



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE INTEGRADA ENTRE DADOS DE EXPRESSÃO GLOBAL DE
TRANSCRITOS CODIFICADORES E DE miRNAs EM CARCINOMAS
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LARINGE**

RAINER MARCO LOPEZ LAPA

Botucatu - São Paulo

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE INTEGRADA ENTRE DADOS DE EXPRESSÃO GLOBAL DE
TRANSCRITOS CODIFICADORES E DE miRNAs EM CARCINOMAS
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LARINGE**

Mestrando: Rainer Marco Lopez Lapa

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – (Genética).

Botucatu - São Paulo

2014



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lopez Lapa, Rainer Marco.

Análise integrada entre dados de expressão global de transcritos codificadores e de miRNAs em carcinomas de células escamosas de laringe / Rainer Marco Lopez Lapa. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Capes: 20205007 1.

Carcinoma de células escamosas. 2. Expressão gênica. 3. Microarranjos de DNA. 4. Vírus do papiloma. 5. Laringe - Câncer.

Palavras-chave: Carcinomas de células escamosas de laringe (CCEL); Expressão gênica; Microarray; Vírus do papiloma humano (HPV); miRNAs.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu irmão
Ronald Joel Lopez Lapa, e aos pacientes que participaram do estudo.**

*“Um intelectual é alguém que, de hábito, não se distingue exatamente por seu intelecto.
Atribui tal qualitativo a si mesmo para compensar a impotência natural que intui em
suas capacidades”.*

(CARLOS RUIZ ZAFÓN)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Silvia Regina Rogatto pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e orientação conjunta, e por suprir todos os aspectos envolvidos nessa tese. Especialmente pela inspiração no nível científico, acadêmico e moral de como fazer ciência. Perfil cientista que levarei como orgulho no meu coração.

A Deus por me abençoar sempre e por colocar pessoas boas no meu caminho com as quais compartilho ideais e objetivos em comum. Pelas portas que foram abertas para mim apesar das dificuldades e momentos tristes sempre me confortando e me encaminhando pelos caminhos certos da vida, sempre com fé esperança obrigado Deus.

Aos meus pais Fortunato Lopez Valer e Justina Lapa Pocomucha pela educação, sustento, conselhos e paciência.

Aos meus irmãos William, Luis, Ronald (*in memorian*), Liz e Shanaya pelo apoio, cuidado, amizade e carinho. Que sempre acreditaram nas minhas decisões e me incentivaram a continuar no mundo da ciência.

À Camila da Silva Ferreira por sua paciência e compreensão durante a realização deste trabalho. Sua presença, amor, carinho e senso de humor peculiar me ajudaram muito!

A todos os integrantes (Mateus, Fábio, Hellen, Juan, Luiza, Maísa, Mariana, Priscila M, Rolando, Sandra, Sara, Tatiane e Caroline) do laboratório Neogene, pela grande amizade que criamos e sustentamos nesses anos de convivência, aprendendo e colaborando muito uns com os outros.

Ao Fábio Albuquerque Marchi, pela assistência nas análises de bioinformática.

Ao Mateus Camargo Barros, pela assistência nas análises de estatísticas.

A todos os funcionários do CIPE, em especial a Graziela Spilborghs e Rogério Nazário pela atenção a todos que necessitaram de sua ajuda.

À Dra. Dirce Maria Carraro, Dr. Antônio Hugo Campos e a todos os funcionários do Biobanco do AC Camargo Cancer Center, pelo processamento de tecidos e extração de ácidos nucleicos, nos fornecendo materiais de excelente qualidade.

Ao AC Camargo Cancer Center por ter me aberto as portas para desenvolver o meu projeto

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e colaborarem com seus conhecimentos e experiências profissionais.

Aos pacientes que nos proporcionaram material biológico para o estudo.

À Biblioteca e os funcionários Pós-graduação - IBB, UNESP, Botucatu.

E por fim, ao Conselho Nacional de desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de laringe (CCEL) é um dos mais comuns que acometem a região da cabeça e pescoço, representando aproximadamente 25% dos tumores malignos desta localização anatômica. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento deste tumor são o consumo de tabaco e álcool, história familiar e a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) em uma parcela dos casos. A ocorrência de segundos tumores primários e metástases é frequentemente relatada nos CCEL. Entretanto, até o momento, não há marcadores moleculares úteis na prática clínica que sejam capazes de prever a progressão e a evolução clínica da doença. Neste contexto, as plataformas de microarranjos de oligonucleotídeos (*microarrays*), têm possibilitado uma análise mais ampla na busca por marcadores de detecção precoce, progressão, resposta e risco de recorrência e metástase. Foram incluídos neste estudo 88 amostras de CCEL de pacientes não tratados. O grupo teste foi composto por 35 CCEL avaliados previamente para expressão gênica global (8x60K, Agilent Technologies) e 33 para a expressão de miRNAs (plataforma Array 8x60K, Agilent Technologies). O grupo de validação foi formado por 33 amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFPE) e 19 amostras de tumor a fresco. O grupo teste foi avaliado para genotipagem para o HPV (*LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test*, Roche), resultando em dois casos positivos para HPV16. A análise de expressão de transcritos revelou 1.680 genes diferencialmente expressos comparados aos tecidos normais de laringe (necrópsias). A análise de expressão global de miRNAs revelou 89 miRNAs diferencialmente expressos na comparação entre tecido normal e tumoral. A integração entre os dados de transcritos codificadores e de miRNAs (correlação negativa $r < 0$) revelou alterações recorrentes em um subgrupo de genes associados com a degradação de componentes da matriz extracelular (*MMP3*, *MMP9*, *MMP10*, *MMP13*, *COL10A1* e *COL3A1*) e em processos neoplásicos (*CAV1*, *ERBB4*, *HLF*, *HMG2*, *HOXB6*, *KLF2*, *PDCD4*, *PPP1R3* e *TOP2*), assim como seus respectivos reguladores epigenéticos (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b-5p*, *hsa-miR-143-3p*, *hsa-miR-93-5p*, *hsa-miR-92a-3p* e *hsa-let-7c-5p*). Estes miRNAs e genes foram confirmados em bancos de dados externos. Cinco miRNAs (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b-5p* e *hsa-miR-92a-3p*) e 10 genes (*COL3A1*, *COL10A1*, *ERBB4*, *HMG2*, *HLF*, *TOP2A*, *MMP3*, *MMP13*, *MMP10* e *PPP1R3*) foram confirmadas por RT-qPCR em um grupo independente de amostras por RT-qPCR. Os achados obtidos da análise integrada apontam para novos marcadores moleculares úteis no prognóstico e terapia dos CCEL.

ABSTRACT

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is one of the most common head and neck malignancies representing approximately 25% of the tumors located in this region. Risk factors associated to development of LSCCs include alcohol and tobacco consumption, family history of cancer and human papilloma virus (HPV) infection. Second primary tumors and metastasis are frequently observed in patients with LSCC. To date, no useful molecular markers have been described that can successfully predict disease progression and clinical outcome. In this context, large scale molecular studies enable a global analysis of tumor molecular alterations aiming to reveal biomarkers for early diagnosis, prognosis and response to therapy. LSCC samples were obtained from 88 untreated patients. Global gene (Array platform 8x60K, Agilent Technologies) and miRNA expression (Array platform 8x60K, Agilent Technologies) profiles were evaluated in 35 and 33 samples, respectively (Test group, N=36). An independent group of samples (N=33, validation group) was included, being 33 formalin fixed and paraffin embedded tissue samples and 19 fresh frozen tissues. HPV genotyping using LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche) was performed in tumor samples from test group. Only two cases were HPV16-positive. The expression analysis revealed 1,680 differentially expressed genes in tumors compared to normal tissue (pool of normal laryngeal samples from necropsies). The miRNA analysis revealed 89 miRNAs differentially expressed. Integrative transcriptome and miRNAs analysis data (negative correlation $r < 0$) revealed a subset of altered genes associated with the degradation of extracellular matrix components (*MMP3*, *MMP9*, *MMP10*, *MMP13*, *COL10A1* and *COL3A1*) and neoplastic processes (*CAVI*, *ERBB4*, *HLF*, *HMGGA2*, *HOXB6*, *KLF2*, *PDCD4*, *PPP1R3* and *TOP2*), as well as their putative miRNA regulators (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b-5p*, *hsa-miR-143-3p*, *hsa-miR-93-5p*, *hsa-miR-92a-3p* and *hsa-let-7c-5p*). Five miRNAs (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b-5p* and *hsa-miR-92a-3p*) and 10 genes (*COL3A1*, *COL10A1*, *ERBB4*, *HMGGA2*, *HLF*, *TOP2A*, *MMP3*, *MMP13*, *MMP10* and *PPP1R3*) were evaluated by RT-qPCR in an independent sample group (validation group). In addition, these altered miRNAs and candidate genes were confirmed as altered in the tumor samples cohort deposited in TCGA database. This study confirmed the findings obtained by integrative analysis revealing potential molecular biomarkers that could be useful in clinical practice.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinomas de laringe.....	1
1.3 Alterações histopatológicas, citogenéticas e moleculares em carcinomas de laringe.....	3
1.4 Análise de perfis de expressão gênica global em CCECP.....	8
1.5 Expressão de miRNAs em carcinomas de laringe.....	11
1.6 Análise de integração de dados em larga escala de miRNAs e mRNAs.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	18
4.1 Casuística.....	18
4.2 Características clínicas e histopatológicas.....	19
4.3 Genotipagem deHPV.....	19
4.4 Análise de expressão global de genes codificadores.....	26
4.5 Expressão global de miRNAs.....	26
4.6 Busca por subtipos moleculares em câncer de laringe.....	28
4.7 Validação pelo pelo banco TCGA (<i>The Cancer Genome Atlas</i>).....	28
4.8 Análise de Predição de Alvos.....	28
4.9 Análise integrada entre dados de expressão global de transcritos codificadores e de miRNAs.....	29
4.10 Análise de expressão de transcritos selecionados por RT-qPCR.....	30
4.11 Análise de expressão de microRNAs (miRNA).....	32
4.12 Seleção de referências e normalização da expressão relativa de miRNAs obtidos por RT-qPCR.....	33
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Análise de Expressão de Transcritos e miRNAs.....	36
5.2 Validação de transcritos codificadores e miRNA pelo banco de dados TCGA.....	37
5.3 Análises <i>insilico</i> de vias canônicas alteradas.....	40
5.4 Análise integrada dos dados globais de expressão de transcritos e de miRNAs.....	42
5.5 Análises <i>in silico</i> de vias e redes com genes regulados por miRNAs.....	45
5.6 Predição de alvos de tratamento usados no tratamento do câncer.....	47

5.7	Comparação dos resultados com dados clínicos patológicos	49
5.8	Confirmação dos achados por RT-qPCR	53
6.	DISCUSSÃO	55
7.	CONCLUSÕES	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9.	FIGURAS SUPLEMENTARES	105
10.	TABELAS SUPLEMENTARES	110

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas de laringe (CCEL) é uma doença com alta morbidade e mortalidade, sendo considerado o nono tipo de câncer em incidência mundial (Bray *et al.*, 2013). Esta neoplasia compreende 25% dos tumores malignos que acometem a região da cabeça e pescoço e 2% de todas as doenças malignas. A prevalência de CCEL é maior no sexo masculino (7:1) e a idade média de acometimento da doença é de 60 anos (Ferlay *et al.*, 2010).

Em 2011, foram estimados 156.000 novos de CCEL no mundo, com uma sobrevida estimada de cinco anos em aproximadamente 50% dos casos (Jemal *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos, estima-se a ocorrência de aproximadamente 12.000 novos casos anualmente, sendo 10.000 em homens e 2.630 em mulheres (Siegel *et al.*, 2013). No Brasil, o câncer de laringe é o oitavo tumor mais incidente, sendo as cidades de São Paulo e Porto Alegre aquelas que apresentam a maior incidência. Para o ano de 2014, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimouem aproximadamente 7.640 novos casos de câncer de laringe, com um risco estimado de sete casos a cada 100.000 homens (Inca, 2014).

1.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinomas de laringe

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço são o consumo de tabaco e álcool, sendo reconhecido que a laringe é o órgão mais suscetível aos malefícios causados pelo tabagismo (Freedman *et al.*, 2007). Estes dois hábitos potencializam consideravelmente o risco de desenvolvimento da doença (Das and Vasudevan, 2007; Haas *et al.*, 2012; Varela-Rey *et al.*, 2013). Outros fatores etiológicos associados ao desenvolvimento deste tumor são o histórico familiar, dieta, radiação, infecção pelo vírus do papiloma humano (do inglês, *human papillomavirus* - HPV) e inflamação crônica da laringe causada pelo refluxo gastroesofágico (Garavello *et al.*, 2009; Duray *et al.*, 2011; Parkin, 2011; Tae *et al.*, 2011; Garavello *et al.*, 2012). O refluxo gastroesofágico é um fator etiológico de alta prevalência na população e tem sido associado com o desenvolvimento de carcinomas de laringe. Aproximadamente 80% dos pacientes portadores de lesões pré-cancerosas ou malignas relatam associação com o refluxo gastroesofágico (Lewin *et al.*, 2003). No entanto, não existem evidências suficientes para estabelecer uma associação direta do refluxo como fator de risco no carcinoma de laringe, pois os efeitos do

consumo de tabaco e álcool podem mascarar o dano causado pelo refluxo nos pacientes que apresentam os três fatores de risco(Coca-Pelaz *et al.*, 2013).

Gong *et al.*(2013) propuseram que a composição bacteriana da cavidade oral pode ser um fator de risco em CCEL. Os autores mostraram que a microbiota nos pacientes com CCEL difere em relação ao grupo controle e que 15 gêneros de bactérias podem ser associados aos CCEL ($p < 0.001$). Bactérias como *Prevotella* e *Fusobacterium* poderiam contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença. Um estudo anterior destes pesquisadores revelou que a infecção pelo *Helicobacter pylori* também estava envolvida no processo tumoral, uma vez que esta bactéria estava presente na maioria dos pacientes estudados(Gong *et al.*, 2012). A composição bacteriana e o CCEL provavelmente interatuam como causa e efeito nos diferentes estágios da doença.Recentemente, Thomas *et al.*(2014) analisaram a microflora de 24 indivíduos demonstrando que o uso contínuo de tabaco ou de álcool e tabaco reduz significativamente a microflora bacteriana. Como consequência, isso poderia levar a uma diminuição na variabilidade inter-grupos tornando o microambiente mais homogêneo em termos de composição bacteriana o que resultaria em risco aumentado de desenvolvimento de doenças da cavidade oral, incluindo o câncer.

A associação entre a infecção pelo HPV e o risco de desenvolver carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CECCP) tem sido estudada desde o início da década de 80, sugerindo o envolvimento dos oncogenes virais *E6* e *E7* como mediadores da carcinogênese do trato aerodigestivo superior (Syrjänen, 2005). Um levantamento de dados da literatura em carcinomas orais, orofaringe e laringe abordando os subtipos virais HPV16 e HPV18, revelou que não existe uma correlação com tipo histológico, grau e idade dos pacientes, mas foi observada maior prevalência desses subtipos de HPV em pacientes com metástase (Wei *et al.*, 2012).

Alguns estudos tem relatado a associação positiva entre a infecção pelo HPV e carcinomas de laringe(Baumann *et al.*, 2009; Bozdayi *et al.*, 2009) e também em lesões benignas da laringe(Gallo *et al.*, 2009). A relação entre a infecção pelo HPV e a alteração da expressão de proteínas do ciclo celular (p16, p53 e ciclina D1) foi avaliada em grupos heterogêneos de câncer de laringe HPV positivos e negativos(Stasikowska-Kanicka *et al.*, 2011). Os autores relataram a diminuição da expressão da proteína p53, assim como, o aumento de expressão de p16 e ciclina D1 no grupo HPV positivo comparado com o grupo HPV negativo. Estes dados sugerem que o HPV também tem um papel importante na perda de regulação do ciclo celular nestes tumores. Há evidências que pacientes HPV16 positivos

respondem melhor a quimioterapia e apresentam uma maior sobrevida livre de doença (DFS, do inglês *Disease Free Survival*) e diminuição das taxas de recorrência. Estes dados sugeriram que a infecção pelo HPV16 pode ser um marcador a ser considerado na preservação do órgão afetado durante a escolha do tratamento (Shaughnessy *et al.*, 2014).

1.3 Localização anatômica, diagnóstico e tratamento em carcinomas de laringe

Histologicamente, mais de 95% das neoplasias de laringe são classificadas como carcinomas de células escamosas, sendo observadas em qualquer sítio anatômico da laringe (supraglote, glote, subglote e transglote), sendo o mais frequentes na glote.

A laringe, além de possuir peculiaridades anatômicas, está situada perto da rede linfonodal da cabeça e pescoço, a qual é subdividida em regiões (I-VI). Esta conformação espacial facilita a invasão em linfonodos, por exemplo, um tumor na subglote atinge o linfonodo da região VI e um tumor de supraglote atinge linfonodos localizados na região II, III e V os quais estão associados com pior prognóstico (Medina *et al.*, 2011).

Ao diagnóstico 7% dos pacientes com carcinoma de laringe já apresentam metástase à distância. O pulmão é o sítio mais comumente acometido (83%), outro órgão é o fígado (17%) e metástases em outros locais ocorrem em 3% dos casos. A metástase em pulmão está relacionada com pior prognóstico (Liu *et al.*, 2003).

O tratamento dos pacientes diagnosticados com CCEL varia dependendo do estágio patológico da doença. Nos estágios 0, I e II, o esquema de tratamento é baseado em radioterapia, quimioterapia, cirurgia a laser e hemilaringectomias. Em carcinomas de glote grau I, Yamazaki *et al.* (2006) relataram que uma dose de radiação de 2.25 Gy (radiação ionizante absorvida) tem melhores resultados e diminui reações adversas geradas pela dose de radiação de 2.0 Gy em tempos prolongados. Entre os casos avançados, estágios III e IV, os esquemas de tratamento são radioterapia e quimioterapia em combinação seguidos de laringectomia total ou parcial (Pfister *et al.*, 2014). A quimioterapia usada para tratar pacientes com CCEL baseado no uso individual ou em combinação de drogas como Cisplatina, 5-Fluorouracil, Carboplatina, Docetaxel, Metotrexato e Cetuximabe (anti EGFR). Este último quimioterápico é utilizado em pacientes positivos EGFR (Loo *et al.*, 2013; Bar-Ad *et al.*, 2014; Zhang, X. *et al.*, 2014).

1.4 Alterações histopatológicas, citogenéticas e moleculares em carcinomas de laringe

A diferenciação, invasão tumoral, atividade mitótica, infiltração angiolímfática, grau histológico, comprometimento linfonodal são descritos como fatores que afetam a sobrevida global em pacientes com CCEL (Fukano *et al.*, 1997; Kurokawa *et al.*, 1998).

Iovănescu *et al.* (2013) avaliaram 95 pacientes com CCEL por análise histopatológica, tendo como parâmetros o tipo de neoplasia, grau histológico, grau de diferenciação do tumor, reação inflamatória tumoral, infiltração perineural e invasão angiolímfática. Como resultado foi demonstrado que tumores com estádios N2 e N3 foram mais comuns, apresentando baixa a moderada quantidade de células diferenciadas associadas a pouca resposta inflamatória do tumor primário, além de apresentar invasão vascular e infiltração perineural. Os estádios N0 e N1 foram associados com graus de diferenciação celular médio e alto e com infiltração inflamatória. Estes resultados reforçam a importância do exame histopatológico para determinar o prognóstico dos pacientes segundo os parâmetros mencionados. A maioria dos tumores consiste de populações celulares heterogêneas com diferentes níveis de complexidade genômica e com comportamento biológico variável de resposta terapêutica (Almendro *et al.*, 2013; Calderwood, 2013), o que pode representar o maior obstáculo no prognóstico e tratamento dos pacientes.

Ainda é limitado o conhecimento sobre os marcadores genéticos relacionados ao desenvolvimento de câncer de laringe. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas moleculares de análises em larga escala tem possibilitado a identificação de candidatos a marcadores que podem contribuir para a detecção precoce da doença, progressão, risco de metástase e doença residual mínima (Sidransky, 2002; Almadori *et al.*, 2005; Loyo and Pai, 2008). A definição do termo *drivers* no processo carcinogênico se refere a mutações que conferem uma vantagem seletiva no crescimento do tumor e cada mutação *driver* tem um papel neste processo. São descritas mais de 100 mutações *drivers*, as quais podem ocorrer em oncogenes e genes supressores tumorais. As mutações pré-neoplásicas que não tem um efeito sobre o processo neoplásico são definidas como *passengers* (Bozic *et al.*, 2010; Vogelstein *et al.*, 2013).

Alguns genes, incluindo *TP53*, *PTEN*, *EGFR*, *CCND1* e a via *Akt/mTOR* foram descritos como importantes para o processo de progressão de displasia para neoplasia invasiva na laringe (Marcos *et al.*, 2011). Jalali *et al.* (2011) relataram que o aumento de

expressão da proteína p53 estava associado com recorrência tumoral e mortalidade pela doença, sugerindo que esta proteína é um marcador importante para a estratificação dos pacientes quanto ao prognóstico.

O gene *PTEN* foi avaliado como marcador preditivo de resposta ao tratamento em 74 CCEL e 73 carcinomas de cavidade oral e orofaringe (Snietura *et al.*, 2012). Os autores relataram que a expressão diminuída do *PTEN* estava presente em 46/74 CCEL e 42/74 de carcinomas orais e de orofaringe. Foi observada associação com recorrência, comprometimento linfonodal e metástase à distância. Os autores concluíram que os tumores com expressão aumentada do *PTEN* cujos pacientes foram tratados com uma fração aumentada de radioterapia apresentaram melhor prognóstico quando comparados aqueles com expressão diminuída e tratados com radioterapia convencional.

Recentemente, Dionysopoulos *et al.* (2013) avaliaram as vias *Akt/mTOR*, ciclina D1 e EGFR como possíveis marcadores em 289 CCEL, 77,8% deles apresentavam estadios T3 e T4 e 84,1% não tinham metástases linfonodais. Os autores relataram que a maioria dos casos com elevada expressão de *mTOR* e *Akt3* apresentava associação com sobrevida diminuída enquanto a expressão aumentada de *ciclina D1* em carcinomas de subglote e transglote estava associada com risco de morte pela doença. Os autores concluíram que a expressão aumentada de *mTOR*, *Akt3* e *ciclina D1* está associada com pior prognóstico.

Além da análise de genes únicos, outra abordagem realizada para a caracterização de perfis genéticos em CCEL é a avaliação de alterações genômicas. Esta estratégia pode revelar alterações onde genes associados ao processo tumoral estão mapeados, incluindo oncogenes e genes supressores de tumor. A maioria dos relatos publicados considera os carcinomas de cabeça e pescoço como um todo, porém os CCEL tem várias peculiaridades já tendo sido demonstradas diferenças no padrão de alterações cromossômicas, moleculares e clínicas (Patmore *et al.*, 2007; Keser *et al.*, 2008).

Bérgamo *et al.* (2005) avaliaram 67 tumores de cabeça e pescoço por métodos de citogenética clássica e molecular, entre os quais 18 CCEL. A alteração mais comumente observada em carcinomas de laringe foi a trissomia do cromossomo 20. A perda do cromossomo Y foi verificada em cinco casos e em seis foram relatadas alterações estruturais no cromossomo 22. A perda em 13q foi frequentemente observada nos CCEL. Posteriormente, Keser *et al.* (2008) relataram que ganhos em 17p, 3p, 4p, 5p, 6q, 8p, 9p, 14q, 18p e Xq e perdas em 15q e 22q podem conter potenciais genes envolvidos no desenvolvimento deste tipo tumoral.

Treze linhagens celulares de CCEL foram avaliadas por Kostrzevska-Poczekaj *et al.*(2010) para Hibridização Genômica Comparativa baseada em arrays (aCGH) utilizando duas plataformas diferentes. Duas das 13 linhagens mostraram ampliações em 22q11.2, região onde estão mapeados os oncogenes *CRKL* e *MAPK1* e somente o gene *CRKL* foi amplificado nas duas linhagens. Os autores relataram que seis de 17 linhagens investigadas apresentaram aumento de expressão (RT-qPCR) do gene *CRKL*. O gene *MAPK1* foi encontrado com aumento de expressão apenas em uma destas 17 linhagens celulares. Os autores concluíram que o gene *CRKL*, envolvido em processos de adesão, migração e resposta imune celular é um potencial oncogene envolvido em carcinomas de laringe.

Yang *et al.*(2011) avaliaram 16 amostras de carcinomas de laringe obtidas de pacientes não tratados utilizando aCGH (*MacroArray™ Karyo 1400, MacroGen, Inc*). Ganhos em 7q e 8q e perdas em 1p, 2q, 17q e 3p22-26 foram relatados em mais de 40% dos casos. Os autores avaliaram com mais detalhes a região 3p22-26 onde estão mapeados os genes *XPC*, *PPARG*, *NCKIPSD*, *MLH1*, *FANCD2*, e *CTNNB1*, ressaltando o envolvimento do gene *XPC*, o qual tem um papel importante na via de reparo a erros do DNA. Seis linhagens celulares de CCECP também apresentaram perda no número cópias onde estes genes estão mapeados. (Tsui and Garnis, 2010).

Em uma análise utilizando a técnica *Whole Genome Tiling Array CGH (HG18 CGH 4x72K WG Tiling v2.0)*, Ecsedi *et al.*(2012) avaliaram um caso raro de carcinoma basalóide-escamoso em laringe. As características clínico-patológicas deste tipo tumoral são diferentes quando comparados com o tipo escamoso, apresentando uma alta agressividade e pior prognóstico. Esta análise permitiu a identificação alterações no número de cópias em 3777 genes, sendo 1726 ganhos e 2051 perdas genômicas. Os autores relataram ganhos em 17q21.3 onde o gene *DUSP3* está mapeado. Este gene codifica uma proteína que atua na via de sinalização dos receptores ERBB, vias de sinalização VEGF e TGF-beta, ciclo celular e sinalização de quimiocinas. Os autores concluíram que a alteração do número de cópias destes genes é um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do carcinoma basalóide de células escamosas de laringe.

Mais recentemente, Jarmuz-Szymczak *et al.*(2013) avaliaram 17 linhagens celulares de carcinomas de laringe utilizando a plataforma *Human Genome CGH Microarray, 4x44K (Agilent Technologies)*. A região 11q13 foi analisada em detalhes para identificar possíveis oncogenes envolvidos na progressão tumoral, além do tamanho real do amplicon

mapeado nesta região. O grupo de validação consistiu de 34 amostras CCEL, as quais foram avaliadas por RT-qPCR e FISH. A alteração em 11q13 envolvia 12 genes, incluindo *CCND1*, *ORAOV1*, *FADD*, *PPFIA1* e *CTTN*, que apresentaram altos níveis de expressão em comparação com os tecidos normais. Estes achados confirmaram o envolvimento de genes mapeados em 11q13 no desenvolvimento de carcinomas de laringe.

Ambrosio *et al.* (2013) avaliaram 32 amostras de CCEL (9 supraglote, 17 glote e 6 transglote) pareadas para o fronte de invasão e a superfície do tumor de pacientes não tratados, utilizando a metodologia de CGH cromossômico de alta resolução (*HR-CGH*). Neste estudo foram identificadas perdas em 3q26-q29 e 18q23. Além disso, foram identificadas alterações específicas no fronte invasivo envolvendo ganhos em 1p, 4q e 9p e perdas em 11p, 12p, 13q, 18p, 19, 20q, 21q e Xp. Alterações em 11q13 foram identificadas na superfície do tumor em amostras de glote, supraglote e transglote e a mesma região alterada foi detectada nas células de fronte invasivo da transglote. A expressão da proteína ciclina D1 (gene mapeado em 11q13) foi confirmada por imunohistoquímica e associada com metástase à distância em tumores e com a diminuição de sobrevida dos pacientes com tumores de supraglote. Os ganhos envolvendo o gene *CCND1* (controle interno *CPE11*) foram confirmados por FISH. As perdas homozigotas em 3q26-q29 e 18q23 foram associadas com a presença de invasão em linfonodos e pior prognóstico. O estudo revelou o potencial da ciclina D1 para ser utilizado como marcador prognóstico em tumores de supraglote.

Como pode ser verificado, a maioria dos estudos foi realizada em linhagens celulares e os relatos em amostras a fresco não informam se os pacientes foram ou não tratados. Para o nosso conhecimento, apenas o relato de Bérghamo *et al.* (2005), Yang *et al.* (2011) e Ambrosio *et al.* (2013) relataram o uso de amostras CCEL de pacientes não tratados. Atualmente existe um limitante para se obter amostras de tumor primário de pacientes não tratados previamente à coleta. Isso ocorre na maioria de pacientes com CCEL que apresenta estádios iniciais, o tratamento preferencial é a radioterapia exclusiva, e aqueles com estádios avançados (III ou IV) são submetidos a tratamentos não cirúrgicos com radioterapia isolada ou concomitante a quimioterapia com objetivo de preservação de órgão, de não apresentar uma resposta positiva nestes casos, a cirurgia fica reservada para o tratamento de resgate. A análise de amostras de pacientes tratados não reflete o mesmo perfil molecular de amostras obtidas de pacientes que foram apenas submetidos a exérese tumoral. A Tabela 1 sumariza os principais estudos utilizando as metodologias baseadas em *aCGH* e técnicas similares em CCEL, CCECP e linhagens celulares derivadas do CCELS.

Tabela 1 - Relatos em literatura descrevendo alterações genômicas (número de cópias de sequências do DNA) em CCEL.

Autores	Plataforma	Amostras	Validação
Keser <i>et al.</i> , 2008	Whole genome tiling array CGH	15 CCEL	Nd
Giefing <i>et al.</i> , 2008	Plataforma de 44K (<i>Agilent Technologies</i>)	12 linhagens celulares de CCEL	qPCR 12 linhagens
Giefing <i>et al.</i> , 2011	Plataforma de 44K (<i>Agilent Technologies</i>)	10 linhagens celulares de CCEL	qPCR 8 linhagens
Yan <i>et al.</i> , 2011	<i>Whole genome tiling array CGH</i>	16 amostras de CCEL	Nd
Ecsedi <i>et al.</i> 2012	<i>Whole genome tiling array CGH</i>	1 CCEL –basalóide	<i>FISH</i>
Jarmuz-Szymczak <i>et al.</i> , 2013	Plataforma de 44K (<i>Agilent Technologies</i>)	17 linhagens celulares de CCEL	qPCR 17 linhagens
Ambrosio <i>et al.</i> , 2013	CGH cromossômicode alta resolução (<i>HR-CGH</i>)	32 CCEL	FISH- 32 amostras de CCEL. IHC-148 amostras (FFEP)

CCEL=Carcinomas de células escamosas de laringe. qPCR= reação em cadeia da polimerasepor análise quantitativa;FISH= hibridização fluorescente *in situ*; IHC=Imunoistoquímica; FFEP=fixados em formalina e em blocos de parafina.

1.5 Análise de perfis de expressão gênica global em CCECP

A maioria das análises transcriptômicas descritas em literatura foi realizada em amostras heterogêneas provenientes de diferentes sítios anatômicos de cabeça e pescoço. São poucos os estudos em CCEL e a maioria busca genes associados com processos tumorais descritos em diferentes tumores, os quais são testados por técnicas de imunoistoquímica e/ou expressão de transcritos por RT-qPCR(Chen *et al.*, 2013; Yilmaz *et al.*, 2014). A Tabela 2 sumariza os principais estudos utilizando as metodologias baseadas em cDNA-microarray em CCEL e CCECP.

Tabela 2 - Relatos utilizando análises de expressão gênica global em carcinomas de cabeça e pescoço e, em especial, em carcinomas de laringe.

Análise de expressão gênica global					
Autores	Amostras CCECP/CCEL	Grupos	Plataforma	Referência	Validação
Carinci <i>et al.</i> , 2007	22 amostras de CCEL	Presença vs ausência de metástase linfonodo	19.200 cDNAs, Ontario Cancer Institute, Toronto, Ontario, Canada	8 amostras (<i>pool</i>) de tecido não neoplásico de mucosa de laringe	RT-qPCR 22 amostras
Järvinen <i>et al.</i> , 2008	14 linhagens celulares de CCEL e 4 linhagens de HNSCC	Linhagens da cavidade oral vs laringe	<i>Human 1A oligo ou 1A oligo (V2) (Agilent Technologies)</i>	10 linhagens celulares diferentes (<i>pool</i>) (não-CCECP)	RT-qPCR 10 linhagens
Kim <i>et al.</i> , 2008	Células HEP-2 de epitélio humano de laringe	Antes e depois tratamento com dose sub-letal de AbOmpA	<i>Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA)</i>	Gene de referência <i>hACTB</i>	RT-qPCR linhagem HEP-2
Ma <i>et al.</i> , 2009	16 CCEL	CCEL vs normal adjacente	<i>Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix- Santa Clara, CA)</i>	RNA referência universal humano (Stratagene)	RT-qPCR 16 amostras
Colombo <i>et al.</i> , 2009	15 CCEL e 10 normais de laringe	CCEL vs tecido de laringe não neoplásico	<i>331 sondas de 284 genes-Array customizado</i>	-	RT-qPCR 15 amostras 7 normais
Giefing <i>et al.</i> , 2011	10 linhagens celulares de CCEL	10 linhagens celulares de CCEL vs controles – RNA total	<i>GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)</i>	RNA referência universal humano (Stratagene) e RNA do epitélio aéreo bronquial reconstituído <i>in vitro</i>	RT-qPCR 21 linhagens
Jarmuz-Szymczak <i>et al.</i> , 2013	10 linhagens celulares de CCEL	10 linhagens celulares de CCEL vs 3 controles – RNA total	<i>GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)</i>	Genes de referência (<i>B2M, TABBP e TNS</i>)	RT-qPCR 17 linhagens e 34 amostras
Fountzilias <i>et al.</i> , 2013	59 CCEL	59 CCEL vs 59 Normal adjacente	<i>GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)</i>	Gene de referência <i>GUSB</i>	RT-qPCR 50 amostras e 149 amostras de parafina
Xu <i>et al.</i> , 2013 Estudar impacto resitença	1 linhagem de CCEL (CCL 23)	Linhagens celulares Hep-2 (CCL-23) tratadas vs não tratadas com paclitaxel	<i>Human Gene 1.0 ST array (Affymetrix GeneChip)</i>	Gene de referência <i>hACTB</i>	RT-qPCR 1 linhagem
Eustace <i>et al.</i> , 2013	157 CCEL e 185 de bexiga	T2-T4 carcinomas laringe vs / T1-T4a carcinoma bexiga	<i>TaqMan low density arrays (TLDA) customizado para 26 genes relacionados a hipóxia</i>	Genes de referência <i>GNB2L1, B2Me RPL11</i>	RT-qPCR 33 amostras

CCEL: carcinomas de células escamosas de laringe. qPCR: PCR quantitativa em tempo real, vs: versus.

Carinci *et al.* (2007) avaliaram 22 CCEL obtidos de pacientes do sexo masculino utilizando a plataforma de *microarrays* contendo 19.200 sequências de cDNAs (Ontario Cancer Institute, Toronto, Ontario, Canada). O estudo revelou uma assinatura de 158 genes diferencialmente expressos associados à metástase linfonodal. Entre os genes associados diretamente com invasão de linfonodos, estavam o *NM23-H3* e o *TRIM8*, importantes no controle de mobilidade celular e supressão de crescimento tumoral, respectivamente.

Colombo *et al.* (2009) avaliaram 13 CCEL e 10 tecidos normais na plataforma customizada contendo 331 sondas para 284 genes. Os autores encontraram 53 genes considerados como significativos na comparação normal *versus* tumoral. Os genes alterados estavam envolvidos em processos relacionados ao câncer como as vias de apoptose, ciclo celular, reparo de DNA e sinais de tradução. Entre eles, o *CSTB* apresentava-se com uma diminuição significativa da expressão nos tumores. O produto deste gene tem atividade inibidora de cisteína protease, associada com função anti-metastática.

Quatro transcritos classificadores de um total de 213 diferencialmente expressos foram detectados usando análises de expressão por *microarrays* em 20 amostras de CCEL (Mirisola *et al.*, 2011). A expressão dos genes *H19*, *HIST1H3F*, *SNORA16A* e *SNORD14C* foi capaz de classificar as amostras tumorais em baixo e alto risco de recidiva, sendo o *H19* ($p < 0,01$) o melhor classificador e preditor de pior prognóstico em amostras de estadios T1 e T2. O produto do gene *H19* é um transcrito não codificador longo que atua como supressor tumoral, sendo este gene localizado próximo ao gene *IGF2*, ambos regulados por *imprinting* (Venkatraman *et al.*, 2013). Os genes *IGF2* e *H19* estão mapeados em 11p15.5, uma região previamente relatada em perdas heterozigóticas em tumores de cabeça e pescoço. O silenciamento deste gene foi associado com pior prognóstico e recorrência em carcinomas de cabeça e pescoço (Esteves *et al.*, 2005).

Fountzilas *et al.* (2013), com o objetivo de obter uma assinatura de expressão relacionada com a recorrência local após cirurgia, avaliaram 66 amostras CCEL utilizando a plataforma *HG-U133A Affymetrix* (Santa Clara, CA). Foram identificados três genes (*ACE2*, *FLOT1* e *PRKD1*) relacionados com alto risco de recorrência sendo o melhor candidato o gene *PDRKD1*.

Estudos utilizando plataformas de *microarray* têm como objetivo a identificação de genes e vias alteradas nos processos de tumorigênese, metástase, resposta e resistência ao

tratamento. Dois estudos foram relatados em literatura para tentar associar o perfil de expressão com estes processos em CCEL. No primeiro, Lian *et al.* (2013) avaliaram 10 amostras de CCEL e tecidos normais adjacentes pela plataforma *Illumina Human HT-12 BeadChip array*. Os autores relataram 361 genes alterados associados com o processo tumoral e 246 genes relacionados com metástase em linfonodos. Oito genes (*CDK1*, *CDK2*, *CDK4*, *MCM2*, *MCM3*, *MCM4*, *IF3a* e *RPN2*) foram validados em 42 amostras por RT-qPCR. Os autores concluíram que a alteração nestes genes está associada com desenvolvimento e progressão tumoral. Coskunpinar *et al.* (2014) avaliaram 36 CCEL e seus respectivos tecidos normais adjacentes, utilizando um painel de 88 genes descritos em processos tumorais. Os dados revelaram um perfil de 16 genes diferencialmente expressos entre o tumor e o tecido adjacente, entre eles, os genes *c-MYC*, *COL4A2* e *SOX4* apresentaram aumento de expressão no tumor. Nas amostras de pacientes que evoluíram para metástase, o gene *SOX4* apresentou expressão diminuída, sendo associado com fenótipo metastático. O gene *TGFBI* apresentou expressão aumentada nos tumores e foi submetido a uma análise *insilico* revelando ser central na regulação de cinco genes que apresentaram expressão alterada (*COL4A2*, *MYC*, *SOX4*, *TMP1* e *SPARC*) (Coskunpinar *et al.*, 2014).

1.6 Expressão de miRNAs em carcinomas de laringe

As alterações epigenéticas são eventos relatados na carcinogênese da laringe, incluindo a metilação do DNA, modificação de histonas e desregulação de RNAs não codificadores (Yang, J. *et al.*, 2011). Com as novas descobertas sobre o genoma humano, os RNAs não codificadores surgiram como importantes fatores que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica (Esteller, 2011).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs de 20 a 25 nucleotídeos que atuam na regulação da expressão gênica pela repressão da tradução ou degradação do transcrito (Lee and Ambros, 2001; Lim *et al.*, 2003). Os miRNAs são normalmente localizados e transcritos em genes codificadores, especificamente em íntrons, além de serem transcritos como parte dos longos RNAs não codificadores presentes no genoma (Bartel, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). O processo de transcrição conduzido pela RNA polimerase II origina um transcrito inicial chamado Pri-miRNA, que possui uma 7'-metil guanosina e a cauda 3'-poly A (Cai *et al.*, 2004), podendo ocasionalmente ser transcrito pela polimerase III

(Cullen, 2004). O Pri-miRNA devido a um pareamento imperfeito forma fitas duplas unidas por pequenos *loops* (estruturas conhecidas como *stem loop*), as quais serão clivadas pelo complexo processador formado pela Droscha e DGCR8 (*Di George syndrome Critical region gene 8*) (Landthaler *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006). Em mamíferos este complexo possui vários fatores proteicos adicionais com função desconhecida (Gregory *et al.*, 2004). A subunidade DGCR8 se une à fita dupla de RNA, especificamente na base da estrutura em *stem loop* e a posiciona para ação da Droscha com atividade RNase III (Han *et al.*, 2006), para liberar uma estrutura precursora em forma de *hairpin* (pre-miRNA) composta de 70 a 100 nucleotídeos.

O pre-miRNA é reconhecido e transportado pelo receptor nuclear Exportina-5 associado a seu cofator Ran acoplado aoGTP e substituído no citoplasma por GDP (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). No citoplasma, o pré-miRNA é clivado por outra RNase (Dicer), enzima que se une na posição 3' do pré-miRNA pelo domínio PAZ posicionando o substrato para clivagem (Zhang *et al.*, 2004). O resultado da clivagem é um RNA de fita dupla contendo 22 nucleotídeos com dois deles salientes na porção 3' de cada fita. A dupla fita é reconhecida pela proteína Argonauta (Ago), onde a fita madura é selecionada pela Ago dependendo da relativa estabilidade termodinâmica de uma das extremidades da dupla fita, e a outra fita é degradada (Schwarz *et al.*, 2003) (Figura 1).

Em mamíferos a seleção da fita e formação RISC é acompanhada por um complexo TRPB contendo Dicer, Ago e a dupla fita unida ao complexo (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005). Geralmente a fita com menos estabilidade de pareamento na extremidade 5' é selecionada como guia (Khvorova *et al.*, 2003). Recentemente, foi proposto que o sensor para a assimetria termodinâmica observada neste pareamento é o domínio helicase da Dicer humana (Noland and Doudna, 2013). Este modelo explicaria porque a Dicer antes da clivagem reposiciona a fita dupla. Neste processo o domínio da helicase detecta a estabilidade termodinâmica das extremidades com o objetivo de posicionar a fita dupla de RNA em uma orientação que permitiria a incorporação da fita guia correta dentro do complexo RISC (Noland *et al.*, 2011). Portanto, o complexo RISC ativo tem como função a repressão ou degradação do transcrito codificador, devido a uma complementariedade entre a região contendo 2-8 nucleotídeos do miRNA e a região 3'-UTR do mRNA alvo. Esta pequena sequência é conhecida como *Seed*, e é a chave determinante para o processo de degradação e repressão envolvido no mecanismo de regulação de sequências transcritas por miRNAs (Lewis *et al.*, 2005) (Figura 1).

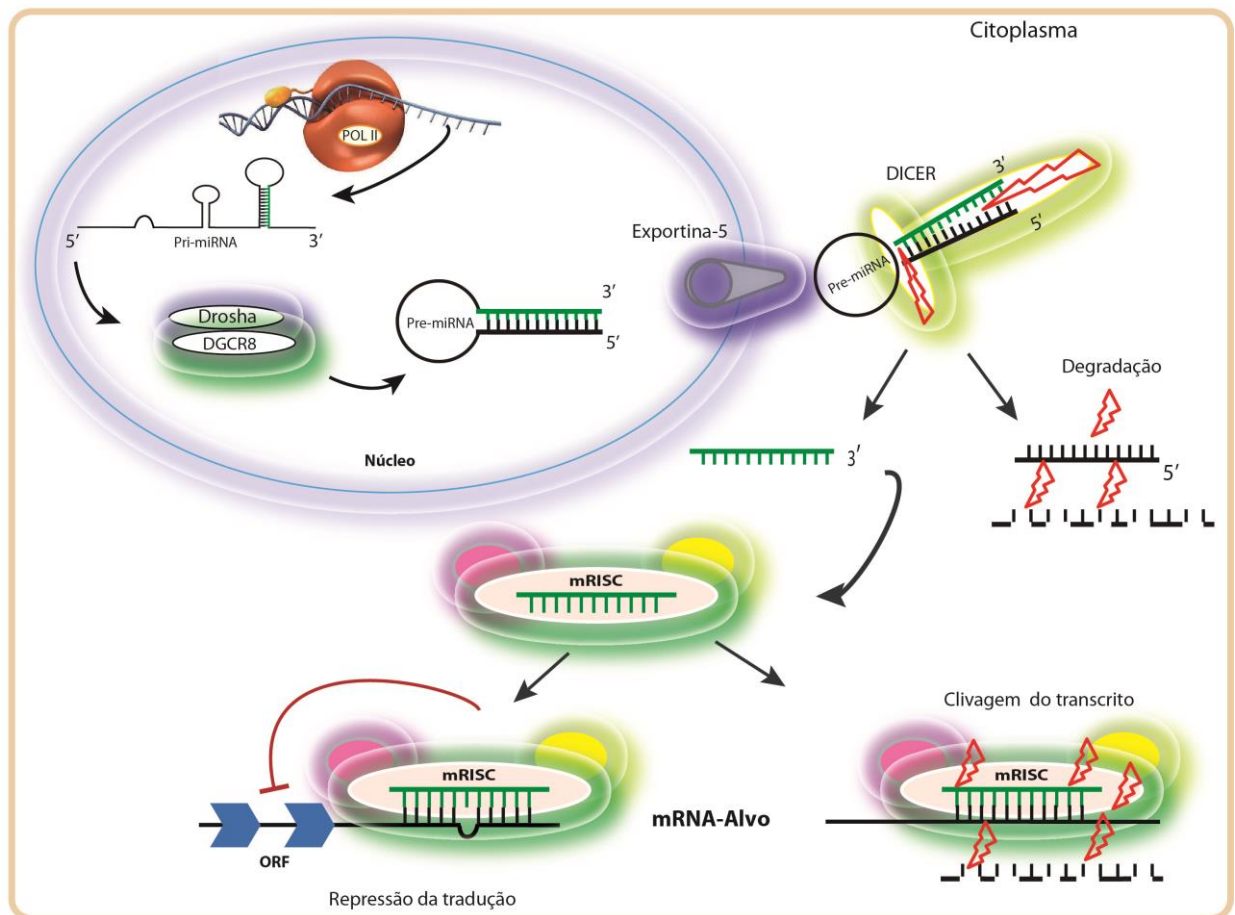


Figura 1. A biogênese dos microRNAs ocorre no núcleo pela ação da RNA Polimerase II para formar o transcrito primário (pri-miRNA) o qual contém uma estrutura em *hairpin*. Este pri-miRNA é clivado pela ação do complexo processador (Droscha/DGCR8) formando uma molécula de 70 nucleotídeos (pré-miRNA). Este produto é exportado para o citoplasma pela exportina 5, onde ocorre o processo de maturação. O pré-miRNA é clivado pela DICER com atividade RNase III, gerando fitas duplas de 22-24 nucleotídeos. A fita funcional é incorporada dentro do complexo silenciador induzido por RNA (mRISC) que posteriormente interage com a porção 3' UTR do transcrito alvo. Quando a complementariedade é perfeita entre o transcrito e o miRNA ocorre a clivagem e se é imperfeita leva a repressão da tradução do transcrito.

Os miRNAs têm um importante papel em processos biológicos normais como desenvolvimento, apoptose, diferenciação e proliferação celular, contribuindo também com a gênese e progressão de diversos tipos tumorais (Kotaja, 2014; Zhang, W. *et al.*, 2014). Um recente estudo realizado com o objetivo de aumentar o grau de confiabilidade das sequências depositadas na base dados do miRBase utilizou a técnica de sequenciamento de nova geração (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014), resultando na atualização de sequências do miRBase em Janeiro 2015, onde foram depositados 1881 precursores, os quais dão origem a 2588 miRNAs maduros (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>.)

Alterações na expressão dos membros da família do miRNA *hsa-let-7* foram reportados em numerosas neoplasias, sugerindo que os membros desta família tem um papel no desenvolvimento de diferentes cânceres. Em CCEL, *hsa-let-7a* parece regular a expressão dos oncogenes *RAS* e *c-MYC*, levando a uma inibição do crescimento e apoptose (Long *et al.*, 2009). O *hsa-miR-206*, um importante regulador da migração celular e invasão, apresentou diminuição significativa da expressão em tumores de laringe, sendo associado com tamanho tumoral e metástase linfonodal (Sullu *et al.*, 2010; Zhang, T. *et al.*, 2011). O aumento da expressão do *hsa-miR-21* foi relatado em várias neoplasias, sugerindo seu papel oncogênico na tumorigênese. A supressão do *hsa-miR-21* em CCEL levou a redução da capacidade de invasão tumoral e apoptose (Ren *et al.*, 2010).

Guo *et al.* (2012) realizaram estudos funcionais na linhagem celular Hep-2 e na linhagem embrionária de rim, HERK239, após analisarem 20 amostras de CCEL e seus correspondentes tecidos normais adjacentes. Utilizando RT-qPCR, os autores avaliaram a expressão do *hsa-miR-24* e do gene *SI00A8* após a análise de predição de alvos utilizando dados de tumores e linhagens celulares. Os resultados mostraram que a expressão ectópica do *hsa-miR-24* *in vitro* induzia alterações morfológicas, inibição da proliferação e invasão celular pelo bloqueio no nível de tradução do transcrito *SI00A8*. Os dados sugeriram que o *hsa-miR-24* atua como um supressor tumoral e é uma molécula terapêutica a ser usada em pacientes com carcinomas de laringe.

O *hsa-miR-370* foi relatado com expressão alterada em várias neoplasias, mas o seu papel funcional ainda continua indefinido. A expressão diminuída do *hsa-miR-370* em carcinomas de laringe foi relatada como inversamente relacionada com a expressão do gene *FOXMI* (Yungang *et al.*, 2013). Utilizando algoritmos de predição (RNAhybrid o qual permite a determinação da interação entre a região 3' UTR do gene e a sequência *seed* do *hsa-miR-370*) os autores verificaram que o gene *FOXMI* é alvo deste miRNA. Ensaios funcionais mostraram que a restauração da expressão do *hsa-miR-370* diminuiu significativamente a proliferação celular, o que sugere que este miRNA atua como um supressor tumoral e marcador terapêutico em carcinomas de laringe.

Zhao *et al.* (2013) avaliaram a função e a relação entre o *hsa-miR-155* e a via de sinalização *SOCS1-STAT* comparando os resultados com dados clínicos e patológicos em 63 CCEL e 21 amostras de mucosa normal adjacente (controle) de pacientes que foram submetidos a laringectomia total. Foi relatado aumento da expressão do *hsa-miR-155* nos

tumores em relação aos tecidos normais. A inibição sintética do *hsa-miR-155* e a elevada expressão de *SOCS1* estavam associadas com a diminuição da expressão de *STAT3*, promovendo a inibição dos processos de crescimento, migração e invasão em células Hep-2. A expressão elevada de *hsa-miR-155* foi relacionada com estádios T3 e T4 em comparação com estágio T2. Os achados deste estudo sugerem que o *hsa-miR-155* tem um papel no desenvolvimento tumoral e poderia ser usado como marcador de prognóstico e terapêutico em carcinomas de laringe.

Recentemente, Tian *et al.* (2014) avaliaram a função e os efeitos do *hsa-miR-205* na proliferação e apoptose em CCEL utilizando análises funcionais *in vitro* e *in vivo*. Após transfecção do *hsa-miR-205* nas células Hep-2 os dados mostraram redução na proliferação e indução do processo de apoptose, devido a um efeito regulador sobre o gene *BCL2*, oncogene envolvido na inibição de apoptose.

Os estudos de perfis de expressão global de miRNAs em carcinomas de laringe são limitados. Saito *et al.* (2013) revelaram o *hsa-miR-196a* como um inibidor da proliferação em tumores de laringe utilizando um *array* contendo sondas para 723 microRNA humanos (*Agilent Human miRNA V2, Agilent Technologies*) em três amostras de CCEL e duas amostras não tumorais. Os autores realizaram estudos funcionais demonstrando a função inibidora de proliferação celular desse microRNA.

Huang *et al.* (2013) isolaram e cultivaram células tronco de carcinoma de laringe e avaliaram a expressão de miRNAs nas células antes e após a estimulação por radioterapia utilizando plataformas de expressão global de miRNAs. Foram identificados 70 miRNAs diferencialmente expressos, oito deles com expressão aumentada e 62 com expressão diminuída em pelo menos duas vezes quando comparados com amostras não irradiadas. Segundo os autores, estes miRNAs poderiam estar envolvidos na autorregulação das células tronco de carcinomas de laringe tratadas com irradiação (Huang *et al.*, 2013).

Análises de miRNAs em plasma sanguíneo também foram relatadas em pacientes com carcinomas de laringe. Ayaz *et al.* (2013) avaliaram a presença de 738 miRNAs no plasma sanguíneo de 20 pacientes comparados a 44 pacientes saudáveis. Dezessete desses miRNAs encontravam-se significativamente alterados no plasma dos pacientes com carcinomas de laringe. Cinco dos 17 miRNAs (*hsa-miR-331-3p*, *hsa-miR-603*, *hsa-miR-1303*, *hsa-miR-660-5p* e *hsa-miR-212-3p*) não foram previamente relatados em amostras de plasma de indivíduos saudáveis e nem em indivíduos com outras doenças. Os autores

sugeriram que estes miRNAs poderiam ter um papel no processo invasivo dos carcinomas de laringe e teriam potencial para serem utilizados como biomarcadores prognósticos.

Os miRNAs são reguladores diretos da expressão dos genes essenciais no processo de homeostase e desenvolvimento dos seres vivos, e por essa razão, muitos deles encontram-se alterados em diversas doenças, tornando esse mecanismo de controle de grande importância em algumas áreas do conhecimento, como a farmacogenômica. A interação entre o miRNA e os genes alvos se mostra relevante em situações onde a expressão do miRNA é inversamente correlacionada com a expressão dos alvos e tem como consequência a inibição da eficácia de um determinado fármaco que interatua com o gene alvo (Rukov *et al.*, 2013). Desta forma, os miRNAs podem ser importantes marcadores moleculares, incluindo de resposta a terapias utilizada em processos tumorais.

1.7 Análise de integração de dados em larga escala de miRNAs e mRNAs

Vários métodos computacionais foram desenvolvidos para analisar os dados moleculares gerados por diferentes plataformas de estudos em larga escala. A análise estatística integrativa se refere à avaliação dos diferentes dados obtidos por estratégias *omics* (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), a qual tem potencial para identificar fatores de risco, redefinir o diagnóstico do tumor, prever o efeito terapêutico e prognóstico e a identificação de novos alvos para terapia, mudando a visão de estratégias de tratamento e pesquisa em câncer (Schadt *et al.*, 2010; Kristensen *et al.*, 2014).

A aplicação de análise integrada de dados tem como objetivo a compreensão do comportamento molecular, mecanismos e relação entre diferentes tipos de estrutura molecular e fenótipos (incluindo resultados clínicos, vias, interações, mutações envolvidas no desenvolvimento do câncer), classificação de subtipos da doença e a predição de resposta e eficácia das terapias. Alguns métodos estatísticos são especializados em responder a estas questões ou objetivos. A maioria das ferramentas aplicadas inclui modelos gráficos de integração, os quais podem ser usados para determinar vias alteradas e subgrupos de pacientes de uma determinada doença.

Vários métodos tem sido desenvolvidos para visualizar ou prever as interações entre miRNAs e mRNAs baseados nas suas sequências. A maioria destes métodos se baseia na complementariedade da sequência *Seed* dos miRNAs e a região 3'UTR do

mRNA. Diferentes *websites* disponibilizam algoritmos para prever a interação entre o miRNAs e alvos potenciais por meio do grau de conservação da sequência do microRNA ou propriedades termodinâmicas, entre eles o TargetScan (Lewis *et al.*, 2005), PicTar (Krek *et al.*, 2005), miRanda (Betel *et al.*, 2010) e Pita (Kertesz *et al.*, 2007). Vários *websites* oferecem fontes já validadas ou predições da interação miRNA e mRNA com altos *scores* de predição, como o TarBase (Vergoulis *et al.*, 2012), miRecords (Xiao *et al.*, 2009) e miRbase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006), entre outros. Atualmente a geração de muitos dados obtidos por plataformas *demicroarray* contribuiu para o desenvolvimento de métodos de integração para dados de expressão entre miRNAs e mRNAs. Um exemplo deles é o algoritmo MAGIA (disponível: <http://gencomp.bio.unipd.it/magia>) desenvolvido por Bisognin *et al.* (2012).

Em função dos resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, o estudo atual foi estruturado para dar continuidade ao objetivo de entender o processo de carcinogênese de laringe, visando a obtenção de candidatos a *drivers*, obtidos pela integração dos dados de transcritos codificadores e expressão global de miRNAs. Além disso, este estudo também incluiu a avaliação da expressão de miRNAs e de genes que esses miRNAs regulam, podendo revelar potenciais marcadores moleculares prognósticos em CCEL.

2. JUSTIFICATIVA

Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo de integração de dados de expressão de transcritos e miRNAs obtidos por análises globais em carcinomas de laringe. O conjunto amostral utilizado neste estudo foi obtido de pacientes não tratados com quimioterapia, radioterapia ou terapias neoadjuvantes, ressaltando a importância dos achados em amostras primárias. Pacientes com tumores apresentando características clínico-patológicas semelhantes e que receberam o mesmo tratamento podem diferir muito quanto ao prognóstico, possivelmente devido à grande heterogeneidade biológica que contribui para respostas insatisfatórias ao tratamento. Além disso, a presença de segundo tumor primário é a causa principal de morte em pacientes com CCEL em estágios iniciais. Estas observações mostram que pesquisas em CCEL podem contribuir para o entendimento destes tumores, visando a caracterização do CCEL e a identificação de marcadores genéticos extremamente importantes, pois podem auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e terapia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Integrar os dados de expressão de transcritos e de miRNAs obtidos de análises de expressão globais para identificar candidatos a *drivers* moleculares e que possam estar associados com características clínicas e histopatológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil global de expressão de miRNAs nas amostras previamente analisadas para expressão gênica global;
- Integrar os dados de expressão global de transcritos e de miRNAs para a identificação de possíveis *drivers* moleculares;
- Avaliar o envolvimento de miRNAs e seus alvos preditos por análises *in silico*;
- Comparar os dados com características clínicas (incluindo segundo tumor primário, comprometimento de linfonodos, metástase à distância e sobrevida câncer-específica) e histopatológicos (incluindo grau histológico, invasão perineural, invasão angiolímfática);
- Investigar a expressão de miRNAs e transcritos selecionados a partir da análise integrada por RT-qPCR em amostras dependentes e independentes dos *microarrays* para confirmar os achados obtidos nas análises globais.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Casuística

O número de amostras usadas no presente estudo foi de 88 CCEL (55 tecidos a fresco e 33 tecidos fixados em formalina e em blocos de parafina - FFEP) além de 16 amostras controles não neoplásicas de laringe (CNL) (6 FFEP e 10 amostras obtidas de necrópsias). As amostras tumorais foram obtidas de pacientes com carcinomas de laringe, submetidos à laringectomia parcial ou total. Os pacientes foram tratados no A.C. Camargo Cancer Center (HCACC), SP, no período de fevereiro de 1985 a outubro de 2007 e foram acompanhados por um período médio de cinco anos. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a coleta das amostras. Este estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center (CEP 1608/11) e do Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP (Nº 476.681).

4.2 Características clínicas e histopatológicas

Todos os tumores de laringe incluídos no estudo foram obtidos de pacientes não tratados por quimioterapia ou radioterapia antes da cirurgia e foram classificados como carcinomas de células escamosas de laringe. O refluxo gastroesofágico não foi incluído no estudo por falta de dados nos prontuários médicos. A Tabela 3 apresenta a descrição dos 35 casos avaliados pela análise global de expressão gênica global, segundo os sítios anatômicos glote (n=7), supraglote (n=13) e transglote (n=15) e 33 casos avaliados pela análise global de miRNAs, segundo os sítios anatômicos glote (n=7), supraglote (n=12) e transglote (n=14). Foram avaliadas 32 amostras as quais foram analisadas pelos dois métodos e se sobrepõem segundo os sítios anatômicos: glote (n=7), supraglote (n=12) e transglote (n=13). Estes 32 CCEL compuseram as amostras utilizadas na análise integrada.

Um total de 33 amostras FFEP foi selecionado para formar o grupo de validação independente para análise exclusiva de miRNAs selecionados (avaliados por RT-qPCR) segundo os sítios anatômicos glote (n=9), supraglote (n=10) e transglote (n=14), incluindo seis amostras FFEP de tecido normal de laringe (CNL) obtidas de necrópsias (Tabela 4). Outro grupo, de 19 amostras de CCEL a fresco e dez amostras CNL (7 tecidos normais adjacentes ao tumor e uma amostra obtida de necrópsia) também foi utilizado para a confirmação dos achados de transcritos codificadores e miRNAs por RT-qPCR (Tabela 5). As amostras incluídas neste grupo são independentes dos ensaios de *arrays* (Figura 2). No grupo teste a proporção entre mulheres e homens é 11/25, das quais 6/11 mulheres são fumantes.

4.3 Genotipagem de HPV

Para realizar a genotipagem de HPV foi utilizado o teste *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test* (Roche), que se baseia na amplificação do DNA alvo pela PCR utilizando iniciadores para mais de 37 tipos de HPV, seguindo para a etapa de hibridização dos

produtos amplificados com sondas de oligonucleotídeos e detecção dos produtos amplificados e ligados a sondas, por determinação colorimétrica. Esta análise permite a genotipagem de 13 HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Para proporcionar um controle adequado da qualidade do DNA, é utilizado um par de iniciadores adicional para o gene da β -globina humana.

A amplificação das 36 amostras de CCEL foi realizada em uma reação contendo 50 μ L da amostra tumoral e 50 μ L de DNA polimerase AmpliTaq Gold na presença de Mg²⁺ em excesso de deoxinucleosídeo 5'-trifosfatos (dNTPs) e iniciadores biotinilados para a amplificação das regiões específicas de HPV (450pb) e do gene da β -globina (268pb). A reação também contém trifosfato deoxiuridina (dUTP) e a enzima AmpErase uracil-N-glicosilase (UNG). As amostras foram mantidas em termociclador por 2min a 55°C para a ação da enzima UNG com a finalidade de remover as bases de uracil de qualquer produto de amplificação contaminante existente na mistura de reação. Após esse período foi realizada a desnaturação da fita de DNA a 95°C por 9min e a reação foi submetida a 40 ciclos de 95°C por 30min, 55°C por 1min e 72°C por 1min. Foi realizado o aquecimento a 72°C por 5min e após a amplificação foi acrescentada ao produto amplificado uma solução de desnaturação. O produto amplificado foi adicionado a bandejas contendo tiras de genotipagem revestidas com sondas dos diferentes tipos de HPV. Foram realizados os procedimentos de hibridização, lavagem e detecção de acordo com as especificações do fabricante e o resultado foi interpretado com o auxílio do Guia de Referência do Teste de Genotipagem Linear Array HPV (Roche).

Tabela 3 - Dados clínicos e histopatológicos de 36 pacientes onde as amostras de CCEL foram submetidas a análise global de expressão gênica e/ou expressão de miRNA.

Paciente	Tecido	Idade/Gênero	Álcool	Tabaco	HPV	Expressão - 35	miRNAs - 33	Localização	TNM	Grau	Recidiva	Metástase a distancia	2º tumor primário	Follow-up (Meses)
1T	CEC	61/M	0	1	0	1	1	Glote	T2N0M0	II	Região da traqueia	Pulmão	0	OPD(34)
2T	CEC	70/M	1	1	0	1	1	Glote	T3N0M0	III	0	0	0	VSR(59)
3T	CEC	65/M	1	0	0	1	1	Glote	T4N2M0	II	Local	Pulmão	0	OPD(63)
4T	CEC	66/F	0	1	0	1	1	Glote	T1N0M0	II	Local/cervical	0	0	OPD(12)
5T	CEC	61/M	1	1	0	1	1	Glote	T4N1M0	I	0	0	0	VSR(83)
6T	CEC	52/M	1	1	0	1	1	Glote	T3N0M0	Nd	0	0	0	VSD(68)
7T	CEC	90/F	0	0	0	1	1	Glote	T2N2M0	I	Local	Pulmão	0	OPD(21)
8T	CEC	64/M	1	1	0	1	1	Supraglote	T1N0M0	I	Esôfago	0	Esôfago	VSR(111)
9T	CEC	57/F	1	1	0	1	1	Supraglote	T3N0M0	II	Base da língua	0	0	VCR(72)
10T	CEC	56/F	1	1	0	1	1	Supraglote	T2N0M0	II	0	Pulmão	Lipoma	VCR(92)
11T	CEC	74/M	1	1	0	1	1	Supraglote	T3N0M0	I	0	0	0	OPD(4)
12T	CEC	50/M	1	1	0	1	1	Supraglote	T4N2M0	II	0	0	0	OPD(29)
13T	CEC	51/F	0	1	HPV16	1	1	Supraglote	T2N0M0	II	Mucosa laríngea	0	0	VSR(84)
14T	CEC	70/M	0	1	0	1	1	Supraglote	T4N1M0	III	0	0	0	OPD(10)
15T	CEC	55/M	1	1	0	1	1	Supraglote	T3N3M0	II	0	Pulmão, osso, fígado	0	OPD(52)
16T	CEC	46/M	0	1	0	1	1	Supraglote	T3N2M1	II	0	0	0	VSR(87)
17T	CEC	72/M	1	1	0	1	1	Supraglote	T4N2M1	II	0	Pulmão, cérebro	0	OPD(77)
18T	CEC	78/F	0	0	0	1	1	Supraglote	T3N2M0	II	0	0	0	OPD(35)
19T	CEC	55/M	1	1	0	1	0	Supraglote	T3N0M0	I	0	0	0	VSD(156)
20T	CEC	68/F	0	0	0	1	1	Supraglote	T3N0M0	II	Local	0	0	OPD(24)
21T	CEC	51/F	0	0	0	1	1	Transglote	T4N1M0	II	Local	0	0	OPD(15)
22T	CEC	50/M	1	0	0	1	1	Transglote	T4N3M0	II	0	0	0	OPD(2)
23T	CEC	64/M	0	1	0	1	1	Transglote	T3N0M0	I	0	0	0	OPD(47)
24T	CEC	60/M	1	1	0	1	1	Transglote	T4N0M0	II	0	0	0	PS (37)
25T	CEC	61/M	1	1	0	1	1	Transglote	T4N0M0	I	0	0	0	PS (110)
26T	CEC	66/M	1	1	HPV16	1	1	Transglote	T4N3M0	II	Cervical	0	0	OPD(13)

Cont/ Tabela 3

Paciente	Tecido	Idade/Gênero	Álcool	Tabaco	HPV	Expressão -35	miRNAs -33	Localização	TNM	Grau	Recidiva	Metástase a distancia	2º tumor primário	Follow-up (Meses)
28T	CEC	69/M	1	1	0	1	1	Transglote	T2N0M0	II	0	0	Pele, costela	VCD(92)
29T	CEC	63/F	1	1	0	1	1	Transglote	T4N0M0	II	Local	Pulmão	0	OPD(34)
30T	CEC	76/M	1	1	0	1	1	Transglote	T3N0M0	II	Local	0	0	VSR(13)
31T	CEC	61/M	1	1	0	1	1	Transglote	T3N0M0	II	Local	Pulmão	seio piriforme	OPD(11)
32T	CEC	67/M	1	1	0	1	1	Transglote	T4N0M0	I	0	0	0	VSR(64)
33T	CEC	52/M	1	1	0	1	1	Transglote	T1N0M1	0	Local	0	0	OPD(40)
34T	CEC	77/F	0	0	0	0	1	Transglote	T4N0M0	I	0	0	0	OPD(6)
35T	CEC	64/M	1	0	0	1	0	Transglote	T3N1M0	II	Local, cervical	Pulmão		OPD(15)
36T	CEC	55/F	0	1	0	1	0	Transglote	T4N2M0	II	0	0	0	VSR(75)

* Tumores primários obtidos de amostras estocadas a -80°C. Abreviaturas - F: Feminino, M: Masculino, OPD: Óbito pela doença, VSR: Vivo sem recidiva, VCR: Vivo com recidiva, VSD: Vivo sem doença, PS: perda de seguimento, Nd: não determinado, 1: presença ou avaliado; 0: ausência ou não avaliado.

Tabela 4 - Dados clínicos e histopatológicos dos 33pacientes cujas amostras tumorais fixadas em formalina e em blocos de parafina submetidas à análise de RT-qPCR (33CCELS).

Paciente	Tecido	Idade/Gênero	Álcool	Tabaco	Localização	TNM	Grau	Recidiva	Metástase à distância	2° Tumor Primário	Followup (Meses)
1PF	CEC	69/M	1	1	Glote	T3N0M0	II	Cervical	Cervical	0	PS(12)
2PF	CEC	70/M	1	1	Glote	T1bN0M0	II	0	0	0	OPD(127)
3PF	CEC	58/M	1	1	Glote	T3N0M0	I	0	0	0	OPD(3)
4PF	CEC	49/M	1	1	Glote	T3N2M0	Nd	Cervical	0	0	VCD(242)
5PF	CEC	60/M	1	1	Glote	T3N1M0	II	0	Ossos (púbis e tórax)	0	OPD(11)
6PF	CEC	45/M	1	1	Glote	Nd	I	0	Pulmão	0	OPD(22)
7PF	CEC	66/M	1	1	Glote	Nd	I	0	0	0	PS(23)
8PF	CEC	58/M	0	1	Glote	T3N0M0	I	0	0	0	PS(150)
9PF	CEC	67/M	1	1	Glote	T2N0M0	I	0	0	0	OOC(135)
10 PF	CEC	43/M	Nd	1	Supraglote	T3N1M0	I	Traqueia	Pulmão	Esôfago e pulmão	OPD(112)
11 PF	CEC	51/M	0	1	Supraglote	T3N0M0	I	0	SNC	Cólon e parede abdominal	OPD(67)
12 PF	CEC	46/M	1	1	Supraglote	T4N2M0	II	Pele submandibular	Osso (Escápula) e Pulmão	0	OPD(38)
13 PF	CEC	66/F	0	1	Supraglote	T4N0M0	I	0	0	0	PS(0.6)
14 PF	CEC	64/M	1	1	Supraglote	T3N1M0	I	0	0	0	OPD(124)
15 PF	CEC	51/F	0	1	Supraglote	T2N0M0	II	0	0	0	PS(85)
16 PF	CEC	60/M	1	1	Supraglote	T3N1M0	II	0	0	CEC palato mole	OPD(0)
17 PF	CEC	69/M	0	1	Supraglote	T2N20M0	I	Seio piriforme	Pulmão	0	OPD(46)
18 PF	CEC	59/M	1	1	Supraglote	TxN0M0	I	0	Pulmão	CBCs de face (21 ocorrências)	OPD(194)
19 PF	CEC	59/M	1	1	Supraglote	T3N0M0	I	0	0	0	OPD(67)
20 PF	CEC	54/M	1	1	Transglote	T2N0M0	I	0	0	Esôfago	Ps(103)
21 PF	CEC	59/F	0	1	Transglote	T3N0M0	I	Cervical	Glândula salivar	Assoalho de boca	PS(182)
22 PF	CEC	44/F	0	1	Transglote	T3N1M0	I	0	0	0	OPD(23)

Cont/ Tabela 4

Paciente	Tecido	Idade/Gênero	Álcool	Tabaco	Localização	TNM	Grau	Recidiva	Metástase a distancia	2º Tumor Primário	Followup (Meses)
23 PF	CEC	67/M	1	1	Transglote	T3N0M0	II	0	0	0	OPD(43)
24 PF	CEC	45/M	1	1	Transglote	T4N3M0	II	Cervical	0	0	OPD(3)
25 PF	CEC	52/M	0	1	Transglote	TxN0M0	I	0	0	0	OPD(1)
26 PF	CEC	48/M	1	1	Transglote	T2N0M0	I	Traqueia	Pulmão	Adenocarcinoma de próstata	OPD(24)
27 PF	CEC	52/M	1	1	Transglote	T3N1M0	I	Assoalho de boca e cervical	0	0	OPD(83)
28 PF	CEC	46/M	Nd	Nd	Transglote	T3N2M0	I	Cervical	0	0	PS (12)
29 PF	CEC	44/F	0	1	Transglote	T4N0M0	I	0	0	0	VSR(186)
30 PF	CEC	47/M	1	1	Transglote	T3N0M0	I	Pele no local da traqueostomia	Pulmão (do segundo primário)	Pulmão e tumor retro molar	VCD(201)
31 PF	CEC	64/M	1	1	Transglote	T4N1M0	II	Local	0	0	OPD(9)
32 PF	CEC	69/M	1	1	Transglote	TxN1M0	I	Local	0	0	OPD(14)
33 PF	CEC	60/M	1	0	Transglote	T4N0M0	II	Cervical	Pulmão	0	OPD(14)
A*	Normal	70/M			Supraglote						
B*	Normal	73/M			Supraglote						
C*	Normal	80/F			Glote						
D*	Normal	77/M			Glote						
E*	Normal	79/M			Supraglote						
F*	Normal	75/F			Subglote						

Abreviaturas - F: Feminino, M: Masculino, todas as amostras - Tumor primário, OPD: Óbito pela doença, OOC: Óbito por outra causa, VSR: Vivo sem recidiva, VCR: Vivo com recidiva, VSD: Vivo sem doença, PS: perda de seguimento. Tratamento – QT: Quimioterapia; RT: Radioterapia; 0: Não; 1:sim, Nd: não determinado, PF: amostra de parafina, HPV: amostras não avaliadas, *: amostra normal de necrópsia.

Tabela 5 - Dados clínicos e histopatológicos de 19 pacientes com CCEL cujas amostras de tumor a fresco foram submetidas à análise de RT-qPCR

Paciente	Tecido	Normal adjacente	Idade/Gênero	Álcool	Tabaco	Localização	TNM	Grau	Recidiva	Metástase a distância	2º tumor primário	Follow-up (Meses)c
1TV	CEC		61/M	0	1	Supraglote	T4N2M0	I	0	0	0	OPD(23)
2TV	CEC		43/F	0	1	Laringe	T3N2M0	II	0	0	0	PS(17)
3TV	CEC		60/M	1	1	Transglote	T4N0M0	II	Local	0	0	OPD(17)
4TV	CEC		77/M	1	1	Transglote	T3N0M0	II	Local	0	0	PS(23)
5TV	CEC		70/M	1	1	Supraglote	T4N0M0	0	Cervical	Pele, Tireóide	0	OPD(24)
6TV	CEC	1	63/M	0	1	Supraglote	T3N2M0	II	0	0	0	OPD(17)
7TV	CEC	1	43/F	1	1	Supraglote	T3N1M0	0	0	0	0	VSR(36)
8TV	CEC		57/M	1	1	Supraglote	T4N0M0	III	0	0	0	VSR(27)
9TV	CEC	1	76/F	0	1	Glote	T2N0M0	0	Local	0	0	VSD(12)
10TV	CEC		61/M	Nd	Nd	Glote	T1bN0M0	0	0	0	Orofaringe	OPD(36)
11TV	CEC		54/M	1	1	Transglote	T3N0M0	0	0	0	Adenocarcinoma de estômago	VSD(159)
12TV	CEC		59/M	Nd	Nd	Glote	Nd	Nd	Nd	Pulmão	0	PS(64)
13TV	CEC		60/M	1	1	Supraglote	T4N3M0	Nd	0	Pulmão	0	PS(82)
14TV	CEC		44/M	Nd	Nd	Glote	T3N1M0	Nd	0	0	0	VSD(144)
15TV	CEC		65/M	Nd	Nd	Supraglote	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	PS(72)
16TV	CEC		78/M	1	1	Glote	T1N0M0	0	Cordeiro Vocal	Generalizada	Pele e Próstata	OPD(88)
17TV	CEC		62/M	1	1	Supraglote	T1N0M0	Nd	0	0	0	PS(42)
18TV	CEC		56/M	1	1	Transglote	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	PS(23)
19TV	CEC		59/M	1	1	Supraglote	Nd	Nd	Hipofaringe	pulmão	0	PS(95)
F	580N	1	Nd			Supraglote						
G	583N	1	Nd			Glote						
H	589N	1	Nd			Glote						
I	603N	1	Nd			Glote						

Abreviaturas - F: Feminino, M: Masculino, todas as amostras - Tumor primário, HPV: não foi avaliado, OPD: Óbito pela doença, VSR: Vivo sem recidiva, VCR: Vivo com recidiva, VSD: Vivo sem doença, PS: perda de seguimento. Tratamento – QT: Quimioterapia; RT: Radioterapia; 0: Não; 1: sim. Nd: Não determinado.

4.4 Análise de expressão global de genes codificadores

A análise de expressão de transcritos foi realizada previamente pelo nosso grupo (Processo CNPq 150129/2011-4, pós-doutorado Ana Hatagima). No estudo atual, os resultados de análise de expressão gênica global foi utilizado para a integração de dados de miRNAs.

Resumidamente, o perfil de expressão gênica foi avaliado utilizando a plataforma *Whole Human Genome 8x60K (Agilent Technologies)*, composta por 62.976 sequências biológicas e 32 sondas para controles positivos *Spike in* (disponível em <http://www.genomics.agilent.com>). Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis (Agilent Technologies)* que utiliza o *Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)*. Os sinais de fluorescência foram capturados pelo scanner Agilent (G2565CA) utilizando o *software Scan Control 8.1 (Agilent Technologies)* e os dados extraídos com o programa *Feature Extraction 10.1.1.1 (Agilent Technologies)*. Após os experimentos, 35/36 amostras preencheram os critérios de qualidade recomendados, o que inclui análises de *background*, uniformidade da hibridação, intensidade dos sinais fluorescentes Cy3 (verde: amostra normal) e Cy5 (vermelha: amostra tumoral). Foram excluídos os valores de expressão de sondas com baixa reprodutibilidade.

Os dados obtidos do perfil de expressão gênica global nas 35 CCEL foram comparados com o *pool* de amostras de laringe não neoplásicas provenientes de necrópsias (n=5), as quais foram utilizadas na co-hibridação. As sondas com razão de $\log_2 > 1$ e < -1 dentro de um intervalo de confiança (IC) de 99% foram consideradas como de maior e menor expressão, respectivamente. O *fold change* (FC) foi definido pela média das sondas representando o mesmo gene contido na lâmina [média da relação de 35 tumores contra o *pool* ($\log_2 \text{Cy3/Cy5}$)]. Os genes resultantes dessa etapa foram utilizados no processo de integração de dados com os miRNAs avaliados.

4.5 Expressão global de miRNAs

O perfil de expressão global de miRNAs foi avaliado utilizando-se a plataforma *Whole Human miRNA Microarray System AgilentG3_miRNA 8x60K (Agilent Technologies)*, composta por 1.872 sequências de miRNAs baseadas no banco de dados do miRBase (*Release 19.0*) e dois microRNAs *Spike-In* (p/n 5190-1934) usados como controles positivos (<http://www.genomics.agilent.com>). Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *one-color microarray-based miRNAs expression*

analysis(AgilentTechnologies). Os procedimentos de desfosforilação, desnaturação, ligação, hibridação e detecção seguiram o protocolo *one-color miRNA Microarray System* (Agilent Technologies), utilizando o kit *miRNA complete labeling and Hyb*(Agilent Technologies), os tampões de lavagem *Gene Expression Wash Buffer* (Agilent Technologies) e os controles internos *Agilents microRNAs Spike-In* (Agilent Technologies). Para o processo de desfosforilação foram utilizados 100ng/ μ L de RNA por amostra diluídas em 2 μ L de água DEPC. Dois microlitros do *master mix* CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) foram adicionados ao RNA e, em seguida, cada amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos. No processo de desnaturação foram adicionados 2,8 μ L de DMSO 100% e incubadas a 100°C por 7 minutos. O processo de ligação foi iniciado com a adição de 4,5 μ L do *master mix* T4 RNA ligase a cada amostra, contendo a enzima que incorpora a cianina 3-pCp na fração 3' UTR do miRNA com uma eficiência de 90% a cada miRNA presente na amostra. As amostras foram então incubadas a 16°C por 2 horas sem exposição a luz, e depois do bloqueio da reação se deu início ao processo de hibridação, no qual foram adicionados 45 μ L do Mix de hibridação que contem o *Spike-In*. O conteúdo foi incubado a 100°C por 5 min e rapidamente foi transferido para o gelo, e por fim, 45 μ L de cada amostra foi aplicado a cada *gride* da lâmina. As lâminas contendo oito amostras foram transferidas para o forno de hibridação por 20 horas a 55°C a 10rpm. Após este período, as imagens de hibridação foram capturadas com o *Scanner Agilent G2565CA* (Agilent Technologies). Os dados foram extraídos pelo *programa Feature Extraction v.10.1.1.1* (Agilent Technologies) e analisados utilizando o *software GeneSpring 12.6* (Agilent Technologies). O sinal de intensidade dos spots sobre o *microarray* foi normalizado com o método *Quantile normalization*. Este tipo de normalização é utilizado para a redução da variância entre *microarrays*. Cada conjunto de sondas foi filtrado com referência aos *flags*, atributos que denotam a qualidade das entidades, juntamente com um percentual de corte (*cut-off* 20% ou 80th *percentil*) que faz a suposição que 20% do conjunto de sondas do genoma em qualquer *microarray* tem valores de intensidade que representam ruído (desde que não são expressos). Posteriormente, a significância foi determinada usando o teste t não pareado com FC (*fold change*) superior a 2, e o teste de correção de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Yekutieli, 2005), para restringir a taxa de falsos positivos ($p < 0.05$).

Para obter o agrupamento hierárquico supervisionado foi aplicada a distância de similaridade métrica (Distância Euclidiana) entre dois valores de expressão e o *linkage rule* que determina a distância máxima de pares entre os membros de cada entidade (miRNA).

4.6 Busca por subtipos moleculares em câncer de laringe

Os maiores intervalos interquartis (20% do total de genes) foram utilizados para a análise de mRNA e miRNAs resultando em 6.010 transcritos e 146 miRNAs. Foi utilizada a distância euclidiana com método de ligação completa pelo programa TMeV versão 4.8.1 (<http://www.tm4.org>), Para definir a reprodutibilidade da separação dos grupos, foi utilizada a técnica de *bootstrapping* (reamostragem) com 1.000 permutações (Efron, 2012).

4.7 Validação pelo banco TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)

Os dados gerados e disponibilizados pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) do NCI (*National Cancer Institute*) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) têm revelado o cenário genético de diversos tipos de câncer, pelo sequenciamento do genoma, análise do número de cópias de DNA, metilação e expressão de mRNA e miRNA em um grande número de tumores e controles (Cancer Genome Atlas Research Network 2013)

Dados de sequenciamento de RNA (Illumina HiSeq v2) avaliados em 93 (para transcritos codificadores) e 94 (para miRNAs) amostras de CCEL e 12 CNL (controle normal de laringe) foram coletados a partir da opção "*Head and Neck cancer*" no portal TCGA (acesso em outubro de 2014). Tanto para mRNA como para miRNA foi utilizado o teste t não pareado ($P < 0.05$) para a comparação entre CCEL e CNL. Para mRNA foi utilizado de FC de 2 e de miRNA um FC de 1,5.

4.8 Análise de Predição de Alvos

Os miRNAs que apresentaram expressão alterada foram avaliados pelos programas *Ingenuity Pathway Analyses* (IPA v8.0, Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA; <http://www.ingenuity.com>) e miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) para a busca em banco de dados de interações experimentalmente observadas (alvo e miRNA validados por técnicas moleculares de alta confiabilidade, como ensaio da luciferase e *western blot*). Também foram utilizados algoritmos de predição de alvos *in silico* pelos programas *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>), *PicTar* (<http://pictar.mdc-b erlin.de/>) e *Diana.microTv.4.0* (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaTools/index.php?r=microtv4/index>), para encontrar interações fortemente preditas ainda não validadas experimentalmente.

Os genes alvo preditos dos miRNAs alterados foram comparados com a lista de genes diferencialmente expressos pela análise de *microarrays* de expressão e previamente confirmados pelo banco de dados TCGA.

4.9 Análise integrada entre dados de expressão global de transcritos codificadores e de miRNAs

Para a análise integrada foram considerados os 32 casos avaliados por expressão global de transcritos codificadores e miRNAs (amostras pareadas). Pelo programa R (www.r-project.org/) foram avaliadas as interações identificadas previamente como experimentalmente validades na busca de correlações negativas (coeficiente de correlação de Spearman).

Em seguida, foi realizada a análise de vias canônicas e redes de interação entre genes obtidos da análise integradoutilizando os programas IPA e KOBAS 2.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>). O programa IPA é uma ferramenta comercial enquanto o programa KOBAS é livre e utiliza um conjunto de banco de dados públicos (KEGG PATHWAY, PID, BioCarta, Reactome, BioCyc e PANTHER). Ambos os programas utilizam o teste exato de Fisher com correção de Benjamin-Hochberg. Foram também selecionadas as vias biológicas potencialmente relacionadas com o desenvolvimento do carcinoma de laringe. Foi realizada a análise de predição de reguladores *upstream* pelo programa IPA, considerando interações experimentalmente comprovadas indiretas e diretas descritas em mamíferos,. Foi também utilizada análises de interações proteína - proteína disponíveis no *Interologous Interaction Database - I2D* (<http://ophid.utoronto.ca/ophidv2.204/>). As imagens de redes foram geradas pelo software *NAViGaTOR V 2.3* (www.ophid.utoronto.ca/navigator/).

Os miRNAs selecionados pela integração de dados foram submetidos a uma análise de alvo de drogas utilizando o banco de dados *Pharmaco-miR* (www.pharmaco-mir.org), que armazena todos os miRNAs relacionados com genes já descritos como alvos de drogas. Os algoritmos de predição e as interações fármacos e proteínas que são anotadas no banco *Pharmacogenomics Knowledge base-PharmGKB* são coletadas por esta base de dados. O resumo das etapas do processo de integração pode ser visualizado no fluxograma abaixo (Figura 2).

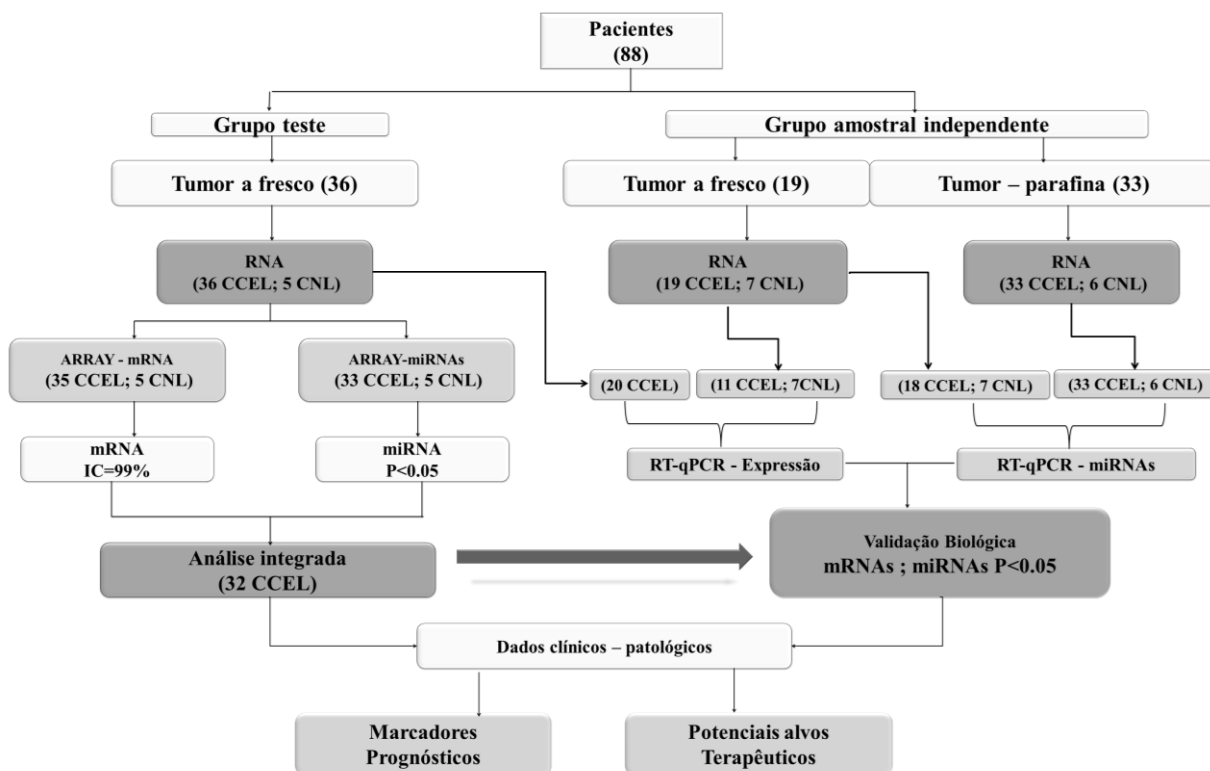


Figura 2. Fluxograma de etapas realizadas no estudo.

4.10 Análise de expressão de transcritos selecionados por RT-qPCR

Os genes selecionados para serem investigados por RT-qPCR foram todos previamente confirmados utilizando banco de dados externos (TCGA). A seleção foi baseada nos resultados da análise integrada, maiores FC, análise *in silico* de vias de sinalização e alvos de drogas. Dez genes regulados por miRNAs em análises *in-silico* e que também estavam alterados no presente estudo foram selecionados para serem avaliados por RT-qPCR incluindo: *COL10A1*, *COL3A1*, *ERBB4*, *HLF*, *HMGA2*, *MMP10*, *MMP13*, *MMP3*, *PPP1R3C* e *TOP2A*.

Os iniciadores foram desenhados usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 6). Os números de acesso das sequências de cada gene plotados na lâmina de *oligoarray* foram anotados e as sequências obtidas no *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Para a análise de mRNA foi utilizado o sistema de detecção Sybr Green I (*Applied Biosystems*) com uso de dois genes controles endógenos (*HMBS* e *HPRT*).

Tabela 6 - Sequências dos iniciadores que foram utilizados na RT-qPCR de transcritos codificadores.

Gene	Iniciadores	Sequência	Tamanho
<i>HMGA2</i>	F	5'-GCAGCTCAAAAAGAAAGCAGAAGCCA-3'	118 pb
	R	5'-GCCCCCTAGTCCTCTTCGGCA-3'	
<i>ERBB4</i>	F	5'-GTACAGTGCTGACCCCACC-3'	136 pb
	R	5'-AACAAAAGGGTTCTCCTCCACT-3'	
<i>COL10A1</i>	F	5'-ACCCAACACCAAGACACAGT-3'	185 pb
	R	5'-GCAACCCTGGCTCTCCTTG-3'	
<i>COL3A1</i>	F	5'-GCCGAGCTTCCCAGAACATC-3'	185 pb
	R	5'-TTCCCCAGTGTGTTTCGTGC-3'	
<i>HLF</i>	F	5'-TCTGAGGAAGAACTGAAGCCAC-3'	101 pb
	R	5'-TTTCTGCGCCTTGCCCA-3'	
<i>MMP3</i>	F	5'-TGGAGATGCCCACTTTGATGA-3'	165 pb
	R	5'-GTCAGGTCTGTGAGTGAGTGA-3'	
<i>MMP10</i>	F	5'-GCTCATGCCTACCCACCTG-3'	105 pb
	R	5'-AGCAACGAGGAATAAATTGGTGC-3'	
<i>MMP13</i>	F	5'-CCTGCTGGCTCATGCTTTTC-3'	160 pb
	R	5'-AGGGTCCTTGGAGTGGTCAA-3'	
<i>PPP1R3C</i>	F	5'-TGGCTTTTAGGGTCCGCC -3'	133 pb
	R	5'-TGGTGAATGTGCCAAGCAAAG - 3'	
<i>TOP2A</i>	F	5'-AGAAGACAGCAGCAAAAAGTCAGTC -3'	179 pb
	R	5'- ACCAGAATTCAAAGCTGGATCC- 3'	
Genes Endógenos			
<i>HMBS*</i>	F	5' GGCAATGCGGCTGCAA 3'	64pb
	R	5' GGGTACCCACGCGAATCAC 3'	
<i>HPRT1*</i>	F	5' TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG 3'	101pb
	R	5' GGCCTCCCATCTCCTTCATC 3'	

F: iniciador *forward*; R: iniciador *reverse*; pb: pares de base; * Genes de referência (endógenos)

As amostras de RNA total foram convertidas em DNA complementar (cDNA) para análises posteriores pela PCR. A primeira etapa consistiu no tratamento das amostras de RNA com DNase, adicionando 1x de DNase I *Reaction Buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 µL de DNase Amp Grade (Invitrogen) em 1 µg de RNA para um volume total de 10 µL de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Às soluções foram adicionadas 2,5 mM de EDTA para inativar a enzima, incubando a 65°C por 10 minutos. O protocolo para a conversão de RNA em cDNA se iniciou com a adição de 2,5 µM de iniciadores oligo dT 12-18 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, St. Giles, UK), 2,5 µM de *random primers* (Invitrogen) 0,5 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (Invitrogen). As amostras foram incubadas por cinco minutos a 65°C e, em seguida, por um minuto em gelo. Foram adicionados 1X de tampão Super Script III First Strand Buffer (Invitrogen), 5 mM de dietiltreitol (DTT) (Invitrogen) e 200 unidades da enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen), voltando-se a incubar as amostras a 55°C por mais 50

minutos, onde ocorre a reação de transcrição reversa e síntese da primeira fita de cDNA. Para a inativação da enzima, as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 70°C por 15 minutos.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando o termociclador *StepOne Plus* (*Applied Biosystems, Life Technologies*), sendo distribuídas em duplicatas em placas de 96 poços, utilizando o reagente *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). A reação foi realizada por 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C. Ao final de cada corrida foram analisadas as curvas de dissociação para a determinação da especificidade dos produtos da PCR. Foram repetidas as reações onde as réplicas mostraram desvio padrão maior que 0,5 entre as quantificações relativas (QR). A média dos valores dos QRs das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse. O cálculo da quantificação relativa foi realizado pelo método proposto por Pfafflet *al.* (2001).

4.11 Análise de expressão de microRNAs (miRNA)

Baseados na confirmação dos achados em banco de dados externos (TCGA), análise integrada, maiores FC e análise *in silico* de alvos de drogas foram selecionados cinco miRNAs para serem avaliados por RT-qPCR: *hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b* e *hsa-miR-92a-3p*. Como referências foram testados quatro genes codificadores de pequenos RNAs nucleolares (*RNU44*, *RNU48*, *RNU6B* e *RNU47*) (Tabela 7).

Tabela 7 -Sequências de miRNAs alvos avaliadas neste estudo.

miRBase ID	Sequência (5'-3')	Nome do ensaio	ID do ensaio*	número miRBase
<i>hsa-miR-199b-5p</i>	GAACAGATAGTCTAAACACTGG	<i>hsa-miR-199b</i>	500	MI0000282
<i>hsa-miR-92a-3p</i>	AGGCATAGGATGACAAAGGG	<i>hsa-miR-92a</i>	431	MI0000093
<i>hsa-miR-125b</i>	TCACAAGTTAGGGTCTC	<i>hsa-miR-125b</i>	449	MI0000446
<i>hsa-miR-204-5p</i>	AGGCATAGGATGACAAAGGG	<i>hsa-miR-204</i>	508	MI0000284
<i>hsa-miR-29c-3p</i>	GAACACCAGGAGAAATCGGT	<i>hsa-miR-29c</i>	587	MI0000735
<i>RNU47</i>	TAATGATTCTGCCAAATGAAATATAA TGATATCACTGTAAAACCGTTCCATTT TGATTCTGAGGT	<i>RNU47</i>	1223	AF141346
<i>RNU48</i>	GATGACCCCAGGTAACCTGAGTGTG TCGCTGATGCCATCACCGCAGCGCTC TGACC	<i>RNU48</i>	1006	NR_002745
<i>RNU44</i>	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGAC TGAACATGAAGGTCTTAATTAGCTCT AACTGACT	<i>RNU44</i>	1094	NR_002750
<i>RNU6B</i>	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGA AGCGTTCCATATTTTT	<i>RNU6B</i>	1093	NR_002752

Fornecedor: **Life Technologies*.

As amostras de RNA foram previamente diluídas para 2ng/μL e a síntese de cDNA foi realizada usando o kit *Taqman miRNA Reverse Transcription*(*Applied Biosystems*), conforme especificações do fabricante.

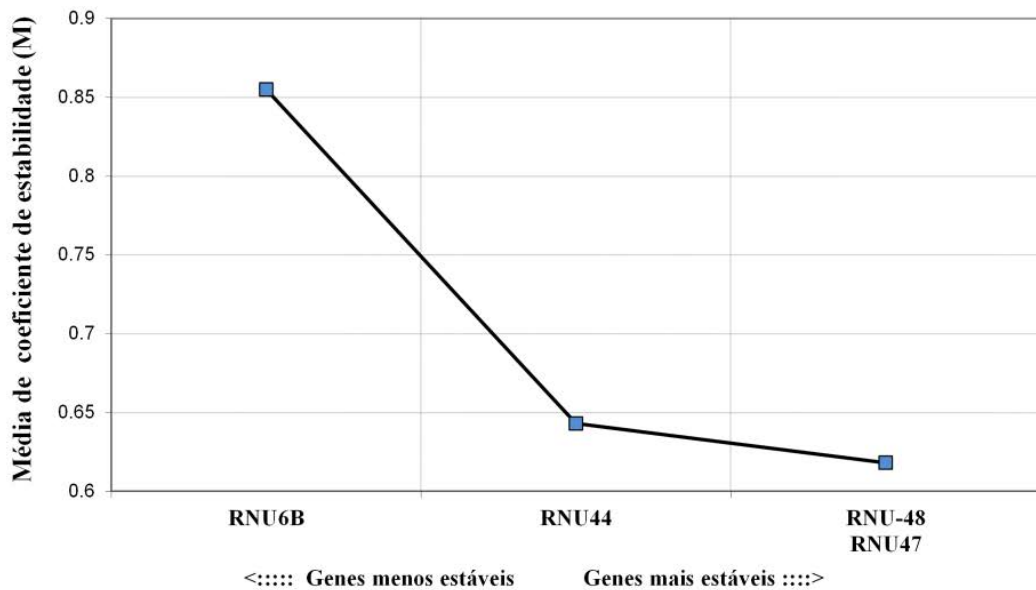
A síntese de cDNA foi realizada com iniciadores específicos para os miRNAs alvos e endógenos. Resumidamente, em um volume final de 15μL foram adicionados 1,5μL de tampão 10X, 0,15μL de dNTP (100mM cada), 3μL de cada iniciador (0,2μM), 0,19μL de RNase Inhibitor (20U/μL), 1μL de *Multiscribe RT enzyme* e 5μL de RNA diluído a 2ng/μL (total de 10ng/μL). Nesta etapa foram utilizados iniciadores em forma de *de loop*, os quais apresentam uma região complementar a sequência de cada miRNA maduro.

As reações foram realizadas no *ABI Prism 7500 Sequence Detection System*(*Life Technologies*). Todos os iniciadores para os miRNAs alvos(*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b*, e *hsa-miR-92a-3p*) e de referência (*RNU48* e *RNU47*) foram adquiridos no formato *TaqMan® MicroRNA Assays* (*Applied Biosystems*), o qual tem sondas marcadas com fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando o *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (*Applied Biosystems*). Resumidamente, em um volume final de 10μL de reação foram adicionados 5μL de Master Mix 2X concentrado, 0,5μL (0,2μM) do mix de iniciadores e sonda e 0,7μL de cDNA específico para cada miRNA.

4.12 Seleção de referências e normalização da expressão relativa de miRNAs obtidos por RT-qPCR

A estabilidade da expressão dos *RNU44*, *RNU48*, *RNU6b* e *RNU47* foi testada como possível referência para a normalização dos miRNAs alvos pelo programa geNorm (disponível em <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) de acordo com Vandesomepele, *et al.*(2002). Esta análise tem como objetivo determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras. A seleção destes miRNAs baseou-se em dados da literatura, que mostraram pouca variação em outros tecidos tumorais (Gee *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011). Para esta análise foram incluídas cinco amostras de laringe normal e cinco tumorais. As referências *RNU48* e *RNU47* foram os mais estáveis (coeficiente de estabilidade [M] = 0.62; variação aos pares [v2/3] = 0.193) (Figura 3).

A Média de valores de estabilidade de expressão para os genes controles remanescentes



B Determinação do número ideal de genes controle para a normalização

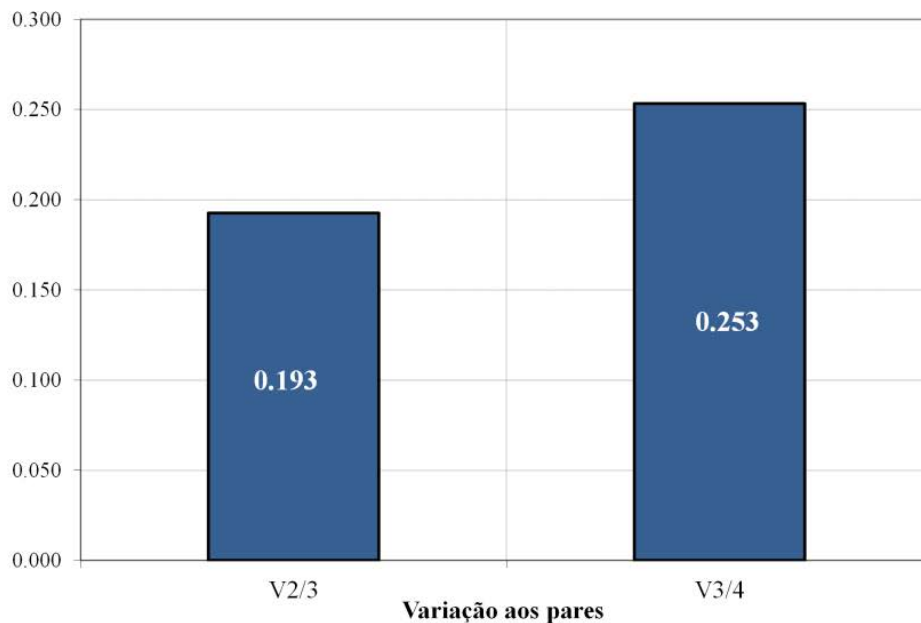


Figura 3. A) Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos quatro transcritos de referência selecionados (*RNU6B*, *RNU44*, *RNU47* e *RNU48*), indicando *RNU47* + *RNU48* como o melhor par ($M=0,62$). B) Determinação do número adequado de transcritos de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que o uso dos três transcritos (2/3) permite a normalização com maior fidelidade (*RNU48* + *RNU47* + *RNU44*). Esta análise permitiu estimar o número de transcritos de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização.

Para a normalização e quantificação relativa de expressão gênica dos miRNA alvos foi utilizado o modelo matemático de Pfaffl (2001) assumindo eficiência na reação de amplificação de 100%.

$$ERN = \frac{(E+1)_{\text{alvo}}^{\Delta Cq_{\text{alvo}}}}{(E+1)_{\text{referência}}^{\Delta Cq_{\text{referência}}}}$$

Onde:

ERN – expressão relativa normalizada do gene alvo ou QR (quantificação relativa)

E – eficiência de reação de amplificação

ΔCq – diferença entre o Cq obtido para a amostra referência e o Cq obtido para a amostra em análise.

Ao utilizar mais de um gene na normalização das reações de amplificação aplicou-se a média geométrica dos valores de expressão relativa (ou fator de normalização gerado pelo programa *geNorm*) dos genes de referência mais apropriados, como segue:

$$ERN = \frac{2^{\Delta Cq_{\text{alvo}}}}{FN}$$

Onde: **FN**- fator de normalização

Os testes estatísticos foram realizados após as exclusões de *outliers* extremos (três vezes o intervalo interquartil), utilizando teste t não pareado com variâncias desiguais.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de Expressão de Transcritos e miRNAs

A análise de expressão de transcritos obtida em 35 casos de CCEL comparada com cinco amostras de tecidos normais de laringe (CNL), revelou 1.680 genes diferencialmente expressos ($FC > 2$, IC 99%), sendo 1.112 genes com expressão aumentada e 568 genes com expressão diminuída.

A expressão global de miRNAs foi realizada em 33 amostras de CCEL e 5 CNL. Todas as amostras atingiram os parâmetros de qualidade e foram plotadas no gráfico de Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis-PCA*) no programa *GeneSpring v 12.6*. Os componentes principais são vetores que capturam a maior variância nos dados. Além disso, cada amostra dentro de uma condição experimental deve ser mais próxima uma da outra do que em relação às demais amostras que apresentam condições diferentes. No presente estudo foram observados dois grupos claramente diferenciados: um contendo apenas as amostras tumorais e o outro as amostras normais (Figura 4).

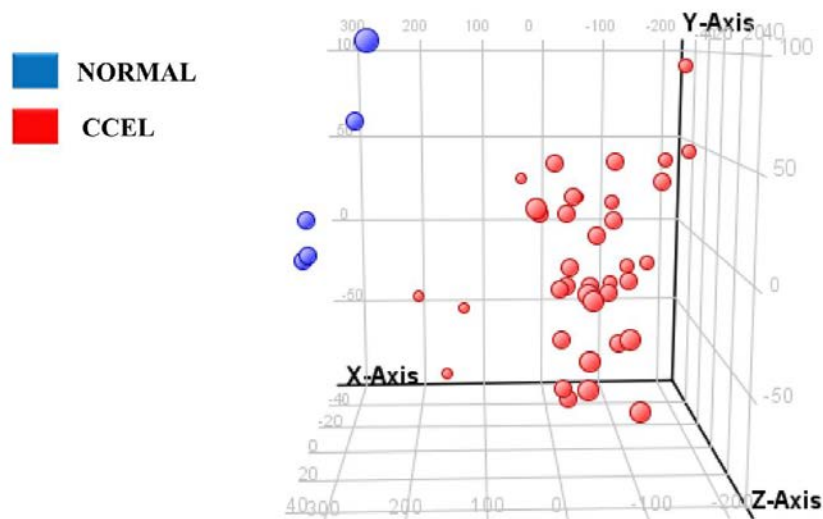


Figura 4. As 33 amostras tumorais são representadas por esferas vermelhas. As amostras normais são representadas por esferas azuis. As amostras foram plotadas no PCA de acordo aos valores de normalização sendo possível observar dois grupos distintos.

Entre as 2.019 sequências de miRNAs presentes na plataforma utilizada, foram filtrados 1.368 miRNAs os quais foram submetidos a uma análise estatística detalhada. Para isso foi utilizado o teste t não pareado e aplicado o teste de correção de Benjamini Hochberg para diminuir a taxa de falsos positivos. O resultado dessa análise revelou 89 miRNAs diferencialmente expressos ($p < 0.05$) (69 com diminuição e 20 com aumento de expressão) (Figura 5; Tabela 9 e Tabela Suplementar: S3).

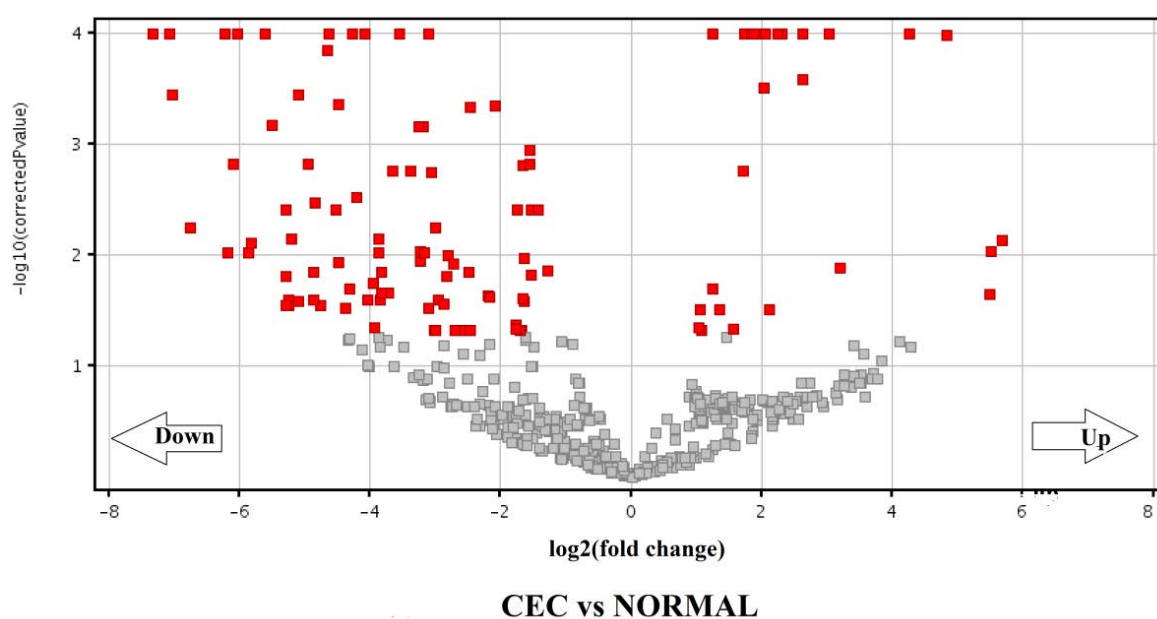


Figura 5. Volcano Plot representando os 89 miRNAs (em vermelho) identificados como diferencialmente expressos ($P < 0.05$) na comparação entre tecidos tumorais e normais de laringe.

5.2 Validação de transcritos codificadores e miRNA pelo banco de dados TCGA

Foram identificados 1.680 transcritos diferencialmente expressos, onde 846 foram confirmados pelo TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) (93 CCEL vs. 12 CNL). Entre os 89 miRNA obtidos nesta análise, 35 miRNAs (39%) foram confirmados pelo TCGA (94 CCEL vs. 12 CNL) (Figura 6). Os 40 transcritos de maiores FC e confirmados por dados externos e os 35 miRNA confirmados por dados externos podem ser visualizadas nas tabelas 8 e 9, respectivamente. Os outros transcritos confirmados (Tabela Suplementar: S1) além dos transcritos e miRNAs não confirmados pelo TCGA estão apresentados nas Tabelas Suplementares 2 e 3, respectivamente.

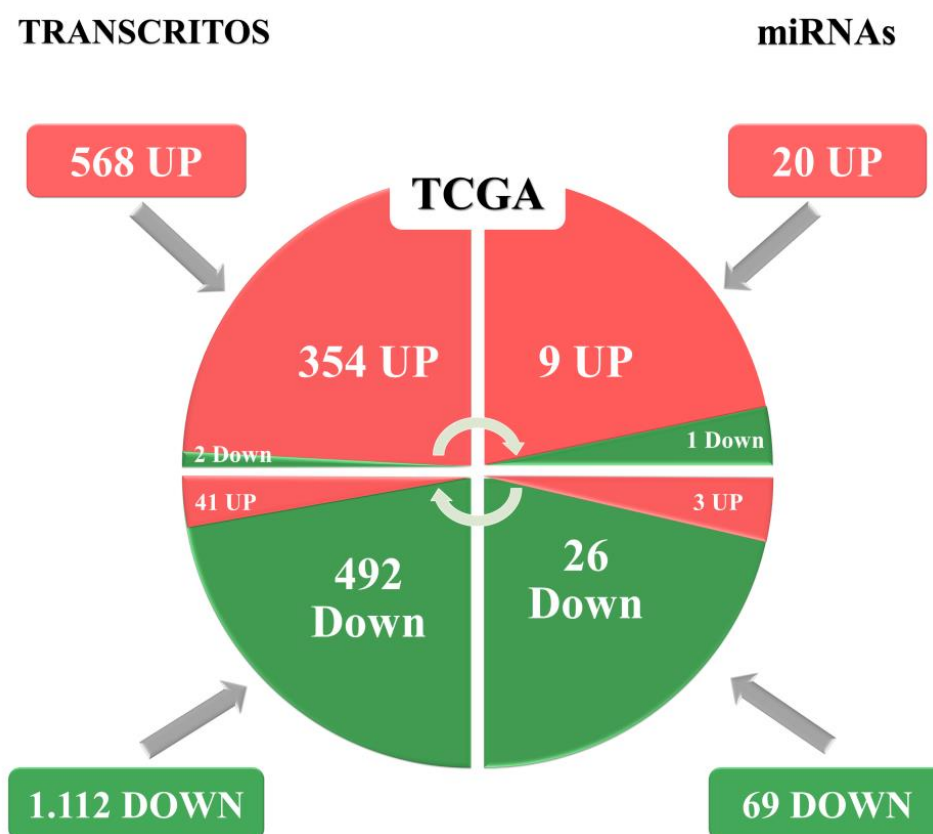


Figura 6. Desempenho da confirmação dos transcritos e miRNAs diferencialmente expressos em CCEL em relação ao tecido não neoplásico de laringe pelo banco de dados do TCGA. UP: expressão aumentada, DOWN: expressão diminuída.

Tabela 8. Principais genes com aumento e diminuição de expressão em CCEL e que também foram relatados como diferencialmente expressos e na mesma direção na comparação com dados externos (TCGA – <http://cancergenome.nih.gov/>).

Símbolo do gene	Descrição	Estudo atual	Dados externos	
		FC*	FC#	P (teste t)
<i>MMP12</i>	<i>matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)</i>	84.7	12.2	2.06E-05
<i>MMP1</i>	<i>matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)</i>	33.0	21.5	2.62E-05
<i>CTHRC1</i>	<i>collagen triple helix repeat containing 1</i>	26.4	14.7	4.84E-07
<i>HOXC9</i>	<i>homeobox C9</i>	20.3	14.4	1.45E-08
<i>MMP13</i>	<i>matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)</i>	17.4	58.7	7.42E-05
<i>POSTN</i>	<i>periostin, osteoblast specific factor</i>	16.1	14.8	7.04E-07
<i>MAGEA1</i>	<i>melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E)</i>	16.0	137.3	6.04E-09
<i>COL10A1</i>	<i>collagen, type X, alpha 1</i>	14.9	93.0	1.41E-09
<i>LRRC15</i>	<i>leucine rich repeat containing 15</i>	12.5	34.3	1.30E-07
<i>MMP10</i>	<i>matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)</i>	12.5	2.9	3.57E-02
<i>LUM</i>	<i>lumican</i>	11.8	4.6	8.94E-05
<i>HOXC6</i>	<i>homeobox C6</i>	11.6	12.0	1.35E-06
<i>PLA2G7</i>	<i>phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)</i>	11.4	9.4	5.74E-08
<i>LHX2</i>	<i>LIM homeobox 2</i>	10.4	17.1	7.01E-08
<i>FCGR3A</i>	<i>Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)</i>	9.9	5.2	9.93E-06

Cont/ Tabela 8

Símbolo do gene	Descrição	Estudo atual	Dados externos	
		FC*	FC#	P (teste t)
<i>HOXD13</i>	<i>homeobox D13</i>	9.9	79.6	9.03E-19
<i>COL3A1</i>	<i>collagen, type III, alpha 1</i>	9.6	3.6	1.43E-04
<i>HSD17B6</i>	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)</i>	9.5	4.7	2.05E-08
<i>HMGA2</i>	<i>high mobility group AT-hook 2</i>	9.2	14.3	5.35E-06
<i>MMP11</i>	<i>matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)</i>	9.0	52.6	3.61E-11
<i>CAPN14</i>	<i>calpain 14</i>	-21.4	-25.0	5.24E-06
<i>SLURP1</i>	<i>secreted LY6/PLAUR domain containing 1</i>	-21.8	-8.1	7.75E-04
<i>PSCA</i>	<i>prostate stem cell antigen</i>	-22.5	-11.7	2.36E-13
<i>PRR4</i>	<i>proline rich 4 (lacrima)</i>	-23.1	-51.2	1.57E-02
<i>LTF</i>	<i>lactotransferrin</i>	-27.5	-6.8	2.57E-03
<i>CYP2F1</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1</i>	-27.8	-17.2	2.89E-06
<i>PADI1</i>	<i>peptidyl arginine deiminase, type 1</i>	-31.3	-27.8	3.83E-13
<i>PAX1</i>	<i>paired box 1</i>	-32.6	-9.0	4.10E-04
<i>MYOC</i>	<i>myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response</i>	-34.0	-31.4	2.77E-05
<i>ZG16B</i>	<i>zymogen granule protein 16 homolog B (rat)</i>	-37.1	-36.1	7.96E-03
<i>KRT4</i>	<i>keratin 4</i>	-40.7	-86.3	1.29E-07
<i>LPO</i>	<i>lactoperoxidase</i>	-41.1	-39.8	4.56E-02
<i>MAL</i>	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	-43.7	-61.3	1.30E-05
<i>TMPRSS11B</i>	<i>transmembrane protease, serine 11B</i>	-44.8	-62.2	2.12E-05
<i>PRB4</i>	<i>proline-rich protein BstNI subfamily 4</i>	-45.8	-1741.3	3.88E-02
<i>CRNN</i>	<i>cornulin</i>	-50.2	-86.5	2.52E-05
<i>MUC21</i>	<i>mucin 21, cell surface associated</i>	-63.3	-56.8	2.94E-07
<i>PRH2</i>	<i>proline-rich protein HaeIII subfamily 2</i>	-182.0	-52.8	7.52E-03
<i>STATH</i>	<i>statherin</i>	-238.3	-29.9	5.24E-03
<i>PIP</i>	<i>prolactin-induced protein</i>	-671.2	-78.4	1.28E-02

Legenda.FC: Fold change; *baseado na média da razão de log₂ dos CCEL, os quais foram co-hibridados com *opool* de cinco controles de laringes não neoplásica proveniente de necropsias. #baseado na média dos CCEL em relação à média do tecido não neoplásico adjacente utilizado pelo TCGA.

Tabela 9. microRNAs diferencialmente expressos em CCEL os quais também encontravam-se como diferencialmente expressos e na mesma direção na comparação com dados externos (TCGA - <http://cancergenome.nih.gov/>).

microRNA	Estudo atual		Dados externos	
	FC*	P (teste t ^o)	FC#	P (teste t)
<i>hsa-miR-92a</i>	66.6	3.29E-03	1.5	1.50E-02
<i>hsa-miR-193b</i>	14.1	2.28E-02	2.7	5.07E-04
<i>hsa-miR-93</i>	9.2	3.30E-06	2.6	7.55E-05
<i>hsa-miR-21*</i>	4.9	2.02E-04	2.1	8.22E-04
<i>hsa-miR-324-3p</i>	4.4	5.00E-07	1.7	2.06E-03
<i>hsa-miR-1246</i>	4.3	4.95E-02	1.8	7.78E-10
<i>hsa-miR-1305</i>	2.4	1.15E-05	1.7	1.68E-03
<i>hsa-miR-21</i>	2.3	4.18E-02	2.1	8.22E-04
<i>hsa-miR-25</i>	2.3	4.48E-02	1.6	3.77E-03
<i>hsa-miR-23b</i>	-2.6	1.23E-02	-1.5	3.66E-02
<i>hsa-let-7c</i>	-3.0	6.31E-03	-4.7	7.51E-06

Cont/ Tabela 9

microRNA	Estudo atual		Dados externos	
	FC*	P (teste t ^o)	FC [#]	P (teste t)
<i>hsa-miR-125b</i>	-3.0	3.91E-02	-3.2	9.80E-05
<i>hsa-miR-29a</i>	-3.1	3.44E-04	-3.0	7.06E-06
<i>hsa-miR-27b</i>	-3.1	3.54E-03	-2.0	2.74E-03
<i>hsa-miR-29b*</i>	-4.3	4.95E-02	-1.6	2.62E-02
<i>hsa-miR-100</i>	-6.1	5.68E-03	-4.9	6.73E-06
<i>hsa-miR-29a*</i>	-9.0	1.81E-04	-3.0	7.06E-06
<i>hsa-miR-3154</i>	-9.4	3.13E-02	-1.5	7.18E-03
<i>hsa-miR-140-3p</i>	-12.1	4.62E-02	-2.6	6.73E-03
<i>hsa-miR-199b-5p</i>	-13.7	2.01E-02	-1.8	2.07E-02
<i>hsa-miR-582-5p</i>	-16.6	1.11E-02	-1.8	1.31E-03
<i>hsa-miR-139-5p</i>	-17.6	4.97E-05	-5.6	1.95E-06
<i>hsa-miR-135a</i>	-26.0	9.30E-06	-2.1	1.26E-02
<i>hsa-miR-136*</i>	-29.9	6.09E-06	-2.3	6.37E-03
<i>hsa-miR-30e*</i>	-35.6	1.02E-03	-2.0	3.42E-04
<i>hsa-miR-143</i>	-39.5	2.47E-02	-2.1	2.73E-02
<i>hsa-miR-376c</i>	-42.2	4.95E-02	-1.9	3.69E-02
<i>hsa-miR-29c*</i>	-54.0	4.13E-06	-4.6	1.05E-06
<i>hsa-miR-30a*</i>	-66.7	1.87E-06	-3.0	6.09E-05
<i>hsa-miR-377</i>	-67.8	1.16E-02	-2.2	4.86E-03
<i>hsa-miR-136</i>	-68.7	5.83E-03	-2.3	6.37E-03
<i>hsa-miR-204</i>	-73.0	1.74E-04	-5.4	1.19E-06
<i>hsa-miR-140-5p</i>	-114.6	9.63E-03	-2.6	6.73E-03
<i>hsa-miR-338-3p</i>	-151.0	3.11E-04	-3.0	7.48E-04
<i>hsa-miR-218</i>	-153.7	4.01E-07	-2.1	2.51E-03

Legenda. °correção por Benjamin-Hochberg; FC: *Fold change*; *baseado na média dos CCEL em relação à média dos cinco controles de laringes não neoplásica proveniente de necropsias; #baseado na média dos CCEL em relação à média do tecido não neoplásico adjacente utilizado pelo TCGA

5.3 Análises *insilico* de vias canônicas alteradas

Os 846 transcritos que foram confirmados como alterados no TCGA foram submetidos à análise *in silico* de vias canônicas alteradas pelos programas IPA e KOBAS 2.0, resultando em vias envolvidas na carcinogênese, invasão e metástase incluindo: degradação de colágeno, interação de receptores da matriz extracelular (ECM), via de sinalização de integrinas, sinalização da oncostatina M e degradação de nicotina. Estas vias alteradas podem ser visualizadas nas Tabelas Suplementares 4 e 5.

A análise de predição de inativação/ativação de reguladores *upstream* pelo programa IPA revelou uma possível inativação dos microRNAs *hsa-let-7*, *hsa-miR-29b* e *hsa-miR-204* (Figura 7). De fato, *hsa-let-7c*, um membro da família de microRNAs *let-7*, assim como *hsa-*

miR-29b e *hsa-miR-204* foram observados como menos expressos nos tumores (todos confirmados pelo TCGA).

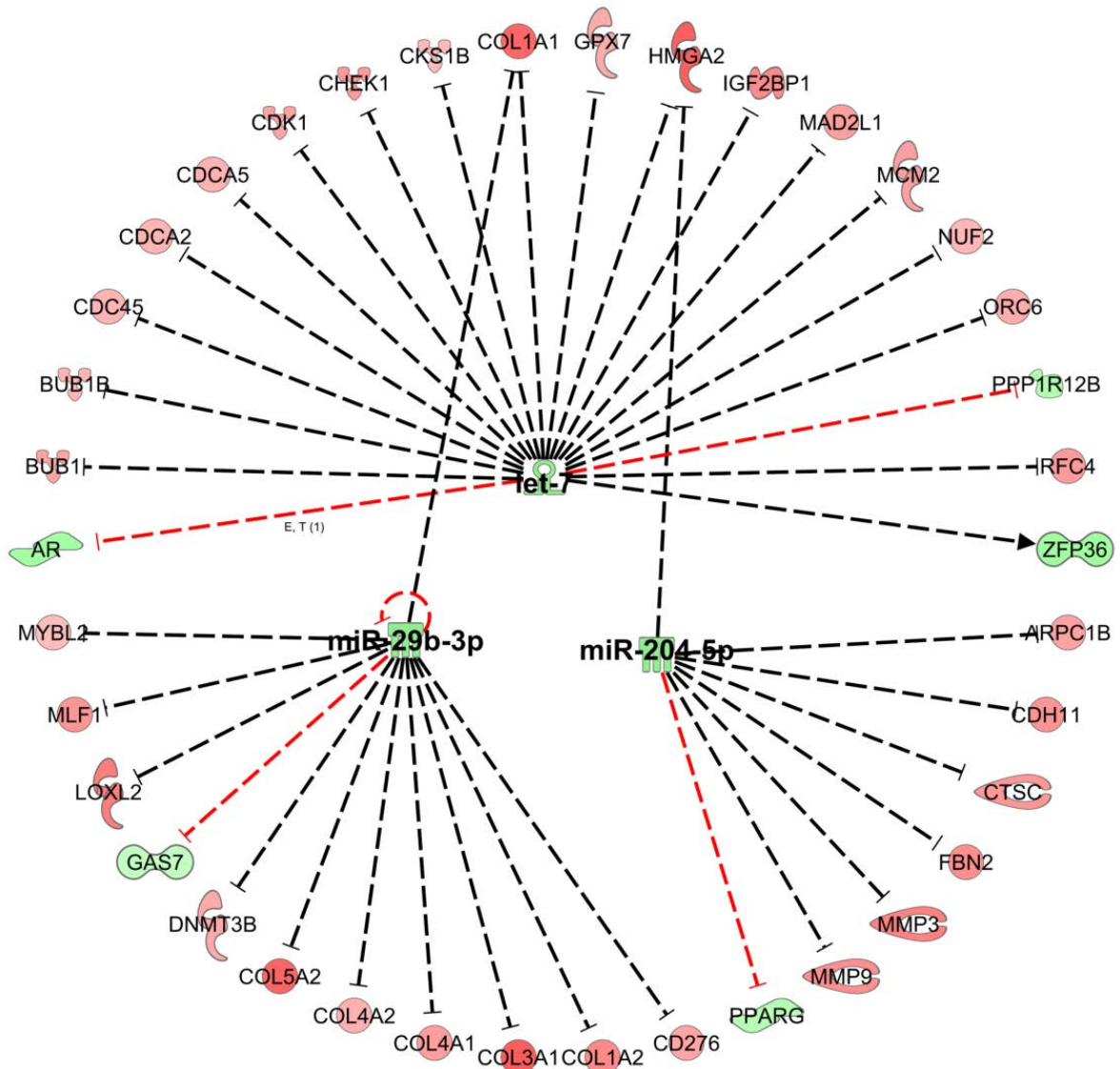


Figura 7. Predição de ativação/inativação de microRNAs pelo programa IPA (análise de reguladores *upstream*). A figura demonstra a predição de inativação dos microRNAs let-7, mir-29b e mir-204, que foram observados como apresentando expressão diminuída em CCEL.

Legenda. verde: diminuição de expressão em CCEL; vermelho: aumento de expressão em CCEL; linha tracejada preta: efeito esperado; linha tecejada vermelha: efeito não-esperado.

5.4 Análise integrada dos dados globais de expressão de transcritos e de miRNAs

O conjunto de abordagens utilizadas para a integração dos dados de transcritos codificadores e miRNAs está resumido no fluxograma abaixo (Figura 8).

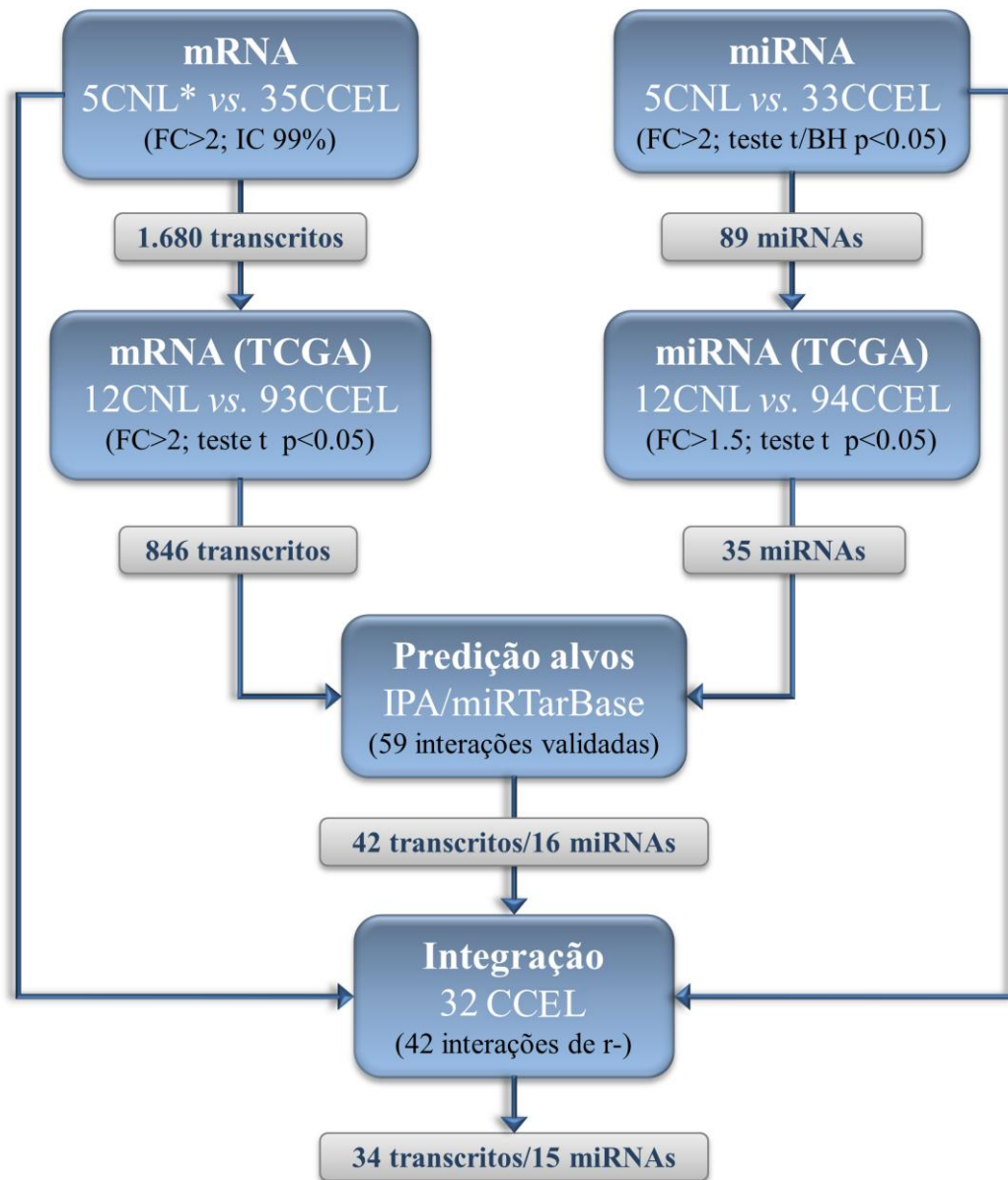


Figura 8. Fluxograma resumindo as abordagens utilizadas para a análise integrada dos dados de expressão gênica e de miRNAs. Pela comparação do perfil de transcritos codificadores entre carcinomas células escamosas de laringe (CCEL) e controles não neoplásicos de laringe (CNL), foram identificados 1.680 genes diferencialmente expressos, dos quais 846 foram confirmados por banco de dados externos (TCGA). Os genes foram submetidos à análise *in silico* de vias de sinalização pelos programas IPA e KOBAS. Pela comparação do perfil de expressão de miRNAs, 89 foram diferencialmente expressos nos CCEL em relação ao CNL. 35 microRNAs foram confirmados por banco de dados externos (TCGA). Com o uso dos programas IPA e miRTarBase, 59 interações experimentalmente validadas foram detectadas entre os transcritos codificadores e microRNAs, representadas por 42 transcritos e 16 microRNAs. Uma análise integrada foi realizada com os 32 CCEL avaliados por ambas as plataformas, confirmando os coeficientes de correlação negativos em 42 interações, compreendendo 33 transcritos e 15 microRNAs. Foram realizadas análises *in silico* de vias e redes, identificando possíveis alvos de tratamento.

Dentre as 74 interações experimentalmente validadas encontradas entre os miRNAs e os transcritos (miRTarBase e IPA), 59 apresentaram *fold change* em direção inversa (expressão diminuída do miRNA e aumentada do transcrito ou expressão aumentada do miRNA e diminuição do transcrito) (Figura 9).

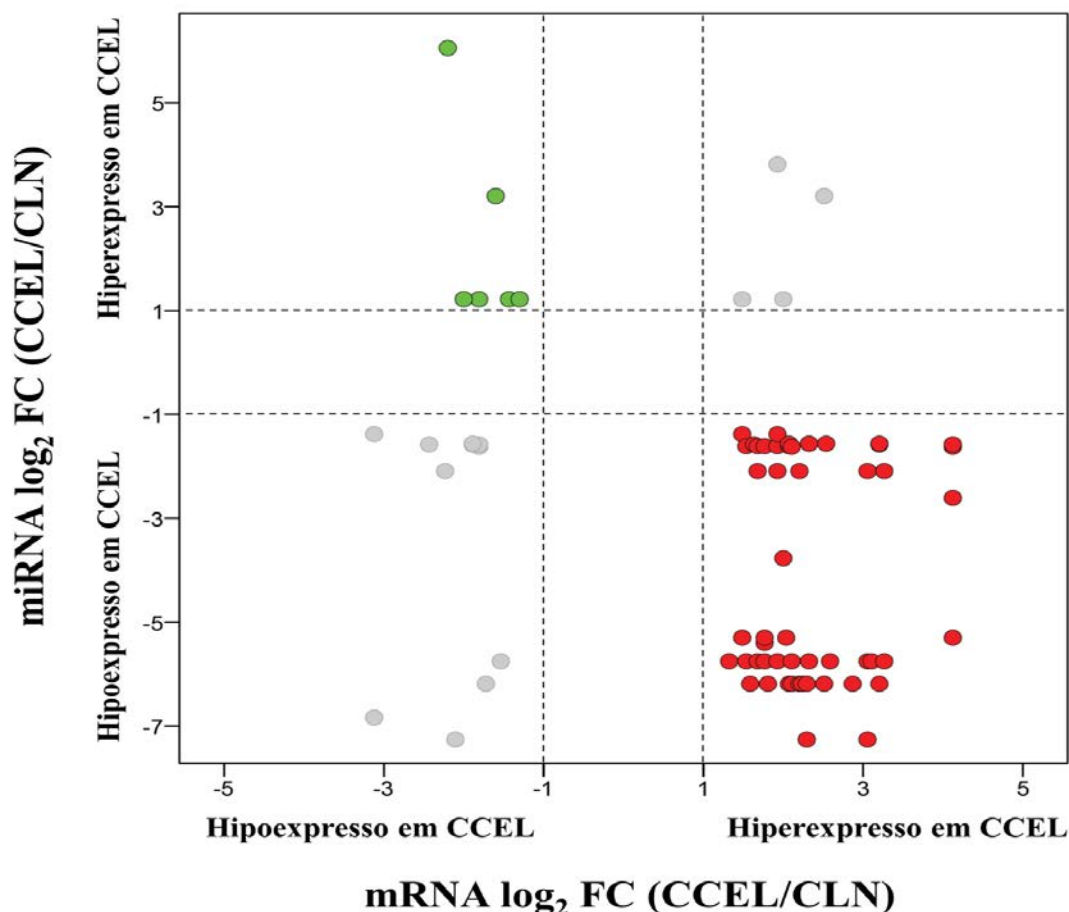


Figura 9. Gráfico de dispersão compreendendo valores em log₂ de *fold changes* (FC) de microRNAs e mRNA. A distribuição de FC dos transcritos e seus respectivos microRNAs reguladores, reportados como interações experimentalmente validadas pelo programa TarBase e/ou IPA (r Spearman = -0.248, $P = 0.033$).

Legenda. Verde: transcritos apresentando expressão diminuída e miRNAs com expressão aumentada em CCEL; vermelho: transcritos com aumento de expressão e miRNAs com diminuição de expressão em CCEL; cinza: relações não esperadas.

Para a integração dos dados, foi realizada uma análise de correlação utilizando apenas amostras avaliadas pelas duas estratégias (32 CCEL). Considerando os miRNAs como um regulador epigenético da expressão de genes, foram consideradas interações de correlação negativa ($r < 0$). Ou seja, miRNAs com expressão elevada atuariam diminuindo a expressão de seus alvos, do mesmo modo a diminuição de expressão dos miRNAs aumentaria a expressão dos seus alvos. Esta análise resultou em 42 interações entre os 33 transcritos codificadores e os 15 miRNAs (Tabela Suplementar: S6 e Figura 10)

ANÁLISE INTEGRADA

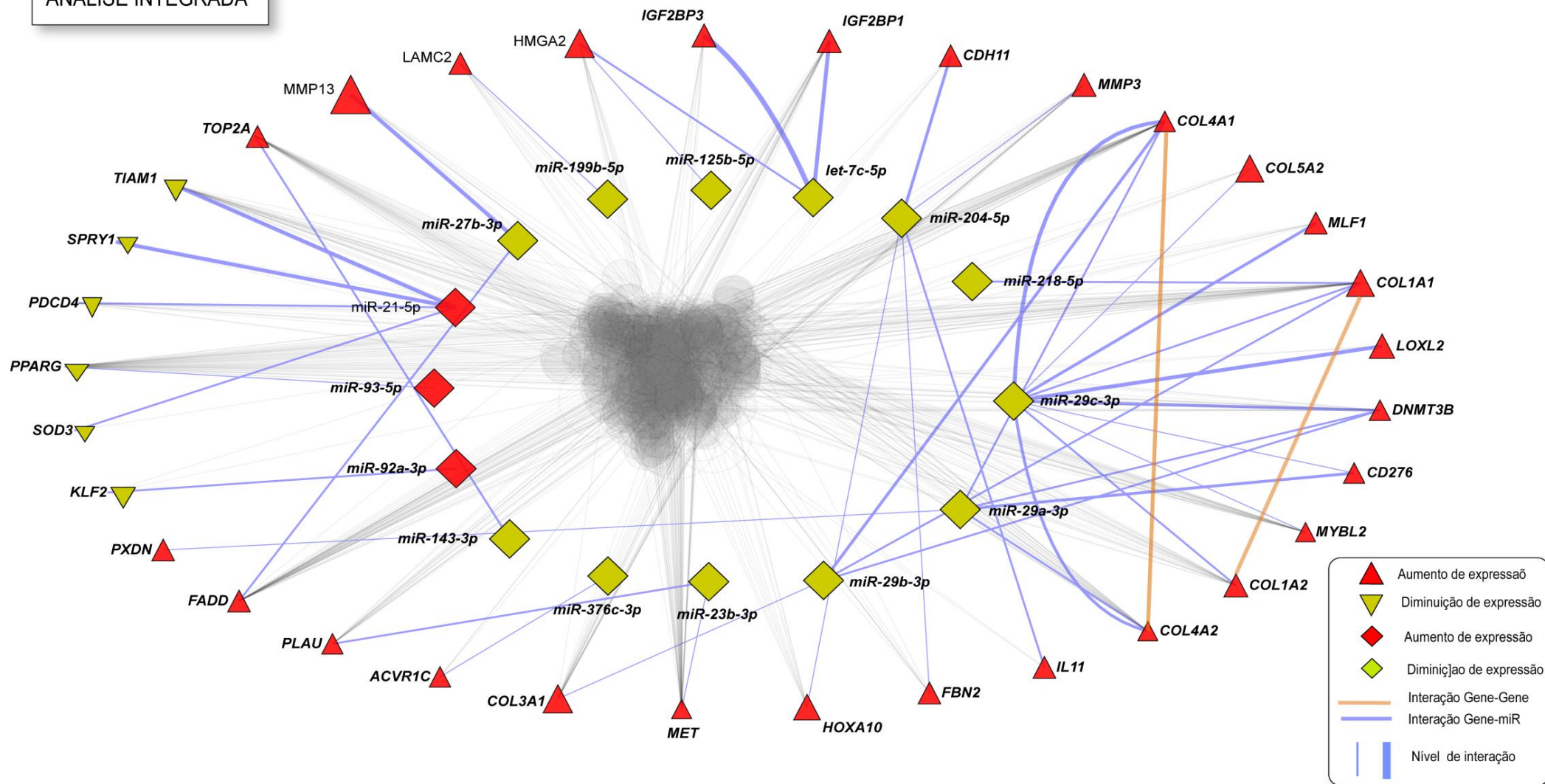


Figura 10. Rede da análise integrada gerada pelo software *NAVIGATOR* v2.3 mostrando os miRNAs e seus alvos confirmados experimentalmente, disponíveis no miTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). O tamanho dos símbolos representando os genes e os miRNA foi baseada no *fold change* (FC) (quanto maior a expressão, maior o tamanho do símbolo ou o inverso).

5.5 Análises *in silico* de vias e redes com genes regulados por miRNAs

Os genes resultantes da análise integrada foram submetidos a uma análise de vias canônicas pelos programas IPA e KOBAS 2.0 para predizer possíveis mecanismos biológicos associados aos genes regulados por miRNA em CCEL. O resultado desta análise mostrou que os genes atuam em diferentes processos biológicos, sendo os principais: metabolismo e degradação de colágeno e formação e degradação da matriz extracelular (Tabela 10). O papel dos genes avaliados nos processos relacionados com o metabolismo e a degradação da matriz extracelular foram observados pelos dois programas utilizados (IPA e KOBAS 2.0) (Figura 11).

Tabela 10. Vias canônicas de sinalização significativamente alteradas pelo programa IPA e KOBAS considerando os 33 genes ao final da análise integrada.

Vias Canônicas (IPA)	Transcritos encontrados	P*
<i>Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation</i>	<i>MET, COL1A2, COL1A1, COL5A2, COL4A1, MMP13, COL4A2, COL3A1</i>	<0.001
<i>Atherosclerosis Signaling</i>	<i>COL1A2, COL1A1, MMP3, MMP13, COL3A1</i>	<0.001
<i>Intrinsic Prothrombin Activation Pathway</i>	<i>COL1A2, COL1A1, COL3A1</i>	<0.001
<i>Oncostatin M Signaling</i>	<i>MMP3, MMP13, PLAU</i>	0.001
<i>Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis</i>	<i>COL1A1, MMP3, MMP13, IL11</i>	0.008
<i>Inhibition of Matrix Metalloproteases</i>	<i>MMP3, MMP13</i>	0.026
<i>Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases</i>	<i>MMP13, IL11</i>	0.029
<i>Dendritic Cell Maturation</i>	<i>COL1A2, COL1A1, COL3A1</i>	0.034
Vias Canônicas (KOBAS)	Transcritos encontrados	P*
<i>Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, MMP13, LOXL2, LAMC2, MMP3, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Collagen formation</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, MMP13, LOXL2, LAMC2, MMP3, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Degradation of the extracellular matrix</i>	<i>COL1A2, FBN2, MMP3, COL4A1, MMP13, LAMC2, COL4A2, COL3A1, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Collagen degradation</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, MMP13, COL1A1, MMP3, COL5A2</i>	<0.001
<i>Extracellular matrix organization</i>	<i>COL1A2, FBN2, MMP3, COL4A1, MMP13, LOXL2, LAMC2, COL4A2, COL3A1, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Non-integrin membrane-ECM interactions</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Anchoring fibril formation</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL4A1, COL1A1, LAMC2</i>	<0.001
<i>Scavenging by Class A Receptors</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL1A1, COL3A1, COL4A1</i>	<0.001
<i>Collagen biosynthesis and modifying enzymes</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, COL1A1, COL5A2</i>	<0.001
<i>ECM proteoglycans</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, COL1A1, COL5A2</i>	<0.001
<i>ECM-receptor interaction</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL1A1, COL3A1, COL4A1</i>	<0.001
<i>Integrin cell surface interactions</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, COL1A1, COL5A2</i>	<0.001

Legenda. *teste exato de Fisher com correção por Benjamin-Hochberg.

Cont/ Tabela 10

Vias Canônicas (KOBAS)	Transcritos encontrados	P*
<i>Amoebiasis</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Syndecan interactions</i>	<i>COL1A2, COL5A2, COL3A1, COL1A1</i>	<0.001
<i>Beta1 integrin cell surface interactions</i>	<i>COL1A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1, PLAU</i>	<0.001
<i>Protein digestion and absorption</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, COL1A1, COL5A2</i>	<0.001
<i>Integrin signalling pathway</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1</i>	<0.001
<i>Focal adhesion</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1, MET</i>	<0.001
<i>Crosslinking of collagen fibrils</i>	<i>COL1A2, LOXL2, COL1A1</i>	<0.001
<i>NCAM1 interactions</i>	<i>COL4A2, COL5A2, COL3A1, COL4A1</i>	<0.001
<i>Transcriptional misregulation in cancer platelet amyloid precursor protein pathway</i>	<i>HOXA10, MMP3, HMG2, MLF1, PPARG, MET, PLAU</i>	0.001
<i>Plasminogen activating cascade</i>	<i>MMP13, MMP3, PLAU</i>	0.004
<i>NCAM signaling for neurite out-growth</i>	<i>COL4A2, COL5A2, COL3A1, COL4A1</i>	0.005
<i>Laminin interactions</i>	<i>COL4A2, COL4A1, LAMC2</i>	0.007
<i>Developmental Biology</i>	<i>COL4A2, COL3A1, COL4A1, TIAMI, ACVR1C, PPARG, COL5A2, MET</i>	0.011
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	<i>COL1A2, COL4A2, COL3A1, COL4A1, LAMC2, COL5A2, COL1A1, MET</i>	0.012
<i>Beta3 integrin cell surface interactions</i>	<i>COL1A2, COL1A1, PLAU, COL4A1</i>	0.025
<i>Axon guidance</i>	<i>COL4A2, COL3A1, COL4A1, TIAMI, COL5A2, MET</i>	0.027
<i>Platelet Adhesion to exposed collagen regulators of bone mineralization</i>	<i>COL1A2, COL1A1</i>	0.035
	<i>COL4A2, COL4A1</i>	0.044

Legenda. *teste exato de Fisher com correção por Benjamin-Hochberg.

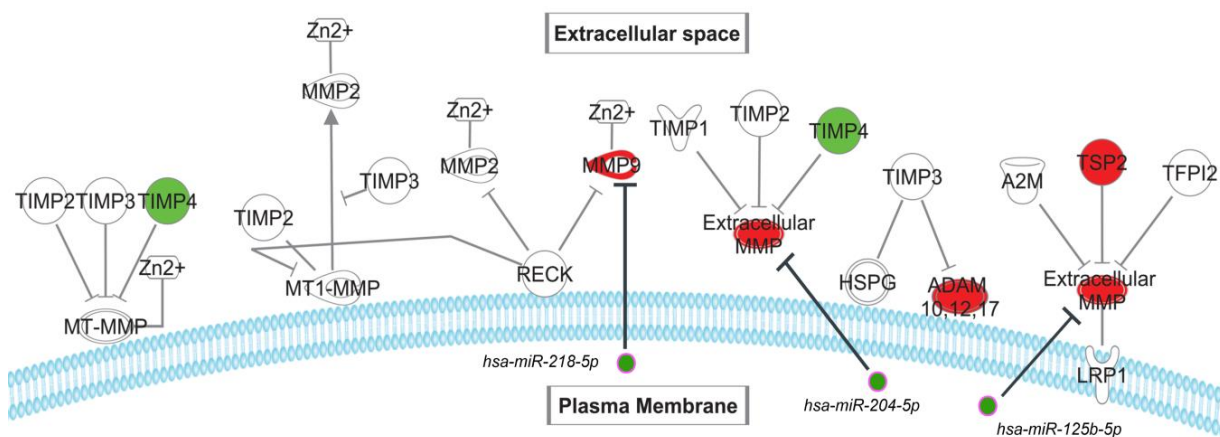


Figura 11. Via canônica das metaloproteinases de matriz extracelular geradas pelo programa IPA.
Legenda. verde: diminuição de expressão em CCEL; vermelho: aumento de expressão em CCEL.

5.6 Predição de alvos de tratamento usados no tratamento do câncer

O resultado da análise de alvos terapêuticos usando fármacos pela base de dados do *Pharmaco-miR*, mostrou que os 15 miRNAs derivados da análise de integrada controlam genes relacionados com terapêuticos que atualmente são usadas no tratamento do câncer, incluindo alguns usados atualmente em pacientes com câncer de laringe (Tabela Suplementar: S7). O programa *NAViGaTOR*(version 2.3) foi utilizado para a visualização das interações miRNA- mRNA- terapêutico(Figura 12).

Alvo de Drogas

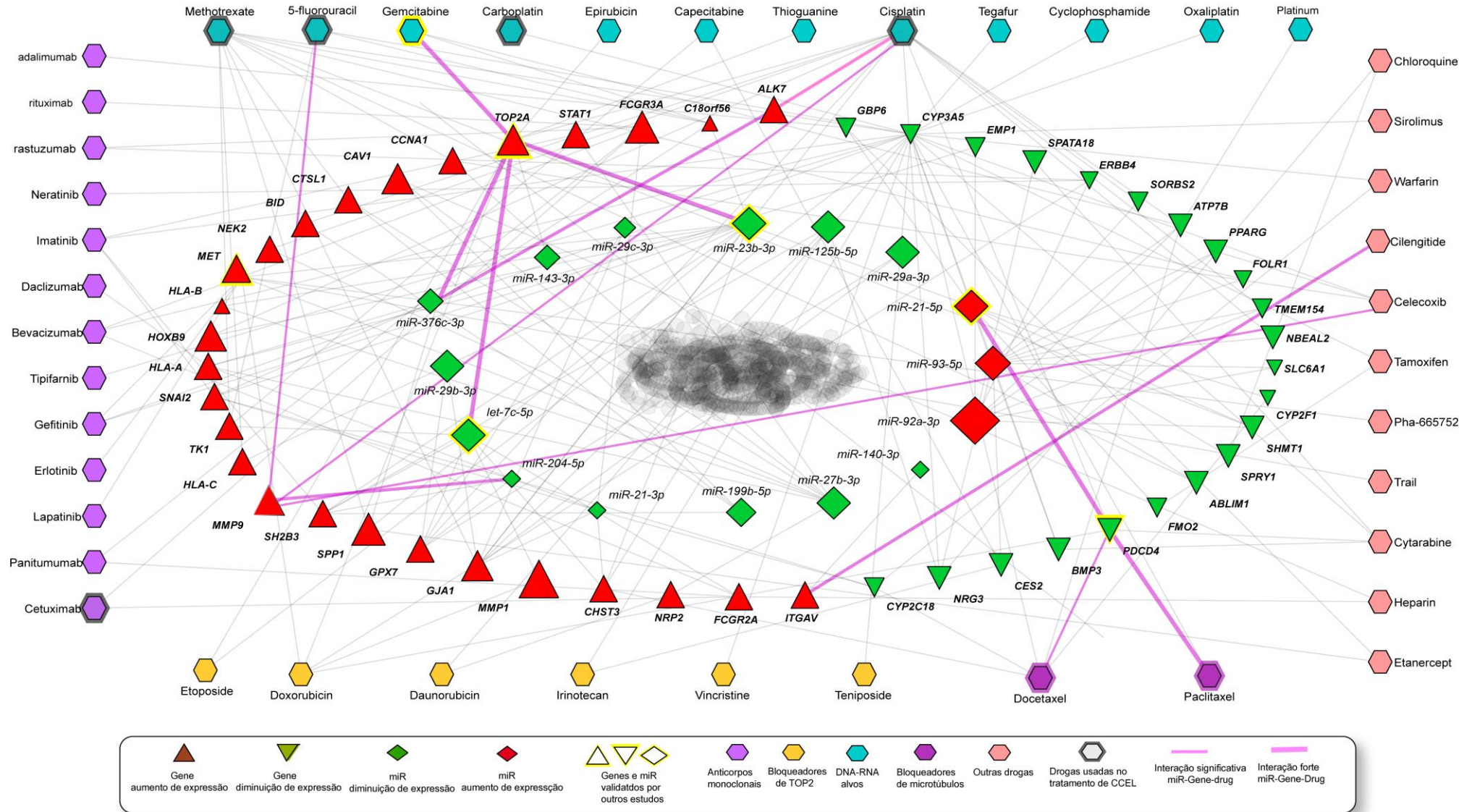


Figura 12. Rede da análise integrada onde são apresentados os quinze miRNAs e seu respectivos alvos, úteis para a seleção de terapias específicas atualmente utilizadas no tratamento do câncer em geral, incluindo câncer de laringe (software *NAViGaTOR v.2.3*).

5.7 Comparação dos resultados com dados clínicos patológicos

A análise não supervisionada utilizando os dados dos transcritos e dos miRNAs não foram concordantes. Foram gerados três agrupamentos na análise dos dados de miRNA os quais apresentaram alta reprodutibilidade, entretanto, os três agrupamentos utilizando os dados de expressão dos transcritos revelaram ser pouco reprodutíveis (pela análise de *bootstrapping*) (Figura 13A e B). Entre os grupos formados não foram observadas associações com os dados clínicos (teste exato de Fisher com correção por Bonferroni) (Figura 13A e B) ou com a sobrevida global (teste de log rank) (Figura 13C).

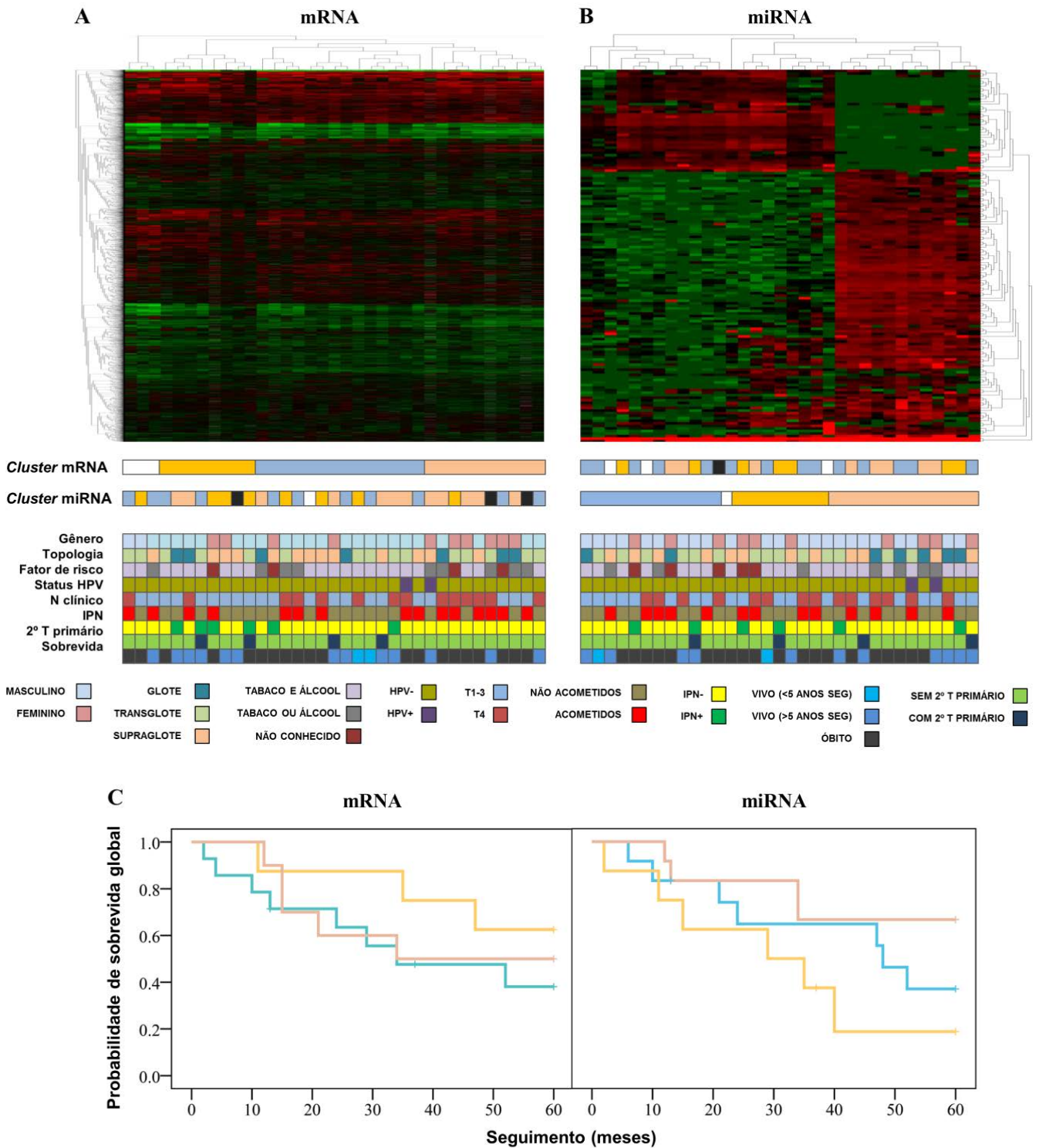


Figura 13. Análise de agrupamento não supervisionado utilizando os dados de expressão transcritos codificadores (A) e miRNAs (B) na comparação com as características clínicas. **A.** O *heatmap* gerado pelo padrão de expressão de mRNA revelou três *clusters* (amarelo, azul e bege). **B.** O *heatmap* obtido da análise de miRNAs demonstrou padrões bem definidos que originaram três *clusters* (amarelo, azul e bege). **C.** Curva de sobrevivida de acordo com os agrupamentos observados, não revelando significância estatística (log rank $P > 0.05$).

Os resultados obtidos da análise de expressão de miRNAs foram comparados com dados clínicos, incluindo metástase a distância, comprometimento de linfonodos, segundo tumor primário, recidiva, infecção pelo HPV e consumo de tabaco e álcool. A maioria das análises realizadas no programa *GeneSpring v12.6* não revelou associação significativa entre os dados clínicos e os miRNAs diferencialmente expressos.

O teste estatístico não pareado foi aplicado para avaliar a presença de alterações na expressão de miRNAs segundo o consumo de tabaco dos 33 CCEL (26 consumidores e 7 não consumidores de tabaco). Esta análise foi capaz de diferenciar os dois grupos de tumores, detectando-se um aumento de expressão do *hsa-miR-99a* entre os usuários de tabaco (Tabela 12 e Figura Suplementar S2-A).

Para revelar miRNAs preditivos de resposta ao tratamento também foi aplicado o teste estatístico não pareado, sendo detectado aumento de expressão do *hsa-miR-17* em pacientes que não responderam ao tratamento adjuvante após cirurgia (casos 1T e 14T) quando comparados com os casos que tiveram resposta parcial ou completa (11 casos) (Tabela 12 e Figura Suplementar S2 – B).

Para avaliar se a infecção pelo HPV16 afeta a expressão dos miRNAs também foi aplicado o teste estatístico não pareado. Os miRNAs *hsa-miR-182*, *hsa-miR-455-5p* e *hs2-miR-H21*, apresentaram alteração nos níveis de expressão nas amostras HPV16 positivas (13T e 26T) quando comparados com os casos HPV negativos (31 casos), porém apenas duas amostras eram HPV positivas (Tabela 11 e Figura Suplementar S2–C e D).

Tabela 11. miRNAs associados com características clínicas em 33 casos com CCEL

miRNAs	log (FC)	Dado clínico	P - valor
<i>hsa-miR-99a</i>	2.1	Uso de Tabaco	P<0.05
<i>hsa-miR-182</i>	3.9		
<i>hsa-miR-455-5p</i>	4.4	HPV16	P<0.05
<i>hs2-miR-H21</i>	6.1		
<i>hsa-miR-17</i>	2.6	Resposta ao tratamento adjuvante	P<0.05

Legenda. log(FC) *fold change* logado

No presente estudo, 10 mulheres eram portadoras de CCEL entre os 33 casos avaliados. Este grupo específico foi avaliado para alteração de miRNAs associados com dados clínicos e histopatológicos. Foi aplicado o teste estatístico não pareado aos dados clínicos que resultaram

significativos ($P < 0.01$) foram o uso de tabaco (*hsa-miR-1238*, *hsa-miR-1281*, *hsa-miR-149*), consumo de álcool (*hsa-miR-183*), grau histológico (*hsa-miR-151-3p*, *hsa-miR-17**, *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-205**, *hsa-miR-3653*, *hsa-miR-378*, *hsa-miR-423-5p*, *hsa-miR-425* e *hsa-miR-99b*), recidiva tumoral (*hsa-miR-197*, *hsa-miR-3127*, *hsa-miR-3907* e *hsa-miR-4291*) e invasão perineural (*hsa-miR-432*) (Tabela 12; Figura Suplementar S3A-C e S4-A-C).

Tabela 12. miRNAs associados com características clínicas nas 10 mulheres com CCEL.

miRNAs	log (FC)	Dado clínico	P - valor
<i>hsa-miR-1238</i>	6.7	Uso de Tabaco	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-1281</i>	6.7		
<i>hsa-miR-149</i>	6.8		
<i>hsa-miR-183</i>	6	Consumo de Álcool	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-151-3p</i>	7.7	Grau Histológico	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-17*</i>	6.5		
<i>hsa-miR-181b</i>	7.8		
<i>hsa-miR-205*</i>	7.8		
<i>hsa-miR-3653</i>	8.8		
<i>hsa-miR-378</i>	7.5		
<i>hsa-miR-423-5p</i>	7.3		
<i>hsa-miR-425</i>	7.4		
<i>hsa-miR-99b</i>	7.3	Recidiva Tumoral	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-197</i>	5.7		
<i>hsa-miR-3127</i>	5.3		
<i>hsa-miR-3907</i>	5.8		
<i>hsa-miR-4291</i>	5.6	Invasão Perineural	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-432</i>	6.8		

Legenda. Log(FC) *fold change* logado

A mesma abordagem foi utilizada para avaliar os 23 pacientes do gênero masculino com CCEL. Foi aplicado o teste estatístico não pareado e os dados clínicos que resultaram significativos ($P < 0.01$) foram o consumo de tabaco (*hsa-miR-99a*) e morte pela doença (*hsa-miR-134*, *hsa-miR-640* e *hsv2-miR-H24*) (Tabela 13; Figura Suplementar S5 A e B).

Tabela 13. miRNAs associados com características clínicas nos 23 homens com CCEL.

miRNAs	log (FC)	Dado clínico	P - valor
<i>hsa-miR-99a</i>	2.7	Uso de Tabaco	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-134</i>	6.1	Óbito pela Doença	$P < 0.01$
<i>hsa-miR-640</i>	5.1		
<i>hsv2-miR-H24</i>	5.9		

Legenda. Log(FC) *fold change* logado

5.8 Confirmação dos achados por RT-qPCR

Os 10 transcritos selecionados para análise de confirmação dos achados dos arrays por RT-qPCR foram *COL3A1*, *COL10A1*, *HLF*, *HMGA2*, *MMP3*, *MMP10*, *MMP13*, *ERBB4*, *TOP2* e *PPPIR3C*). Dezenove amostras de tumor independentes dos *microarrays* foram incluídos no estudo. Esta análise revelou a diminuição significativa da expressão dos transcritos *HLF* ($P < 0,05$), *PPPIR3C* ($P < 0,05$) e *ERBB4* ($P < 0,05$) e aumento significativo de expressão dos transcritos *COL3A1* ($P < 0,05$), *COL10A1* ($P < 0,01$), *HMGA2* ($P < 0,001$), *MMP3* ($P < 0,05$), *MMP10* ($P < 0,05$), *MMP13* ($P < 0,001$) e *TOP2A* ($P < 0,001$) em CCEL (Figura 14) confirmando os achados nos *arrays* de expressão realizados no grupo teste (35 amostras).

A mesma abordagem foi realizada na confirmação da expressão dos miRNAs *hsa-mir-29c-3p*, *hsa-mir-199-5p*, *hsa-mir-125b-5p*, *hsa-mir-92a-3p* e *hsa-mir-204-5p*. Foi utilizado também um grupo de amostras independentes dos *arrays*: 19 amostras a fresco e 33 amostras FFEP (Figura 14). Foi verificada a diminuição significativa da expressão do *hsa-miR-29c-3p* ($P < 0,05$), *hsa-miR-125b-5p* ($P < 0,05$), *hsa-miR-199b-5p* ($P < 0,05$) e *hsa-miR-204-5p* ($P < 0,001$), e aumento de expressão para *hsa-miR-92a-3p* ($P < 0,05$) (Figura 14). Esta análise confirmou os achados obtidos nos *arrays*.

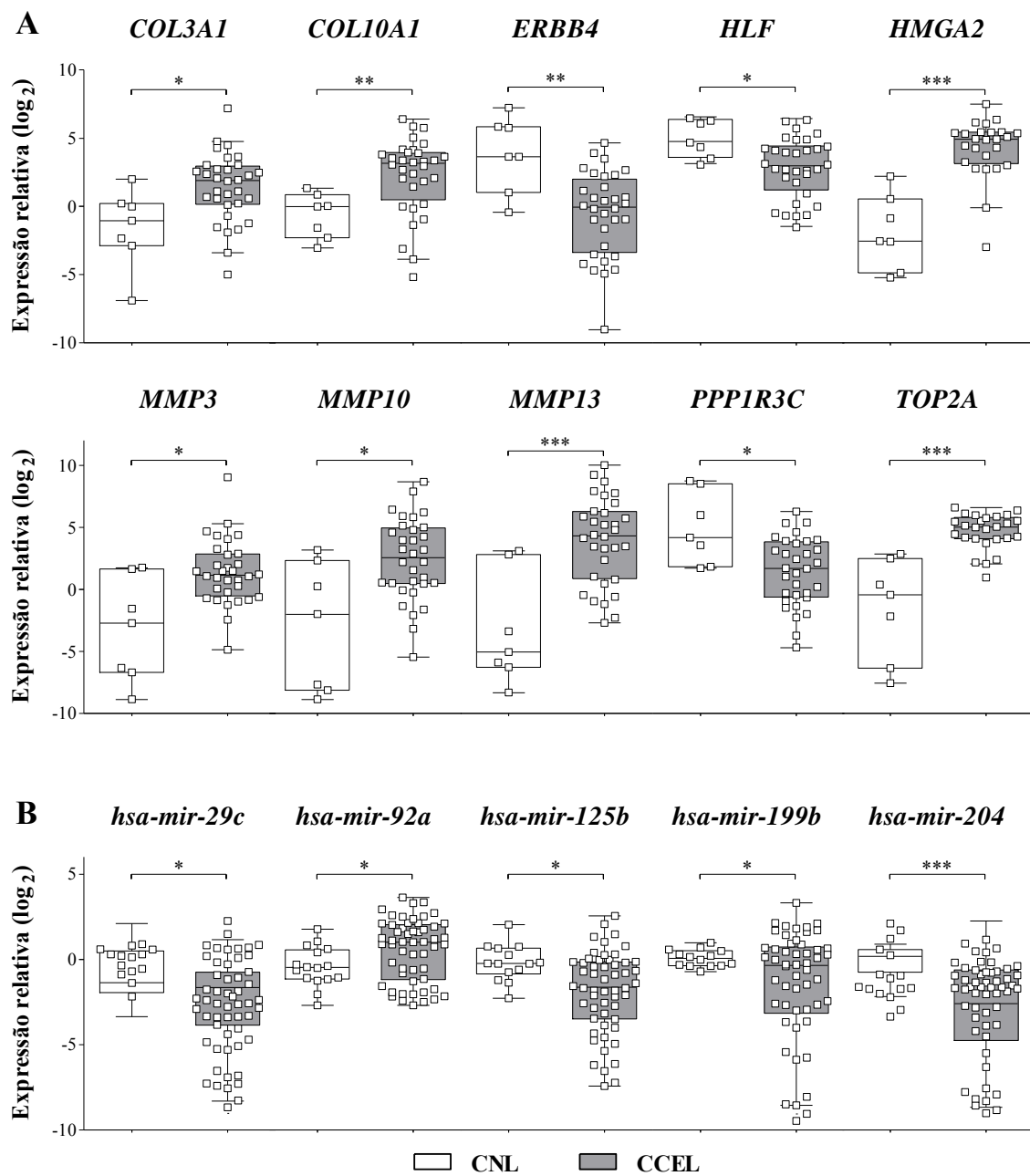


Figura 14. Análise de expressão de transcritos (A) e de microRNAs (B) por RT-qPCR. Os *boxplots* indicam o intervalo interquartil e a mediana enquanto os traços indicam os pontos de valores mais extremos não definidos como *outliers*.

Legenda. CNL: controle não neoplásico de laringe (caixa branca); CCEL: carcinoma de células escamosas de laringe - caixa cinza). NS > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (teste t não pareado).

6. DISCUSSÃO

Embora o estudo molecular em carcinomas de laringe tenha avançado nos últimos anos, a avaliação do prognóstico continua sendo baseada em parâmetros clínicos. Os estudos realizados nos últimos anos em diferentes tipos tumorais apontam a presença de marcadores prognósticos e diagnósticos baseados em informações genéticas. Além disso, tais marcadores tem revelado um potencial para identificar pacientes com tumores mais agressivos, os quais poderiam ser beneficiados com tratamentos diferenciados e novas terapias. Com o avanço destes estudos, provavelmente serão identificadas novas moléculas designadas a alvos e vias específicas associadas com os tumores de laringe. Neste contexto a identificação de miRNAs com papel na regulação do processo tumoral da laringe pode ser importante na descoberta de potenciais marcadores moleculares.

Os resultados da expressão de genes codificadores realizados em um estudo prévio do grupo (dados não publicados) em 35/36 CCEL foram utilizados com o objetivo de integrar estes dados de expressão de transcritos codificadores com o de miRNAs. Esta análise resultou em candidatos a *drivers* moleculares.

A primeira estratégia do presente estudo foi a obtenção dos miRNAs diferencialmente expressos em 33 amostras de CCEL em relação ao tecido normal de laringe. Foram identificados 89 miRNAs diferencialmente expressos nos tumores comparados com as amostras normais (*fold change* >2 ou <-2). Estes achados foram comparados com todos os miRNAs relatados em literatura revelando oito miRNAs descritos em CCEL: *hsa-let-7a* (Long *et al.*, 2009), *hsa-miR-21* (Shen *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2014), *hsa-miR-93* (Wang *et al.*, 2010; Fuet *et al.*, 2012), *hsa-let-7c* (Levy *et al.*, 2011; Hanet *et al.*, 2012), *hsa-miR-24* (Guo *et al.*, 2012), *hsa-miR-660* (Ayaz *et al.*, 2013), *hsa-miR-30b* (Li *et al.*, 2014) e *hsa-miR-139-5p* (Luo *et al.*, 2014) (Tabela Suplementar: S9).

Entre as características clínico-patológicas consideradas significativas ($P < 0,05$) na comparação com o perfil de expressão de miRNAs, estavam incluídas o hábito tabagista, a infecção pelo HPV16 e a resposta a tratamento. O consumo de tabaco é um fator etiológico importante no desenvolvimento de CCEL. Foi observado que o *hsa-miR-99a* apresentava-se com aumento de expressão nos pacientes tabagistas em comparação com os não tabagistas. A alteração na expressão do *hsa-miR-99a* foi relatada em vários tumores incluindo carcinoma cervical, hepatocarcinoma, de esôfago e pâncreas (Petrelli *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Wang, L. *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). O *hsa-miR-99a* foi também relatado como alterado no epitélio respiratório de fumantes (Schembri *et al.*, 2009).

Foi observada diferença no perfil de expressão de miRNAs quando comparados com a infecção pelo HPV, embora apenas dois casos tenham sido positivos (HPV16: casos 13T e 26T). Os *hsa-miR-182*, *hsa-miR-455-5p* e *hsv2-miR-H21* (este último de origem viral) apresentaram um aumento de expressão em relação aos tumores negativos para HPV16. Tem sido relatada uma prevalência entre 5 a 60% do HPV16 em amostras de carcinomas de laringe (Pérez-Ayala *et al.*, 1990; Gungor *et al.*, 2007; Morshed *et al.*, 2008), mas há falta de uma evidência biológica do papel do HPV16 neste tipo tumoral.

O aumento de expressão de *hsa-miR-182* foi relatado em carcinoma de endométrio, câncer de vesícula biliar, hepatocarcinoma, melanoma e ovário (Segura *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013; Wang, Y. Q. *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2014). A alteração na expressão do *hsa-miR-455-5p* foi relatada em carcinoma colorretal. Foi demonstrado que este miRNA regula a expressão do protooncogene *RAF1* na linhagem SW480 (Chai *et al.*, 2014). Outro miRNA detectado no nosso estudo com aumento de expressão foi o *hsv2-miR-H21*, o qual é codificado pelo vírus *Herpes Simplex 2* que infecta células humanas (Ghosal *et al.*, 2014). Portanto, os oito casos (2T, 9T, 10T, 13T, 22T, 25T, 26T e 33T) da nossa casuística possivelmente foram infectados por este vírus. O *hsa-miR-17* foi detectado com aumento de expressão nos pacientes que apresentaram falha na resposta ao tratamento após cirurgia. Este miRNA foi relatado como envolvido com pior prognóstico em outros tumores (Yu *et al.*, 2010). A inibição deste miRNA aumenta a sensibilidade das células tumorais para gencitabine nas linhagens Panc-1 e BxPC3 de câncer de pâncreas (Yan *et al.*, 2012).

Estudos sobre o HPV16 e a expressão da proteína de ciclo celular p16 mostraram a existência de uma fração mínima do envolvimento ativo do HPV16 em tumores de laringe (Schlecht *et al.*, 2011; Lewis, 2012). Halec *et al.* (2013) avaliaram o papel de transformação do HPV em 102 amostras FFEP de CCEL, utilizando um grupo de marcadores em conjunto: presença DNA e mRNA do HPV16 e a expressão das proteínas de ciclo celular p16, pRb, ciclina D1 e p53. Foram detectadas 24 amostras HPV16 positivas as quais apresentaram um aumento de expressão de p16 e diminuição de pRb além da diminuição da expressão de p53 e um aumento da ciclina D1. Os autores concluíram que o uso destes quatro marcadores evidenciam o poder de transformação do HPV16 em tumores de laringe. Em nosso estudo os dois casos HPV16 positivos mostraram a diminuição de expressão de p16 (*CDKN2A*) (caso 26T - FC = -0.95, não significativo e 13T - FC = -2.26, significativo) e aumento de expressão da *CCND1* (caso 26T - FC = 0.7, não significativo e 13T - FC = 0,13; não significativo). Estes dados são concordantes aos descritos e (Schlecht *et al.*, 2011; Lewis, 2012).

O HPV codifica três oncoproteínas E5, E6 e E7. As oncoproteínas E6 e E7 foram relatadas como importantes moduladores no processo carcinogênico inativando genes supressores tumorais como p53 e Rb além de outros alvos envolvidos em apoptose e transformação maligna (Hebner and Laimins, 2006). A degradação da p53 é resultado da união do complexo ubiquitina ligase E6-AP (*UBE3A*) levando a degradação no proteossomo (Scheffner *et al.*, 1994). Em nosso estudo foi detectada uma tendência a diminuição de expressão de *TP53* nos dois casos HPV16 (caso 26T -FC= -0.34 e caso 13T - FC= -0.56) e não sendo observadas alterações de expressão significativa nas enzimas que formam o complexo ubiquitina. A oncoproteína E7 liga-se à pRb, alterando o ciclo celular e inativando a via deste supressor tumoral (Wise-Draper and Wells, 2008). A oncoproteína E5 foi implicada na transformação celular, sendo o EGFR alvo na superfície celular (Tomakidi *et al.*, 2000). Em nosso estudo também foi detectada uma tendência a aumento de expressão do *EGFR* nos casos HPV16 (caso 26T - FC= 0,7 e caso 13T - FC= 0,43). Em uma recente revisão da literatura, Kuasne *et al.*(2013) relataram a associação entre a infecção pelo HPV e diferenças na expressão de p16 assim como no padrão de metilação de *CDKN2A* em carcinomas de pênis e carcinomas de cérvix uterino. Em conjunto, estes dados reforçam que as oncoproteínas produzidas durante a replicação do HPV16 nas células de laringe podem contribuir para o fenótipo tumoral. Em resumo, em nosso estudo também foram observadas alterações nos dois casos positivos para HPV16, embora não significativas, nos genes afetados pela ação das oncoproteínas produzidas pelo HPV, sendo necessário ampliar o número de amostras para desvendar o papel do HPV nos CCEL.

Não foram observadas diferenças significativas no perfil de expressão dos microRNAs em comparação com outros dados histopatológicos como segundo tumor primário, metástase a distância e recidiva.

A segunda estratégia utilizada foi a análise dos dados exclusivamente em pacientes do sexo feminino, uma vez que a nossa casuística apresentava um número maior de mulheres afetadas com a doença (1 mulher: 2,3 homens), uma proporção que não é compatível com a relatada em literatura de outros países, onde a prevalência de CCEL é maior no sexo masculino (1 mulher: 7 homens) (Ferlay *et al.*, 2010). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,01$) na comparação entre o perfil de expressão de miRNAs e as características de consumo de tabaco, álcool, grau, recidiva e invasão perineural nas amostras tumorais destas mulheres. Os miRNAs *hsa-miR-146*, *hsa-miR-1281* e *hsa-miR-1238* apresentaram um aumento de expressão significativo nas mulheres tabagistas. Para o nosso conhecimento não há relatos destes miRNAs associados com o consumo de tabaco. O aumento da expressão do *hsa-miR-146* foi relatado em carcinomas de nasofaringe e associado com migração e metástase (Luo, Z. *et al.*, 2011).

A comparação entre os resultados da expressão de miRNAs em pacientes do gênero feminino segundo hábito etilista revelou um aumento significativo na expressão do *hsa-miR-183*. Para o nosso conhecimento não há dados em literatura descrevendo o envolvimento deste miRNA associado com o consumo de álcool. Um estudo recente usando um modelo em ratos da estirpe *Sprague-Dawley*, revelou um aumento do *hsa-miR-183* no fígado de animais que consumiram álcool (Chen, Y. P. *et al.*, 2014). Este miRNA também foi relatado como alterado em vários tipos de câncer incluindo próstata, bexiga, glioma, adenocarcinoma hepatocelular e colorretal (Earle *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Mihelich *et al.*, 2011; Liu, Y. *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013).

Em mulheres, também foram detectados nove miRNAs (Tabela 13) como significativos na comparação entre os carcinomas de laringe grau I *versus* II. Os tumores grau II apresentaram aumento destes miRNAs. Alguns destes miRNAs são descritos como importantes no processo tumoral, como o *hsa-miR-151-3p*, o qual foi relatado em osteossarcoma e associado com proliferação e invasão celular (Duan *et al.*, 2011). Entre os casos estudados, seis CCEL grau II (4T, 9T, 13T, 20T, 21T e 29T) apresentaram relação com recidiva local e/ou cervical quando comparado com os dois casos de grau I (7T e 34T). Além disso, dois CCEL grau II (10T e 29T) evoluíram para metástase de pulmão, dois casos grau II (29T e 18T) tiveram relação com invasão perineural. Em adição, foi também observado que as duas pacientes com tumores grau I e cinco pacientes grau II foram a óbito pela doença. Estes resultados demonstram uma relação entre a alteração deste miRNA com características de agressividade tumoral. O *hsa-miR-181b* foi associado com proliferação e inibição de apoptose em câncer cervical (Yang, L. *et al.*, 2014); o *hsa-miR-378* foi relatado como marcador de resposta de tratamento tendo um efeito anti-angiogênico em câncer de ovário (Chan, Kiet, *et al.*, 2014). O *hsa-miR-423* foi relatado com um candidato associado a regulação da proliferação celular em hepatocarcinoma (Lin *et al.*, 2011).

O aumento de expressão de cinco miRNAs (*hsa-miR-197*, *hsa-miR-3127*, *hsa-miR-3907* e *hsa-miR-4291*) foi capaz de diferenciar as pacientes do sexo feminino que apresentaram recidiva. Embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar esse achado, estes miRNAs têm potencial uso como marcadores prognósticos em CCEL de pacientes do sexo feminino. Entre esses cinco miRNAs, apenas o *hsa-miR-197* foi relatado previamente como envolvido em processos tumorais. O aumento da expressão do *hsa-miR-197* foi descrito no carcinoma folicular de tireóide e no plasma de pacientes com câncer de pulmão (Weber *et al.*, 2006; Abd-El-Fattah *et al.*, 2013).

O aumento da expressão do *hsa-miR-432* foi capaz de diferenciar mulheres com CCEL que apresentaram invasão perineural. Um estudo recente mostrou que o aumento de expressão deste miRNA foi associado com a inibição do *ADARI*, um gene importante cuja função é a edição e regulação de vários miRNAs, por fazer parte do complexo DROSHA. Foi demonstrado que a

diminuição da expressão deste gene foi resultado da ação reguladora do *hsa-miR-432* e *hsa-miR-17* em células mestatáticas de melanoma (Nemlich *et al.*, 2013). Não foram detectadas outras diferenças significativas no grupo dos pacientes do sexo feminino.

Embora tenham sido detectadas alterações na expressão de miRNAs com características clinico-patológicas nas pacientes do sexo feminino, outros estudos são necessários para confirmar esses achados pois o número amostral estudado é limitado e não há estudos funcionais realizados para conclusões mais definitivas.

A mesma abordagem utilizada nas pacientes do sexo feminino, foi realizada na análise com dados clínicos dos pacientes do sexo masculino (23/33 do total de casos). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,01$) para o consumo de tabaco e morte pela doença.

O *hsa-miR-99a* foi detectado com aumento de expressão em 21 pacientes do gênero masculino tabagistas, apenas dois pacientes (1T e 33T) apresentaram uma diminuição não significativa de expressão deste miRNA. A expressão deste miRNA foi também significativa na comparação quanto ao hábito tabagista considerando os 33 casos, onde apenas três casos (3T, 7T e 22T) sem hábito tabagista apresentaram diminuição de expressão. Ao contrário do nosso achado, vários estudos relataram este miRNA com diminuição de expressão e como possível candidato a supressor tumoral (Xin *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014). Um recente estudo utilizando 15 linhagens celulares de carcinoma oral e uma linhagem normal de queratinócitos (HOK) revelou que a expressão ectópica deste miRNA inibe a invasão, migração e metástase à distância *invitro* e *invivo* (Yen *et al.*, 2014). Nesse estudo, o ensaio de luciferase revelou que o *IGF1R* é alvo deste miRNA e que a expressão deste receptor regula negativamente o *hsa-miR-99a* (Yen *et al.*, 2014). Por outro lado, um estudo avaliou o plasma de 50 pacientes com tumores de cabeça e pescoço, onde três eram tumores de laringe e 36 indivíduos saudáveis para *hsa-let-7a*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR26b*, *hsa-miR-34c*, *hsa-miR-99a*, *hsa-miR-133a*, *hsa-miR-137*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-194a*, e *hsa-miR-375*, mas a expressão do *hsa-miR-99a* não foi detectada como alterada (Hsu *et al.*, 2012). Contrário a estes achados, nós observamos um aumento de expressão do *hsa-miR-99a* associado com o consumo de tabaco sendo que apenas três pacientes apresentaram diminuição de expressão deste miRNA, os quais foram para óbito pela doença.

O aumento da expressão dos *hsa-miR-134*, *hsa-miR-640* e *hsv2-miR-H42* foi capaz de diferenciar pacientes do sexo masculino que morreram pela doença, sendo potenciais marcadores prognósticos em CCEL. Semelhante aos nossos resultados, o aumento de expressão do *hsa-miR-134* foi relatado em carcinomas de cabeça e pescoço, sendo associado com metástase e morte pela doença (Liu *et al.*, 2014). Os autores sugeriram que este miRNA pode ser um marcador preditivo de fácil detecção no plasma, sendo que a diminuição da sua expressão poderia evidenciar casos

com melhor prognóstico. Não há dados em literatura envolvendo os outros dois miRNAs em CCEL.

Os resultados da análise de expressão global de miRNAs revelaram que *hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-125b*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-143-3p* e *hsa-miR-204-5p* estavam significativamente menos expressos nas amostras tumorais em comparação aos tecidos normais, e os *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-93-5p* e *hsa-miR-92a-3p* apresentaram aumento de expressão nos tumores. Entre os 15 miRNAs confirmados como alterados no banco de dados TCGA, cinco deles (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-125b-5p*, *hsa-miR-92a-3p* e *hsa-miR-204-5p*) apresentaram alteração na expressão (RT-qPCR) em amostras independentes dos arrays. Igualmente, entre os 33 genes confirmados como alterados no perfil de expressão pelo banco de dados TCGA, 10 deles (*COL3A1*, *COL10A1*, *HLF*, *HMGGA2*, *MMP3*, *MMP10*, *MMP13*, *ERBB4*, *TOP2* e *PPPIR3C*) apresentaram significativa alteração de expressão em amostras independentes dos arrays por RT-qPCR (Tabela S8 mostra os transcritos codificadores e miRNAs selecionados para estudo mais detalhado). Para o nosso conhecimento, não há relatos em literatura de alterações de expressão destes miRNAs em carcinomas de laringe.

No presente estudo foi detectada diminuição na expressão do *hsa-miR-199b-5p* (FC = -3.8). Este miRNA (mapeado em 9q34.11) foi relatado como alterado em vários tipos de tumores incluindo leucemia mielóide crônica, câncer de colón e carcinoma renal (Garzia *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2010; Flamant *et al.*, 2010). Semelhante aos nossos achados, em câncer de mama foi relatada uma diminuição de expressão deste miRNA em comparação com o tecido normal adjacente (Persson *et al.*, 2011). Um estudo recente demonstrou que o *hsa-miR-199b-5p* inibe a expressão do gene *HER2*, que faz parte da via ERK1,2 e AKT. Em nosso estudo também foi verificada a diminuição de expressão de *HER2* (FC = -1.5) na análise de expressão de transcritos. Contrariamente, foi relatado que o aumento de expressão do *hsa-miR-199b-5p* inibe a migração e a clonogenicidade de células tumorais de mama, interferindo com o fenótipo agressivo (Fang *et al.*, 2013). O banco de dados TCGA revelou que *hsa-miR-199b-5p* apresentou uma diminuição de expressão por sequenciamento de alto desempenho (*MiSeq System, Illumina*) em CCEL. Este miRNA tem como alvos diferentes transcritos que se expressam em tipos celulares distintos razão pela qual o alvo varia dependendo do tipo tumoral. Andolfo *et al.* (2012) relataram que o *hsa-miR-199b-5p* regula o gene *HES1*, que é um efetor da via canônica do Notch e da via não canônica *sonic hedgehog* nas linhagens celulares de meduloblastoma. A diminuição deste miRNA ocorre por uma regulação do tipo *feedback* negativo dirigido pelo fator de transcrição *HES1*, além da metilação do promotor do próprio do miRNA. Adicionalmente, este miRNA regula os genes *CD15* e *CD133*

relacionados com propagação celular. Neste contexto, nós verificamos uma diminuição de expressão dos genes *HES1* (FC= -1,4), *CD133* (FC= -2,3) e *CD15* (FC= 0,09) um achado contrário ao descrito acima, demonstrando que a regulação de expressão do *hsa-miR-199b-5p* e dos genes *HES1*, *CD15*, e *CD133* é mediada por outros mecanismos em CCEL.

Os genes *CAVI*, *HOXB6* e *LAMC2* apresentaram aumento de expressão nos CCEL (FC= 2.2, 2.4 e 2.0) do presente estudo e também pela base de dados do TCGA. Estes genes também apresentarem uma correlação negativa com seu miRNA regulador predito *hsa-miR-199b-5p*, que por sua vez mostrou-se significativamente menos expresso nos tumores em relação aos controles (FC = -3,8). Baseado nestes achados é possível especular que o aumento da expressão de *CAVI* é mediada pela expressão diminuída do *hsa-miR-199b-5p* podendo ter um papel na tumorigênese de laringe. O gene *CAVI* codifica a proteína caveolina 1 responsável pelo transporte de moléculas e tradução de sinais. As primeiras descrições da função da proteína CAV1 mostraram um papel fundamental de fosforilação nos resíduos de tirosina 14 ou serina 80, por vários estímulos, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), insulina e estímulos de estresse (Sanguinetti *et al.*, 2003; Fielding *et al.*, 2004). O gene *CAVI* é um supressor tumoral e apresenta diminuição de expressão em muitos tumores associados com invasão de linfonodos, recorrência, pior prognóstico e resistência a fármacos (Di Vizio *et al.*, 2009; Sotgia *et al.*, 2009; Witkiewicz *et al.*, 2010). A análise de vias pelo IPA revelou que CAV1 faz parte da via de sinalização das integrinas (Tabela Suplementar 1) associadas com receptores de tirosina quinase (FYN e YES), as quais estão envolvidas no crescimento e metástase de células tumorais (Guo and Giancotti, 2004). Em células metastáticas de melanoma (B16F10) a expressão de *CAVI* reduz a expressão e a atividade das proteínas FAK e SRC, também inibe a expressão da integrina $\beta 3$ suprimindo o potencial metastático nestas células com alteração na sinalização de integrinas (Trimmer *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, o gene *CAVI* apresentou aumento de expressão contrária em comparação com outros achados. A nossa hipótese é de que os carcinomas de laringe apresentam ganho genômico nessa região (Kesser *et al.*, 2008) ou possivelmente o gene estaria sujeito a mutações como descrito em câncer de mama (Syed *et al.*, 2010). Estas mutações poderiam mudar a conformação protéica, interferindo com a função supressora e deixando os sítios ativos para ser estimulada por fatores de crescimento como o EGF e o PDGF. Como consequência, estas alterações contribuiriam para o crescimento e a proliferação celular nos CCEL.

Nossos dados também sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *HOXB6* é mediada por *hsa-miR-199b-5p*. O gene *HOXB6*, mapeado no cromossomo 17q21.3 pertence a família de genes *HOX*, associados com funções de desenvolvimento embrionário, regulação de ciclo celular, apoptose, migração e diferenciação. Os genes da família *HOX* tem sido relatados como tendo função de oncogenes ou supressores tumorais (Shah and Sukumar, 2010). O gene *HOXB6* codifica uma proteína chamada homeobox com domínio de ligação ao DNA. No nosso estudo foi verificado um aumento da expressão nos CCEL. As primeiras descrições da função da proteína *HOXB* mostraram um papel fundamental no desenvolvimento, diferenciação epidermal e de células progenitoras hematopoiéticas (HPCs) (Shah and Sukumar, 2010). O gene *HOXB6* tem um papel importante na diferenciação celular, no entanto, a alteração na sua expressão foi associada com o desenvolvimento tumores (Giampaolo *et al.*, 2002; Di Pietro *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2014). Um aumento de expressão de genes *HOXB*, incluindo o *HOXB6* foi relatada em esôfago de Barrett (lesão pré-maligna do adenocarcinoma de esôfago) e no câncer de mama (Hur *et al.*, 2014). Os genes *HOX* são alvos das proteínas Polycomb e Tritorax, complexos que estão envolvidos na regulação destes genes por meio da modificação dos resíduos presentes nas histonas. A perda das marca repressiva H3K27me3 e ganho de acetilação na histona H3 levaria ao aumento na expressão destes genes (Di Pietro *et al.*, 2012). No nosso estudo foi demonstrado um outro mecanismo que poderia contribuir para o aumento de expressão do gene *HOXB6*, ou seja, por meio do seu miRNA regulador, o *hsa-miR-199b-5p* o qual apresentou diminuição da expressão nos CCEL.

Os dados também sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *LAMC2* é mediada por *hsa-miR-199b-5p*. Baseados nestes achados, é possível especular que o aumento de expressão de *LAMC2* é mediado pela expressão alterada deste miRNA nos tumores de laringe. O gene *LAMC2* é um importante componente da laminina. A alteração de expressão deste gene tem sido relatada em vários tipos de câncer, incluindo pâncreas, estômago, língua, pulmão, colorretal esôfago e melanoma (Earle *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Mihelich *et al.*, 2011; Liu, Y. *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013). A expressão elevada desse gene nos tumores foi associada com pior prognóstico, recorrência e metástase (Ono *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2001; Gasparoni *et al.*, 2007), além de estimular o aumento de expressão de *MMP1* e *MMP3* via ERK1/2, metaloproteinases importantes na proliferação e invasão (Reunanen *et al.*, 2002). Nós detectamos um aumento de expressão de *MMP3* (FC= 2,5) e de *MMP1* (FC= 5). Não foi detectada alteração no via ERK1/2. Além disso, foi demonstrado que *LAMC2* interage com vários receptores da superfície celular incluindo os receptores de integrina

$\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 3\beta 1$ e EGFRs (Garg *et al.*, 2014). Também pode ser usado como marcador diagnóstico uma vez que níveis elevados de expressão de *LAMC2* foi encontrado em soro de pacientes com câncer de pâncreas (Kosanam *et al.*, 2013). Em conjunto, estes dados indicam a importância do miRNA *hsa-miR-199b-5p* na regulação da expressão de vários genes críticos no processo tumoral e que podem ser marcadores diagnósticos, prognósticos ou contribuir para o delineamento de novos alvos terapêuticos para pacientes com CCEL.

Foi também detectado no nosso estudo a diminuição da expressão do *hsa-miR-218-5p* (FC = -7,3). Este miRNA foi relatado como alterado em vários tipos de câncer incluindo, o gástrico, de pulmão, cabeça e pescoço, cervical, mama e adenocarcinoma colorretal (Davidson *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Kinoshita *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

O *hsa-miR-218-5p* foi relatado como apresentando expressão diferencial no plasma de pacientes com câncer gástrico e positivos para *H. pylori*, sendo associado com estádios iniciais da doença (Li *et al.*, 2012). A mesma abordagem foi realizada no plasma de 90 pacientes com câncer cervical, revelando uma diminuição deste miRNA associado com estádios avançados e metástase em linfonodos (Yu *et al.*, 2012). No presente estudo não encontramos relação alguma deste miRNA com dados clínicos e histopatológicos, porém uma abordagem a ser utilizada seria a avaliação deste miRNA no plasma de um grande número de pacientes com CCEL. Foi demonstrada que a restauração dos níveis de expressão deste miRNA inibe a migração e a invasão em linhagens derivadas de carcinoma cervical positivas para HPV (CaSki-HPV16 e ME180-HPV39) e negativas para HPV (linhagem celular Yumoto), sendo o oncogene *LAMB3* alvo deste miRNA (Yamamoto *et al.*, 2013). Em nosso estudo foi observado o aumento de expressão deste gene alvo (*LAMB3*; FC=1.2).

O *hsa-miR-218-5p* interage com diferentes genes alvos dependendo do tipo celular. Em câncer de pulmão, foi relatada uma deleção onde se mapeia o *hsa-miR-218* a qual foi confirmada pela diminuição de expressão deste miRNA e dos genes associados nessa região genômica (*SLIT2* e *SLIT3*) (Davidson *et al.*, 2010). Em nosso estudo foi detectada uma diminuição não significativa de expressão do gene *SLIT2* (FC= -0.9). Os mesmos autores relataram que a diminuição de expressão do *hsa-miR-218* está associada com consumo de tabaco nos 39 pacientes com câncer de pulmão (Davidson *et al.*, 2010). Em nosso estudo não foi observada uma associação entre o consumo de tabaco e a expressão do *hsa-miR-218-5p*.

Em carcinoma nasofaríngeo associado ao vírus Epstein-Barr foi detectada uma diminuição na expressão do *hsa-miR-218* associada a um silenciamento por metilação dos genes *SLIT2* e *SLIT3* (Alajez *et al.*, 2011). As análises funcionais utilizando as linhagens celulares C666-1, CNE-1, HONE-1, C15, C17, HEK293, UT-SCC-8, UT-SCC-42 e NOE (epitélio oral

normal) revelaram que os transcritos dos genes *ROBO1*, *BIRC5* e *GJAI* são alvos diretos deste miRNA, sendo a via sinalização SLIT-ROBO regulada negativamente. Esta via foi associada com o controle da migração e sobrevivência celular (Alajez *et al.*, 2011). Em nosso estudo foi detectado um aumento de expressão dos genes *BIRC5* (FC=1.5) e *GJAI* (FC=2.3) pela análise de arrays de expressão, mas o *ROBO1* não apresentou alteração significativa na expressão. Kinoshita *et al.* (2012) utilizando linhagens celulares de cabeça e pescoço (FaDu e SAS) revelaram que a restauração dos níveis de expressão do *hsa-miR-218-5p* inibe a migração e invasão. Após análise *insilico* os autores mostraram que a via de sinalização de adesão focal é regulada por este miRNA. Todos os transcritos componentes da laminina-332 (*LAMA3*, *LAMB3* e *LAMC2*) associados com esta via foram avaliados pelo ensaio da luciferase, demonstrando que o transcrito do gene *LAMB3* é um alvo deste miRNA nas células tumorais de cabeça e pescoço. Em nosso estudo foi observado um aumento relativo da expressão dos genes *LAMA3* (FC=0.8), *LAMB3* (FC=1.2) e *LAMC2* (FC=1.9) o que dá um suporte adicional sobre o envolvimento destes genes na carcinogênese de laringe. Em osteosarcoma, a diminuição de expressão do *hsa-miR-218-5p* foi associada a processos de migração e invasão e estudos funcionais utilizando uma linhagem celular (Saos-2) revelaram os transcritos *TIAM1*, *MMP2* e *MMP9* como alvos diretos deste miRNA (Jin *et al.*, 2013). Os genes *MMP2* (FC=1.5) e *MMP9* (FC=2.2) foram confirmados com aumento de expressão na nosso estudo. Além disso, o *hsa-miR-218-5p* também foi inversamente correlacionado com os níveis de expressão *MMP9* sendo confirmado como alterado pelo TCGA. Esses achados confirmam a importância do *hsa-miR-218-5p* e seus genes alvos como marcadores em vários tumores, incluindo o CCEL.

No presente estudo, foi também verificado o aumento da expressão dos genes *COL10A1* (FC= 3,9), *MMP9* (FC= 2,2) e *COL1A1* (FC= 3,1) os quais foram correlacionados negativamente com seu miRNA regulador predito, *hsa-miR-218-5p*. Este miRNA foi encontrado significativamente menos expresso nos tumores (FC = -7,3). Estes dados sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão dos genes *COL1A1*, *COL10A1* e *MMP9* em CCEL ocorre pelo *hsa-miR-218-5p*.

O gene *COL10A1* codifica o colágeno tipo 10 α -1, proteína que faz parte da matriz extracelular e participa ativamente na remodelação e diferenciação dos condrócitos (Zimmermann *et al.*, 2008; Tsuchimochi *et al.*, 2010). O aumento de expressão deste gene foi relatado em diversos tumores sólidos e linhagens celulares derivadas de tumores, além de ser associado com a formação de vasos nos carcinomas mamários. O gene *COL10A1* foi considerado um novo marcador diagnóstico pela facilidade de detecção de sua expressão protéica usando a técnica de imunistoquímica já descrita em outros tumores (Chapman *et al.*, 2012). No desenvolvimento do

sarcoma de Ewing, o gene *COL10A1* apresentou um aumento de expressão e foi considerado como um *driver* associado ao desenvolvimento desse tumor (Tanaka *et al.*, 2014). O nosso estudo detectou aumento de expressão do gene *COL1A1* em CCEL. Um estudo realizado em carcinoma gástrico relatou o gene *COL1A1* com um aumento de expressão significativo em 78% dos pacientes avaliados (Oue *et al.*, 2004). Liu *et al.*, 2012 revelaram que o tratamento com TGF β 1 eleva a expressão de *COL1A1* em células do ducto biliar 603B. No presente estudo não encontramos aumento de expressão de TGF β 1. Em resumo, estes dados sugerem que o gene *COL1A1* e *COL10A1* podem ser usados como marcadores de desenvolvimento tumoral em CCEL.

O gene *MMP9*, alvo do *hsa-miR-218-5p*, também conhecido como gelatinase B é uma metaloproteinase associada com fenótipos agressivos e metastáticos em diversos tumores incluindo mama (Van 'T Veer *et al.*, 2002). O aumento desta proteína foi detectado em amostras tumorais de mama classificadas como *Basal-Like* triplo negativas e associado com a vascularização e pior prognóstico (Mehner *et al.*, 2014). Papadas *et al.* (2013) avaliaram 30 pacientes com CCEL revelando um aumento de expressão de *MMP9* por imunohistoquímica, o qual foi associado com grau de diferenciação celular e níveis de infiltração inflamatória. O nosso estudo encontrou aumento de expressão de *MMP9* em 9/11 amostras de pacientes com CCEL que progrediram para metástase, sugerindo seu envolvimento em fenótipos mais agressivos.

A transição epitélio-mesênquima (EMT) é uma característica das células tumorais por aumentar a capacidade proteolítica da matriz extracelular para migração. Um mecanismo dessa capacidade foi relatado em estudos funcionais utilizando linhagens de carcinoma oral (Tu167 e SCC1) (Walker *et al.*, 2014). Nesse estudo foi verificado que o aumento de expressão da N-caderina induz a transcrição de *MMP9* via β -Catenina (Walker *et al.*, 2014). Em carcinoma de esôfago, Chen *et al.* (2014) detectaram o aumento de expressão dos genes *PLGF* e *MMP9*. Para desvendar o *cross-talk* entre os dois genes os autores utilizaram a linhagem celular (TE-1) para os ensaios funcionais sendo observado que o aumento de *PLGF* ativa o aumento nos níveis de *MMP9*, mas um aumento de *MMP9* não necessariamente induz o aumento *PLGF*. Os autores concluíram que o *PLGF* promove a invasão e metástase por meio de *MMP9*. Na análise de expressão de transcritos do presente estudo foi observada a diminuição na expressão de *PLGF* (FC=-0.3), a qual foi não significativa, reforçando a hipótese de que em CCEL o aumento de expressão de *MMP9* pode ser mediado pelo *hsa-miR-218-5p* e não pela ação do gene *PLGF*. Além disso, juntamente com outros genes alvos deste miRNA, como *COL1A1* e *COL10A1*, reforçando a hipótese de que esses genes e miRNA são potenciais *drivers* moleculares em CCEL.

Semelhante ao descrito em vários tipos tumorais como hepatocarcinoma, câncer de próstata, oral e de mama, em nosso estudo foi observada uma alteração na expressão do *hsa-miR-125b-5p* (FC=-3), (Li *et al.*, 2008; Ozen *et al.*, 2008; Henson *et al.*, 2009; Mar-Aguilar *et al.*, 2013). Análises funcionais utilizando linhagens celulares (MCF-7, MDA-MB-231, e MDA-MB-453) revelaram que a expressão ectópica do *hsa-miR-125b-5p* suprime a proliferação mediante a parada de ciclo celular (Zhang, Y. *et al.*, 2011). Tendo conhecimento da diminuição de expressão deste miRNA em vários tumores, Wu *et al.* (2013) utilizaram as linhagens celulares de câncer de bexiga (T24 e EJ) e relataram que a expressão ectópica deste miRNA foi capaz de inibir a migração e a invasão celular nestas linhagens. Nesse estudo, os autores demonstraram que o gene *MMP13* é um outro alvo deste miRNA. A análise de expressão de transcritos revelou um aumento de expressão de *MMP13* (FC=4.1) nas amostras aqui estudadas. Na análise integrada realizada em CCEL foi verificado que o *MMP13* pode ser regulado pelo *hsa-miR-125b-5p*, reforçando a hipótese de que alguns tumores possuem alterações e mecanismos de regulação similares e que estas alterações são relevantes em CCEL.

No presente estudo foi observada a expressão aumentada dos genes *HMGA2* (FC= 3,2) e *MMP13* (FC= 4,1) detectada no *array* de expressão e confirmada como alterada no banco de dados TCGA e por RT-qPCR. Estes genes foram correlacionados negativamente na análise integrada com seu miRNA regulador predito, *hsa-miR-125b-5p* (diminuição de expressão nos tumores; FC = -3). Estes dados sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão dos genes *HMGA2* e *MMP13* se dá pelo *hsa-miR-125b-5p* em CCEL.

O gene *HMGA2* mapeado em 12q15 codifica uma proteína nucleolar de 20kDa que atua como fator de transcrição o qual se liga a sequências ricas em AT do DNA ou interage com outros fatores de transcrição, alterando a estrutura da cromatina e regulando a transcrição de genes alvos (Reeves, 2001; Cleyne and Van De Ven, 2008). A expressão alterada do transcrito foi identificada em neoplasias utilizando camundongos, células embrionárias e linhagens celulares de tumores (Ashar *et al.*, 2010). Utilizando diversas linhagens celulares (T29H, T29, T80, T29, SKOV3, HEY, OVCAR-3, Caov-3 e células infectadas pelo vírus Phoenix), foi demonstrado que o *HMGA2* promove a transformação maligna, crescimento, proliferação, invasão e metástase nas células tumorais de ovário (Xi *et al.*, 2014). Em linhagens celulares de hepatocarcinoma (PLC/PRF/5, Huh-7, HepG2, e Hep3B) com baixo potencial metastático, Luo *et al.* (2013) avaliaram o efeito de expressão de *HMGA2* sobre a transição epitélio-mesênquima (EMT). As análises funcionais revelaram que os níveis aumentados de *HMGA2* exercem um papel no comportamento celular, ativando os reguladores SNAIL(1 e 2) e TWIST(1 e 2), os quais tem um papel na EMT, promovendo invasão e metástase. Em comparação com este estudo o nossos

resultados revelaram um aumento de expressão de *SNAIL2* (FC=1.2). A nossa hipótese é de que nos CCELS, o *HMGA2* (FC= 3.2) poderia ativar o fator *SNAIL2*, o qual teria o potencial para promover invasão e metástase. Na nossa casuística 10/11 casos que apresentaram aumento expressão de *HMGA2* e *SNAIL2* progrediram para metástase, demonstrando a importância destes genes no processo tumoral.

O gene *MMP13* é uma metaloproteinase que participa na degradação do colágeno, sendo ativa no desenvolvimento embrionário, especialmente na remodelação do colágeno presente na matriz extracelular para a mineralização óssea (Inada *et al.*, 2004). Níveis elevados do transcrito desse gene foram associados com a diminuição da sobrevida e metástase em linfonodos de pacientes com câncer de mama (Zhang, B. *et al.*, 2008), em metástase óssea em carcinoma renal (Kominsky *et al.*, 2008) e ao pior prognóstico em câncer de pulmão (Hsu *et al.*, 2006). No carcinoma papilífero da tireóide, o aumento de expressão do gene *MMP13* foi associado com a invasão no fronte e metástase (Wang, J. R. *et al.*, 2013).

A análise de vias pelo programa KOBAS revelou que *HMGA2* faz parte da via de sinalização de perda da regulação transcricional em câncer (do inglês, *Transcriptional misregulation in cancer*), além de integrar vias associadas com a remodelação da matriz extracelular e formação de colágeno (Tabela S1). Em nosso estudo *HMGA2* e *MMP13* apresentaram aumento de expressão. A nossa hipótese é que nos carcinomas de laringe, o aumento de expressão desses transcritos é favorecida pela diminuição da expressão do *hsa-miR-125b-5p*. Os achados deste estudos revelaram uma relação entre o *hsa-miR-125b-5p* e os genes *HMGA2* e *MMP13*, alvos que poderiam ser usados como marcadores moleculares e terapêuticos. Atualmente tem sido relatada aplicações terapêuticas utilizando modelos de *delivery* de miRNAs com o objetivo de restaurar a expressão do miRNA regulando a expressão de genes críticos no processo tumoral (Castaño *et al.*, 2014). Assim, esta seria uma possível estratégia terapêutica considerando que o *HMGA2* pode ser considerado um *driver* em carcinomas de laringe e um possível mecanismo para inibir a sua expressão. Outra estratégia seria usar inibidores dos produtos protéicos dos genes alvo deste miRNA (*HMGA2* e *MMP13*) (Lee *et al.*, 2014; Spicer *et al.*, 2014).

Foi também detectado uma diminuição da expressão do *hsa-miR-29c-3p* nos tumores quando comparado aos controles (FC= -5,8). Este miRNA é membro da família de *hsa-miR-29* composto por *hsa-miR-29a*, *hsa-miR-29b* e *hsa-miR-29c* (Fan *et al.*, 2013), que por vez também apresentaram diminuição de expressão. A diminuição da expressão do *hsa-miR-29c-3p* tem sido reportada em vários tumores humanos, incluindo o carcinoma nasofaríngeo (Liu, N. *et al.*, 2013), carcinoma de células transicionais da bexiga (Friedman *et al.*, 2009), leucemia linfocítica crônica (Stamatopoulos *et al.*, 2009), câncer gástrico (Matsuo *et al.*, 2013), câncer cervical (Li, Wang, *et*

al., 2011), carcinoma hepatocelular (Xiong *et al.*, 2010) e melanoma cutâneo (Nguyen *et al.*, 2011). Estes estudos demonstraram que diminuição da expressão de *hsa-miR-29c-3p* está envolvida na iniciação e progressão dos diferentes tumores afetando o crescimento celular, invasão, metástase e apoptose.

Baseado em dados de *microarray*, Xion *et al.*(2010) mostraram uma diminuição significativa do *hsa-miR-29c-3p* em carcinomas hepatocelulares (HCC). Esse estudo mostrou que a expressão reduzida de *hsa-miR-29c-3p* é um evento frequente em HCC, sendo associada com pior sobrevida livre de doença. Ensaio funcionais do *hsa-miR-29c-3p* caracterizaram dois transcritos codificadores, *BCL2* e *MCL1*, como alvos diretos desse miRNA (Xion *et al.* 2010). Entretanto, no nosso estudo não foi detectado aumento de expressão destes genes, pelo contrário detectamos diminuição da expressão dos genes *BCL2* (FC= -1,49) e *MCL1* (FC= -0.6). Estes dados sugerem que este miRNA deve ter alvos diferentes na laringe.

Os dados de expressão de transcritos codificadores no nosso estudo mostraram um aumento de expressão do gene *COL3A1* nos CCEL (FC= 3,3), o qual foi correlacionado negativamente com seu miRNA regulador predito *hsa-miR-29c-3p*, que por vez mostrou-se significativamente menos expresso nos tumores quando comparado aos controles (FC= -5,8). O *hsa-miR-29c-3p* é um dos candidatos a regular a expressão do gene *COL3A1*e, portanto, estas alterações poderiam contribuir para a tumorigênese da laringe. O gene *COL3A1*, codifica o colágeno tipo III, proteína homotrímica que contém três domínios (N-terminal, domínio colágeno e C- terminal) (Dalglish, 1998). A expressão alterada do gene *COL3A1* foi associada com a síndrome Ehlers-Danlos, aneurismas intracranianos e fibrose pulmonar idiopática (IPF) que apresenta um acúmulo excessivo de colágeno tipo I e III (Zhang and Clatterbuck, 2008; Chen *et al.*, 2012; Zhang, X. *et al.*, 2013). Esse gene também foi relatado com expressão aberrante em cânceres humanos, como de ovário e lipoblastoma(Lili *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2014).

Uma característica dos CCEL é a presença de metástase à distância, sendo o pulmão o sítio mais comumente acometido (83%). A metástase em pulmão está relacionada com pior prognóstico nestes pacientes, outro sítio acometido é o fígado (17%), metástases em outros locais ocorrem em 3% dos casos (Liu *et al.*, 2003). Em nosso estudo, 11/33 casos apresentaram metástase a distância, sendo 10 casos em pulmão e um em osso e bexiga. Outra característica relatada em CCEL é a presença de metástase linfonodal especialmente na região IV do pescoço que está associada com pior prognóstico em pacientes com carcinomas em estágio avançado (Medina *et al.*, 2011). Na nossa casuística a presença de metástase linfonodal foi evidenciada em cinco pacientes com tumores maiores (T3 e T4), dos quais quatro foram a óbito pela doença.

Embora a nossa casuística seja pequena para estas características, estas foram analisadas no contexto de expressão de transcritos e miRNAs. Foi detectado um aumento da expressão de *COL3A1* na maioria dos casos, incluindo aqueles que apresentaram metástases linfonodais e nos casos que evoluíram para metástase à distância, os casos (12T, 15T e 29T) apresentaram as duas características clínicas e foram para óbito pela doença. Estes achados sugerem o papel da *COL3A1* no processo de invasão e metástase em CCEL.

O *COL3A1* pode ser considerado como um alvo terapêutico a ser melhor investigado em pacientes com CCEL. Dentro deste contexto, Zhanget *al.*, (2013) mostraram a diminuição *in vitro* e *in vivo* do colágeno tipo III utilizando o fármaco SAHA (do inglês, *suberoylanilide hidroxamic acid*), aprovado pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para tratamento do câncer. O aumento de colágeno em pacientes e em camundongos com fibrose pulmonar idiopática foi reduzido substancialmente pelo tratamento de SAHA por promover um aumento da acetilação nas marcas de repressão de cromatina (H3K27Me3) das histonas H3 e H4, resultando na diminuição da expressão de *COL3A1*. Outro estudo recente utilizando análise integrada de dados genômicos e transcriptômicos em 51 leiomiomas uterinos (LU) revelou 32 genes moduladores, entre eles, um aumento de expressão do gene *COL3A1* (Cirilo *et al.*, 2013). A análise funcional *in silico* revelou que *COL3A1* estava associado com a resposta à colagenase de *Clostridium histolyticum*, um fármaco aprovado e utilizado no tratamento das doenças com transtornos fibroproliferativos. Os autores concluíram que a *COL3A1* é um alvo terapêutico que pode ser usado nestes pacientes. Similarmente, outros estudos confirmam o envolvimento deste gene em CCEL e portanto, essas estratégias terapêuticas também poderiam ser utilizadas nestes pacientes.

O nosso estudo revelou diminuição da expressão do *hsa-miR-204-5p* nos tumores quando comparado aos controles (FC= -6,2). O *hsa-miR-204-5p* está localizado em 9q21.1-22.3, uma região denominada CAGR (do inglês, *cancer-associated genomic regions*), um locus de um fator de risco bem estabelecido em tumores de cabeça e pescoço (Lee *et al.*, 2010). Os autores reportaram a diminuição da expressão do *hsa-miR-204-5p* e caracterizaram este miRNA como um supressor tumoral em linhagens celulares deste tipo tumoral (SCC25, SCC35, SCC58, SCC61, SCC135, SCC151, SQ20B e SQ38). Com a expressão aumentada do *hsa-miR-204-5p* essas linhagens celulares foram capazes de inibir a expressão dos seus genes alvos funcionalmente relacionados (*APRC1B*, *FAP* e *MMP9*), levando à diminuição da adesão, migração e invasão *in vitro*. Portanto, em CCEL, este miRNA pode também atuar como um importante supressor tumoral. Entre os três genes descritos como sendo regulados pelo *hsa-miR-204-5p*, *APRC1B*, *FAP* e *MMP9*, nós confirmamos a alteração no nível de expressão dos genes *FAP* (FC= 2.6) e

MMP9(FC= 2.2). Na análise integrada foi confirmada a correlação inversa da expressão do *hsa-miR-204-5p* (FC= -6.2) como alvo direto dos genes *FAP* e *MMP9* em carcinomas de laringe.

Na análise de *microarray* foi observado aumento de expressão do gene *MMP3* nos tumores (FC= 2,5) e foi correlacionado negativamente com seu miRNA regulador predito *hsa-miR-204-5p*, que por sua vez mostrou-se significativamente menos expresso nos tumores (FC= -6,2). Estes dados foram confirmados em um grupo independente de amostras sugerindo que em CCEL, um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *MMP3* é por meio do *hsa-miR-204-5p*.

O gene *MMP3* faz parte da família de metaloproteinases da matriz, e está envolvido na degradação e remodelamento da matriz extracelular podendo ativar outras metaloproteinases. O aumento de expressão do gene *MMP3* foi descrito como relacionado com o processo de metástase e invasão em diferentes tipos tumorais como no carcinoma de mama, esôfago e cabeça e pescoço (Mendes *et al.*, 2005; Zhang, C. *et al.*, 2013; Uraoka *et al.*, 2014). Em nosso estudo, 8 dos 28 casos que apresentaram aumento de expressão deste gene tiveram metástase à distância.

Em 42 carcinomas de laringe, Zhou *et al.* (2014) relataram um aumento de expressão dos transcritos *PLGF* e *MMP3*. Para avaliar o efeito dos transcritos na neovascularização que é comum nos carcinomas de laringe, os autores utilizaram a linhagem derivada de laringe Hep-2 que expressa os dois genes. O silenciamento do gene *PLGF* levou à diminuição da expressão do *MMP3*, entretanto a inibição do *MMP3* não afetou a expressão do *PLGF*, o que levou os autores a sugerir que o *PLGF* aumenta a expressão do *MMP3* pela via de sinalização ERK/MAPK e, como consequência levaria a neovascularização. Em nosso estudo, não foi observada alteração significativa na expressão do *PLGF* (FC=0.6). É importante salientar que os autores utilizaram uma linhagem de laringe contaminada com células Hep-2 um modelo não ideal para provar o mecanismo de regulação da expressão desses genes.

O *hsa-miR-143-3p* apresentou expressão significativamente menor nos tumores quando comparado aos controles (FC= -5,3). Este é um dos miRNAs mais descritos em literatura com diminuição de expressão em vários tipos de câncer incluindo carcinoma nasofaríngeo, bexiga, câncer colorretal e osteosarcoma (Chen *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Luo, X. *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2013).

Em três linhagens de osteosarcoma (MG63, U2OS e HEK293) e uma linhagem de tecido ósseo normal (hFOB 1.19), foi demonstrado que a restauração da expressão deste miRNA suprimiu a proliferação. A predição *in-silico* e o ensaio por luciferase confirmaram que a proteína anti-apoptótica BCL-2 é alvo deste miRNA (Zhang *et al.*, 2010). Em câncer cervical, esta mesma interação foi relatada nos modelos celulares (HeLa) e nos xenotransplantes, onde o

aumento de expressão deste miRNA inibia a expressão de *BCL2*(Liu, L. *et al.*, 2012). Contrariamente a estes dois estudos, nós encontramos uma diminuição da expressão de *BCL2*(FC= -1,5) em CCEL. A nossa hipótese é que em laringe, o *BCL2* não é alvo do *hsa-miR-143-3p* podendo haver outros mecanismos de regulação deste gene. O efeito deste miRNA também foi avaliado em linhagens derivadas de câncer de próstata (DU145 e PC-3), mediante o ensaio de luciferase e *Western blot*, revelando que a restauração deste miRNA inibe a migração e a invasão por inibição da *MMP13*, alvo confirmado pelo ensaio da luciferase (Wu, Huang, *et al.*, 2013). Este achado é concordante com os dados do nosso estudo, onde encontramos aumento de *MMP13* (FC= 4.1) presente nos 33 casos avaliados, 8 dos 11 casos com metástase apresentaram aumento de expressão de *MMP13*. Em adição, este gene na análise integrada apresentou correlação negativa com o *hsa-miR-125b-5p*, outro alvo deste miRNA em CCEL.

A importância do *hsa-miR-143-3p* como marcador de diagnóstico, preditivo e de resistência ao tratamento tem sido relatada nos últimos anos. Borralho *et al.*(2009) avaliaram o efeito deste miRNA no tratamento com 5-Fluoracil na linhagem celular HCT116 (derivada de carcinoma colorretal). Os autores mostraram que a restauração deste miRNA melhora o efeito anti-neoplásico e citotóxico deste fármaco uma vez que o miRNA promove a diminuição da expressão dos transcritos *ERK5*, *NF- κ B* e *BCL-2*, os quais estão envolvidos na progressão tumoral. No nosso estudo não foram detectadas alterações significativas nestes três genes. Entretanto, os resultados obtidos na análise de alvos de drogas revelou alteração na expressão dos genes *ALK7*, *MMP9*, *TKI*, *EMPI* e *BMP3* regulados por miRNA específicos associados com a resistência a 5-Fluoracil (Figura 12). Em câncer de próstata foi verificada a interação do *hsa-miR-143-3p* e *KRAS* confirmados por RT-qPCR e *Western blot*(Xu *et al.*, 2011). Os autores utilizaram duas linhagens (DU145 e PC3) para verificar o efeito deste miRNA no tratamento com docetaxel e verificaram que a restauração deste miRNA melhora a sensibilidade e o efeito citotóxico deste fármaco. O *KRAS* atua na via de sinalização *EGFR/RAS/MAPK*, a qual é alvo deste fármaco (Xu *et al.*, 2011). Em nosso estudo não foi observada alteração significativa no nível de expressão do *EGFR* (FC= 0.28), *KRAS* (FC = 0.90) e *MAPK4* (FC = 0.11), *MAPK10* (FC = -0.67), *MAPK11* (FC = -0.08), *MAPK12* (FC = 1.137) e *MAPK13* (FC = -0.13), sugerindo que o *hsa-miR-143-3p* não seria um regulador da via de sinalização *EGFR/RAS/MAPK* em CCEL. A análise de alvos de drogas revelou os genes *CHST3*, *NRG3*, *EMPI*, *PPARG* e *FMO2* seriam alvos da regulação dos miRNAs obtidos na análise de integrada e associados com a resistência ao docetaxel (Figura 12). Os dois fármacos (5-fluoracil e docetaxel) usados nestes estudos são utilizados atualmente no tratamento de CCEL de acordo com a guia de tratamento dos tumores em cabeça e pescoço (Pfister *et al.*, 2014). Desta

forma, poderiam ser selecionados os pacientes cujas alterações seriam alvos compatíveis com a indicação destes tratamentos.

Como resultado da análise integrada foi observado o aumento de expressão do gene *TOP2A* (FC= 2,03), o qual foi confirmado pelo banco de dados TCGA e correlacionado negativamente com seu miRNA regulador predito, *hsa-miR-143-3p* o qual apresentou diminuição de expressão comparado com os controles (FC = -5.3). Estes dados sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão dos genes *TOP2A* se dá pelo *hsa-miR-125b-5p* em CCEL.

O gene *TOP2A* (mapeado em 17q21-q22) atua em vários processos como a síntese de DNA, transcrição, segregação cromossômica e mitose celular (Tsavaris *et al.*, 2009). Um aumento de expressão de *TOP2A* foi relatado em vários tumores incluindo câncer de próstata, carcinoma adrenocortical, nasofaríngeo e mama (De Resende *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2013; Engström *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2014). Atualmente existem várias drogas inibidoras do gene *TOP2A* e outras que causam quebras no DNA e promovem apoptose (Nitiss, 2009). Alguns estudos em literatura mostraram a resistência a estes inibidores assim como alguns mecanismos que tentam explicar esse processo. Um estudo recente mostrou que o fator de transcrição *DLX4* localizado na mesma região genômica de *TOP2A* induz expressão de *TOP2A* e estimula o reparo das quebras em dupla fita do DNA. Este estudo revelou que pacientes com câncer de mama e ovário, que apresentam aumento de expressão de *TOP2A* e *DLX4* não respondem bem ao tratamento com antraciclina (doxorubicina e daunorubicina) quando comparados com pacientes que apresentam aumento de expressão de *TOP2A* e diminuição de *DLX4* (Trinh *et al.*, 2013). A análise de arrays não revelou uma alteração significativa na expressão de *DLX4* (FC=0.9). Os nossos dados indicam que a regulação de expressão de *TOP2A* em CCEL é mediada pela ação do *hsa-miR-143-3p*. Desta forma, os casos contendo essas alterações poderiam ser alvos para o tratamento com antraciclina (uma das estratégias terapêuticas segundo o guia de tratamento dos tumores em cabeça e pescoço; (Pfister *et al.*, 2014). Os casos contendo essas alterações seriam melhor responsivos a esse tratamento. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo relatando uma associação entre o *hsa-miR-143-3p* e o gene *TOP2A* em CCEL, alvo que poderia ser usado como marcador molecular e terapêutico.

O nosso estudo revelou aumento de expressão do *hsa-miR-21-5p* nos tumores quando comparado aos controles (FC= 1.2). *hsa-miR-21-5p* é descrito em literatura como alterado em vários tipos de câncer incluindo carcinoma gástrico, adenocarcinoma ductal de pâncreas, carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo de cavidade oral (Chang *et al.*, 2008; Zhang, Z. *et al.*, 2008; Kadera *et al.*, 2013; Kawakita *et al.*, 2013). Este miRNA tem como alvos diferentes transcritos expressos em diversos tipos celulares. Um estudo utilizando várias linhagens celulares

de carcinoma de esôfago e cabeça e pescoço relatou o aumento de expressão deste miRNA, sendo confirmado por RT-qPCR em amostras tumorais fixadas em parafina (Kimura *et al.*, 2010). Dados semelhantes foram relatados em 121 carcinomas renais, sendo confirmado por RT-qPCR. As alterações no *hsa-miR-21-5p* foram associadas com sobrevida diminuída (Faragalla *et al.*, 2012). Estes estudos fazem correspondência com nosso achado, além disso o nosso estudo detectou aumento de expressão do *hsa-miR-21-3p* (FC=2.3), fita contrária ao *hsa-miR-21-5p* contida no *harpin* do pré-miRNA.

Em carcinomas de laringe, Liuet *al.* (2009) relataram o aumento de expressão do *hsa-miR-21-5p*. Os autores utilizaram a linhagem celular Hep-2e demonstraram que a expressão ectópica deste miRNA suprime a proliferação (ensaio de formação de colônias). Além disso, foi relatado que o gene *BTG2* é alvo deste miRNA. Foi observada uma diminuição na expressão do gene *BTG2* (FC= -1,0) na análise de *arrays*, embora não significativa pelos critérios adotados no nosso estudo. Um outro alvo deste miRNA relatado em literatura é o gene supressor de tumor *PDCD4*. Em linhagens celulares de carcinoma do conduto biliar (colangiocarcinoma), a inibição deste miRNA aumentou os níveis do supressor *PDCD4* e do inibidor de metaloproteinase *TIMP3*(Selaru *et al.*, 2009). Em carcinomas orais, Reis *et al.*(2010) relataram a diminuição da expressão do supressor tumoral *PDCD4*e aumento da expressão do *hsa-miR-21-5p*, os quais foram associados com invasão e metástase linfonodal. Na linhagem celular TPC-1 (derivada de carcinoma papilífero de tireóide), o aumento de expressão deste miRNA promoveu a proliferação e a invasão celular, além de mostrar uma correlação negativa com o nível de expressão do gene *PDCD4*(Zhang, J. *et al.*, 2014). Em nosso estudo foi detectada diminuição de expressão de *PDCD4* (FC = -1.4), e uma tendência a diminuição na expressão de *TIMP3* (FC = -0.9). Estes achados reforçam a nossa hipótese de que o *hsa-miR-21-5p* regula a expressão destes genes. A alteração destes *drivers* está associada com processos de proliferação e invasão celular os quais poderiam ser confirmados em análises funcionais em culturas celulares de CCEL.

A importância do *hsa-miR-21-5p* como marcador de diagnóstico, preditivo e de resistência ao tratamento têm sido relatada recentemente onde vários autores usaram técnicas não invasivas de detecção como em plasma ou soro de pacientes. Tsujiura *et al.*(2010) avaliaram o plasma de 10 pacientes com câncer gástrico (antes e após a cirurgia) e relataram o aumento na expressão de quatro miRNAs, incluindo o *hsa-miR-21-5p* no plasma obtido antes da cirurgia. Um enfoque similar foi aplicado em câncer de pulmão detectando o aumento de expressão de *hsa-miR-21-5p* e *hsa-miR-24-5p* no soro dos pacientes antes da cirurgia (Le *et al.*, 2012). Em carcinomas de mama também foram detectados os *hsa-miR-21-5p* e *hsa-miR-92a-5p* no soro dos pacientes, sendo a expressão aumentada destes miRNAs associada com tamanho tumoral e metástase em linfonodos

(Si *et al.*, 2013). Além disso, a expressão aumentada do *hsa-miR-21-5p* também foi encontrada nos exossomos dos pacientes com câncer colorretal (Ogata-Kawata *et al.*, 2014). A presença de altos níveis do *hsa-miR-21-5p* no soro de pacientes com osteosarcoma foi associada com estágio avançado e resistência ao tratamento com quimioterapia adjuvante (cisplatina, metrotexato e fosfamida) (Yuan *et al.*, 2012). Estes achados poderiam ser confirmados no soro ou plasma dos pacientes com CCEL para confirmar o papel destes miRNAs como *drivers*.

Em câncer de ovário, este aumento de expressão do *hsa-miR-21-5p* foi associado com a resistência a cisplatina, uma vez que o miRNA inibe o alvo *PDCD4* (um gene envolvido no processo de apoptose), a restauração da expressão de *PDCD4* atuaria sensibilizando as células e melhorando o efeito da cisplatina (Chan, Blansit, *et al.*, 2014). Assim, este miRNA poderia ser usado como marcador para auxiliar na decisão da melhor estratégia de tratamento quimioterápico em CCEL pelo fato da cisplatina ser um dos agentes quimioterápicos usado nestes pacientes.

Um recente estudo revelou o potencial de Berberine (alcalóide natural usado na medicina tradicional chinesa) para diminuir a expressão deste miRNA (*hsa-miR-21-5p*) e aumentar a expressão do gene supressor *PDCD4* nas células de mieloma múltiplo (Luo *et al.*, 2014), um fármaco que poderia ser testado como terapêutico em CCEL. No nosso estudo o gene supressor tumoral *PDCD4* foi encontrado com diminuição de expressão (FC= -1.4), demonstrando que este gene é regulado pelo *hsa-miR-21-5p* em CCEL, concordante com os estudos funcionais relatados em literatura.

A diminuição da expressão do gene *ERBB4* (FC= -3,3) e *PDCD4* (FC= -1,4) nos *arrays* de expressão foi confirmada pelo banco de dados TCGA. A análise de expressão desses transcritos por RT-qPCR foi realizada apenas para o gene *ERBB4*. A expressão destes genes foi correlacionada negativamente com seu miRNA regulador predito, o *hsa-miR-21-5p* o qual apresentou aumento significativo de expressão nos tumores (FC = 1,2). Estes dados sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão dos genes *ERBB4* e *PDCD4* em CCEL ocorre pelo *hsa-miR-21-5p*.

O gene *ERBB4* (2q33.3-q34) faz parte da família de receptores EGFR, a qual compreende o *EGFR/ErbB1*, *HER2/ErbB2*, *HER3/ErbB3* e *HER4/ErbB4*. As proteínas desta família tem atividade tirosina quinase (Carpenter and Cohen, 1990). O gene *ERBB4* tem sido relatado com aumento de expressão em vários tumores incluindo meduloblastoma, melanoma, mama e carcinoma oral (Gilbertson *et al.*, 2001; Prickett *et al.*, 2009; Kurppa *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Em sarcomas de Ewing, o aumento e a ativação do ERBB4 suprime o *anoikis* e induz a resistência à quimioterapia, além de promover o fenótipo metastático em linhagens celulares pela ativação das vias PI3K-Akt e de adesão focal dependente de quinase (FAK) (Kang *et al.*, 2007). O

achado de diminuição da expressão deste oncogene (FC= -3,2) em CCEL, confirmada pelo banco de dados externos e na análise em amostras independentes, revela que nestes tumores este evento é crítico e pode ser regulado pelo *hsa-miR-21-5p*. Entretanto, experimentos funcionais são necessários para confirmar esses achados. No entanto, o gene *PDCD4* apresentou diminuição de expressão por ser um alvo confirmado de regulação por este miRNA (Reis *et al.*, 2010; Brønnum *et al.*, 2013). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato que mostra uma associação entre o *hsa-miR-21-5p* e os genes *ERBB4* e *PDCD4*, os quais poderiam ser usados como marcadores moleculares e terapêuticos, especialmente na hora de decisão pelo uso de inibidores do receptor EGFR.

O nosso estudo revelou aumento da expressão (FC= 6.1) do *hsa-miR-92a-3p* nos tumores quando comparado aos controles. Este miR faz parte do *cluster miR-17-92* mapeado em 13q31.3, o qual tem função oncogênica descrita em algumas doenças malignas (Hayashita *et al.*, 2005). A expressão elevada do *hsa-miR-92a-3p* foi relatada em vários tipos de câncer, incluindo pulmão e suas metástases, carcinoma hepatocelular, carcinoma de esôfago e câncer colorretal (Hayashita *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Shigoka *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Recentemente e contrariamente a esses dados prévios, foi relatada a diminuição de expressão do *hsa-miR-92a-3p* em linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo e câncer de mama (Ohyashiki *et al.*, 2011; Nilsson *et al.*, 2012; Yoshizawa *et al.*, 2012).

Em uma meta-análise, Luo *et al.* (2011) relataram 20 estudos de expressão de miRNAs em tecidos tumorais e três estudos realizados no plasma de pacientes com carcinoma colorretal. Os autores verificaram que o *hsa-miR-92a-3p* apresentava expressão aumentada em uma parcela significativa destes estudos, tornando-o um marcador de prognóstico de fácil detecção utilizando o plasma dos pacientes com CCEL.

Os nossos resultados mostraram o aumento da expressão do *hsa-miR-92a-3p* na análise de *microarray* qual foi confirmado por RT-qPCR em um grupo de amostras independentes. Semelhante aos nossos achados, Chen *et al.* (2011) relataram a expressão aumentada deste miRNA em amostras de carcinoma de esôfago. Os autores também encontraram correlação significativa deste achado com a presença de metástase linfonodal, estadiamento TNM (III) e pior prognóstico. Por ensaios funcionais, o *hsa-miR-92a-3p* modulou migração e invasão tumoral, mas não mostrou relação com os processos de apoptose e proliferação nas linhagens celulares derivadas de carcinoma de esôfago. Os autores ainda mostraram a regulação direta deste miRNA com o supressor tumoral *CDHI* (E-caderina), responsável pela adesão celular entre células. A restauração da função da *CDHI* foi capaz de inibir a invasão e a progressão tumoral. O nosso estudo não

detectou alteração significativa de *CDHI* (FC= -0.3) na análise de arrays, sugerindo outros alvos para este miRNA em carcinomas de laringe.

O gene *KLF2* (mapeado em 19p13.11) apresentou diminuição de expressão do transcrito (FC= -2,1) na análise de *array* do nosso estudo e pelo banco de dados TCGA. Foi também correlacionado negativamente com seu miRNA regulador predito, *hsa-miR-92a-3p*, que por sua vez foi encontrado com aumento de expressão nos tumores (FC = 6,1). Estes dados sugerem que em CCEL um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *KLF2* se dá pelo *hsa-miR-92a-3p*.

O gene *KLF2* faz parte da família de fatores de transcrição (*zinc finger*), sendo relatado na regulação de diversos processos biológicos, como crescimento, diferenciação e inflamação (Tetreault *et al.*, 2013; Limame *et al.*, 2014). O gene *KLF2* apresenta-se com diminuição de expressão em vários tumores incluindo leucemia mieloide aguda, próstata, mama e ovário (Wang *et al.*, 2005; Duhagon *et al.*, 2010; Humbert *et al.*, 2011). Este gene é considerado um supressor de tumor por atuar como inibidor de crescimento (Tetreault, Yang and Katz, 2013) e na angiogênese por inibir a expressão de HIF-1 α (Kawanami *et al.*, 2009) sendo também o regulador crítico do *VEGFR2* (Bhattacharya *et al.*, 2005). Além de ser regulado epigeneticamente, o gene *KLF2* pode ser regulado por vias de sinalização (*upstream*). Um estudo utilizando as linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), próstata (PC3 e LNCaP) e osteosarcoma (U2OS) revelou que o silenciamento do gene *KLF2* é mediado pelo complexo repressor *polycomb* (*EZH2*) que se liga no final 5' do gene *KLF2*. Tal ligação promove a metilação do promotor do gene *KLF2*, fato que promove a inibição de ligação entre a RNA polimerase e o promotor. As análises funcionais mostraram que a restauração da função deste gene mostrou efeitos antitumorais nessas linhagens celulares (Taniguchi *et al.*, 2012). Outro estudo utilizando a linhagem celular H1299 derivada de câncer de pulmão revelou que o gene *KLF2* é alvo da proteína SMURF1 ubiquitina ligase que leva o gene para uma degradação proteossômica (Xie *et al.*, 2011). Recentemente, Wang *et al.* (2013) relataram que o gene *KLF2* é alvo de FBW7, uma proteína que medeia a degradação de várias proteínas, incluindo c-Myc, Ciclina E, c-Jun, C/EBP α , Notch e KLF5. Os autores mostraram que o FBW7 identifica os dois sítios conservados de fosforilação conhecidos como *phosphodegronCDC4* (CPD) do *KLF2* promovendo a sua degradação. Em nosso estudo não foi detectada alteração significativa na expressão dos gene *EZH2* (FC= 0.05), *SMURF1* (FC= 0.3) e *FBW7* (FC= -0.5), o que confirma a nossa hipótese de que a regulação do gene *KLF2* em CCEL é mediada pelo *hsa-miR-92a-3p*.

Foi também detectado neste estudo a diminuição da expressão do *hsa-miR-92a-3p* (FC= 3.2) nos tumores quando comparado aos controles. A expressão do *hsa-miR-93-5p* foi relatada

como alterada em vários tipos de câncer incluindo o carcinoma nasofaríngeo, glioma, câncer de mama e pulmão (Deng *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014; Yang, F. *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Shi *et al.* (2014) utilizando as linhagens 786-O e 796-P derivadas de carcinoma renal, revelaram mediante ensaios *in vitro* e *in vivo* que o tratamento com TFG-beta nas células induz a parada de ciclo celular, suprime o crescimento e regula a expressão de *RBL2*, além de inibir a expressão do *hsa-miR-93-5p*, e este mecanismo de interação induz a inibição de crescimento nestas células. A hipótese deste mecanismo sugerido pelos autores poderia ser confirmado em nível funcional utilizando células derivadas de CCEL.

Um recente estudo em carcinomas de laringe relatou um aumento de expressão do *hsa-miR-93-5p* e uma diminuição de expressão do gene *CCNG2*, os quais estão associados com metástase em linfonodos e com alto grau histológico (Xiao *et al.*, 2014). Os autores utilizando células Hep-2 e ensaio da luciferase demonstraram que *CCNG2* é alvo direto deste miRNA e que o silenciamento deste miRNA inibe o processo de carcinogênese (Xiao *et al.*, 2014). Concordante com estes achados nós detectamos um aumento deste miRNA e uma diminuição na expressão do *CCNG2* (FC= -0.7), entretanto não foi observada associação com metástase em linfonodos e grau histológico avançado.

A importância do *hsa-miR-93-5p* como marcador diagnóstico, preditivo e de resistência a tratamento tem sido relatado por técnicas não invasivas de detecção utilizando plasma ou soro de pacientes. Wang *et al.* (2013) avaliaram o plasma de 241 de pacientes com câncer colorretal (triagem = 80, teste = 112, validação = 49). Os autores detectaram diminuição na expressão do *hsa-miR-93-5p* no plasma dos pacientes em relação aos doadores normais de plasma. Um enfoque similar em câncer de cabeça e pescoço detectando revelou a diminuição de expressão de quatro miRNAs incluindo *hsa-miR-21-5p* e *hsa-miR-93-5p* no soro dos pacientes e nas linhagens celulares após quimioterapia e radioterapia. Os autores concluíram que a resposta ao tratamento pode ser monitorada por estes miRNAs, sendo que o aumento de expressão dos mesmos estaria associado com baixa resposta a quimioterapia e radioterapia (Summerer *et al.*, 2013). Esses dois miRNAs foram detectados no presente estudo e poderiam ser avaliados no soro e plasma de pacientes com CCEL e teriam potencial para serem novos marcadores preditivos em CCEL.

A diminuição da expressão do gene *HLF* (FC= -3,5) também verificada no banco de dados TCGA e no presente estudo foi correlacionada negativamente com seu miRNA regulador predito, *hsa-miR-93-5p*, o qual apresentou aumento de expressão nos tumores (FC = 6,1). Estes dados sugerem que em CCEL um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *HLF* se dá pelo *hsa-miR-93-5p*.

O gene *HLF* codifica o fator de leucemia hepática, proteína que faz parte da família de fatores de transcrição (PAR bZIP) (Falvey *et al.*, 1995). A expressão do gene *HLF* está relacionada com a regulação do ritmo circadiano (Gachon, 2007) e relatada como alterada em tumores humanos. Por exemplo, em leucemias a expressão aberrante é devido a translocação t(17;19) que dá origem a uma proteína quimérica (E2A-HLF) (Look, 1997), a qual atua inibindo a morte celular por inativação da apoptose. Esse mesmo efeito foi relatado em células epidérmicas de camundongo (Waters *et al.*, 2009) e possivelmente em células tronco tumorais (Dorn *et al.*, 2009). Em nosso estudo foi observado a diminuição da expressão do gene *HLF*, achado contrário ao relatos em literatura, que indicam que o produto do gene *HLF* atua inibindo a apoptose e, portanto, atua como um oncogene especialmente em leucemias (Smith *et al.*, 2002). Estudos funcionais serão necessários para desvendar o papel de *HLF* no processo de carcinogênese em CCEL.

No presente estudo foram descritos genes e seus respectivos miRNAs reguladores preditos obtidos da análise integrada descritos na Tabela S8. Os nossos resultados foram contrastados com os achados descritos em literatura dando suporte adicional para os mecanismos de regulação de genes alvos por miRNAs em CCELS, por exemplo, o aumento de expressão de *MMP9* e mediada pelo *hsa-miR-218-5p*, assim como o aumento de expressão de *MMP3* e mediada pelo *hsa-miR-204-5p*, o aumento de expressão de *TOP2A* mediada pela ação do *hsa-miR-143-3p* e não pela ação do fator de transcrição *DLX4*. Também foram descritos genes alterados e seus respectivos inibidores como possíveis alternativas de tratamento, por exemplo, uso do fármaco SAHA e a colagenase de *Clostridium histolyticum* como inibidores de *COL3A*, o fármaco Berberine que inibe a expressão do *hsa-miR-21-5p*, além disso, aplicação de *antagomirs* e *mimics* para aumentar ou diminuir os níveis de miRNAs cujos genes alvos estão associados com processos de invasão e metástase (*HMGA2*, *LAMC2*, *COL1A1*, *COL10A1*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13* e *COL3A1*). Desta forma, as células tumorais de laringe seriam mais sensíveis a tratamentos específicos baseados nos achados moleculares ou haveriam alternativas quando há evidências de que determinados genes alvos de terapias não estão alterados (por exemplo, *ERBB4*). Análises funcionais em *in vitro* e *in vivo* poderão ser realizados utilizando células derivadas de CCEL, para dar validade aos achados e hipóteses geradas no presente estudo.

A análise para avaliar a relação entre as alterações da expressão de transcritos e de miRNAs como alvos para tratamentos usando quimioterápicos específicos revelou alvos de drogas e diversas interações entre miRNA-gene-droga que poderiam ser utilizadas como testes de screening como análise preditiva para uma melhor conduta a ser utilizada no tratamento de pacientes com CCEL.

Essa abordagem foi capaz de demonstrar que o celecoxibe poderia ser uma nova droga a ser considerada no tratamento dos pacientes com CCEL. Esse fármaco possui a habilidade de inibir a expressão *COX-2* e aumentar expressão de *PPARG*, uma proteína que tem um efeito anti-neoplásico relatada em câncer gástrico (Zhang *et al.*, 2009). Também já foi relatado que este inibidor de *COX-2* inibe a expressão das metaloproteinases 2 e 9 relacionadas em processos de metástase (Steenport *et al.*, 2009; Jendrossek, 2013; Li, W. W. *et al.*, 2014). No presente estudo, os genes que codificam as metaloproteinases 2 e 9 apresentaram aumento de expressão e os miRNA reguladores também apresentaram alteração inversa. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a relatar as interações entre alvos (genes e miRNAs) em pacientes com CCEL. Celocoxibe não só inibe metaloproteinases mas também participa em diversas vias com efeitos anti-tumorais (Figura Suplementar 1S) e seria uma alternativa para casos apresentando essas alterações.

Um outro fármaco que poderia ser utilizado nos pacientes com CCEL segundo os dados do nosso estudo é o Cilengitide. Esta droga sintética contém peptídeos conhecidos como RGD (formados por sequências de Arg-Gly-Asp), que se ligam a proteínas e integrinas da matriz extracelular, reconhecendo e interagindo com as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ para inibi-las (Mas-Moruno *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2014) em estudos prévios detectaram aumento de expressão das integrina αv (*ITGAV*) em amostras de laringe e hipofaringe (Lu *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Utilizando a linhagem Hep-2 os autores relataram que cilengitide diminui a expressão de *ITGAV* uma vez que os peptídeos da droga impedem que as integrinas se liguem com seus ligantes. Dessa forma são bloqueadas as vias de sinalização mediada por integrinas reduzindo o risco de invasão e metástase (Wang *et al.*, 2014). Em nosso estudo foi detectado um aumento de expressão desta integrina a qual é potencialmente regulada pelo *hsa-miR-140*. Estes dados sugerem que cilengitide poderia ser usada no tratamento de pacientes com CCEL que apresentam aumento de expressão *ITGV* e o efeito desse fármaco poderia ser reforçado com a restauração da expressão ectópica do *hsa-miR-140*.

Além dos dados descritos, também foram identificados vários genes envolvidos no mecanismo de resistência a cisplatina os quais também foram relatados em alguns tipos de câncer. O aumento de expressão do gene *GJA1* foi associado com a resistência a cisplatina em câncer de ovário (Li *et al.*, 2007), e no nosso estudo foi observado um aumento de expressão deste gene, além da diminuição da expressão do seu regulador predito, *oHas-miR-29a-3p*. O aumento da expressão de *GPX7* também está relacionado com a resistência a cisplatina em câncer de pulmão (Li, Sun, *et al.*, 2011). Em nosso estudo esse gene também apresentou aumento de expressão, além do cluster de miRNAs *has-miR-29*, reguladores preditos deste gene, apresentarem diminuição de expressão. O aumento de expressão de *HOXB9* também foi relacionado com a resistência a

cisplatina e carboplatina em câncer de pulmão e vários outros tipos de câncer (Tang *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2012; Sha *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). No presente estudo esse gene apresentou aumento de expressão e uma correlação negativa com o *has-miR-29b-3p*, um regulador predito deste gene. Em câncer colorretal, a resistência à cisplatina foi relacionada com o aumento de expressão de *NEK2* (Suzuki *et al.*, 2010). Esse gene também apresentou aumento de expressão no presente estudo, mediado em parte pela diminuição da expressão do *has-miR-27b-3p*. Em resumo, a investigação da expressão destes genes e miRNAs poderia auxiliar na melhor conduta terapêutica a ser utilizada em pacientes com carcinomas de laringe.

A diminuição de expressão do gene *ATP7B* foi relacionada com a resistência a cisplatina em câncer de pulmão (Nakagawa *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2010). Em nosso estudo este gene apresentou diminuição de expressão, e seu regulador predito, o *has-miR-92a-3p* apresentou aumento de expressão. A diminuição de expressão de *TOP2A* foi relacionada com a resistência à cisplatina e carboplatina em câncer de bexiga e outros tipos de câncer (Takata *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2008; Le Scolan *et al.*, 2008). Em nosso estudo o gene *TOP2A* apresentou aumento de expressão, além disso, os miRNA *hsa-miR-376c-3p*, *hsa-miR-23b-3p*, *hsa-let-7c-5p* e *hsa-mir-143-3p* reguladores preditos deste gene apresentaram diminuição de expressão. Estes dados mostram novamente que há alterações moleculares capazes de auxiliar na a decisão terapêutica para pacientes com carcinomas de laringe. Há relatos indicando que ocorre resistência a este tratamento por diferentes mecanismos (Shen *et al.*, 2012; Jacobsen and Honecker, 2014). A diminuição de expressão de *PDCD4* foi relacionada com resistência à cisplatina em câncer de ovário e língua (Liu, S. *et al.*, 2013; Sha *et al.*, 2013; Li, H. *et al.*, 2014). Nós também encontramos diminuição da expressão deste gene o que poderia ser explicado pela diminuição de um dos reguladores preditos para esse gene, o *has-miR-21-5p* e como consequência estes pacientes teriam resistência ao tratamento. Uma alternativa poderia ser o uso de um inibidor (*antagomir*) para o *has-miR-21* a qual poderia restaurar a expressão do gene *PDCD4*, que por vez faria com que as células tumorais fossem mais sensíveis a docetaxel (Shi *et al.*, 2010).

Assim, a construção de um painel de genes e miRNAs capazes de auxiliar na decisão terapêutica para pacientes com carcinomas de laringe teria extrema importância, diminuindo o uso de tratamentos ineficazes selecionando aqueles mais efetivos segundo o perfil molecular. Em conjunto estes achados sugerem que é possível modular a resposta ao tratamento nos pacientes com CCEL com as drogas disponíveis no mercado, as quais interagem diretamente com o produto dos genes ou que modulam indiretamente a expressão do gene por meio do miRNA alvo.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificados 89 miRNAs diferencialmente expressos (FC>2) em CCEL sendo 35 miRNAs confirmados em banco de dados externo (TCGA), os quais apresentam a mesma direção de expressão; entre os 1.680 transcritos codificadores considerados significativos, 846 foram confirmados como alterados pelo TCGA.
- A análise integrada entre dados de expressão de transcritos codificadores e de miRNAs, revelou 42 interações significativas experimentalmente observadas com correlação inversa envolvendo 15 miRNAs e 33 genes como potenciais marcadores moleculares associados aos carcinomas de laringe.
- A avaliação de vias moleculares *in silico* revelou alteração na expressão de genes regulados por miRNAs, cujos produtos protéicos foram associados com a composição e remodelação da matriz extracelular (*MMP3*, *MMP9*, *MMP10*, *MMP13*, *COL10A1* e *COL3A1*) e genes associados com processos de carcinogênese (*CAV1*, *ERBB4*, *HLF*, *HMG2*, *HOXB6*, *KLF2*, *LAMC2*, *PDCD4*, *PPP1R3* e *TOP2A*). Foi também detectado o envolvimento de miRNAs candidatos a reguladores desses genes (*hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-143-3p*, *hsa-miR-125b-5p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-93-5p*, *hsa-miR-92a-3p* e *hsa-let-7c-5p*).
- O *hsa-miR-199b-5p* regula epigeneticamente os genes *CAV1*, *HOXB6* e *LAMC2*, associados com diferentes processos tumorais incluindo o CCEL.
- O *hsa-miR-218-5p* regula os genes *COL1A1*, *COL10A1* e *MMP9* os quais estão associados com invasão e metástase em CCEL sendo um candidato a alvo para terapia.
- Foi verificada uma associação entre o aumento de expressão de *MMP9*, *MMP3* e *TOP2A* e a diminuição da expressão do *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-204-5p* e *hsa-miR-143-3p*, respectivamente, e não por outros mecanismos como descritos em literatura .
- O nosso estudo deu evidências adicionais que o *hsa-miR-125b-5p* regula os genes *HMG2* e *MMP13*, os quais estão associados com o câncer de laringe e o desenvolvimento de metástases. A expressão do *hsa-miR-29c-3p* foi detectada como associada inversamente com a expressão do gene *COL3A1*, o qual está associado com a transição epitélio-mesênquima (EMT). Este gene poderia ser inibido usando o fármaco SAHA ou a colagenase de *Clostridium histolyticum* como previamente relatado em estudos funcionais que apresentaram alteração no *COL3A1*.

- Uma estratégia proposta é a análise dos *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-93-5p* e *hsa-miR-92a-3p* no plasma e soro de pacientes com CCEL, os quais poderiam ser usados como marcadores preditivos. Uma alternativa para casos com alteração do *hsa-miR-21-5p* seria o uso de berberine já demonstrado como capaz de inibir a sua expressão.
- Estratégias usando *antagomirs* e *mimics* poderiam ser úteis para aumentar ou diminuir os níveis de miRNAs reguladores de genes que foram associados com processos de invasão e metástase e resistência ao tratamento (*HMG2*, *LAMC2*, *COL1A1*, *COL10A1*, *COL3A1*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13*, *PDCD4*, *TOP2A*, *KLF2* e *LAMC2*).
- Foram confirmadas em amostras independentes as alterações nos níveis de expressão dos miRNAs *hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-218-5p*, *hsa-miR-204-5p*, *hsa-miR-125b-5p*, *hsa-miR-29c-3p* e *hsa-miR-92a-3p*, evidenciando seu papel como marcadores moleculares em carcinomas de laringe. Foram também confirmados os níveis de expressão dos transcritos *ERBB4*, *HLF*, *HMG2*, *COL10A1*, *COL3A1*, *MMP3*, *MMP10*, *MMP13*, *PPIR3C* e *TOP2A*.
- O aumento de expressão do *hsa-miR-99a* foi associada com pacientes tabagistas. Uma análise exclusivamente em 11 pacientes do gênero feminino revelou miRNAs alterados associados significativamente com consumo de tabaco (*hsa-miR-1238*, *hsa-miR-1281* e *hsa-miR-149*), álcool (*hsa-miR-183*), grau histológico (9 miRNAs), recidiva (*hsa-miR-197*, *hsa-miR-3127*, *hsa-miR-3907* e *hsa-miR-4291*) e invasão perineural (*hsa-miR-432*). Em pacientes de gênero masculino foram detectados alterações nos níveis de expressão dos miRNAs com consumo de tabaco (*hsa-miR-99a*) e óbito pela doença (*hsa-miR-134*, *hsa-miR-640* e *hsv2-miR-H24*).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-FATTAH, A. A. et al. Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pneumonia. **Cell Biochem Biophys**, v. 67, n. 3, p. 875-84, 2013. ISSN 1559-0283. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559272>>.

ALAJEZ, N. M. et al. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. **Cancer Res**, v. 71, n. 6, p. 2381-91, Mar 2011. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385904>>.

ALMADORI, G. et al. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 5, p. 683-93, Mar 2005. ISSN 0959-8049. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763643>>.

ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 8, p. 277-302, Jan 2013. ISSN 1553-4014. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092187>>.

AMBROSIO, E. P. et al. Chromosomal imbalances exclusively detected in invasive front area are associated with poor outcome in laryngeal carcinomas from different anatomical sites. **Tumour Biol**, v. 34, n. 5, p. 3015-26, Oct 2013. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749487>>.

ANDOLFO, I. et al. The micro-RNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma. **Neuro Oncol**, v. 14, n. 5, p. 596-612, May 2012. ISSN 1523-5866. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411914>>.

ASHAR, H. R. et al. In vivo modulation of HMGA2 expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 1-2, p. 55-61, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 0006-3002. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123068>>.

AYAZ, L. et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 9, p. 1499-506, Sep 2013. ISSN 1432-1335. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817697>>.

BAR-AD, V. et al. Current management of locally advanced head and neck cancer: the combination of chemotherapy with locoregional treatments. **Semin Oncol**, v. 41, n. 6, p. 798-806, Dec 2014. ISSN 1532-8708. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499638>>.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>>.

BAUMANN, J. L. et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. **Laryngoscope**, v. 119, n. 8, p. 1531-7, Aug 2009. ISSN 1531-4995. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489068>>.

BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. Quantitative trait Loci analysis using the false discovery rate. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 783-90, Oct 2005. ISSN 0016-6731. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956674>>.

BETEL, D. et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. **Genome Biol**, v. 11, n. 8, p. R90, 2010. ISSN 1465-6914. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20799968>>.

BHATTACHARYA, R. et al. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. **J Biol Chem**, v. 280, n. 32, p. 28848-51, Aug 2005. ISSN 0021-9258. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980434>>.

BISOGNIN, A. et al. MAGIA²: from miRNA and genes expression data integrative analysis to microRNA-transcription factor mixed regulatory circuits (2012 update). **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Web Server issue, p. W13-21, Jul 2012. ISSN 1362-4962. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618880>>.

- BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 185-91, Feb 2004. ISSN 1355-8382. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730017>>.
- BORRALHO, P. M. et al. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. **FEBS J**, v. 276, n. 22, p. 6689-700, Nov 2009. ISSN 1742-4658. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843160>>.
- BOZDAYI, G. et al. Role of human papillomavirus in the clinical and histopathologic features of laryngeal and hypopharyngeal cancers. **J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 38, n. 1, p. 119-25, Feb 2009. ISSN 1916-0216. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344621>>.
- BOZIC, I. et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 43, p. 18545-50, Oct 2010. ISSN 1091-6490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876136>>.
- BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133-45, Mar 2013. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752881>>.
- BRØNNUM, H. et al. miR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56280, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441172>>.
- BURGESS, D. J. et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9053-8, Jul 2008. ISSN 1091-6490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18574145>>.
- BÉRGAMO, N. A. et al. Classic and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 2 Pt 1, p. 621-31, Jan 2005. ISSN 1078-0432. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701849>>.
- CAI, X.; HAGEDORN, C. H.; CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA**, v. 10, n. 12, p. 1957-66, Dec 2004. ISSN 1355-8382. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525708>>.
- CALDERWOOD, S. K. Tumor heterogeneity, clonal evolution, and therapy resistance: an opportunity for multitargeting therapy. **Discov Med**, v. 15, n. 82, p. 188-94, Mar 2013. ISSN 1944-7930. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545047>>.
- CARINCI, F. et al. Molecular classification of nodal metastasis in primary larynx squamous cell carcinoma. **Transl Res**, v. 150, n. 4, p. 233-45, Oct 2007. ISSN 1931-5244. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900511>>.
- CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **J Biol Chem**, v. 265, n. 14, p. 7709-12, May 1990. ISSN 0021-9258. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2186024>>.
- CASTAÑO, I. M. et al. A novel collagen-nanohydroxyapatite microRNA-activated scaffold for tissue engineering applications capable of efficient delivery of both miR-mimics and antagomiRs to human mesenchymal stem cells. **J Control Release**, Dec 2014. ISSN 1873-4995. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550154>>.
- CHAI, J. et al. MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. **Tumour Biol**, Oct 2014. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355599>>.
- CHAN, J. K. et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 132, n. 3, p. 739-44, Mar 2014. ISSN 1095-6859. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472409>>.

_____. MiR-378 as a biomarker for response to anti-angiogenic treatment in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 133, n. 3, p. 568-74, Jun 2014. ISSN 1095-6859. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680769>>.

CHANG, S. S. et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 123, n. 12, p. 2791-7, Dec 2008. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798260>>.

CHAO, A. et al. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. **Cancer Lett**, v. 291, n. 1, p. 99-107, May 2010. ISSN 1872-7980. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900756>>.

CHAPMAN, K. B. et al. COL10A1 expression is elevated in diverse solid tumor types and is associated with tumor vasculature. **Future Oncol**, v. 8, n. 8, p. 1031-40, Aug 2012. ISSN 1744-8301. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894674>>.

CHEN, H. C. et al. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. **Br J Cancer**, v. 100, n. 6, p. 1002-11, Mar 2009. ISSN 1532-1827. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19293812>>.

CHEN, J. et al. A functional variant of the collagen type III alpha1 gene modify risk of sporadic intracranial aneurysms. **Hum Genet**, v. 131, n. 7, p. 1137-43, Jul 2012. ISSN 1432-1203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241462>>.

CHEN, K. et al. Oncofetal protein IMP3: a new diagnostic biomarker for laryngeal carcinoma. **Hum Pathol**, v. 44, n. 10, p. 2126-31, Oct 2013. ISSN 1532-8392. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806529>>.

CHEN, Y. et al. Esophageal cancer stem cells express PLGF to increase cancer invasion through MMP9 activation. **Tumour Biol**, Sep 2014. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213700>>.

CHEN, Y. P. et al. Pattern of microRNA expression associated with different stages of alcoholic liver disease in rat models. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 3, p. 1195-204, Sep 2014. ISSN 1791-3004. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017766>>.

CHEN, Z. L. et al. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin. **J Biol Chem**, v. 286, n. 12, p. 10725-34, Mar 2011. ISSN 1083-351X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148309>>.

CHENDRIMADA, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740-4, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973356>>.

CIRILO, P. D. et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals potential targets associated with cell proliferation in uterine leiomyomas. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57901, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483937>>.

CLEYNEN, I.; VAN DE VEN, W. J. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). **Int J Oncol**, v. 32, n. 2, p. 289-305, Feb 2008. ISSN 1019-6439. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202751>>.

COCA-PELAZ, A. et al. Relationship between reflux and laryngeal cancer. **Head Neck**, Jun 2013. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794281>>.

COLOMBO, J. et al. Gene expression profiling reveals molecular marker candidates of laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 21, n. 3, p. 649-63, Mar 2009. ISSN 1021-335X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212623>>.

COSKUNPINAR, E. et al. Identification of a differential expression signature associated with tumorigenesis and metastasis of laryngeal carcinoma. **Gene**, v. 534, n. 2, p. 183-8, Jan 2014. ISSN 1879-0038. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239743>>.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Mol Cell**, v. 16, n. 6, p. 861-5, Dec 2004. ISSN 1097-2765. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610730>>.

DAI, Y. et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance. **Head Neck**, v. 33, n. 6, p. 786-91, Jun 2011. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560177>>.

DALGLEISH, R. The Human Collagen Mutation Database 1998. **Nucleic Acids Res**, v. 26, n. 1, p. 253-5, Jan 1998. ISSN 0305-1048. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399846>>.

DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 177-87, Jun 2007. ISSN 0024-3205. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570440>>.

DAVIDSON, M. R. et al. MicroRNA-218 is deleted and downregulated in lung squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12560, 2010. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838434>>.

DE RESENDE, M. F. et al. Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. **J Transl Med**, v. 11, p. 36, 2013. ISSN 1479-5876. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398928>>.

DENG, Z. Q. et al. Expression level of miR-93 in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of breast cancer patients. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 18, n. 5, p. 366-70, May 2014. ISSN 1945-0257. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606013>>.

DI PIETRO, M. et al. Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. 9077-82, Jun 2012. ISSN 1091-6490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22603795>>.

DI VIZIO, D. et al. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. **Cell Cycle**, v. 8, n. 15, p. 2420-4, Aug 2009. ISSN 1551-4005. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556867>>.

DIONYSOPOULOS, D. et al. Cyclin D1, EGFR, and Akt/mTOR pathway. Potential prognostic markers in localized laryngeal squamous cell carcinoma. **Strahlenther Onkol**, v. 189, n. 3, p. 202-14, Mar 2013. ISSN 1439-099X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23400686>>.

DORN, D. C. et al. The effect of cantharidins on leukemic stem cells. **Int J Cancer**, v. 124, n. 9, p. 2186-99, May 2009. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19123473>>.

DUAN, Z. et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 8, p. 1337-45, Aug 2011. ISSN 1538-8514. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666078>>.

DUHAGON, M. A. et al. Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres. **BMC Genomics**, v. 11, p. 324, 2010. ISSN 1471-2164. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500816>>.

DURAY, A. et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. **Int J Oncol**, v. 39, n. 1, p. 51-9, Jul 2011. ISSN 1791-2423. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573490>>.

EARLE, J. S. et al. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. **J Mol Diagn**, v. 12, n. 4, p. 433-40, Jul 2010. ISSN 1943-7811. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413677>>.

- ECSEDI, S.; TÓTH, L.; BALÁZS, M. Array CGH analysis of the rare laryngeal basaloid squamous cell carcinoma: a case report. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 5, n. 8, p. 834-9, 2012. ISSN 1936-2625. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071866>>.
- EFRON, B. Bayesian inference and the parametric bootstrap. **Ann Appl Stat**, v. 6, n. 4, p. 1971-1997, Oct 2012. ISSN 1932-6157. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843930>>.
- ENGSTRØM, M. J. et al. TOP2A gene copy number change in breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 67, n. 5, p. 420-5, May 2014. ISSN 1472-4146. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403186>>.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 12, p. 861-74, Dec 2011. ISSN 1471-0064. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094949>>.
- ESTEVEZ, L. I. et al. DNA methylation in the CTCF-binding site I and the expression pattern of the H19 gene: does positive expression predict poor prognosis in early stage head and neck carcinomas? **Mol Carcinog**, v. 44, n. 2, p. 102-110, Oct 2005. ISSN 0899-1987. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16015666>>.
- FALVEY, E.; FLEURY-OLELA, F.; SCHIBLER, U. The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. **EMBO J**, v. 14, n. 17, p. 4307-17, Sep 1995. ISSN 0261-4189. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556072>>.
- FAN, Y. C. et al. MiR-29c inhibits glioma cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. **J Neurooncol**, v. 115, n. 2, p. 179-88, Nov 2013. ISSN 1573-7373. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943502>>.
- FANG, C.; ZHAO, Y.; GUO, B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 7, p. 1457-63, Jul 2013. ISSN 1097-4644. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296799>>.
- FARAGALLA, H. et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. **J Mol Diagn**, v. 14, n. 4, p. 385-92, Jul 2012. ISSN 1943-7811. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580180>>.
- FENG, Y. et al. microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer. **BMC Urol**, v. 14, p. 50, 2014. ISSN 1471-2490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24957100>>.
- FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 2010. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>>.
- FIELDING, P. E. et al. Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. **Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 2578-86, Mar 2004. ISSN 0006-2960. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14992595>>.
- FLAMANT, S. et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 95, n. 8, p. 1325-33, Aug 2010. ISSN 1592-8721. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460641>>.
- FOUNTZILAS, E. et al. Identification and validation of a multigene predictor of recurrence in primary laryngeal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70429, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950933>>.
- FREEDMAN, N. D. et al. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1593-601, Oct 2007. ISSN 0008-543X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724671>>.
- FRIEDMAN, J. M. et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. **Cancer Res**, v. 69, n. 6, p. 2623-9, Mar 2009. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258506>>.

FUKANO, H. et al. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. **Head Neck**, v. 19, n. 3, p. 205-10, May 1997. ISSN 1043-3074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142520>>.

GACHON, F. Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors. **Ann Med**, v. 39, n. 8, p. 562-71, 2007. ISSN 0785-3890. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17852034>>.

GALLO, A. et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 141, n. 2, p. 276-81, Aug 2009. ISSN 0194-5998. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643265>>.

GAO, C. et al. Reduced microRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. **Cancer**, v. 116, n. 1, p. 41-9, Jan 2010. ISSN 0008-543X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890957>>.

GARAVELLO, W. et al. Diet diversity and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. **Oral Oncol**, v. 45, n. 1, p. 85-9, Jan 2009. ISSN 1879-0593. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487075>>.

_____. Family history of cancer and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. **Int J Cancer**, v. 130, n. 3, p. 665-70, Feb 2012. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21400506>>.

GARG, M. et al. Laminin-5 γ -2 (LAMC2) is highly expressed in anaplastic thyroid carcinoma and is associated with tumor progression, migration, and invasion by modulating signaling of EGFR. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 1, p. E62-72, Jan 2014. ISSN 1945-7197. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170107>>.

GARZIA, L. et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4998, 2009. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308264>>.

GEE, H. E. et al. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2148-58, May 2010. ISSN 0008-543X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20187102>>.

GIAMPAOLO, A. et al. Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1293-301, Jul 2002. ISSN 0887-6924. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094253>>.

GILBERTSON, R. et al. Novel ERBB4 juxtamembrane splice variants are frequently expressed in childhood medulloblastoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 31, n. 3, p. 288-94, Jul 2001. ISSN 1045-2257. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391800>>.

GONG, H. et al. Helicobacter pylori infection of the larynx may be an emerging risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma. **Clin Transl Oncol**, v. 14, n. 12, p. 905-10, Dec 2012. ISSN 1699-3055. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855167>>.

GONG, H. L. et al. The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66476, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824228>>.

GREGORY, R. I. et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 631-40, Nov 2005. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271387>>.

_____. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-40, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531877>>.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, Jan 2006. ISSN 1362-4962. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381832>>.

GUNGOR, A. et al. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. **J Laryngol Otol**, v. 121, n. 8, p. 772-4, Aug 2007. ISSN 1748-5460. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320003>>.

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 816-26, Oct 2004. ISSN 1471-0072. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459662>>.

GUO, Y. et al. miR-24 functions as a tumor suppressor in Hep2 laryngeal carcinoma cells partly through down-regulation of the S100A8 protein. **Oncol Rep**, v. 27, n. 4, p. 1097-103, Apr 2012. ISSN 1791-2431. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139384>>.

_____. MicroRNA-182 promotes tumor cell growth by targeting transcription elongation factor A-like 7 in endometrial carcinoma. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 3, p. 581-90, 2013. ISSN 1421-9778. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021963>>.

HAAS, S. L.; YE, W.; LÖHR, J. M. Alcohol consumption and digestive tract cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 15, n. 5, p. 457-67, Sep 2012. ISSN 1473-6519. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797570>>.

HALEC, G. et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 1, p. 172-83, Jul 2013. ISSN 1532-1827. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778529>>.

HAN, J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 887-901, Jun 2006. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751099>>.

HAYASHITA, Y. et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. **Cancer Res**, v. 65, n. 21, p. 9628-32, Nov 2005. ISSN 0008-5472. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266980>>.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1052-9276. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287204>>.

HENSON, B. J. et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 48, n. 7, p. 569-82, Jul 2009. ISSN 1098-2264. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396866>>.

HSU, C. M. et al. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 33, n. 6, p. 1933-42, Dec 2012. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811001>>.

HSU, C. P.; SHEN, G. H.; KO, J. L. Matrix metalloproteinase-13 expression is associated with bone marrow microinvolvement and prognosis in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 52, n. 3, p. 349-57, Jun 2006. ISSN 0169-5002. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569461>>.

HUANG, C. X. et al. Screening for MiRNAs related to laryngeal squamous carcinoma stem cell radiation. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 8, p. 4533-7, 2013. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083697>>.

HUANG, K. et al. Overexpression of HOXB9 promotes metastasis and indicates poor prognosis in colon cancer. **Chin J Cancer Res**, v. 26, n. 1, p. 72-80, Feb 2014. ISSN 1000-9604. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24653628>>.

- HUANG, Z. et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 127, n. 1, p. 118-26, Jul 2010. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876917>>.
- HUMBERT, M. et al. Deregulated expression of Kruppel-like factors in acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 35, n. 7, p. 909-13, Jul 2011. ISSN 1873-5835. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470678>>.
- HUR, H. et al. Analysis of HOX gene expression patterns in human breast cancer. **Mol Biotechnol**, v. 56, n. 1, p. 64-71, Jan 2014. ISSN 1559-0305. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820980>>.
- INADA, M. et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17192-7, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563592>>.
- INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014. Available at: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=7>>.
- INOUE, Y. et al. ATP7B expression is associated with in vitro sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer. **Oncol Lett**, v. 1, n. 2, p. 279-282, Mar 2010. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966294>>.
- IOVĂNESCU, G. H. et al. Histopathological prognostic and risk factors in patients with laryngeal neoplasms. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 4, p. 1087-92, 2013. ISSN 1220-0522. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399006>>.
- JACOBSEN, C.; HONECKER, F. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms. **Andrology**, Dec 2014. ISSN 2047-2927. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546083>>.
- JAIN, M. et al. TOP2A is overexpressed and is a therapeutic target for adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, v. 20, n. 3, p. 361-70, Jun 2013. ISSN 1479-6821. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533247>>.
- JALALI, M. M. et al. p53 overexpression impacts on the prognosis of laryngeal squamous cell carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 7, p. 1731-4, 2011. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126554>>.
- JARMUZ-SZYMCZAK, M. et al. Heterogeneity of 11q13 region rearrangements in laryngeal squamous cell carcinoma analyzed by microarray platforms and fluorescence in situ hybridization. **Mol Biol Rep**, May 2013. ISSN 1573-4978. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652995>>.
- JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855>>.
- JENDROSSEK, V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. **Cancer Lett**, v. 332, n. 2, p. 313-24, May 2013. ISSN 1872-7980. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345578>>.
- JIN, J. et al. miRNA-218 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating of TIAM1, MMP2 and MMP9. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 6, p. 3681-4, 2013. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886165>>.
- KADERA, B. E. et al. MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71978, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991015>>.
- KANG, H. G. et al. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. **Cancer Res**, v. 67, n. 7, p. 3094-105, Apr 2007. ISSN 0008-5472. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409416>>.

- KAWAKITA, A. et al. MicroRNA-21 Promotes Oral Cancer Invasion via the Wnt/ β -Catenin Pathway by Targeting DKK2. **Pathol Oncol Res**, Sep 2013. ISSN 1532-2807. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2399978>>.
- KAWANAMI, D. et al. Kruppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function in the endothelium. **J Biol Chem**, v. 284, n. 31, p. 20522-30, Jul 2009. ISSN 1083-351X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491109>>.
- KERTESZ, M. et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nat Genet**, v. 39, n. 10, p. 1278-84, Oct 2007. ISSN 1546-1718. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893677>>.
- KESER, I. et al. DNA gains and losses of chromosome in laryngeal squamous cell carcinoma using comparative genomic hybridization. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 6, p. 949-54, Dec 2008. ISSN 0513-5796. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19108018>>.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 209-16, Oct 2003. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567918>>.
- KIMURA, S. et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. **Oncol Rep**, v. 23, n. 6, p. 1625-33, Jun 2010. ISSN 1791-2431. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428818>>.
- KINOSHITA, T. et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 3, n. 11, p. 1386-400, Nov 2012. ISSN 1949-2553. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159910>>.
- KOMINSKY, S. L. et al. MMP-13 is over-expressed in renal cell carcinoma bone metastasis and is induced by TGF-beta1. **Clin Exp Metastasis**, v. 25, n. 8, p. 865-70, 2008. ISSN 1573-7276. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18709334>>.
- KOSANAM, H. et al. Laminin, gamma 2 (LAMC2): a promising new putative pancreatic cancer biomarker identified by proteomic analysis of pancreatic adenocarcinoma tissues. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 10, p. 2820-32, Oct 2013. ISSN 1535-9484. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798558>>.
- KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M. et al. Recurrent amplification in the 22q11 region in laryngeal squamous cell carcinoma results in overexpression of the CRKL but not the MAPK1 oncogene. **Cancer Biomark**, v. 8, n. 1, p. 11-9, 2010-2011 2010. ISSN 1875-8592. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896986>>.
- KOTAJA, N. MicroRNAs and spermatogenesis. **Fertil Steril**, v. 101, n. 6, p. 1552-62, Jun 2014. ISSN 1556-5653. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882619>>.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, Jan 2014. ISSN 1362-4962. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275495>>.
- KREK, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. **Nat Genet**, v. 37, n. 5, p. 495-500, May 2005. ISSN 1061-4036. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806104>>.
- KRISTENSEN, V. N. et al. Principles and methods of integrative genomic analyses in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 5, p. 299-313, May 2014. ISSN 1474-1768. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759209>>.
- KUASNE, H. et al. Epigenetic mechanisms in penile carcinoma. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 10791-808, 2013. ISSN 1422-0067. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702847>>.
- KUROKAWA, H. et al. Estimation of tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis, the prognosis and the treatment follow-up of oral squamous cell carcinoma. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v. 89, n. 11, p. 312-20, Nov 1998. ISSN 0016-254X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884462>>.

- KURPPA, K. J. et al. ERBB4 promoter polymorphism is associated with poor distant disease-free survival in high-risk early breast cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102388, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036186>>.
- LAN, J. et al. TOP2A overexpression as a poor prognostic factor in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Tumour Biol**, v. 35, n. 1, p. 179-87, Jan 2014. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897556>>.
- LANDTHALER, M.; YALCIN, A.; TUSCHL, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. **Curr Biol**, v. 14, n. 23, p. 2162-7, Dec 2004. ISSN 0960-9822. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589161>>.
- LE, H. B. et al. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients. **Med Oncol**, v. 29, n. 5, p. 3190-7, Dec 2012. ISSN 1559-131X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782668>>.
- LE SCOLAN, E. et al. Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. **Cancer Res**, v. 68, n. 9, p. 3277-85, May 2008. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451154>>.
- LEE, J. H. et al. Ginsenosides from Korean red ginseng inhibit matrix metalloproteinase-13 expression in articular chondrocytes and prevent cartilage degradation. **Eur J Pharmacol**, v. 724, p. 145-51, Feb 2014. ISSN 1879-0712. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384406>>.
- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862-4, Oct 2001. ISSN 0036-8075. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679672>>.
- LEE, Y. et al. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis. **PLoS Comput Biol**, v. 6, n. 4, p. e1000730, Apr 2010. ISSN 1553-7358. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369013>>.
- LEWIN, J. S. et al. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. **Cancer**, v. 97, n. 4, p. 1010-4, Feb 2003. ISSN 0008-543X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569600>>.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, Jan 2005. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>>.
- LEWIS, J. S. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol**, v. 6 Suppl 1, p. S75-82, Jul 2012. ISSN 1936-0568. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782226>>.
- LI, B. S. et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41629, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860003>>.
- LI, F. et al. Elevated expression of integrin α v and β 5 subunit in laryngeal squamous-cell carcinoma associated with lymphatic metastasis and angiogenesis. **Pathol Res Pract**, v. 209, n. 2, p. 105-9, Feb 2013. ISSN 1618-0631. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261238>>.
- LI, H.; XU, H.; SHEN, H. microRNA-106a modulates cisplatin sensitivity by targeting PDCD4 in human ovarian cancer cells. **Oncol Lett**, v. 7, n. 1, p. 183-188, Jan 2014. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348845>>.
- LI, J. et al. miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 10, p. 354, 2010. ISSN 1471-2407. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602797>>.

_____. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. **Oncogene**, v. 26, n. 20, p. 2860-72, May 2007. ISSN 0950-9232. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072341>>.

LI, W. et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, v. 123, n. 7, p. 1616-22, Oct 2008. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649363>>.

LI, W. W. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib suppresses invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cell lines through a decrease in matrix metalloproteinase-2 and -9 activity. **Pharmazie**, v. 69, n. 2, p. 132-7, Feb 2014. ISSN 0031-7144. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24640603>>.

LI, Y. et al. Genetic variations in multiple drug action pathways and survival in advanced stage non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 11, p. 3830-40, Jun 2011. ISSN 1078-0432. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636554>>.

_____. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. **J Pathol**, v. 224, n. 4, p. 484-95, Aug 2011. ISSN 1096-9896. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503900>>.

LIAN, M. et al. Microarray gene expression analysis of tumorigenesis and regional lymph node metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84854, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24386425>>.

LILI, L. N. et al. Molecular profiling supports the role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer metastasis. **J Ovarian Res**, v. 6, n. 1, p. 49, 2013. ISSN 1757-2215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837907>>.

LIM, L. P. et al. Vertebrate microRNA genes. **Science**, v. 299, n. 5612, p. 1540, Mar 2003. ISSN 1095-9203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624257>>.

LIMAME, R. et al. Krüppel-like factors in cancer progression: three fingers on the steering wheel. **Oncotarget**, v. 5, n. 1, p. 29-48, Jan 2014. ISSN 1949-2553. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429391>>.

LIN, J. et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 11, p. 1641-7, Nov 2011. ISSN 1460-2180. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890460>>.

LIN, T. et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. **J Urol**, v. 181, n. 3, p. 1372-80, Mar 2009. ISSN 1527-3792. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157460>>.

LIU, C. J. et al. miR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene. **Int J Cancer**, v. 134, n. 4, p. 811-21, Feb 2014. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824713>>.

LIU, L. et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. **Mol Med Rep**, v. 5, n. 3, p. 753-60, Mar 2012. ISSN 1791-3004. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160209>>.

LIU, M. et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. **Cell Res**, v. 19, n. 7, p. 828-37, Jul 2009. ISSN 1748-7838. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546886>>.

LIU, N. et al. MiR-29c suppresses invasion and metastasis by targeting TIAM1 in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett**, v. 329, n. 2, p. 181-8, Feb 2013. ISSN 1872-7980. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142282>>.

LIU, S. et al. Berberine sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin through miR-21/PDCD4 axis. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 45, n. 9, p. 756-62, Sep 2013. ISSN 1745-7270. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824073>>.

LIU, W. W. et al. [Distant metastases and their significant indicators in laryngeal cancer]. **Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi**, v. 38, n. 3, p. 221-4, Jun 2003. ISSN 0412-3948. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515785>>.

LIU, Y. et al. Synthetic miRNA-mowers targeting miR-183-96-182 cluster or miR-210 inhibit growth and migration and induce apoptosis in bladder cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52280, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284967>>.

LONG, X. B. et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. **Oncol Rep**, v. 22, n. 5, p. 1189-95, Nov 2009. ISSN 1021-335X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19787239>>.

LOO, S. W.; GEROPANTAS, K.; ROQUES, T. W. Functional organ preservation in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma: is there a role for induction chemotherapy? **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 25, n. 5, p. 298-307, May 2013. ISSN 1433-2981. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290343>>.

LOOK, A. T. E2A-HLF chimeric transcription factors in pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 220, p. 45-53, 1997. ISSN 0070-217X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103674>>.

LOYO, M.; PAI, S. I. The molecular genetics of laryngeal cancer. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 41, n. 4, p. 657-72, v, Aug 2008. ISSN 0030-6665. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570952>>.

LU, J. G. et al. Overexpression of osteopontin and integrin αv in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 137, n. 11, p. 1613-8, Nov 2011. ISSN 1432-1335. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853313>>.

_____. Role of the alpha v-integrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 266, n. 1, p. 89-96, Jan 2009. ISSN 1434-4726. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427826>>.

LUND, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-8, Jan 2004. ISSN 1095-9203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631048>>.

LUO, X. et al. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 7, p. 1272-86, Jul 2011. ISSN 1538-7755. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551242>>.

_____. Integrative analysis of differential miRNA and functional study of miR-21 by seed-targeting inhibition in multiple myeloma cells in response to berberine. **BMC Syst Biol**, v. 8, p. 82, 2014. ISSN 1752-0509. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000828>>.

LUO, Y.; LI, W.; LIAO, H. HMGA2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncol Lett**, v. 5, n. 4, p. 1353-1356, Apr 2013. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23599793>>.

LUO, Z. et al. miR-149 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 36, n. 7, p. 604-9, Jul 2011. ISSN 1672-7347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873783>>.

MAR-AGUILAR, F. et al. Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue. **Asia Pac J Clin Oncol**, v. 9, n. 1, p. 53-9, Mar 2013. ISSN 1743-7563. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898264>>.

MARCOS, C. et al. Genetic model of transformation and neoplastic progression in laryngeal epithelium. **Head Neck**, v. 33, n. 2, p. 216-24, Feb 2011. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629083>>.

MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 10, n. 10, p. 753-68, Dec 2010. ISSN 1875-5992. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269250>>.

MATSUO, M. et al. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. **Mol Cancer**, v. 12, p. 15, 2013. ISSN 1476-4598. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442884>>.

MEDINA, J. E. et al. Central compartment dissection in laryngeal cancer. **Head Neck**, v. 33, n. 5, p. 746-52, May 2011. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20652888>>.

MEHNER, C. et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2736-49, May 2014. ISSN 1949-2553. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811362>>.

MENDES, O.; KIM, H. T.; STOICA, G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. **Clin Exp Metastasis**, v. 22, n. 3, p. 237-46, 2005. ISSN 0262-0898. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158251>>.

MIHELICH, B. L. et al. miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 52, p. 44503-11, Dec 2011. ISSN 1083-351X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045813>>.

MIRISOLA, V. et al. A prognostic multigene classifier for squamous cell carcinomas of the larynx. **Cancer Lett**, v. 307, n. 1, p. 37-46, Aug 2011. ISSN 1872-7980. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481529>>.

MORSLED, K. et al. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 265 Suppl 1, p. S89-96, Jul 2008. ISSN 0937-4477. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193443>>.

NAKAGAWA, T. et al. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts. **Oncol Rep**, v. 20, n. 2, p. 265-70, Aug 2008. ISSN 1021-335X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636185>>.

NEMLICH, Y. et al. MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth. **J Clin Invest**, v. 123, n. 6, p. 2703-18, Jun 2013. ISSN 1558-8238. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728176>>.

NGUYEN, T. et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 388-94, Mar 2011. ISSN 1559-2308. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081840>>.

NI, Y. et al. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma. **Gene**, v. 517, n. 2, p. 197-204, Apr 2013. ISSN 1879-0038. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276710>>.

NILSSON, S. et al. Downregulation of miR-92a is associated with aggressive breast cancer features and increased tumour macrophage infiltration. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36051, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563438>>.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338-50, May 2009. ISSN 1474-1768. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377506>>.

NOLAND, C. L.; DOUDNA, J. A. Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. **RNA**, v. 19, n. 5, p. 639-48, May 2013. ISSN 1469-9001. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23531496>>.

NOLAND, C. L.; MA, E.; DOUDNA, J. A. siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. **Mol Cell**, v. 43, n. 1, p. 110-21, Jul 2011. ISSN 1097-4164. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726814>>.

OGATA-KAWATA, H. et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e92921, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705249>>.

OHYASHIKI, K. et al. Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16408, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383985>>.

OUE, N. et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. **Cancer Res**, v. 64, n. 7, p. 2397-405, Apr 2004. ISSN 0008-5472. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059891>>.

OUYANG, L. et al. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. **Med Oncol**, v. 30, n. 1, p. 340, Mar 2013. ISSN 1559-131X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269581>>.

OZEN, M. et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 12, p. 1788-93, Mar 2008. ISSN 1476-5594. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891175>>.

PAPADAS, T. A. et al. Determination of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein expression in laryngeal squamous cell carcinomas based on digital image analysis. **J BUON**, v. 18, n. 4, p. 977-81, 2013 Oct-Dec 2013. ISSN 1107-0625. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24344026>>.

PARKIN, D. M. 14. Cancers attributable to occupational exposures in the UK in 2010. **Br J Cancer**, v. 105 Suppl 2, p. S70-2, Dec 2011. ISSN 1532-1827. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158325>>.

PATMORE, H. S. et al. Genetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma using comparative genomic hybridisation identifies specific aberrations associated with laryngeal origin. **Cancer Lett**, v. 258, n. 1, p. 55-62, Dec 2007. ISSN 0304-3835. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920192>>.

PERSSON, H. et al. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. **Cancer Res**, v. 71, n. 1, p. 78-86, Jan 2011. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199797>>.

PETRELLI, A. et al. Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. **Oncogene**, v. 31, n. 42, p. 4517-26, Oct 2012. ISSN 1476-5594. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249248>>.

PFISTER, D. G. et al. Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 12, n. 10, p. 1454-87, Oct 2014. ISSN 1540-1413. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313184>>.

PRICKETT, T. D. et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1127-32, Oct 2009. ISSN 1546-1718. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718025>>.

PÉREZ-AYALA, M. et al. Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas. **Int J Cancer**, v. 46, n. 1, p. 8-11, Jul 1990. ISSN 0020-7136. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2163992>>.

QIU, Y. et al. TGF- β upregulates miR-182 expression to promote gallbladder cancer metastasis by targeting CADM1. **Mol Biosyst**, v. 10, n. 3, p. 679-85, Mar 2014. ISSN 1742-2051. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445397>>.

REEVES, R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 63-81, Oct 2001. ISSN 0378-1119. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602345>>.

- REIS, P. P. et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. **Mol Cancer**, v. 9, p. 238, 2010. ISSN 1476-4598. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831814>>.
- REN, J. et al. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 18, p. 3409-16, Dec 2010. ISSN 1879-0852. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801640>>.
- REUNANEN, N. et al. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. **J Biol Chem**, v. 277, n. 35, p. 32360-8, Aug 2002. ISSN 0021-9258. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060661>>.
- RODRIGUEZ, A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Res**, v. 14, n. 10A, p. 1902-10, Oct 2004. ISSN 1088-9051. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364901>>.
- RUKOV, J. L. et al. Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. **Brief Bioinform**, Jan 2013. ISSN 1477-4054. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376192>>.
- SAITO, K. et al. MicroRNA-196a Is a Putative Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target for Laryngeal Cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71480, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23967217>>.
- SANGUINETTI, A. R.; CAO, H.; CORLEY MASTICK, C. Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. **Biochem J**, v. 376, n. Pt 1, p. 159-68, Nov 2003. ISSN 1470-8728. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921535>>.
- SCHADT, E. E. et al. Computational solutions to large-scale data management and analysis. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 9, p. 647-57, Sep 2010. ISSN 1471-0064. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20717155>>.
- SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; HOWLEY, P. M. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, p. 8797-801, Sep 1994. ISSN 0027-8424. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090726>>.
- SCHEMBRI, F. et al. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 7, p. 2319-24, Feb 2009. ISSN 1091-6490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168627>>.
- SCHLECHT, N. F. et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. **Mod Pathol**, v. 24, n. 10, p. 1295-305, Oct 2011. ISSN 1530-0285. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572401>>.
- SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, Oct 2003. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567917>>.
- SEGURA, M. F. et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 6, p. 1814-9, Feb 2009. ISSN 1091-6490. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188590>>.
- SEKI, H. et al. HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis is associated with clinical outcomes in breast cancer patients. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1831-40, Jun 2012. ISSN 1534-4681. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396001>>.
- SELARU, F. M. et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 1595-601, May 2009. ISSN 1527-3350. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19296468>>.

SHA, S. et al. Decreased expression of HOXB9 is related to poor overall survival in patients with gastric carcinoma. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 5, p. 422-9, May 2013. ISSN 1878-3562. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332081>>.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 5, p. 361-71, May 2010. ISSN 1474-1768. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357775>>.

SHAUGHNESSY, J. N. et al. HPV: a factor in organ preservation for locally advanced larynx and hypopharynx cancer? **Am J Otolaryngol**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 1532-818X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24119488>>.

SHEN, D. W. et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 3, p. 706-21, Jul 2012. ISSN 1521-0081. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659329>>.

SHI, G. H. et al. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 7, p. 867-73, Jul 2010. ISSN 1745-7254. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581857>>.

SHI, J. et al. TGF-beta induced RBL2 expression in renal cancer cells by down-regulating miR-93. **Clin Transl Oncol**, v. 16, n. 11, p. 986-92, Nov 2014. ISSN 1699-3055. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183046>>.

SHIGOKA, M. et al. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. **Pathol Int**, v. 60, n. 5, p. 351-7, May 2010. ISSN 1440-1827. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20518884>>.

SI, H. et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 2, p. 223-9, Feb 2013. ISSN 1432-1335. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052693>>.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210-9, Mar 2002. ISSN 1474-175X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990857>>.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 11-30, Jan 2013. ISSN 1542-4863. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335087>>.

SILVA, S. D. et al. Cooverexpression of ERBB1 and ERBB4 receptors predicts poor clinical outcome in pN+ oral squamous cell carcinoma with extranodal spread. **Clin Exp Metastasis**, v. 31, n. 3, p. 307-16, Mar 2014. ISSN 1573-7276. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338375>>.

SMITH, K. S.; RHEE, J. W.; CLEARY, M. L. Transformation of bone marrow B-cell progenitors by E2a-Hlf requires coexpression of Bcl-2. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 21, p. 7678-87, Nov 2002. ISSN 0270-7306. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370314>>.

SNIETURA, M. et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33396, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22413021>>.

SOTGIA, F. et al. Caveolin-1-/- null mammary stromal fibroblasts share characteristics with human breast cancer-associated fibroblasts. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 746-61, Mar 2009. ISSN 1525-2191. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234134>>.

SPICER, T. P. et al. Characterization of selective exosite-binding inhibitors of matrix metalloproteinase 13 that prevent articular cartilage degradation in vitro. **J Med Chem**, v. 57, n. 22, p. 9598-611, Nov 2014. ISSN 1520-4804. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330343>>.

STAMATOPOULOS, B. et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5237-45, May 2009. ISSN 1528-0020. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144983>>.

STASIKOWSKA-KANICKA, O.; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16INK4A, p21waf1/cip1, p53 and cyclin D1 in sinonasal inverted papilloma and laryngeal carcinoma. An in situ hybridization study. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 49, n. 1, p. 34-40, 2011. ISSN 1897-5631. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21526487>>.

STEENPORT, M. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 8119-27, Dec 2009. ISSN 1550-6606. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923455>>.

SULLU, Y. et al. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 35, 2010. ISSN 1746-1596. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546613>>.

SUMMERER, I. et al. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. **Radiat Oncol**, v. 8, p. 296, 2013. ISSN 1748-717X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24373621>>.

SUN, J. et al. MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma. **Med Oncol**, v. 30, n. 1, p. 411, Mar 2013. ISSN 1559-131X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23292834>>.

SUZUKI, K. et al. Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. **Cancer Sci**, v. 101, n. 5, p. 1163-9, May 2010. ISSN 1349-7006. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345485>>.

SYEED, N. et al. Caveolin-1 promotes mammary tumorigenesis: mutational profile of the Kashmiri population. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 3, p. 689-96, 2010. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039037>>.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S59-66, Mar 2005. ISSN 1386-6532. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753013>>.

TAE, K. et al. The role of laryngopharyngeal reflux as a risk factor in laryngeal cancer: a preliminary report. **Clin Exp Otorhinolaryngol**, v. 4, n. 2, p. 101-4, Jun 2011. ISSN 2005-0720. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716948>>.

TAKATA, R. et al. Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 7, p. 2625-36, Apr 2005. ISSN 1078-0432. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814643>>.

TANAKA, M. et al. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. **J Clin Invest**, v. 124, n. 7, p. 3061-74, Jul 2014. ISSN 1558-8238. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911143>>.

TANG, C. H. et al. Picoplatin overcomes resistance to cell toxicity in small-cell lung cancer cells previously treated with cisplatin and carboplatin. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 1389-400, Jun 2011. ISSN 1432-0843. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20809122>>.

TANG, H. et al. The miR-183/96/182 cluster regulates oxidative apoptosis and sensitizes cells to chemotherapy in gliomas. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 221-31, Feb 2013. ISSN 1873-5576. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252827>>.

TANG, J. F. et al. Five miRNAs as Novel Diagnostic Biomarker Candidates for Primary Nasopharyngeal Carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 18, p. 7575-81, 2014. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25292031>>.

TANIGUCHI, H. et al. Silencing of Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1988-94, Apr 2012. ISSN 1476-5594. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892211>>.

- TETREAULT, M. P.; YANG, Y.; KATZ, J. P. Krüppel-like factors in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 701-13, Oct 2013. ISSN 1474-1768. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060862>>.
- THOMAS, A. et al. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. **BMC Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 250, Oct 2014. ISSN 1471-2180. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278091>>.
- TIAN, L. et al. MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Med Oncol**, v. 31, n. 1, p. 785, Jan 2014. ISSN 1559-131X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297308>>.
- TOMAKIDI, P. et al. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. **Eur J Cell Biol**, v. 79, n. 6, p. 407-12, Jun 2000. ISSN 0171-9335. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928456>>.
- TRIMMER, C. et al. CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway. **Cancer Res**, v. 70, n. 19, p. 7489-99, Oct 2010. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709760>>.
- TRINH, B. Q. et al. Dual functions of the homeoprotein DLX4 in modulating responsiveness of tumor cells to topoisomerase II-targeting drugs. **Cancer Res**, v. 73, n. 2, p. 1000-10, Jan 2013. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222298>>.
- TSAVARIS, N. et al. Topoisomerase I and IIalpha protein expression in primary colorectal cancer and recurrences following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 391-8, Jul 2009. ISSN 1432-0843. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083133>>.
- TSUCHIMOCHI, K. et al. GADD45beta enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBPbeta-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 11, p. 8395-407, Mar 2010. ISSN 1083-351X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20048163>>.
- TSUI, I. F.; GARNIS, C. Integrative molecular characterization of head and neck cancer cell model genomes. **Head Neck**, v. 32, n. 9, p. 1143-60, Sep 2010. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20014447>>.
- TSUJIURA, M. et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. **Br J Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1174-9, Mar 2010. ISSN 1532-1827. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234369>>.
- URAOKA, N. et al. NRD1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. **Cancer Sci**, v. 105, n. 1, p. 134-40, Jan 2014. ISSN 1349-7006. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168165>>.
- VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-6, Jan 2002. ISSN 0028-0836. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823860>>.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002. ISSN 1465-6914. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>>.
- VARELA-REY, M. et al. Alcohol, DNA methylation, and cancer. **Alcohol Res**, v. 35, n. 1, p. 25-35, 2013. ISSN 2168-3492. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313162>>.
- VENKATRAMAN, A. et al. Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 345-9, Aug 2013. ISSN 1476-4687. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863936>>.
- VERGOULIS, T. et al. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D222-9, Jan 2012. ISSN 1362-4962. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135297>>.

- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 2013. ISSN 1095-9203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539594>>.
- WALKER, A.; FREI, R.; LAWSON, K. R. The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP-9 induction in oral squamous carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 45, n. 4, p. 1699-706, Oct 2014. ISSN 1791-2423. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175499>>.
- WANG, F. et al. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 24, n. 24, p. 3875-85, Jun 2005. ISSN 0950-9232. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735666>>.
- WANG, J. R. et al. Expression of MMP-13 is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 4, p. 427-35, Feb 2013. ISSN 1128-3602. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467939>>.
- WANG, J. T. et al. Cilengitide, a small molecule antagonist, targeted to integrin αv inhibits proliferation and induces apoptosis of laryngeal cancer cells in vitro. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 271, n. 8, p. 2233-40, Aug 2014. ISSN 1434-4726. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515920>>.
- WANG, L. et al. miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway. **Med Oncol**, v. 31, n. 5, p. 934, May 2014. ISSN 1559-131X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668416>>.
- WANG, R. et al. FBW7 regulates endothelial functions by targeting KLF2 for ubiquitination and degradation. **Cell Res**, v. 23, n. 6, p. 803-19, Jun 2013. ISSN 1748-7838. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507969>>.
- WANG, S. et al. A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer. **Int J Cancer**, Mar 2013. ISSN 1097-0215. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456911>>.
- WANG, Y. Q. et al. MicroRNA-182 promotes cell growth, invasion, and chemoresistance by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in human ovarian carcinomas. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 7, p. 1464-73, Jul 2013. ISSN 1097-4644. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296900>>.
- WATERS, K. M. et al. Cellular dichotomy between anchorage-independent growth responses to bFGF and TPA reflects molecular switch in commitment to carcinogenesis. **Mol Carcinog**, v. 48, n. 11, p. 1059-69, Nov 2009. ISSN 1098-2744. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526458>>.
- WEBER, F. et al. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 9, p. 3584-91, Sep 2006. ISSN 0021-972X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822819>>.
- WEI, W. et al. The distribution of human papillomavirus in tissues from patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 28, n. 5, p. 1750-6, Nov 2012. ISSN 1791-2431. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923266>>.
- WISE-DRAPER, T. M.; WELLS, S. I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. **Front Biosci**, v. 13, p. 1003-17, 2008. ISSN 1093-9946. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981607>>.
- WITKIEWICZ, A. K. et al. Loss of stromal caveolin-1 expression predicts poor clinical outcome in triple negative and basal-like breast cancers. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 2, p. 135-43, Jul 2010. ISSN 1555-8576. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431349>>.
- WU, D. et al. microRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer. **Oncol Lett**, v. 5, n. 3, p. 829-834, Mar 2013. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23425975>>.

_____. MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. **Mol Med Rep**, v. 8, n. 2, p. 626-30, Aug 2013. ISSN 1791-3004. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732700>>.

_____. microRNA-99a inhibiting cell proliferation, migration and invasion by targeting fibroblast growth factor receptor 3 in bladder cancer. **Oncol Lett**, v. 7, n. 4, p. 1219-1224, Apr 2014. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24944696>>.

XI, Y. N.; XIN, X. Y.; YE, H. M. Effects of HMGA2 on malignant degree, invasion, metastasis, proliferation and cellular morphology of ovarian cancer cells. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 4, p. 289-92, Apr 2014. ISSN 1995-7645. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507678>>.

XIAO, F. et al. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D105-10, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996891>>.

XIAO, X. et al. MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, Oct 2014. ISSN 1791-2423. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309979>>.

XIE, P. et al. Smurf1 ubiquitin ligase targets Kruppel-like factor KLF2 for ubiquitination and degradation in human lung cancer H1299 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 407, n. 1, p. 254-9, Apr 2011. ISSN 1090-2104. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382345>>.

XIN, J. X. et al. miR-99 inhibits cervical carcinoma cell proliferation by targeting TRIB2. **Oncol Lett**, v. 6, n. 4, p. 1025-1030, Oct 2013. ISSN 1792-1074. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137458>>.

XIONG, Y. et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 51, n. 3, p. 836-45, Mar 2010. ISSN 1527-3350. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041405>>.

XU, B. et al. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. **Mol Cell Biochem**, v. 350, n. 1-2, p. 207-13, Apr 2011. ISSN 1573-4919. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197560>>.

YAMAMOTO, N. et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 42, n. 5, p. 1523-32, May 2013. ISSN 1791-2423. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483249>>.

YAN, H. J. et al. miR-17-5p inhibitor enhances chemosensitivity to gemcitabine via upregulating Bim expression in pancreatic cancer cells. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 12, p. 3160-7, Dec 2012. ISSN 1573-2568. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001407>>.

YANG, F. et al. [Overexpressed microRNA-93 inhibits the proliferation and promotes apoptosis of A172 glioma cells]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 30, n. 4, p. 342-5, Apr 2014. ISSN 1007-8738. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721397>>.

YANG, J. et al. [DNA methylation and histone modification relate to RASSF1A gene deletion in laryngeal carcinoma tissues]. **Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi**, v. 46, n. 4, p. 308-12, Apr 2011. ISSN 1673-0860. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624251>>.

YANG, L. et al. Silencing of miRNA-218 promotes migration and invasion of breast cancer via Slit2-Robo1 pathway. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 7, p. 535-40, Oct 2012. ISSN 1950-6007. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898079>>.

_____. miR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenylyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells. **FEBS Lett**, v. 588, n. 1, p. 124-30, Jan 2014. ISSN 1873-3468. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269684>>.

YANG, M.; PARK, J. Y.; TAE, K. Genome-wide evidence of XPC alteration in laryngeal squamous cell carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 6, p. 1477-81, 2011. ISSN 1513-7368. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126485>>.

YEN, Y. C. et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. **Mol Cancer**, v. 13, p. 6, 2014. ISSN 1476-4598. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410957>>.

YILMAZ, M. et al. α B-Crystallin expression in human laryngeal squamous cell carcinoma tissues. **Head Neck**, May 2014. ISSN 1097-0347. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817638>>.

YOSHIDA, H. et al. Identification of COL3A1 and RAB2A as novel translocation partner genes of PLAG1 in lipoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, n. 7, p. 606-11, Jul 2014. ISSN 1098-2264. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24700772>>.

YOSHIZAWA, S. et al. Downregulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders. **Blood Cancer J**, v. 2, n. 1, p. e53, Jan 2012. ISSN 2044-5385. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829237>>.

YU, H. et al. Decreased expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 6, n. 12, p. 2904-11, 2013. ISSN 1936-2625. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294377>>.

YU, J. et al. MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis, and involved in cancer cell proliferation and invasion. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 8, p. 748-57, Oct 2010. ISSN 1555-8576. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703102>>.

_____. Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 4, p. 671-4, Apr 2012. ISSN 1432-1335. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237456>>.

YUAN, J. et al. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for chemosensitivity and prognosis in human osteosarcoma. **J Int Med Res**, v. 40, n. 6, p. 2090-7, 2012. ISSN 1473-2300. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321165>>.

YUNGANG, W. et al. miR-370 targeted FoxM1 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). **Biomed Pharmacother**, Aug 2013. ISSN 1950-6007. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055400>>.

ZHANG, B. et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, p. 83, 2008. ISSN 1471-2407. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18373849>>.

ZHANG, C. et al. Meta-analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 promoter polymorphisms and head and neck cancer risk. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62023, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637955>>.

ZHANG, H. et al. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. **Oncol Rep**, v. 24, n. 5, p. 1363-9, Nov 2010. ISSN 1791-2431. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878132>>.

_____. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 57-68, Jul 2004. ISSN 0092-8674. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242644>>.

ZHANG, J.; CLATERBUCK, R. E. Molecular genetics of human intracranial aneurysms. **Int J Stroke**, v. 3, n. 4, p. 272-87, Nov 2008. ISSN 1747-4949. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18811744>>.

ZHANG, J. et al. MicroRNA-21 regulates biological behaviors in papillary thyroid carcinoma by targeting programmed cell death 4. **J Surg Res**, v. 189, n. 1, p. 68-74, Jun 2014. ISSN 1095-8673. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650454>>.

ZHANG, L. J. et al. Anti-Helicobacter pylori therapy followed by celecoxib on progression of gastric precancerous lesions. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 22, p. 2731-8, Jun 2009. ISSN 2219-2840. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522023>>.

ZHANG, T. et al. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. **Anticancer Res**, v. 31, n. 11, p. 3859-63, Nov 2011. ISSN 1791-7530. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110210>>.

ZHANG, W.; LIU, J.; WANG, G. The role of microRNAs in human breast cancer progression. **Tumour Biol**, v. 35, n. 7, p. 6235-44, Jul 2014. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938874>>.

ZHANG, X. et al. Histone deacetylase inhibition downregulates collagen 3A1 in fibrotic lung fibroblasts. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 19605-17, 2013. ISSN 1422-0067. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084714>>.

_____. Efficacy and safety of combined radiotherapy with EGFR inhibitors and chemotherapy for laryngeal organ preservation in patients with locally advanced hypopharyngeal carcinomas. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 14, n. 6, p. 589-98, 2014. ISSN 1873-5576. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25039274>>.

ZHANG, Y. et al. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 10, p. 3552-62, May 2011. ISSN 1538-7445. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21444677>>.

ZHANG, Z. et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. **Lab Invest**, v. 88, n. 12, p. 1358-66, Dec 2008. ISSN 1530-0307. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794849>>.

ZHAO, X. D. et al. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56395, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437123>>.

ZHOU, X.; QI, Y. PLGF inhibition impairs metastasis of larynx carcinoma through MMP3 downregulation. **Tumour Biol**, Jun 2014. ISSN 1423-0380. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946722>>.

ZHU, W. et al. Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection of early stage non-small lung cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87780, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523873>>.

ZIMMERMANN, P. et al. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 9, p. 2743-53, Sep 2008. ISSN 1529-0131. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759285>>.

9. FIGURAS SUPLEMENTARES

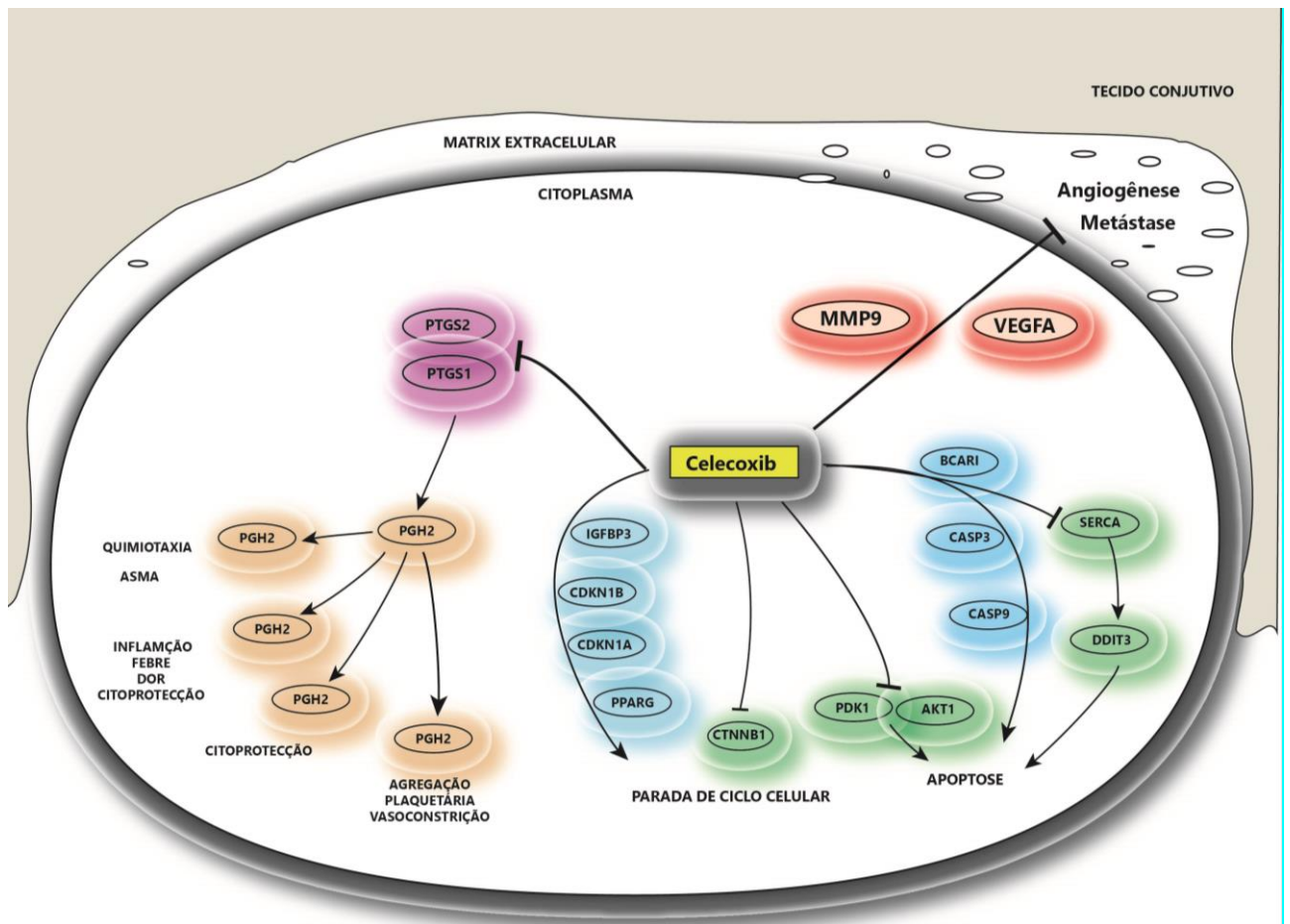


Figura S1. Celecoxib (Celebrex) inibidor seletivo de (PTGS2/ COX-2) usado no tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide. Atua diminuindo a síntese de prostaglandinas por meio da inibição de COX-2. Os mecanismos anti-tumorais de celecoxib envolve indução de apoptose, parada de ciclo celular e regulação de angiogênese;este último por diminuir a expressão *VEGFA* e inibir *MMP9*.Imagem modificada da fonte: [//www.pharmgkb.org/](http://www.pharmgkb.org/)

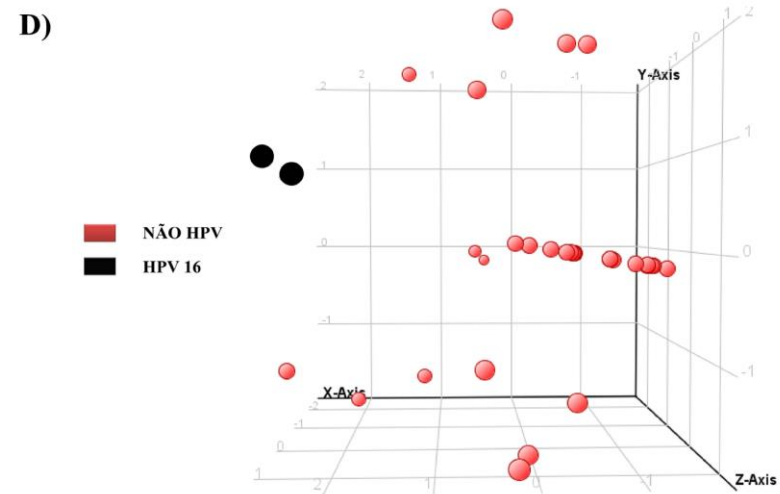
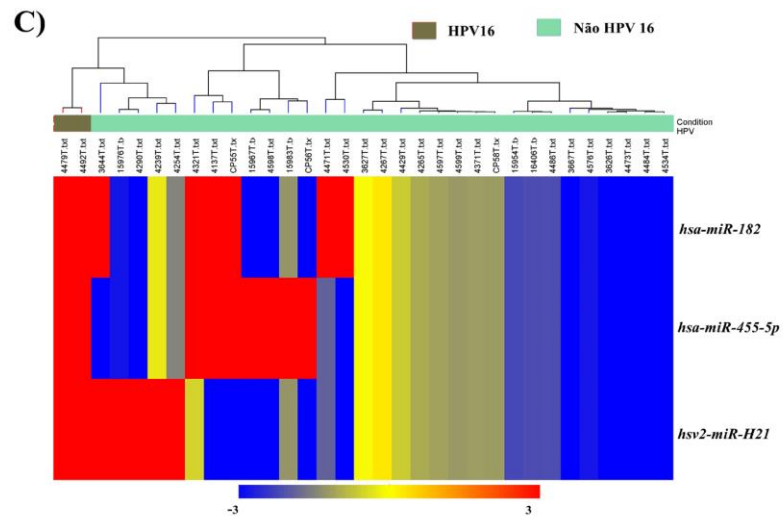
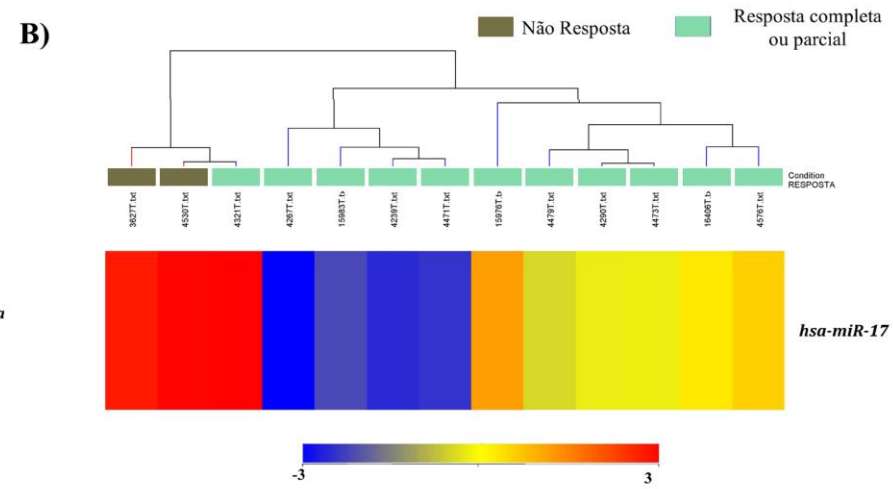
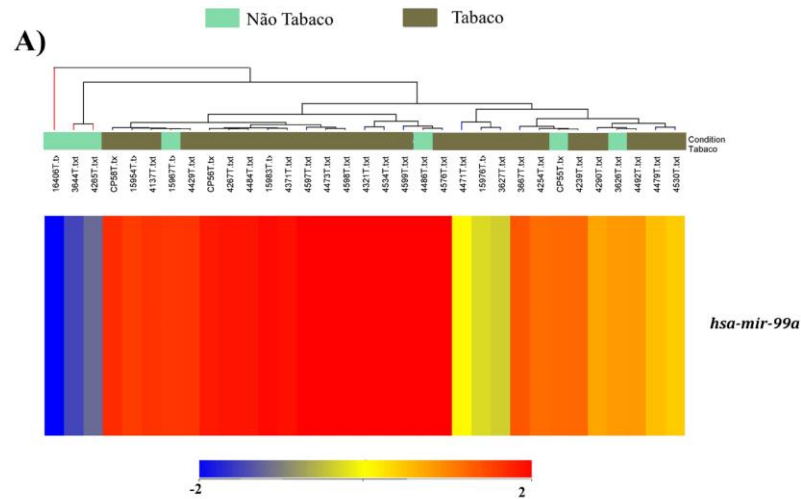


Figura S2. Dendrogramas representativos dos miRNA diferencialmente expressos na comparação com os dados clínicos dos 33 pacientes com carcinomas de laringe. A –Análise de clusterização supervisionada entre tabagistas (azul) e não tabagistas (vermelho) B –Observa-se a análise de agrupamentos entre os pacientes responsivos ao tratamento (azul) versus aqueles responsivos (vermelho) C- Comparação entre os pacientes HPV positivos (vermelho) e negativos (azul). D – *Principal component analysis*(PCA), mostrando dois agrupamentos distintos segundo a genotipagem do HPV (HPV16 : preto e HPV negativo: vermelho). Azul: miRNAs com expressão diminuída; vermelho: miRNAs com expressão aumentada.

Figuras geradas software GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies).

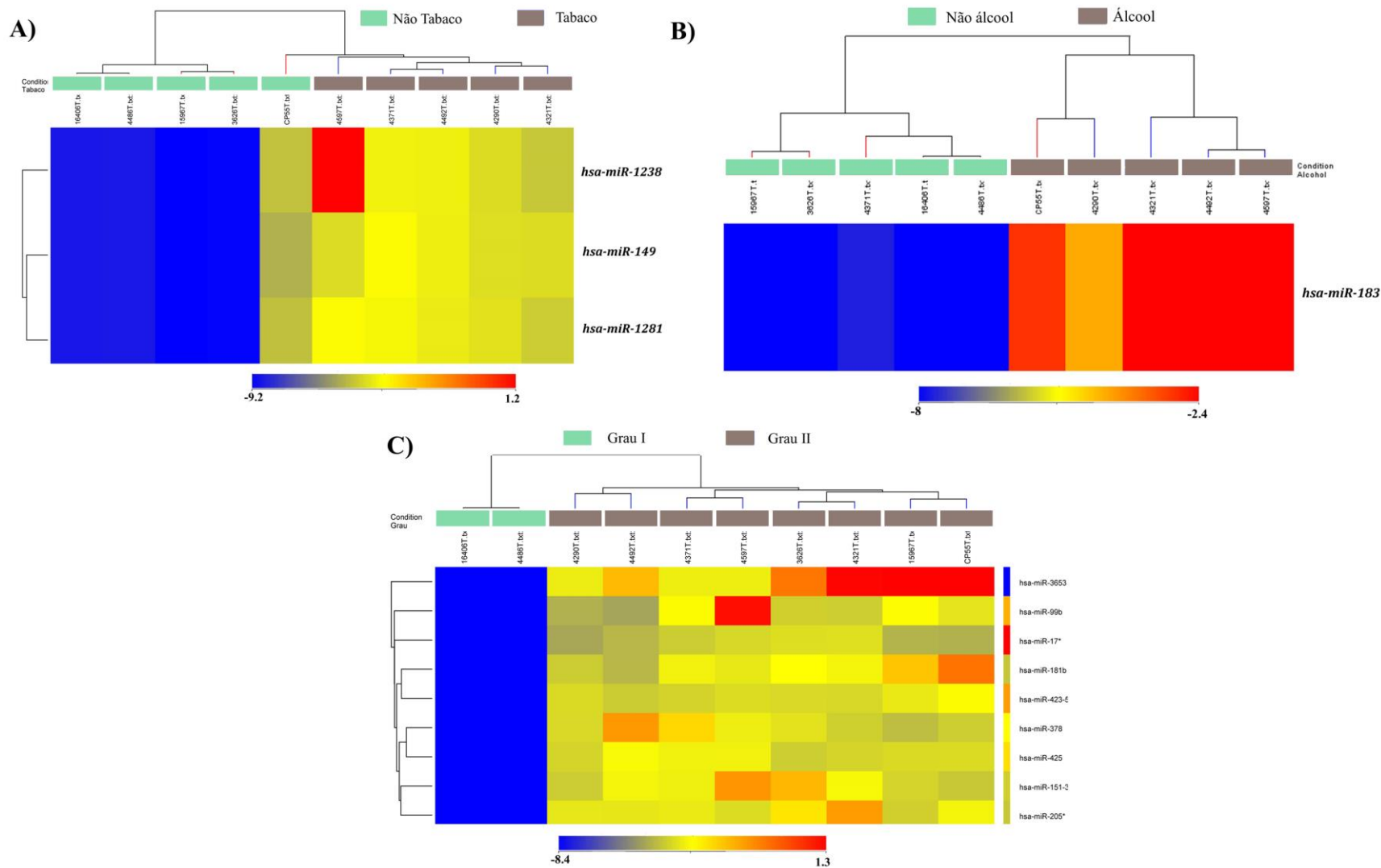


Figura S3. Comparação dos miRNAs diferencialmente expressos em mulheres com CCEL. A –Análise supervisionada segundo o hábito tabagista (azul) versus não tabagista (vermelho). B –Análise supervisionada segundo o consumo de álcool (azul) versus aquelas não consumidoras de álcool (vermelho). C- Análise mostra a diferença entre os tumores de laringe de grau I (vermelho) *versus* grau II (azul). O azul corresponde a miRNAs com expressão diminuída e vermelho corresponde a miRNAs com expressão aumentada dentro da escala.

Figuras geradas software GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies).

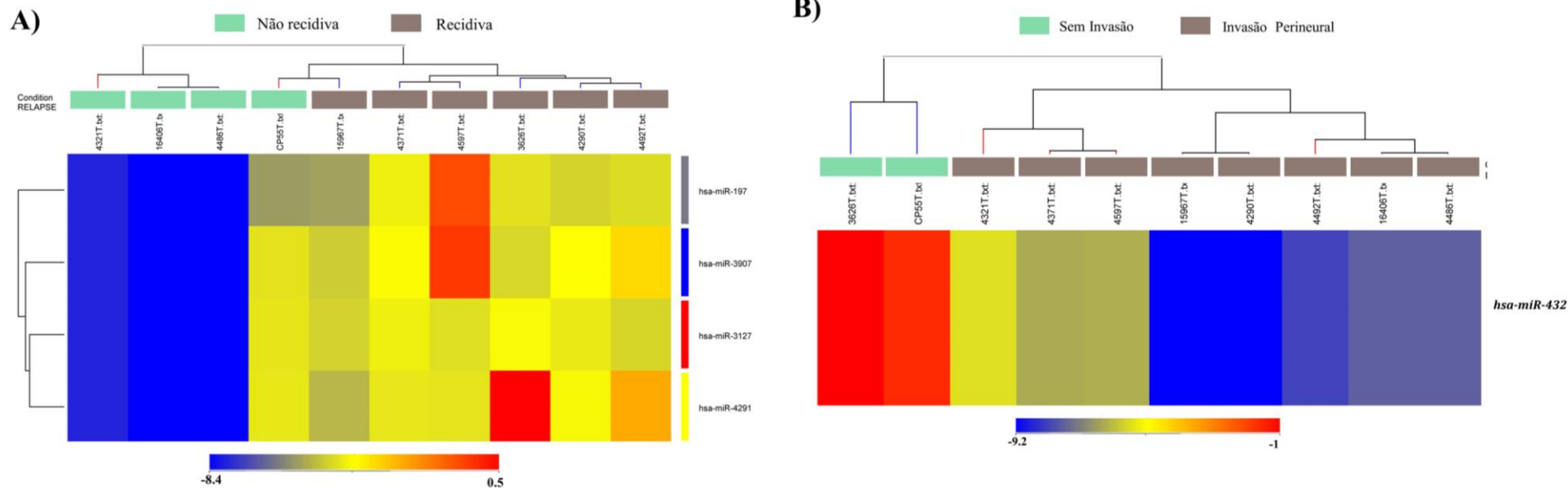


Figura S4. Comparação dos miRNAs diferencialmente expressos em mulheres com CCEL. - A análise de recidiva com os miRNA diferencialmente expressos revelou dois grupos: recidiva (Azul) e sem recidiva (vermelho). C- A análise de invasão perineural com os miRNA diferencialmente expressos, é possível observar diferença entre os tumores de laringe de grau I (vermelho) *versus* grau II (azul). O azul corresponde a miRNAs com expressão diminuída e vermelho corresponde a miRNAs com expressão aumentada dentro da escala. Figuras geradas software GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies).

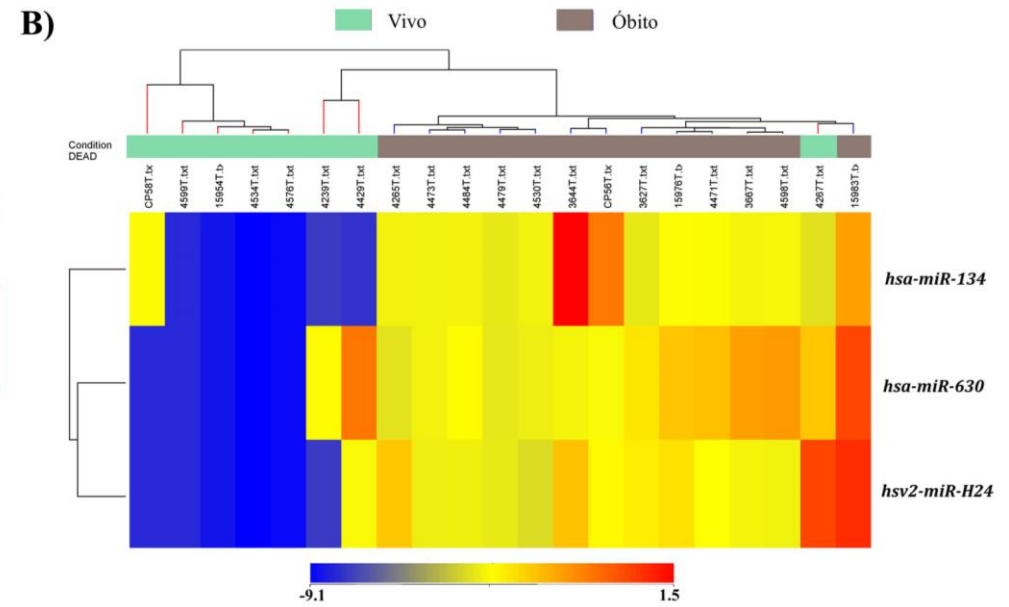
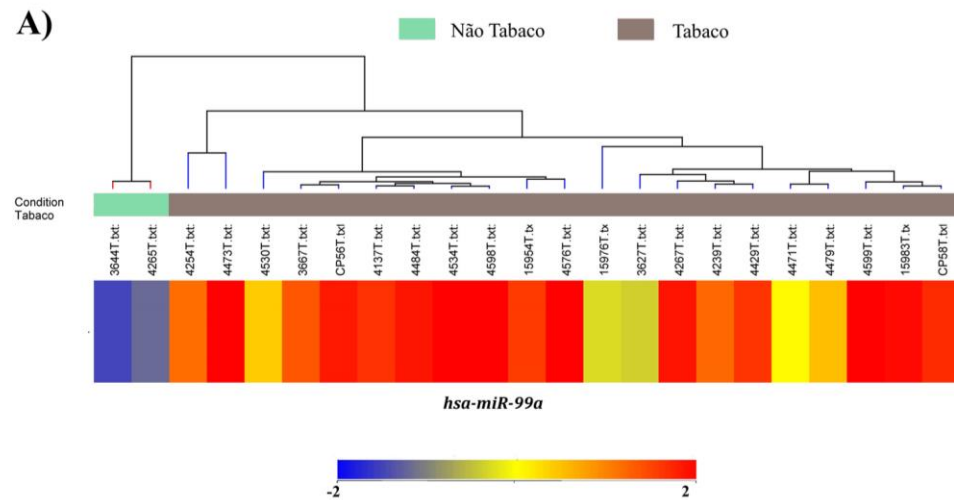


Figura S5. Comparação dos miRNAs diferencialmente expressos em homens com CCEL A- Dendograma Tabaco (azul), não Tabaco (vermelho) B- Dendograma óbito (azul) e vivo (vermelho). Figuras geradas software GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies).

10. TABELAS SUPLEMENTARES

As tabelas suplementares estarão disponíveis após publicação do artigo, para maior informação sobre as tabelas podem ter acesso após prévia consulta utilizando o email: rogatto@fmb.unesp.br ou silvia.rogatto2@gmail.com.