, o primeiro estudo sugestivo do seu papel nesta doença foi publicado em 2002, referente à Leucemia Linfocítica Crónica, mas foi em 2005 que se percebeu que os miRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores do tumor e que estão envolvidos em inúmeras vias que se encontram desreguladas no cancro (Almeida, Reis e Calin, 2011).

Inúmeros estudos têm demonstrado que os miRNAs possuem um importante papel na carcinogénese oral e funcionam como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico do OSCC, podendo ser utilizados na terapêutica anti-tumoral (Min *et al.*, 2015).

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

### i. Biogénese dos microRNAs

A biogénese dos miRNAs começa no núcleo da célula, sofre modificações pós-transcricionais e termina no citoplasma (Santos, Gil da Costa e Medeiros, 2018). Inicialmente, os miRNAs são transcritos a partir de genes codificantes de miRNA pela enzima RNA polimerase II ou III, em longas moléculas de miRNAs primários (pri-miRNAs) (Manasa e Kannan, 2017). Os pri-miRNAs são processados no núcleo pela enzima Drosha e pelo cofator DGCR8 (proteína de ligação ao RNA de cadeia dupla) em um ou mais miRNAs precursores (pré-miRNAs), com cerca de 65-85 pares de base (Medina e Slack, 2008). Depois do processamento nuclear, os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma através da via XPO-5 e Ran-GTP. No citoplasma, os pré-miRNAs são clivados pela enzima Dicer, em associação com a TRBP e com a PACT, formando RNAs de cadeia dupla, com cerca de 22 pares de base. Esta cadeia é composta pelo miRNA funcional e o complementar (miRNA\*). A cadeia funcional é ligada à proteína AGO2 e incorporada no complexo RISC, guiando este complexo para o mRNA-alvo (Santos, Gil da Costa e Medeiros, 2018). O miRNA\* é, normalmente, degradado, mas estudos recentes sugerem que talvez também possa ser selecionado como cadeia funcional e participar significativamente nos processos biológicos (**figura 2 – em anexo**) (Melo e Esteller, 2011; Krol, Loedige e Filipowicz, 2010; Iorio e Croce, 2012).

### ii. Função e mecanismo de ação dos microRNAs

Estima-se que os miRNAs sejam responsáveis por cerca de 30 a 50% da regulação génica humana ao nível pós-transcricional (Momen-Heravi *et al.*, 2014). Um único miRNA pode regular a expressão e/ou função de centenas de mRNAs e proteínas-alvo e, conseqüentemente, regular vários processos biológicos (Min *et al.*, 2015).

Em geral, a função dos miRNAs é regular negativamente a expressão génica. A região 5' do miRNA liga-se à região 3' UTR do mRNA-alvo, onde se encontram os elementos de reconhecimento (Irimie *et al.*, 2017; Santos, Gil da Costa e Medeiros, 2018). Consoante a complementaridade das sequências do miRNA e do mRNA, a função do miRNA sobre o mRNA varia. Se a complementaridade for perfeita, o miRNA induz a clivagem do mRNA; se a complementaridade for parcial (situação mais comum), o miRNA reprime a tradução. Ambas as situações induzem o silenciamento do mRNA, pois impedem a síntese da proteína codificada pelo mRNA afetado (**figura 3 – em anexo**) (Iorio e Croce, 2012; Santos, Gil da Costa e Medeiros, 2018).

### 4. microRNAs no cancro oral

#### i. Desregulação dos microRNAs na carcinogénese oral: oncogenes ou supressores tumorais

A cavidade oral é constantemente afetada por agressões bacterianas, víricas e fúngicas, bem como por agressões ambientais variadas. Estas agressões contribuem para alterações a nível da expressão de genes na cavidade oral e das suas interações (Kulkarni *et al.*, 2017).

Cerca de metade dos miRNAs humanos estão localizados em regiões frágeis do genoma, que estão associadas ao desenvolvimento do cancro. A expressão dos microRNAs que se localizam nas zonas frágeis fica alterada, uma vez que estas zonas sofrem frequentemente quebras cromossómicas, amplificações e perda de heterozigotia (em que existe perda de um alelo supressor funcional que, posteriormente, caso ocorram mutações no outro alelo, podem iniciar o processo carcinogénico) (Chamorro *et al.*, 2015; Momen-Heravi e Bala, 2018). Os miRNAs sofrem regulação transcricional e pós-transcricional, e a sua desregulação afeta processos celulares-chave, como a apoptose, diferenciação, proliferação, e invasão e migração celular, uma vez que os miRNAs regulam a expressão de moléculas que são responsáveis por estes processos. (Min *et al.*, 2015). Dada, então, a sua função nos processos biológicos, os miRNAs estão ativamente envolvidos na manutenção da integridade genómica (Irimie *et al.*, 2017).

O cancro é um processo com múltiplas fases: na fase de iniciação, as células normais sofrem um dano genómico permanente, que resulta da exposição a um agente carcinogénico. Na fase da promoção, estas células alteradas aumentam a capacidade de proliferação, o que pode contribuir para a acumulação de mutações adicionais, potenciando a transformação maligna. A progressão sucede quando as células malignas adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes e metastizar para outros locais distantes. Os genes relacionados com o desenvolvimento de cancro podem ser classificados em oncogenes ou supressores tumorais (Macfarlane e Murphy, 2010; Santos e Teixeira, 2011a).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que uma expressão anormal dos miRNAs está relacionada com o comportamento do cancro (**figura 4 – em anexo**). Esta anormalidade na expressão, como referido anteriormente, pode dever-se a alterações cromossómicas, alterações

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

no controlo transcricional, defeitos na biogénese dos miRNAs ou ainda alterações epigenéticas (Liu *et al.*, 2011; Irimie *et al.*, 2017). Os miRNAs podem funcionar tanto como supressores ou indutores (oncomiRs) tumorais, dependendo dos seus mRNAs-alvo (Zhang *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2013; Chamorro *et al.*, 2015).

Até ao momento, o miR-21 é o miRNA mais estudado ao nível do OSCC. Este miRNA, que atua como oncomiR, tem um papel importante no desenvolvimento do cancro. Participa na proliferação celular e na regulação da apoptose, através da supressão da Tropomiosina 1, que funciona como supressor tumoral, em casos de Carcinoma Espinocelular da Língua (Irimie *et al.*, 2017; Yao e Lin, 2012). Cervigne *et al.*, (2009) demonstrou que o miR-21 está sobre-expresso na leucoplasia progressiva e no OSCC, mas não na mucosa normal. Mehdipour *et al.*, (2018) concluiu que em casos de líquen plano oral (LPO), este miRNA se encontra, igualmente, sobre-expresso. Também o estudo de Singh *et al.*, (2018) constatou que o miR-21 está aumentado em pacientes com fibrose submucosa oral (FSMO) e com OSCC.

Outro oncomiR que está relacionado com a proliferação e apoptose celular é o miR-31. Este miRNA encontra-se aumentado no plasma pré-operatório de pacientes com OSCC, comparativamente com o plasma recolhido após a ressecção do tumor dos mesmos pacientes (Liu *et al.*, 2010), e em estádios primários de OSCC, em relação às amostras de tecido normal (Siow *et al.*, 2013).

Por outro lado, também há estudos que apuram a função dos miRNAs enquanto supressores tumorais. O miR-125b, que diminui a proliferação celular através, por exemplo, da inibição da MALAT1, apresenta-se diminuído em pacientes com OSCC, sendo que esta diminuição é mais significativa quanto mais avançado o estádio do tumor (Shiiba *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2014; Chang e Hu, 2017). De igual modo, o miR-125a está sub-expresso no OSCC comparativamente com o tecido normal, facilitando o crescimento e proliferação tumoral (Tiwari *et al.*, 2014).

Da mesma forma, o miR-375 pode inibir o crescimento celular, induzir a paragem nas fases G0 e G1 do ciclo celular e aumentar a apoptose, pela ligação ao recetor da IGF-1 (IGFR-1). No entanto, encontra-se diminuído no tecido tumoral. A sub-expressão de miR-375 está associada a estádios mais avançados da doença, com tumores de maior tamanho e mais invasivos (Siow *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

## **microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral**

Assim, relativamente à carcinogénese, a sobre-expressão de certos miRNAs pode resultar na sub-expressão de genes supressores do tumor, promovendo, assim, o desenvolvimento do tumor. Por outro lado, a expressão de alguns miRNAs supressores tumorais está diminuída, levando, assim, à sobre-expressão de oncogenes e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do tumor (Ahmad *et al.*, 2013).

### **5. Uso dos microRNAs enquanto biomarcadores no Cancro Oral**

#### **i. microRNAs: biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no Cancro Oral**

Estudos recentes têm pesquisado as funções de diversos miRNAs na carcinogénese oral e estudado o seu papel enquanto biomarcadores de diagnóstico ou de prognóstico (Irimie *et al.*, 2017). A evidência dos miRNAs enquanto moduladores da expressão génica identifica-os como candidatos a indicadores de diagnóstico e prognóstico, bem como possíveis alvos terapêuticos (Cheng, 2015).

Os miRNAs possuem características que os classificam como marcadores tumorais ideais, como a sua estabilidade em condições que, normalmente, degradariam a maioria dos RNAs – altas temperaturas e valores extremos de pH, por exemplo –, a facilidade na sua deteção e a associação com parâmetros de prognóstico clínico-patológicos (Heneghan, Miller e Kerin, 2010; Chawla *et al.*, 2015; Cheng, 2015).

Tem-se tornado evidente que as alterações na expressão de alguns miRNAs se relacionam com o grau de malignidade e o estágio do cancro. Tal revela-se importante para o conhecimento exato da agressividade da doença e, conseqüentemente, para uma abordagem terapêutica mais eficaz (Oom, Humphries e Yang, 2014).

Segundo um estudo de Liu *et al.*, (2011), o miR-31 encontra-se aumentado na saliva de pacientes com OSCC, sendo detetado mesmo em tumores iniciais e com a mesma sensibilidade de tumores avançados, sugerindo o potencial deste miRNA como biomarcador de diagnóstico. De igual forma, estudos sobre o miR-29a constataram que este se encontra sub-expresso no soro de pacientes com lesões orais de alto risco (MacLellan *et al.*, 2012) e em amostras de

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

tecido de pacientes com carcinoma espinocelular da língua (Lu *et al.*, 2014). Assim, o uso dos miRNAs enquanto biomarcadores do diagnóstico pode ter dois propósitos básicos: um diagnóstico mais precoce e um diagnóstico mais eficiente (Oom, Humphries e Yang, 2014).

A invasão e a metastização do cancro oral estão intimamente relacionadas com o prognóstico da doença, uma vez que uma maior capacidade de invasão e metastização estão associadas a um pior prognóstico clínico do paciente. Por esta razão, torna-se crucial verificar o papel dos miRNAs nestes processos (Chang *et al.*, 2013).

Huang *et al.*, (2014) averiguou que a sub-expressão de miR-491-5p está relacionada com um comportamento mais invasivo do OSCC e com menor sobrevivência dos pacientes. De forma semelhante, níveis elevados de miR-181 em pacientes com OSCC (quer no plasma, quer nos tecidos) associam-se a metástases mais avançadas, invasão vascular e pior prognóstico (Cheng-Chieh *et al.*, 2011).

### ii. Tipos de amostras usadas para análise dos microRNAs no Cancro Oral

Para a análise dos miRNAs enquanto biomarcadores, é possível utilizar qualquer tipo de amostra biológica. No entanto, para o diagnóstico precoce e tendo por base o contacto direto com as lesões orais, pretende-se uma forma não invasiva de recolha de amostras, como a saliva ou a citologia esfoliativa (Fontes *et al.*, 2008; Yoshizawa e Wong, 2013). A **tabela 1** indica as principais vantagens do uso da saliva e do esfregaço oral (citologia esfoliativa) como amostras para a análise dos microRNAs (Fontes *et al.*, 2008; Radhika *et al.*, 2016).

<b>Tabela 1. Principais vantagens do uso da saliva e da citologia esfoliativa como amostras para análise dos microRNAs</b>
Fácil acesso
Fácil recolha das amostras (não requerem grande experiência por parte do clínico)
Conforto e aceitação do paciente
Não requer qualquer tipo de anestesia
Colheita rápida e de baixo custo
Minimizar o risco de sangramento e de infeção, comparativamente com métodos invasivos

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

### iii. Limitações dos microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Embora os miRNAs demonstrem potencial como novos métodos de diagnóstico e prognóstico no cancro oral, ainda existem limitações na sua utilização clínica (Cheng, Rees e Wright, 2014). A **tabela 2** resume os principais problemas referidos na literatura (Cheng, Rees e Wright, 2014; Troiano *et al.*, 2016; Adami, Tang e Markiewicz, 2017).

<b>Tabela 2. Principais limitações do uso de microRNAs como biomarcadores do Cancro Oral</b>
Falta de padronização nos métodos de colheita, processamento e armazenamento das amostras
Dificuldade no diagnóstico causada pela heterogeneidade intra-tumoral
Falta de validação dos biomarcadores em condições específicas: presença de condições inflamatórias, presença de outros tipos de cancro, entre outras
Diferenças nos valores obtidos nos diversos métodos de quantificação dos miRNAs e nos diferentes tipos de amostras
Dificuldade em atribuir a desregulação de um dado miRNA a uma patologia em particular

### 6. Novas perspectivas: Terapêutica baseada em microRNAs

Um grande número de miRNAs humanos já foi relacionado com vários cancros, evidenciando o papel oncogénico ou supressor tumoral destas moléculas. Tendo por base esta consideração, o desenvolvimento de novas tecnologias e formas de controlo da modulação da expressão dos miRNAs representa um avanço na terapia oncológica (Nicolas *et al.*, 2011)

A aplicação terapêutica dos miRNAs envolve, essencialmente, duas estratégias. A primeira visa inibir os oncomiRs, usando miRNAs antagonistas, os antagomiRs. Já a segunda envolve a introdução de um miRNA que mimetiza a ação de um supressor tumoral (Bader, Brown e Winkler, 2010).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de explorar a forma terapêutica dos miRNAs nos diversos tipos de cancro, no entanto, relativamente ao OSCC, ainda não existem dados suficientes da sua aplicabilidade. Referem-se, em particular, os estudo de Rather *et al.*, (2013) e de Zhang *et al.*, (2017). Rather *et al.*, (2013) concluiu, *in vitro*, que a introdução do antagomiR-155 em células tumorais de OSCC resulta no aumento da apoptose, promovendo a

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

diminuição tumoral. Já Zhang *et al.*, (2017) verificou, igualmente *in vitro*, que a introdução de uma molécula que mimetiza a ação do miR-375, para além de reduzir o crescimento, aumenta a radiosensibilidade das células de OSCC, abrindo portas para um contínuo estudo e investigação nesta área.

### III. DISCUSSÃO

O cancro oral é uma patologia de origem multifatorial e crescente a nível mundial, representando o sexto tipo de cancro mais frequente em todo o Mundo. O tipo histológico mais comum é o carcinoma espinocelular. Embora tenha uma localização de fácil acesso, ainda é diagnosticado tardiamente, o que aumenta as taxas de morbilidade e mortalidade (Brenner *et al.*, 2007; Troiano *et al.*, 2016; OMD, 2017). Desta forma, a investigação direcionada para a identificação de biomarcadores para um diagnóstico precoce do OSCC e do seu prognóstico são essenciais (Manikandan *et al.*, 2016).

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de cadeia simples de RNA não-codificante, com cerca de 18-25 ribonucleótidos de comprimento que regulam negativamente a expressão génica ao nível pós-transcricional (El-Sakka, Kujan e Farah, 2018). Estima-se que os miRNAs sejam responsáveis por cerca de 30 a 50% da regulação génica humana ao nível pós-transcricional (Momen-Heravi *et al.*, 2014). Um único miRNA pode regular a expressão e/ou função de centenas de mRNAs, induzindo a sua clivagem ou reprimindo a tradução, dependendo da forma de ligação ao mRNA-alvo (Min *et al.*, 2015; Santos, Gil da Costa e Medeiros, 2018).

No cancro oral, os miRNAs encontram-se desregulados, quer por sobre-expressão (oncogenes), quer por sub-expressão (supressores tumorais) (Irimie *et al.*, 2017).

Esta desregulação altera os processos biológicos de apoptose, proliferação, diferenciação, invasão e migração celular, promovendo o desenvolvimento do cancro (Min *et al.*, 2015).

Inúmeros estudos têm sido efetuados com o intuito de verificar a expressão dos miRNAs no OSCC (**tabela 3 – em anexo**). Destes, podem-se mencionar os estudos recentes de Fu *et al.*, (2017), Mehdipour *et al.*, (2018) e Singh *et al.*, (2018), que verificaram que, no OSCC, existe a sobre-expressão de miR-155, miR-31 e miR-21, respetivamente. Também a sub-expressão de

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

alguns miRNAs está presente no OSCC, comparativamente com amostras saudáveis. Destacam-se os miR-125b, miR-9 e miR-143, referidos, respetivamente, por Peng *et al.*, (2014), Sun *et al.*, (2016) e Sun e Zhang, (2017). Pode-se concluir, então, que os oncogenes miR-155, miR-31 e miR-21 e os supressores tumorais miR-125b, miR-9 e miR-143 estão intimamente ligados ao cancro oral.

Também a ação dos miRNAs nas diferentes fases da carcinogénese oral tem sido objeto de estudo (**tabela 4 – em anexo**). MiRNAs que atuem preferencialmente na regulação da apoptose, crescimento e proliferação celular relacionam-se com fases iniciais da carcinogénese, constituindo bons biomarcadores de diagnóstico. Normalmente, estes miRNAs também se encontram desregulados em condições orais com potencial de malignização. Singh *et al.*, (2018) verificou que o miR-21 se encontra aumentado em casos de FSMO, tal como em casos de OSCC. Também Mehdipour *et al.*, (2018) concluiu que o miR-125a se encontra diminuído em pacientes com LPO e em pacientes com OSCC. Assim, valida-se que estes miRNAs estão associados à progressão maligna de algumas condições orais e à iniciação de OSCC, funcionando como biomarcador de diagnóstico precoce e permitindo um acompanhamento mais atento destas condições.

Já miRNAs que estejam relacionados com a invasão e metastização celular podem ser utilizados como biomarcadores de prognóstico. Peng *et al.*, (2014) concluiu que, em pacientes pN+, a baixa expressão de miR-218 está associada a um aumento de metástases à distância, desfavorecendo o prognóstico, enquanto aumento do microRNA Let-7g prediz maior possibilidade de sobrevivência em pacientes com estadiamento T3-T4.

Há cerca de 1917 miRNAs no genoma humano. No entanto, ainda não existem estudos referentes ao papel de todos os miRNAs no cancro oral, pelo que se propõe uma contínua investigação neste sentido.

Os miRNAs possuem características que os classificam como marcadores tumorais ideais, como a sua estabilidade a altas temperaturas e valores extremos de pH, a facilidade na sua deteção e a associação com parâmetros de prognóstico clínico-patológicos (Heneghan, Miller e Kerin, 2010; Chawla *et al.*, 2015; Cheng, 2015). No entanto, continuam a existir algumas limitações, como a falta de padronização de processamento das amostras e a heterogeneidade intra-tumoral, que condicionam o seu avanço como ferramenta clínica. Uma vez mais, urge a

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

necessidade de pesquisas mais aprofundadas para ultrapassar estes problemas e para que a sua implementação clínica seja realizada.

Apesar de um grande número de estudos ser baseado em análises de tecido excisionado, para o diagnóstico precoce, é fundamental a existência de técnicas de recolha de amostras não invasivas. Por terem contacto direto com as lesões orais, serem fáceis de recolher e terem boa aceitação por parte dos pacientes, a saliva e a citologia esfoliativa representam amostras eficazes para a deteção dos miRNAs (Yoshizawa e Wong, 2013).

Atualmente, existem diversas técnicas para a deteção de miRNAs, incluindo a qRT-PCR, hibridização *in situ*, *northern blotting* ou *microarrays*. A qRT-PCR é a técnica *gold-standard*, sendo a mais utilizada, pois é a técnica mais sensível e específica, seguindo-se da técnica de *microarray* (Lan *et al.*, 2015).

A terapia baseada em miRNAs, atualmente, é foco de um crescente estudo e desenvolvimento tecnológico, tendo-se descoberto as duas principais estratégias na sua atuação: por inibição de oncomiRs, repondo, assim, a função dos mRNAs supressores tumorais, ou por introdução de um miRNA supressor tumoral, inibindo os oncogenes (Bader, Brown e Winkler, 2010; Nicolas *et al.*, 2011). Contudo, ainda é necessária uma investigação mais aprofundada neste campo, antes de estar disponível enquanto opção terapêutica a nível clínico.

O médico-dentista tem um papel fundamental na deteção precoce de lesões orais malignas, bem como no acompanhamento atento das condições com alto risco de malignização.

Os estudos referentes aos miRNAs demonstram perspectivas positivas para o seu uso na prática clínica, particularmente na área do diagnóstico (Chamorro *et al.*, 2015; Zahra *et al.*, 2018). Desta forma, aconselha-se que o médico-dentista se mantenha atualizado quanto às novas ferramentas de diagnóstico baseadas em miRNAs, tornando-se importante o seu conhecimento e estudo acerca destas moléculas.

## IV. CONCLUSÃO

É essencial diminuir as taxas de mortalidade e morbidade associadas ao diagnóstico tardio do cancro oral. Para tal, o uso de novas ferramentas de diagnóstico precoce e de prognóstico têm despertado grande interesse e vários estudos neste sentido têm sido realizados.

## **microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral**

Os miRNAs, pelo seu papel na carcinogénese oral enquanto oncogenes ou supressores tumorais, têm potencial para serem utilizados como biomarcadores do cancro oral, quer como biomarcadores de diagnóstico, quer de prognóstico, pois a sua desregulação permite inferir a possibilidade de transformação maligna de uma lesão prévia, a deteção do cancro oral em fases iniciais e, em casos em que o cancro oral já se encontra desenvolvido, permite também verificar a possibilidade de metastização e o prognóstico clínico dos pacientes.

Atualmente, a pesquisa dos miRNAs passa igualmente pelo estudo de novas formas terapêuticas baseadas nestas moléculas, de forma a diminuir a sua desregulação e limitar a progressão tumoral.

Para o médico-dentista, a existência de uma forma fácil de colheita, através da saliva ou de um esfregaço da mucosa oral, que permite a deteção do cancro oral constitui uma mais-valia clínica, permitindo-lhe um acompanhamento mais atento e eficaz e a referenciação atempada do doente para os serviços especializados.

Embora seja uma área recente e em constante evolução, é necessário realizar mais pesquisas a fim de verificar a existência de desregulações específicas de miRNAs no carcinoma oral espinocelular, bem como no âmbito da terapêutica desta patologia, uma vez que existe pouca informação disponível na literatura.

Em suma, a aplicação recorrente dos miRNAs na prática clínica para o diagnóstico precoce parece estar cada vez mais próxima, havendo a expectativa de diminuir a mortalidade associada à descoberta tardia do cancro e aumentar a qualidade de vida dos doentes.

**V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adami, G. R., Tang, J. L. e Markiewicz, M. R. (2017). Improving Accuracy Of RNA-Based Diagnosis And Prognosis Of Oral Cancer By Using Noninvasive Methods. *Oral Oncology*, 69, pp. 62–67.

Ahmad, J. *et al.* (2013). MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(4), pp. 680–694.

Almeida, M. I., Reis, R. M. e Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), pp. 1–8.

Bader, A. G., Brown, D. e Winkler, M. (2010). The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Research*, 70(18), pp. 7027–7030.

Brener, S. *et al.* (2007). Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(1), pp. 63–69.

Cervigne, N. K. *et al.* (2009). Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Human Molecular Genetics*, 18(24), pp. 4818–4829.

Chamorro, A. C. *et al.* (2015). micro-RNAs e câncer: Abordagens e perspectivas. *Pnas*, 16(2), pp. 119–124.

Chang, C.-C. *et al.* (2013). MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 49(9), pp. 923–931.

Chang, S.-M. e Hu, W.-W. (2017). Long non-coding RNA MALAT1 promotes oral squamous cell carcinoma development via microRNA-125b/STAT3 axis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), pp. 3384-3396.

Chang, Y.-A. *et al.* (2018). A Three–MicroRNA Signature as a Potential Biomarker for the Early Detection of Oral Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), pp. 758-775.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Chawla, J. P. S. *et al.* (2015). Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein–Barr virus and human papillomaviruses: With special reference to oral cancer. *Oral Oncology*, 51(8), pp. 731–737.

Cheng-Chieh, Y. *et al.* (2011). miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(5), pp. 397–404.

Cheng, G. (2015). Circulating miRNAs : Roles in cancer diagnosis , prognosis and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 81, pp. 75–93.

Cheng, Y.-S. L., Rees, T. e Wright, J. (2014). Salivary biomarkers - A review. *Clinical and Transational Medicine*, 3(3), pp. 210–212.

El-Sakka, H., Kujan, O. e Farah, C. S. (2018). Assessing miRNAs profile expression as a risk stratification biomarker in oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Oral Oncology*, 77, pp. 57–82.

Fontes, K. B. F. C. *et al.* (2008). Contribuição da citopatologia para o diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 44, pp. 17–24.

Fu, S. *et al.* (2017). MiR-155 regulates oral squamous cell carcinoma Tca8113 cell proliferation, cycle, and apoptosis via regulating p27Kip1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(5), pp. 937–944.

Grishok, A. *et al.* (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), pp. 23-24.

Gupta, N. *et al.* (2016). Changing Trends in oral cancer – a global scenario Citation. *Nepal J Epidemiol*, 6(4), pp. 613–619.

Heneghan, H. M., Miller, N. e Kerin, M. J. (2010). MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(5), pp. 543–550.

Henry, N. L. e Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 6(2), pp. 140–146.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Huang, W. C. *et al.* (2014). MiRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research*, 74(3), pp. 751–764.

Hung, P.S. *et al.* (2013). miR-146a Enhances the Oncogenicity of Oral Carcinoma by Concomitant Targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB Genes. *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1-17.

Hutvagner, G. *et al.* (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531), pp. 834-838.

Iorio, M. V e Croce, C. M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33(6), pp. 1126–1133.

Irimie, A. I. *et al.* (2017). A looking-glass of non-coding RNAs in oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), pp. 1–28.

Jing, Y. e Xu, B. (2017). Decreased expression of miR-153-3p in oral squamous cell carcinoma contributes to cell migration and invasion. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(5), pp. 6117–6129.

Krol, J., Loedige, I. e Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), pp. 597–610.

Kulasingam, V. e Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, p. 588.

Kulkarni, V. *et al.* (2017). MicroRNAs: Emerging players in oral cancers and inflammatory disorders. *Tumor Biology*, 39(5), pp. 1-12.

Lambert, R. *et al.* (2011). Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 23(8), pp.633-641.

Lan, H. *et al.* (2015). MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *BioMed Research International*. 2015. pp.1-17.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. e Ambros, V. (1993), The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *CellPress*, 75, pp. 843-854.

Lin, S.C. *et al.* (2016). Up-regulation of miR-187 modulates the advances of oral carcinoma by targeting BARX2 tumor suppressor. *Oncotarget*, 7(38), pp. 61355–61365.

Liu, C. *et al.* (2012), Exploiting salivary *miR-31* as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 34(2), pp. 219-224.

Liu, C. *et al.* (2010). Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Diseases*, 16(4), pp. 360–364.

Liu, C.-J. *et al.* (2017). Plasma miR-187\* is a potential biomarker for oral carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 21(4), pp. 1131–1138.

Liu, J. *et al.* (2011). microRNAs, an active and versatile group in cancers. *International Journal of Oral Science*, 3(4), pp. 165–175.

Lu, L. *et al.* (2014). MicroRNA-29a upregulates MMP2 in oral squamous cell carcinoma to promote cancer invasion and anti-apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(1), pp. 13–19.

Macfarlane, L. e Murphy, P. R. (2010). MicroRNA : Biogenesis , Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), pp. 537–561.

MacLellan, S. A. *et al.* (2012). Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Medicine*, 1(2), pp. 268–274.

Manasa, V. G. e Kannan, S. (2017). Impact of microRNA dynamics on cancer hallmarks: An oral cancer scenario. *Tumor Biology*, 39(3), pp. 1-14.

Manikandan, M. *et al.* (2016). Oral squamous cell carcinoma: MicroRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism. *Molecular Cancer*, 15(28), pp.1-17.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

- Medina, P. P. e Slack, F. J. (2008). microRNAs and cancer: An overview. *Cell Cycle*, 7(16), pp. 2485–2492.
- Mehdipour, M. *et al.* (2018). Diagnostic and prognostic relevance of salivary microRNA-21, -125a, -31 and -200a levels in patients with oral lichen planus - a short report. *Cellular Oncology*, 41(3), pp. 329–334.
- Melo, S. A. e Esteller, M. (2011). Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Letters*, 585(13), pp. 2087–2099.
- Min, A. *et al.* (2015). MicroRNAs as important players and biomarkers in oral carcinogenesis. *BioMed Research International*, 2015, pp. 1-10.
- miRbase. (2018). miRBase: DataBase. [em linha]. Disponível em < [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)>. [consultado em 17-07-2018].
- Momen-Heravi, F. *et al.* (2014). Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(7), pp. 1517–1527.
- Momen-Heravi, F. e Bala, S. (2018). Emerging role of non-coding RNA in oral cancer. *Cellular Signalling*. Elsevier, 42, pp. 134–143.
- Montero, P. H. e Patel, S. G. (2015). Cancer of the oral cavity. *Oxford Handbook of Oncology*, 24(3), pp. 448–446.
- NCI. Dictionary of Cancer Terms. [em linha]. Disponível em < <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>>. [consultado em 16-06-2018]
- Ni, Z. *et al.* (2015). Decreased microRNA-143 expression and its tumor suppressive function in human oral squamous cell carcinoma. *Genetics and Molecular Research*, 14(142), pp. 6943–6952.
- Nicolas, F. E. *et al.* (2011). Silencing Human Cancer: Identification and Uses of MicroRNAs. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 6(1), pp. 94–105.
- OMD. (2017). Folhetos educativos: Cancro Oral. [em linha]. Disponível em < <https://www.ond.pt/content/uploads/2017/12/folheto-ond-cancro-oral.pdf>>. [consultado em 14-05-2018].

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Oom, A. L., Humphries, B. A. e Yang, C. (2014). MicroRNAs: Novel players in cancer diagnosis and therapies. *BioMed Research International*, 2014, pp. 1-13.

Osamu, B. *et al.* (2015). MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(4), pp. 248–255.

Peng, S. C. *et al.* (2014). MicroRNAs MiR-218, MiR-125b, and Let-7g predict prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(7), pp. 1–9.

Petti, S. (2009). Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology*, 45(4–5), pp. 340–350.

Radhika, T. *et al.* (2016). Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma – An insight. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, Suppl, pp. 51–54.

Rather, M. I. *et al.* (2013). Oncogenic MicroRNA-155 Down-regulates Tumor Suppressor CDC73 and Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation: IMPLICATIONS FOR CANCER THERAPEUTICS. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(1), pp. 608–618.

Ries, J. *et al.* (2014). miR-186, miR-3651 and miR-494: Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood. *Oncology Reports*, 31(3), pp. 1429–1436.

Santos, J. M. O., Gil da Costa, R. M. e Medeiros, R. (2018). Dysregulation of cellular microRNAs by human oncogenic viruses – Implications for tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(2), pp. 95–105.

Santos, L. L. and Teixeira, L. M. (2011a). Biopatologia do Cancro Oral. *In: Oncologia Oral*. Lisboa, Lidel, pp. 7-10

Santos, L. L. and Teixeira, L. M. (2011b). Cancro Oral: a Dimensão do Problema. quem são os Doentes de Risco? *In: Oncologia Oral*. Lisboa, Lidel, pp. 3-6

Santosh, A., Jones, T. e Harvey, J. (2016). A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), pp. 486–492.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Shiiba, M. *et al.* (2013). MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 108(9), pp. 1817–1821.

Singh, P. *et al.* (2018). Circulating MicroRNA-21 Expression as a Novel Serum Biomarker for Oral Sub-Mucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(4), pp. 1053–1058.

Siow, M. *et al.* (2013). Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Diseases*, 20(4), pp. 345–351.

Slack, F.J. *et al.* (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, pp. 901-906

Sun, L. *et al.* (2016). Association of Decreased Expression of Serum miR-9 with Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Medical Science Monitor*, 22, pp. 289–294.

Sun, X. e Zhang, L. (2017). MicroRNA-143 suppresses oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion and glucose metabolism through targeting hexokinase 2. *Bioscience Reports*, 37(3), pp. 1-10.

Tavares, C. *et al.* (2016). Perfil epidemiológico das neoplasias orais malignas numa população da região norte de Portugal. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial*, 57(4), pp. 229–235.

Tiwari, A. *et al.* (2014). MicroRNA-125a Reduces Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Targeting Estrogen-related Receptor  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), pp. 32276–32290.

Troiano, G. *et al.* (2016). Circulating miRNAs from blood, plasma or serum as promising clinical biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review of current findings. *Oral Oncology*, 63, pp. 30–37.

Wang, J. *et al.* (2014). Tumor-Associated circulating micrnas as biomarkers of cancer. *Molecules*, 19(2), pp. 1912–1938.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

Xu, H. *et al.* (2016). Serum miR-483-5p: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, 37(1), pp. 447–453.

Yan, B. *et al.* (2012). Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 6(3), pp. 675–681.

Yao, T. e Lin, Z. (2012). miR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, pp. 248-260

Yoshizawa, J. M. e Wong, D. T. W. (2013). Salivary MicroRNAs and Oral Cancer Detection. *Methods in Molecular Biology*, 936, pp. 313–324.

Zahra, A. *et al.* (2018). Meta-Analysis of miRNAs and Their Involvement as Biomarkers in Oral Cancers. *BioMed Research International*, 2018, pp. 1-9.

Zhang, B. *et al.* (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), pp. 1–12.

Zhang, B. *et al.* (2017). MicroRNA-375 Inhibits Growth and Enhances Radiosensitivity in Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting Insulin Like Growth Factor 1 Receptor. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(5), pp. 2105–2117.

VI. ANEXOS

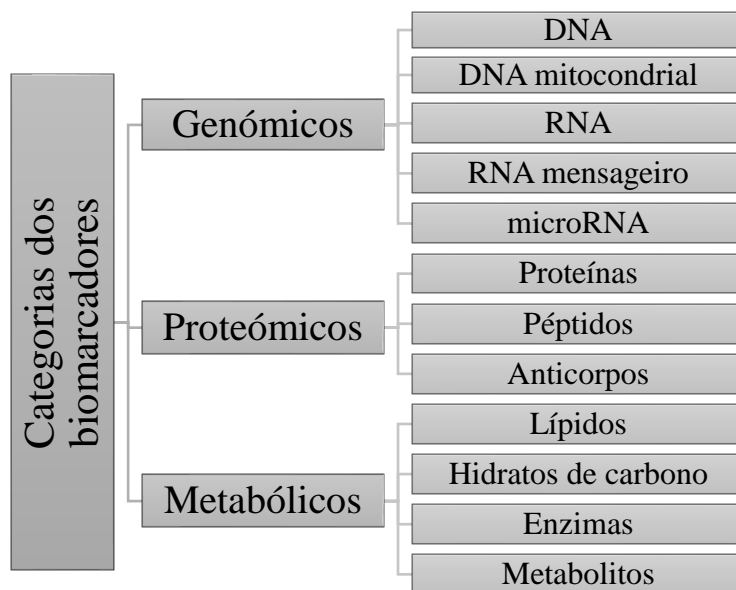


Figura 1. Categorias dos biomarcadores (adaptado de Santosh, Jones e Harvey, 2016)

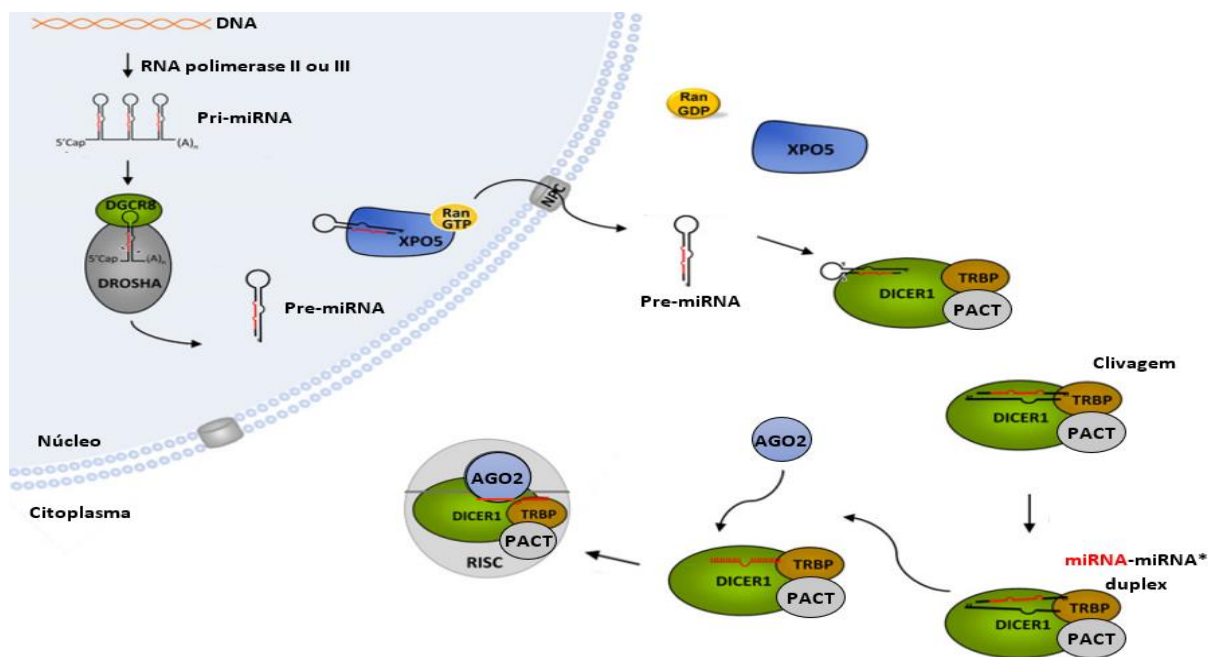


Figura 2. Esquema da biogénese dos microRNAs (adaptado de Melo e Esteller, 2011)

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

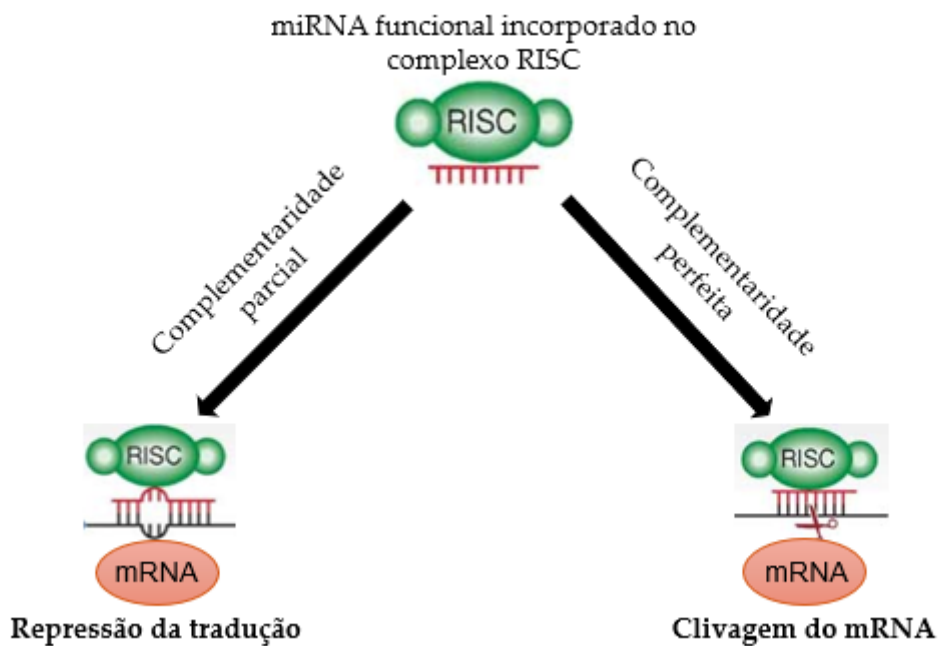


Figura 3. Ação do microRNA nas moléculas-alvo (adaptado de Iorio e Croce, 2012)

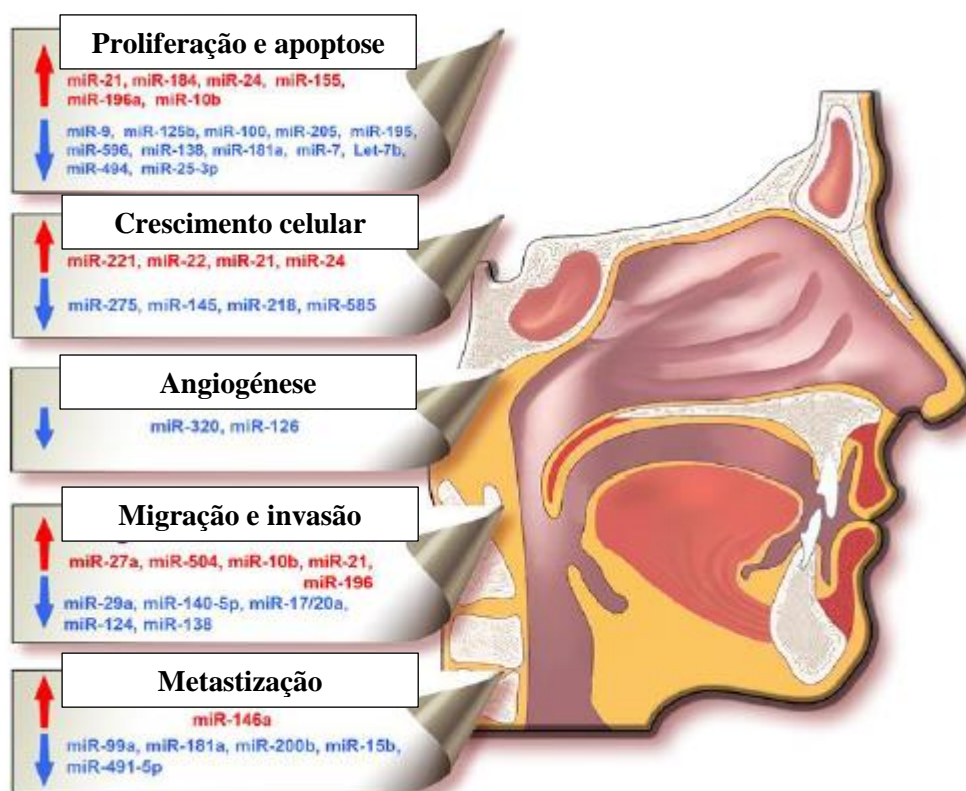


Figura 4. Alguns microRNAs desregulados nas diferentes etapas da carcinogénese oral (adaptado de Irimie *et al.*, 2017)

As setas vermelhas, apontando para cima, indicam sobre-expressão e as setas azuis, apontando para baixo, indicam sub-expressão.

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

**Tabela 3. Revisão dos estudos recentes que avaliam a expressão dos microRNAs em amostras humanas de OSCC (de acordo com os critérios de inclusão mencionados)**

miRNA estudado	Tipo de amostra	Expressão no OSCC	Oncogene ou supressor tumoral	Referência bibliográfica
miR-375	Tecido	Diminuída	Supressor	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
miR-155	Tecido	Aumentada	Oncogene	(Rather <i>et al.</i> , 2013)
miR-146a	Tecido e Plasma	Aumentada	Oncogene	(Hung <i>et al.</i> , 2013)
miR-491-5p	Tecido	Diminuída	Supressor	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
miR-155	Tecido	Aumentada	Oncogene	(Fu <i>et al.</i> , 2017)
miR-187	Tecido	Aumentada	Oncogene	(Lin <i>et al.</i> , 2016)
miR-218	Tecido	Diminuída	Supressores	(Peng <i>et al.</i> , 2014)
miR-125b				
Let-7g				
miR-483-5p	Soro	Aumentada	Oncogene	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
miR-143	Tecido	Diminuída	Supressor	(Ni <i>et al.</i> , 2015; Sun e Zhang, 2017)
miR-125b	Tecido	Diminuída	Supressor	(Shiiba <i>et al.</i> , 2013)
miR-99a	Tecido	Diminuída	Supressor	(Yan <i>et al.</i> , 2012)
miR-9	Soro	Diminuída	Supressor	(Sun <i>et al.</i> , 2016)
miR-155-5p	Tecido	Aumentada	Oncogene	(Osamu <i>et al.</i> , 2015)
miR-31	Plasma e Saliva	Aumentada	Oncogene	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
miR-153-3p	Tecido	Diminuída	Supressor	(Jing and Xu, 2017)
miR-21	Soro	Aumentada	Oncogene	(Singh <i>et al.</i> , 2018)
miR-181a miR-181b	Tecido e Plasma	Aumentada	Oncogenes	(Cheng-Chieh <i>et al.</i> , 2011)
miR-187*	Tecido e Plasma	Aumentada	Oncogene	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
miR-186	Sangue	Diminuída	Supressor	(Ries <i>et al.</i> , 2014)
miR-3651		Aumentada	Oncogene	
miR-494		Aumentada	Oncogene	
miR-21	Saliva	Aumentada	Oncogene	(Mehdipour <i>et al.</i> , 2018)
miR-125a		Diminuída	Supressor	
miR-31		Aumentada	Oncogene	
miR-200a		Diminuída	Supressor	

## microRNAs como biomarcadores no Cancro Oral

<b>Tabela 4. Ação dos microRNAs no OSCC (de acordo com os critérios de inclusão mencionados)</b>		
<b>miRNA estudado</b>	<b>Ação no OSCC</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
miR-375	A sua sub-expressão induz o crescimento, inibe a apoptose e diminui a radiosensibilidade das células tumorais	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
miR-155	Níveis elevados inibem a apoptose e promovem a proliferação celular tumoral	(Rather <i>et al.</i> , 2013)
miR-146a	Concentrações elevadas promovem um crescimento tumoral mais rápido e aumentam a incidência de metástases nos gânglios linfáticos do pescoço	(Hung <i>et al.</i> , 2013)
miR-491-5p	Níveis baixos estão relacionados com maior capacidade de invasão, metastização e com menor sobrevivência dos pacientes com OSCC	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
miR-155	Valores mais elevados predizem um aumento do bloqueio da apoptose e aumento da proliferação das células tumorais	(Fu <i>et al.</i> , 2017)
miR-187	Concentrações mais altas associadas a metástases nos gânglios linfáticos, pelo que promove a proliferação e migração celular	(Lin <i>et al.</i> , 2016)
miR-218	Valores diminuídos destes miRNAs predizem piores valores de sobrevivência em pacientes pT3-T4, pN+ e estádios pIII e pIV.	(Peng <i>et al.</i> , 2014)
miR-125b		
Let-7g		
miR-483-5p	Valores elevados indicam maior capacidade de metastização e diferenciação tumoral, relacionando-se com pior prognóstico	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
miR-143	Sub-expressão de miR-143 aumenta a proliferação celular, inibe a apoptose e promove a migração e invasão celular	(Ni <i>et al.</i> , 2015; Sun e Zhang, 2017)
miR-125b	Valores diminuídos aumentam a proliferação celular e diminuem a radiosensibilidade	(Shiiba <i>et al.</i> , 2013)
miR-99a	A sub-expressão relaciona-se com o crescimento celular das células tumorais	(Yan <i>et al.</i> , 2012)
miR-9	Valores diminuídos indicam aumento da possibilidade de transformação maligna de leucoplasias e progressão de OSCC	(Sun <i>et al.</i> , 2016)
miR-155-5p	Valores altos estão relacionados com a recorrência de OSCC e com metastização	(Osamu <i>et al.</i> , 2015)
miR-31	Valores aumentados em pacientes T1/T2, N0 e estádios I e II, indicando a sua relação com a iniciação e progressão de OSCC	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
miR-153-3p	Valores elevados indicam maior capacidade de metastização e baixa sobrevivência dos pacientes	(Jing and Xu, 2017)
miR-21	Valores aumentados indicam maior possibilidade de transformação maligna em pacientes com fibrose submucosa oral. Também se relaciona com a progressão de OSCC	(Singh <i>et al.</i> , 2018)
miR-181a miR-181b	Níveis altos favorecem a migração celular e conseqüentemente a metastização. A sobre-expressão conjunta indica pior prognóstico	(Cheng-Chieh <i>et al.</i> , 2011)
miR-187*	A sobre-expressão promove a migração e formação de colónias de células tumorais. Piora o prognóstico dos doentes cujos valores não diminuem no pós-operatório	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
miR-186	Níveis baixos de miR-186 em associação a níveis elevados de miR-3651 e miR-494 relacionam-se com a presença de OSCC. Sem mais dados quanto à ação na carcinogénese e quanto ao prognóstico	(Ries <i>et al.</i> , 2014)
miR-3651		
miR-494		
miR-21	Valores diminuídos de miR-125a e aumentados de miR-21 indicam pior prognóstico no líquen plano oral, aumento o risco de progressão para OSCC. Sem dados para os restantes miR.	(Mehdipour <i>et al.</i> , 2018)
miR-125a		
miR-31		
miR-200a		