

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANNA KAROLINA DE CARVALHO ABREU

**Análise de miRNAs circulantes identificados em pacientes com Carcinoma de Células
Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe.**

BRASÍLIA

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANNA KAROLINA DE CARVALHO ABREU

Análise de miRNAs circulantes identificados em pacientes com Carcinoma de Células
Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe.

Tese apresentada como requisito parcial ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade de Brasília para
Obtenção do título de Doutor (a) em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Ciências Aplicadas em
Saúde.

Linha de pesquisa: Aspectos clínicos,
epidemiológicos, experimentais,
microbiológicos, patológicos, terapêuticos e
profiláticos das doenças crônico-degenerativas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Doralina do Amaral
Rabello Ramos

BRASÍLIA

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da de Carvalho Abreu, Anna Karolina
Análise de miRNAs circulantes identificados em pacientes
com Carcinoma de Células Escamosas em Cavidade Oral e
Orofaringe. / Anna Karolina de Carvalho Abreu; orientador
Doralina do Amaral Rabello Ramos. -- Brasília, 2023.
76 p.

Tese(Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Sequenciamento de Nova Geração. 2. miRNA circulante.
3. MiRNoma. 4. Biópsia Líquida. 5. Carcinoma de Células
Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe. I. do Amaral
Rabello Ramos, Doralina, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANNA KAROLINA DE CARVALHO ABREU

Análise de miRNAs circulantes identificados em pacientes com Carcinoma de Células
Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^a Doralina do Amaral Rabello Ramos
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Robert Edward Pogue
Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra
Grupo Sabin – Setor de Genômica

Prof. Dr. Glauber Moreira Leitão - Suplente
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico esta tese especialmente à minha família: marido, mãe, pai e irmão, em reconhecimento pelo apoio e compreensão diante das minhas ausências em momentos valiosos ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Raimunda Teixeira e José Antônio, sou eternamente grata a vocês, que sem medir esforços, sempre fizeram tudo para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Encorajaram-me nos momentos desafiadores e celebraram cada conquista durante toda a minha trajetória de vida.

Ao meu amado Elias, neste momento especial, quero expressar minha profunda gratidão. Sua presença constante ao meu lado, ao longo desta jornada, tornou esta realização possível. Obrigada por toda paciência, palavras de apoio, carinho e respeito. Sempre lembrarei com gratidão o amor e dedicação despendidos a mim.

Ao meu estimado irmão, Júnior, por toda paciência, amor e principalmente respeito. E mesmo distante saiba que sempre estarei presente para o que precisar. À Conceição, a irmã que a vida me deu de presente, muito obrigada pelo carinho e cumplicidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas (PPGCM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), por possibilitar a aquisição de conhecimentos científicos com professores extremamente qualificados. Aos Decanatos de Pesquisa e Inovação (DPI) e de Pós-Graduação (DPG) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo suporte financeiro que desempenhou um papel crucial para a publicação do artigo e desenvolvimento da pesquisa.

À Prof^a Dr^a Doralina Ramos quero destacar a inspiração que você me proporcionou durante toda essa jornada. Sua orientação, dedicação e disponibilidade para discutir, esclarecer dúvidas e sugerir melhorias ao longo desses anos foram inestimáveis e fundamentais para o meu crescimento e concretização deste trabalho. Sou verdadeiramente grata por ter tido a oportunidade de ser orientada por você.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Molecular, Fábio Willian e Marcos Ezequiel, pelo companheirismo, pelas trocas de ideias/conhecimentos e apoio no desenvolvimento da pesquisa e produção de artigos.

À Prof^a Dr^a Andrea Motoyama e Dr. Marcos Santos pela disponibilidade para discutir, esclarecer dúvidas e sugerir melhorias que foram inestimáveis e fundamentais para concretização deste trabalho.

A Mariana Oliveira, especialista da ThermoFisher, por todo o suporte durante a realização dos experimentos. Seu apoio foi fundamental para execução desse projeto.

A equipe de Odontologia do HUB-UnB, juntamente com a equipe de Enfermagem da Radioterapia do UNACON/HUB-UnB, formada por Nayara Narley, Priscila Bontempo,

Kamilla Rodrigues, Érica Greydes e Maria Vanda, aos médicos radioterapeutas, residentes, físicos, em especial meu colega de doutorado Luís Felipe, técnicos em radiologia e tecnólogos por todo aprendizado e apoio durante o recrutamento dos pacientes.

“Cada descoberta importante na ciência é uma porta aberta para novas descobertas.”

Jonas Salk

RESUMO

Abreu, Anna Karolina de Carvalho Abreu. Análise de miRNAs circulantes identificados em pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe. [Tese].2024. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília.

Introdução O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) é responsável pela maioria dos casos de câncer na cavidade oral e/ou orofaringe e devido a sua elevada taxa de incidência e mortalidade é considerado um grande problema de saúde pública, com desafios distintos de diagnóstico e tratamento. Neste estudo, identificamos miRNAs circulantes associados ao CCE em cavidade oral e orofaringe, investigamos seus níveis de expressão *in silico*, previmos seus genes-alvos e identificamos as vias biológicas que eles regulam.

Métodos e Resultados A técnica RNA-seq para identificação total de miRNAs (miRNoma) foi aplicada em 16 amostras de plasma, sendo 12 de pacientes antes de iniciar qualquer tratamento, 02 coletadas após a radioterapia desse mesmo grupo de pacientes e 02 do grupo controle. Após a aplicação dos critérios de seleção de miRNAs, foi possível identificar um total de 444 miRNAs do experimento de miRNoma, sendo 339 miRNAs detectados no grupo de casos (262 em indivíduos antes da iniciar qualquer tratamento e 77 em indivíduos após radioterapia) e 105 no grupo controle. As análises de bioinformática, usando amostras independentes de bancos de dados públicos, permitiram a identificação de seis miRNAs significativamente associados ao CCE em cavidade oral e orofaringe: miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-191-5p e miR-223-3. Nas plataformas de predição TargetScan e miRDB, foram identificados um total de 194 genes-alvo, previstos para estes miRNAs. Posteriormente, uma análise funcional desses genes, realizada pela ferramenta DAVID, destacou vias e anotações com enriquecimento significativo. Entre eles, a via microRNAs no câncer, pela KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se mostrou enriquecida. Pela GO (Gene Ontology), estavam enriquecidas as anotações do núcleo (Compartimento Celular), ligação às proteínas (Função Molecular) e regulação negativa da transcrição modelada pelo DNA (Processo Biológico). Além disso, a análise da Rede de Interação Proteína-Proteína com STRING e Cytoscape permitiu a identificação de proteínas relevantes para a doença estudada: PRKCA, RRAS2, RASA1, CALML4, PAX5 e FOXO1.

Conclusão Nosso experimento de miRNoma, a predição *in silico* de genes-alvo, análises funcionais e construção da rede PPI para miRNAs específicos destacaram o miR-150-5p e o

miR-223- 3p como miRNAs associados ao CCE de cavidade oral e de orofaringe, fornecendo informações importantes sobre como eles podem modular a expressão e a função dos genes nesta doença. Estes resultados estabelecem as bases para futuras investigações, incluindo estudos para validar o potencial destes miRNAs como biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico, ou como alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Palavras chaves: Sequenciamento de Nova Geração. miRNA circulante. MiRNoma. Biópsia Líquida. Carcinoma de Células Escamosas em Cavidade Oral e Orofaringe.

ABSTRACT

Abreu, Anna Karolina de Carvalho Abreu. Analysis of circulating miRNAs identified in patients with Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. [Thesis]. 2024. Faculty of Medicine. University of Brasilia.

Background Squamous Cell Carcinoma (SCC) is the most frequent cancer in the oral and/or oropharyngeal cavity and, due to its high incidence and mortality rates, is considered a significant public health issue, thus presenting distinct diagnosis and treatment challenges. In this study, circulating miRNAs associated with oral cavity and oropharyngeal SCC were identified, and further investigation was performed on their expression levels *in silico*, prediction of their target genes, and identification of the biological pathways they regulate.

Methods and Results The RNA-seq technique for comprehensive miRNA (miRNoma) identification was applied to 16 plasma samples, including 12 from patients before initiating any treatment, 02 collected after radiotherapy in the same patient group, and 02 from the control group. After applying criteria for miRNA selection, a total of 444 miRNAs were identified from the miRNome experiment, with 339 miRNAs detected in the case group (262 in individuals before initiating any treatment and 77 in individuals after radiotherapy) and 105 in the control group. The bioinformatic analyses using independent samples from public databases enabled the identification of six prominent miRNAs significantly associated with oral cavity and oropharyngeal SCC: miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-191-5p, and miR-223-3. A total of 194 target genes, predicted for these miRNAs, were identified using both TargetScan and miRDB prediction platforms. A functional analysis of these genes, using the DAVID tool, highlighted pathways, and annotations with significant enrichment. Among them, the pathway microRNAs in cancer, from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was enriched. In the Gene Ontology (GO) analysis, the nucleus (Cell Compartment), protein binding (Molecular Function), and negative regulation of transcription DNA-templated (Biological Process) annotations were enriched. In addition, the Protein-Protein Interaction Network analysis with STRING and Cytoscape allowed the identification of six proteins relevant to the studied disease: PRKCA, RRAS2, RASA1, CALML4, PAX5 and FOXO1.

Conclusion Among the complex network of miRNAs associated with oral cavity and oropharyngeal SCC, our miRNome experiment, besides the *in silico* prediction of target genes, functional analyses, and construction of the PPI network of specific miRNAs, highlighted both the miR-150-5p and miR-223-3p as being associated with oral and oropharyngeal cancer,

providing important insights into how they can modulate the expression and function of genes in this disease. These results lay the foundation for further investigation, including studies to validate the potential of these miRNAs as diagnostic or prognostic biomarkers, or as targets for the development of novel therapeutic approaches.

Keywords: Next-generation sequencing. Circulating miRNAs. Liquid biopsy. MiRNome. Oral and oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Região que corresponde a Cavidade Oral (2/3 frontais da língua, assoalho de boca, mucosa jugal, gengiva, lábios, trígono retromolar e palato duro). Região que corresponde a Orofaringe (base de língua, palato mole, amígdalas e parede posterior da faringe). Criado com biorender.

Figura 2 - Biogênese dos miRNAs e mecanismo de regulação do RNA mensageiro alvo.

Figura 3 - Total de miRNAs identificados no estudo.

Figura 4 - Total de miRNAs identificados no estudo após a exclusão dos que tinham menos de 10 leituras.

Figura 5 - Panorama dos miRNAs identificados nos grupos de casos e controle após a exclusão dos que tinham menos de 10 leituras.

Figura 6 - MiRNAs com mais de 10 leituras e que apareceram em todas as amostras do grupo de casos pós-radioterapia e controle e em mais de 80% das amostras antes da radioterapia.

Figura 7 - Panorama dos miRNAs identificados em mais de 80% das amostras do grupo de casos antes da radioterapia e em todas as amostras do grupo de casos pós-radioterapia e controle.

Figura 8 - Genes-alvos comuns aos bancos de dados TargetScan e miRDB. Legenda: 1. H5P90B1 e PAX5 identificados no miR-150-5p e miR-223-3p.

Figura 9 - Rede de Interação Proteína-Proteína, construída usando o STRING, com os 194 genes-alvos identificados por meio da ferramenta DAVID. Estatística da rede: 194 nós, 50 arestas, grau médio de nó 0,518, coeficiente médio de agrupamento local 0,255, número de arestas esperado 34 e valor de p de enriquecimento 0,00638.

Figura 10 - As 03 regiões densamente interconectadas da rede de PPI identificadas pelo aplicativo MCODE do Cytoscape, em que (A) e (B) correspondem às regiões com pontuação 3.000 e (C) às com a melhor classificação alcançando a pontuação 3.333.

Figura 11 - Principais genes da rede PPI identificados pelo aplicativo cytoHubba do Cytoscape. A diferenciação de cores nos nós representam as pontuações geradas pelo método MCC, conforme apresentada no ranking da figura.

Figura 12 - Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/via biológica dos genes principais, detectados pelo aplicativo cytoHubba, que também foram localizados nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI, identificadas pelo aplicativo MCODE.

Figura 13 - Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/via biológica dos genes principais, detectados pelo aplicativo cytoHubba, que não foram identificados nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI conforme aplicativo MCODE.

Figura 14 - Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/via biológica dos genes detectados exclusivamente nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI identificadas pelo aplicativo MCODE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do conjunto de dados selecionados no GEO DataSets.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos indivíduos incluídos no grupo de casos da pesquisa.

Tabela 3 - Características clínicas dos indivíduos saudáveis incluídos no grupo controle da pesquisa.

Tabela 4 - Análise de expressão dos miRNAs identificados no conjunto de dados do GEO DataSets e no nosso sequenciamento.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

ACSL3	acyl - CoA synthetase long chain family member 3
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10
ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19
ADSS	adenylosuccinate synthase
AIFM2	apoptosis inducing factor mitochondria associated 2
AMPK	AMP - activated Protein Kinase
ANKRD13C	ankyrin repeat domain 13C
ARFGEF1	ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 1
ARMCX1	armadillo repeat containing X - linked 1
ATG7	autophagy related 7
ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1
ATP7A	ATPase copper transporting alpha
AUC	Area Under the Curve
BAM	Binary Alignment Map
BASP1	brain abundant membrane attached signal protein 1
Bcl-6	BCL6 transcription repressor
BP	Biological Process
BRMS1L	BRMS1 like transcriptional repressor
BRPF1	bromodomain and PHD finger containing 1
BRWD3	bromodomain and WD repeat domain containing 3
BSN	bassoon presynaptic cytomatrix protein

C18orf54	chromosome 18 open reading frame 54
C6orf120	chromosome 6 open reading frame 120
CALML4	calmodulin like 4
CAMK2G	calcium/calmodulin dependent protein kinase II gamma
CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin associated protein 1
CAV2	caveolin 2
CBL	Cbl proto - oncogene
CBX5	chromobox 5
CC	Cellular Component
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCNG1	cyclin G1
CD320	CD320 molecule
CDDP	cis-diaminodicloroplatina
CDK17	cyclin dependent kinase 17
cDNA	Complementary DNA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CERS3	ceramide synthase 3
CLIC4	chloride intracellular channel 4
CLIC5	chloride intracellular channel 5
CMTM6	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 6
CPD	carboxypeptidase D
CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1

CS	citrate synthase
CTDNEP1	CTD nuclear envelope phosphatase 1
CYTIP	cytohesin 1 interacting protein
DAVID	Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery
DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6
DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
DENND4A	DENN domain containing 4A
DENND5B	DENN domain containing 5B
DICER1	dicer 1, ribonuclease III
DM	Diabetes Mellitus
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELK4	ETS transcription factor ELK4
EMT	Epithelial – Mesenchymal Transition
ENSA	endosulfine alpha
EPHB2	EPH receptor B2
F3	coagulation factor III, tissue factor
FASTQ	Fast Quality
FBXO8	F - box protein 8
FBXW11	F - box and WD repeat domain containing 11
FBXW7	F -box and WD repeat domain containing 7
FKBP5	FKBP prolyl isomerase 5
FM	Faculdade de Medicina

FM	Função Molecular
FOXO1	forkhead box O1
FOXO3	forkhead box O3
FOXP1	forkhead box P1
FTO	FTO alpha - ketoglutarate dependent dioxygenase
FUNDC2	FUN14 domain containing 2
G3BP1	G3BP stress granule assembly factor
GABRG2	gamma - aminobutyric acid type A receptor subunit gamma2
GALNT1	polypeptide N - acetylgalactosaminyltransferase 1
GALNT18	polypeptide N - acetylgalactosaminyltransferase 18
GATK	Genome Analysis Toolkit
GDI1	GDP dissociation inhibitor 1
GEO DataSets	Gene Expression Omnibus DataSets
GEO2R	Gene Expression Omnibus 2 Results
GGNBP2	gametogenetin binding protein 2
GIT1	GIT ArfGAP 1
GO	Gene Ontology
GPM6B	glycoprotein M6B
GTPBP8	GTP binding protein 8 (putative)
Gy	Gray
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDAC4	histone deacetylase 4
HECTD3	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 3

HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated
HLF	HLF, PAR bZIP transcription factor
HMGCS1	3 - hydroxy - methylglutaryl - CoA synthase 1
HNRNPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
HNRNPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
HSP90B1	heat shock protein 90 beta family member 1
HUB	Hospital Universitário de Brasília
ICAM2	Molecule de Adhesion Intercellular 2
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor
IGSF5	immunoglobulin superfamily member 5
INPP4A	inositol polyphosphate - 4 - phosphatase type I A
INPP5B	inositol polyphosphate - 5 - phosphatase B
IPO9	importin 9
KAT6A	lysine acetyltransferase 6A
KCNIP1	potassium voltage - gated channel interacting protein 1
KCTD5	potassium channel tetramerization domain containing 5
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KLF9	KLF transcription factor 9
KLHL29	kelch like family member 29
KPNA3	karyopherin subunit alpha 3
LACC1	laccase domain containing 1
LAMC1	laminin subunit gamma 1
LELP1	late cornified envelope like proline rich 1

let	7d – microRNA família let
LMO2	LIM domain only 2
logFC	Log Fold Change
LRC	locorregional control
LRRC58	leucine rich repeat containing 58
MBD6	methyl - CpG binding domain protein 6
MBTD1	mbt domain containing 1
MCC	Maximal Clique Centrality
MCF2L	MCF.2 cell line derived transforming sequence like
MICU3	mitochondrial calcium uptake family member 3
MIPOL1	mirror - image polydactyly 1
miRbase	microRNA Database
miRNAs	Micro RNAs
MOSPD1	motile sperm domain containing 1
MPZ	myelin protein zero
mRNAs	RNAs mensageiros
MTCH2	mitochondrial carrier 2
MYBL1	MYB proto - oncogene like 1
MYO9A	myosin IXA
NDC1	NDC1transmembrane nucleoporin
NDNF	neuron derived neurotrophic factor
NEURL4	neuralized E3 ubiquitin protein ligase 4
NFIA	nuclear factor I A

NFIB	nuclear factor I B
NGS	Next Generation Sequencing
NKX2	4 - NK2 homeobox 4
NR1D2	nuclear receptor subfamily 1 group D member 2
NRCAM	neuronal cell adhesion molecule
NUBPL	NUBP iron - sulfur cluster assembly factor, mitochondrial
NUP210	nucleoporin 210
OCLN	occludin
P4HA1	prolyl 4 - hydroxylase subunit alpha 1
PAX5	paired box 5
PAX6	paired box 6
PDE7A	phosphodiesterase 7A
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase 4
PDS5A	PDS5 cohesin associated factor A
PDS5B	PDS5 cohesin associated factor B
pH	Potential of Hydrogen
PIK3AP1	phosphoinositide - 3 - kinase adaptor protein 1
PIP4K2A	phosphatidylinositol - 5 - phosphate 4 - kinase type 2 alpha
PKM	pyruvate kinase M1/2
PKP4	plakophilin 4
PLP2	proteolipid protein 2
POM121C	POM121 transmembrane nucleoporin C
PPI	Protein-Protein Interaction

PRDM1	PR/SET domain 1
PRKAR1A	protein kinase cAMP - dependent type I regulatory subunit alpha
PRKCA	protein kinase C alpha
PRKCE	protein kinase C epsilon
PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTGFR	prostaglandin F receptor
PTPN9	protein tyrosine phosphatase non - receptor type 9
PURA	purine rich element binding protein A
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family
RAD23B	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein
RASA1	RAS p21 protein activator 1
RBM47	RNA binding motif protein 47
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RC3H1	ring finger and CCCH - type domains 1
RCN2	reticulocalbin 2
REERG	RAS like estrogen regulated growth inhibitor
RHOB	ras homolog family member B
RNA	Ribonucleic Acid
RNA-seq	Ribonucleic Acid Sequencing
ROC	Receiver Operating Characteristic
RORB	RAR related orphan receptor B

RRAS2	RAS related 2
SATB1	SATB homeobox 1
SBF1	SET binding factor 1
SDC2	syndecan 2
SEPT6	septin 6
SESN2	sestrin 2
SH2B3	SH2B adaptor protein 3
SIAH1	siah E3 ubiquitin protein ligase 1
SLC25A34	solute carrier family 25 member 34
SLC30A5	solute carrier family 30-member 5
SLC37A3	solute carrier family 37 member 3
SLC4A4	solute carrier family 4-member 4
SLC4A8	solute carrier family 4 member 8
SLC52A2	solute carrier family 52 member 2
SLC7A1	solute carrier family 7 member 1
SLC7A5	solute carrier family 7 member 5
SLC8A1	solute carrier family 8 member A1
SMARCD1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1
SMYD4	SET and MYND domain containing 4
SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1
SP1	Sp1 transcription factor
SP3	Sp3 transcription factor
SPOCK1	SPARC (osteonectin), cwcv and kazal like domains proteoglycan 1

SPRED1	sprouty related EVH1 domain containing 1
SPRY2	sprouty RTK signaling antagonist 2
SPTLC2	serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2
SREK1	splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes
SZRD1	SUZ RNA binding domain containing 1
TADA1	transcriptional adaptor 1
TAF5	TATA - box binding protein associated factor 5
TBC1D10B	TBC1 domain family member 10B
TBC1D17	TBC1 domain family member 17
TBC1D22B	TBC1 domain family member 22B
TBR1	T - box brain transcription factor 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFBR3	transforming growth factor beta receptor 3
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
TJP1	tight junction protein 1
TMEM178B	transmembrane protein 178B
TMOD2	tropomodulin 2
TSPYL5	TSPY like 5
UBE2A	ubiquitin conjugating enzyme E2 A
UNACON	Unidade de Alta Complexidade em Oncologia
UnB	Universidade de Brasília
USP42	ubiquitin specific peptidase 42

UST	uronyl 2 - sulfotransferase
VAMP3	vesicle associated membrane protein 3
VPS53	VPS53 subunit of GARP complex
WBP1L	WW domain binding protein 1 like
WDR43	WD repeat domain 43
WTAP	WT1 associated protein
ZBTB34	zinc finger and BTB domain containing 34
ZBTB4	zinc finger and BTB domain containing 4
ZEB1	zinc finger E - box binding homeobox 1
ZFP91	ZFP91 zinc finger protein, atypical E3 ubiquitin ligase
ZNF827	zinc finger protein 827

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	28
1.1	CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CAVIDADE ORAL E OROFARINGE.....	28
1.1.1	Epidemiologia e Fatores de risco	28
1.1.2	Avanços na prevenção, diagnóstico e prognóstico do CCE em Cavidade Oral e Orofaringe.....	29
1.1.3	Tratamento.....	31
1.2	MicroRNAs (miRNAs).....	32
1.2.1	Biogênese dos miRNAs.....	32
1.2.2	miRNAs como biomarcadores em CCE de Cavidade Oral e Orofaringe	33
1.3	JUSTIFICATIVA.....	35
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos.....	36
3.	METODOLOGIA	37
3.1	Delineamento do estudo e aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP/FM/UnB).....	37
3.2	Local da Pesquisa.....	37
3.3	Sujeitos da Pesquisa	37
3.4	Crterios de Elegibilidade	37
3.5	Procedimentos para coleta de dados e amostras sangúneas.....	38
3.5.1	Coleta de Dados	38
3.5.2	Coleta, Centrifugação e Armazenamento das Amostras Sangúneas	38
3.6	Análise do perfil de miRNAs circulantes (miRNoma).....	39
3.6.1	Processamento das Amostras de Plasma.....	39
3.6.2	Sequenciamento de miRNAs	40
3.6.3	Análise dos dados gerados pelo sequenciamento	40
3.6.3.1	Pré-processamento	40
3.6.3.2	Deteção de miRNAs	41
3.6.3.3	Crterios para seleção dos miRNAs.....	41
3.6.4	Análise de Bioinformática em amostras independentes de bancos de dados	41
3.6.4.1	Seleção <i>in silico</i> dos miRNAs diferencialmente expressos em bancos de dados de acesso aberto	41

3.6.4.2	Previsão de genes-alvos.....	43
3.6.4.3	Análise funcional dos genes-alvos identificados pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO)	43
3.6.4.4	Rede de Interação Proteína-Proteína (PPI).....	44
3.6.4.5	Interação miRNAs-Proteínas-Vias/Anotações	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	Características clínico-patológicas dos sujeitos da pesquisa	45
4.2	miRNAs identificados no sequenciamento	49
4.3	Análise de Bioinformática em amostras independentes de bancos de dados	52
4.3.1	miRNAs diferencialmente expressos.....	52
4.3.2	Previsão de genes-alvo	53
4.3.3	Análise funcional dos genes-alvos identificados pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO).....	54
4.3.4	Rede de Interação Proteína-Proteína (PPI).....	54
4.3.5	Interação miRNAs-Proteínas-Vias/Anotações	56
5.	DISCUSSÃO.....	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	APÊNDICES	71
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	71
	APÊNDICE B - Instrumento de caracterização dos pacientes com câncer de cavidade oral e orofaringe	73
	APÊNDICE C - Instrumento para coleta de dados dos pacientes com câncer de cavidade oral e orofaringe submetidos à radioterapia	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

1.1.1 Epidemiologia e Fatores de risco

A definição de câncer de cavidade oral e orofaringe mostra-se divergente tanto na literatura nacional quanto internacional, devido à falta de uma definição precisa em relação às suas localizações. No entanto, de maneira geral, considera-se como *Câncer em Cavidade Oral* as lesões malignas que envolvem os dois terços frontais da língua, assoalho da boca, mucosa jugal, gengiva, lábios, trígono retromolar e palato duro. Já o *Câncer em Orofaringe* refere-se a lesões malignas em base de língua, palato mole, amígdalas e parede posterior da faringe, conforme apresentado na Figura 1 (ALGUDAIBI et.al. 2021).

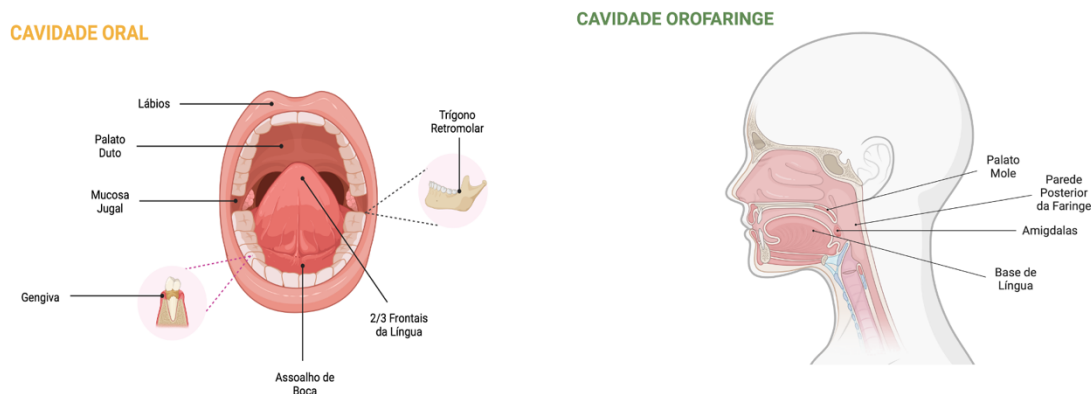


Figura 1 - Região que corresponde à Cavidade Oral (2/3 frontais da língua, assoalho de boca, mucosa jugal, gengiva, lábios, trígono retromolar e palato duro). Região que corresponde à Orofaringe (base de língua, palato mole, amígdalas e parede posterior da faringe). Criado com Biorender.com.

Para o ano de 2025, a International Agency for Research on Cancer (IARC), prevê para câncer em lábio e cavidade oral 421.000 casos novos (294.000 para homens e 127.000 para mulheres) e 198.400 mortes (139.000 para homens e 59.400 para mulheres), enquanto o câncer em orofaringe foi associado a 110.400 casos novos (88.700 para homens e 21.700 para mulheres) e 54.390 mortes (sendo 44.700 para homens e 9.690 para mulheres). No Brasil, no triênio 2023-2025, prevê-se anualmente 15.100 casos novos, sendo 10.900 em homens e 4.200 em mulheres para neoplasias malignas primárias em lábios, cavidade oral, glândulas salivares e orofaringe (IARC, 2023; INCA, 2022).

A maioria das lesões nestas regiões inicia-se geralmente em células escamosas, sendo chamadas de Carcinomas de Células Escamosas (CCE), e estão fortemente associadas a fatores ambientais específicos, como tabagismo e etilismo, infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e papilomavírus humano (HPV). Nas últimas três décadas, pode-se observar uma diminuição na incidência dos casos de câncer relacionados ao tabagismo, em parte devido ao sucesso de políticas públicas antitabagistas. No entanto, a incidência de câncer relacionado a infecção por HPV, neste mesmo período, aumentou consideravelmente. (ZHANG et. al., 2018).

Em uma análise global da prevalência de HPV+ em CCE de cavidade oral, conduzida por uma metanálise que envolveu um total de 5.007 pacientes em 24 países, evidenciou-se uma variação significativa na proporção de casos de HPV+ para esse tipo específico de câncer, que oscilou entre 0% e 37%. Além disso, conforme indicado por este estudo, nos indivíduos com HPV+, os tumores localizados na língua emergiram como a sublocalização predominante (KATIRACHI et. al., 2023).

Quanto à oncogenicidade, o HPV pode ser classificado em baixo risco ou alto risco, sendo os genótipos de alto risco, principalmente o HPV16 e o HPV18, predominantes nos casos de câncer em orofaringe. A indução da carcinogênese por este vírus está associada principalmente à atuação da oncoproteína E6 que degrada o supressor tumoral p53, inibe as proteínas proapoptóticas celulares e ativa a telomerase, e a oncoproteína E7 que se liga e inativa a proteína do retinoblastoma, que tem um papel supressor na atividade do tumor. A inibição do retinoblastoma pelo HPV produz um aumento mensurável no p16 e é usada como teste diagnóstico (KATIRACHI et. al., 2023; NIÑO et. al. 2023).

1.1.2 Avanços na prevenção, diagnóstico e prognóstico do CCE em Cavidade Oral e Orofaringe

A alta incidência do CCE em cavidade oral e orofaringe, aliada aos elevados custos associados ao tratamento, destaca a necessidade de inovações, principalmente, nas estratégias de prevenção. E para otimizar essas estratégias, considerando as várias etapas que envolvem essa doença, iniciando-se com alterações na mucosa normal e progredindo até a formação tumoral, a conscientização pública e dos profissionais de saúde sobre os fatores de risco e os primeiros sinais de câncer oral desempenha um papel fundamental. Adicionalmente, uma compreensão mais aprofundada das vias moleculares envolvidas no desenvolvimento desse tipo de câncer pode contribuir significativamente para aprimorar essas abordagens (BURCHER et. al., 2023; IRANI, 2020).

Outros aspectos fundamentais para redução dessa incidência incluem o diagnóstico precoce e o estadiamento preciso da doença. Atualmente, a análise histopatológica de fragmento de tecido coletado cirurgicamente (biópsia do tecido) é considerada padrão ouro para a classificação tumoral, mas a complexidade deste procedimento e, muitas vezes, a dificuldade de acesso a esse serviço, retardam o início do tratamento, permitindo um crescimento rápido da lesão e influenciando diretamente no prognóstico do paciente. Além de gerar desconforto, estresse, risco de complicações, aumento dos custos com cuidados de saúde, existe ainda uma limitação na avaliação do tecido seccionado, uma vez que o fragmento pode não representar toda a massa tumoral e a retirada de tecidos tumorais necróticos não retrata adequadamente as alterações genéticas e epigenéticas do tumor (CALANDRI et. al., 2020; MACHIELS et. al., 2020; SCHUTTE et. al, 2020).

Apesar do progresso no diagnóstico e tratamento de câncer de cavidade oral e orofaringe, a maioria dos pacientes é diagnosticada em estágios avançados, que estão associados a um mau prognóstico e altas taxas de recorrência local e metástases. No geral, quando a doença é diagnosticada em estágios iniciais, a taxa de sobrevivência de 5 anos é de 80%, mas em estágios avançados esta taxa diminui para 20%. Portanto, é notória a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens que melhorem o diagnóstico destes tipos de câncer (GONZALEZ et. al, 2019).

Nos últimos anos, a biópsia líquida vem surgindo como uma excelente alternativa de diagnóstico e acompanhamento do câncer, devido ao baixo risco de complicações, além de ser um procedimento minimamente invasivo, de acesso rápido e indolor que pode ser utilizado em diferentes etapas da doença, incluindo triagem, detecção precoce, estadiamento, classificação com estimativa de carga mutacional do tumor, recidiva e avaliação de resposta terapêutica. A nível molecular, a biópsia líquida pode abranger um amplo espectro de espécimes derivadas do tumor, como células tumorais circulantes (CTCs), RNAs circulantes (em particular microRNAs), DNA tumoral livre circulante (ctDNA) e livre de células (cfDNA) que podem ser detectados no sangue e outros fluidos corporais (VALIHRACH, ANDROVIC, KUBISTA, 2019; CALANDRI et. al., 2020).

Diversos estudos dedicados a vários tipos de cânceres têm identificado promissores biomarcadores por meio da biópsia líquida. Em uma revisão sistemática e meta-análise que investigou miRNAs exossômicos provenientes de amostras de biópsia líquida de soro e plasma, constatou-se que a sensibilidade para detectar câncer de tireóide alcançou 82%, enquanto a especificidade atingiu 76%. Adicionalmente, destacou-se que os miRNAs com melhor desempenho em termos de sensibilidade e especificidade foram miR-16-2-3p (94%), miR-223-

5p (91%), miR-130a-3p (90%) e miR182-5p (94%). Esses achados sugerem a viabilidade desses miRNAs como marcadores eficazes, proporcionando uma perspectiva valiosa para a detecção precoce e o diagnóstico desses tipos de câncer (TORAIH et. al., 2021).

Em outra pesquisa conduzida em pacientes com câncer colorretal metastático, que tinha como objetivo investigar se o monitoramento da resposta ao tratamento, baseado em ctDNA, poderia ser realizado de maneira independente do tecido tumoral, mostrou que a análise combinada de ctDNA e glóbulos brancos impediu falsos positivos devido a variantes germinativas ou hematopoiéticas em 40% (21/52) dos pacientes. Análises longitudinais do ctDNA foram mais preditivas da sobrevida global do que a avaliação da resposta radiológica padrão de cuidados. Além disso, mutações de ctDNA relacionadas a resistência primária ou adquirida ao panitumumab foram identificadas em 42% (22/52) dos pacientes. Esses dados corroboram a viabilidade da biópsia líquida para o monitoramento destes pacientes. (ERVE et. al., 2023).

As atuais evidências econômicas em saúde provenientes de uma revisão sistemática sobre ensaios de biópsia líquida indicam que essa técnica pode oferecer uma abordagem economicamente viável em cenários de triagem e quando comparada a técnicas padrões para alguns tipos de cânceres, incluindo o de pulmão para seleção de tratamento e o colorretal, gástrico, de mama e cerebral para rastreamento e detecção. Nesta revisão, a maioria dos estudos de impacto em saúde e orçamento relatou economia de custo, impacto orçamentário mínimo ou modesto. Os autores preveem benefícios econômicos dessas aplicações de biópsia líquida, porém advertem contra a generalização do seu uso para outras aplicações clínicas em diferentes tipos de câncer. Isso ressalta a necessidade de cautela e considerações das peculiaridades de cada contexto clínico ao interpretar tais dados econômicos (FAGERY et. al.2023).

1.1.3 Tratamento

As opções de tratamento para este tipo de câncer são multimodais podendo ser cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação dessas modalidades, onde a escolha é baseada nas características do paciente (capacidade funcional, comorbidades, sintomas relacionados à doença, expectativa de vida e adesão ao tratamento) e características do tumor (estágio, classificação, volume e finalidades terapêuticas) (LANG et. al., 2021; CAO et. al., 2022; FASANO et. al., 2022).

A radioterapia, um dos principais tratamentos para o CCE em cavidade oral e orofaringe, tem sido aplicada em diversas situações clínicas, como após a realização de cirurgia (radioterapia adjuvante) e para pacientes considerados inoperáveis (radioterapia radical). No

entanto, essa modalidade terapêutica enfrenta desafios específicos para esse tipo de câncer, incluindo dificuldades no posicionamento do paciente, exposição limitada devido à complexa anatomia, doses desiguais e a incidência de eventos adversos locais na cavidade oral. Esses fatores exigem a necessidade de aprimorar a precisão da radioterapia para o câncer oral e/ou de orofaringe, reduzindo os danos causados pela irradiação. Para mitigar esses efeitos colaterais, geralmente a técnica de escolha, sempre que possível, é a radioterapia modulada por intensidade (IMRT) e terapia de feixe de prótons, que permitem uma entrega mais eficaz para a área de interesse (tumor) em comparação à radioterapia conformada tridimensional (3D) (MA et. al., 2023; SANKAR, 2023).

Essas modalidades terapêuticas podem ser realizadas tanto de forma isolada quanto em combinação com a quimioterapia. Em pacientes submetidos a cirurgia, a inclusão da quimioterapia de indução ou concomitante à radioterapia resulta em um aumento significativo na taxa de sobrevida global em 5 anos (66,9%) quando comparado a pacientes tratados com radioterapia exclusiva (15%). (JAMAL, ANJUM, 2023; LANG et. al., 2021; FELICE et. al, 2020; FU et. al., 2018).

Em tumores irresssecáveis, a quimioterapia a base de cisplatina, concomitante à radioterapia, é considerada padrão-ouro, demonstrando vantagens na taxa de sobrevida quando comparada à radioterapia isolada. Entretanto, estudos indicam que o uso da carboplatina/paclitaxel, em estágios III e IV não metastáticos, apresenta prognóstico semelhante, mas com menos efeitos adversos (JAMAL, ANJUM, 2023).

Os efeitos favoráveis proporcionados por essas terapias geralmente são limitados devido à detecção tardia da doença e às altas taxas de recorrência local e metástase. Assim, a compreensão da patogênese molecular envolvida e a descoberta de potenciais biomarcadores poderão abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e, conseqüentemente, melhorar a sobrevida dos indivíduos acometidos por essa neoplasia (XING et. al, 2022; AHMAD et. al, 2017).

1.2 MICRORNAS (MIRNAS)

1.2.1 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA endógeno, não codificantes de proteínas, com comprimento de 19 a 25 nucleotídeos (nt), que controlam a estabilidade e a tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs). O processo de biogênese dessa molécula (Figura 2), inicia-se com a conversão de um gene miRNA em um miRNA primário (pri-miRNA) através da RNA polimerase II. O complexo Drosha e DGCR8 cliva este pri-miRNA usando a atividade

endonuclease, originando um precursor de miRNA com 70nt (pré-miRNA) que por meio da exposição a exportina-5 segue para o citoplasma. No citoplasma, o complexo TRBP e Dicer (de fita dupla) converte esse pré-miRNA em cadeias duplex de miRNA (miRNAs maduros) que são incorporadas ao complexo RISC (RNA- induced silencing complex). A destruição seletiva de uma dessas cadeias é essencial para reprimir o mRNA pretendido, possivelmente dependendo das estabilidades termodinâmicas. O miRNA maduro é direcionado a um mRNA alvo pelo complexo RISC, que, durante o processo de seleção da cadeia inclui o componente-chave Argonaute 2. Nesse contexto, as interações promovem a desestabilização do mRNA alvo e a repressão traducional, clivando o mRNA alvo ou encurtando a cauda de 3' poli- A do mRNA alvo (ESLAMI et. al, 2023; GONZALEZ et.al, 2019; DHARMAWARDANA et.al, 2019; SCHNEIDER et. al, 2018).

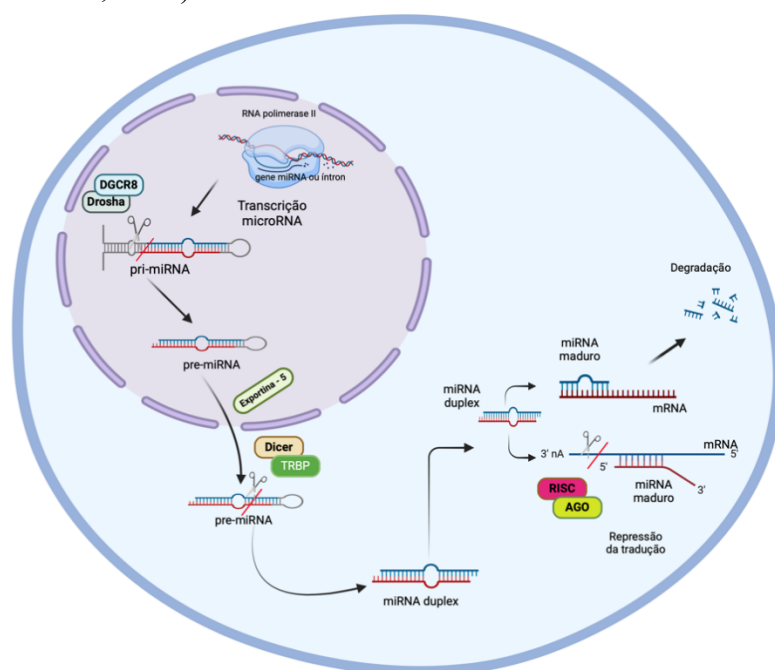


Figura 2 - Biogênese dos miRNAs e mecanismo de regulação do RNA mensageiro alvo. Criado com BioRender.com.

1.2.2 miRNAs como biomarcadores em CCE de Cavidade Oral e Orofaringe

Os perfis e níveis de expressão de miRNA apresentam variações entre pacientes com câncer e indivíduos saudáveis, desempenhando um papel significativo na carcinogênese humana. Essas moléculas, devido às suas propriedades químicas e estruturais, podem se tornar detectáveis na circulação, podendo ser identificadas em diferentes fluidos corporais, incluindo plasma, soro, saliva ou urina. Suas vantagens como biomarcadores são muitas e incluem além da fácil detecção, a resistência à atividade de RNase endógena e a boa estabilidade em condições adversas (pH extremos, altas temperaturas, após fervura e múltiplos ciclos de

congelamento-descongelamento) (WANG et. al., 2021; GONZALEZ et.al, 2019; MUZUMDER et.al, 2019).

Os avanços contínuos na compreensão das atividades biológicas e interações moleculares do CCE em cavidade oral e/ou orofaringe, bem como o crescente conhecimento sobre a atuação dos miRNAs, evidenciam que dependendo dos seus alvos, essas moléculas podem atuar tanto como supressores tumorais ou como oncogenes, inclusive com papéis importantes em vários outros processos celulares que incluem o crescimento, proliferação, diferenciação, apoptose e angiogênese (XING et. al, 2022; DASHANTAN et. al, 2020).

No contexto do CCE oral, há diversos estudos recentes mostrando detecção de miRNAs tanto no sangue quanto em tecido tumoral. Em um deles, cujo objetivo é determinar o miRNoma de pacientes com CCE de cavidade oral, foram detectados 567 miRNAs em tecido tumoral, sendo os mais expressos o miR-143-3p, miR-22-3p e miR-21-5p. Ao realizar o comparativo de amostras teciduais normais e tumorais identificou-se 66 miRNAs diferencialmente expressos nos dois grupos, dos quais o miR-940-3p, miR-615-3p e miR-3615-3p foram mais expressos nos tecidos tumorais e o miR-204-5p, miR-144-5p e o miR-30a-5p menos expressos. No plasma, quatro miRNAs mostraram-se significativamente mais expressos nos pacientes com tumor, o miR-30a-5p, miR-370-3p, miR-1307-5p e miR-769-5p. As técnicas utilizadas neste estudo foram sequenciamento de nova geração (NGS) para amostras de tecidos (normais e CCE) e reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) para validar os resultados, tanto em amostras de tecidos como de plasma (PEDERSEN et. al., 2018).

Em outro estudo, no qual foram analisadas, por meio de rt-PCR, amostras de sangue total de indivíduos saudáveis e pacientes com CCE em cavidade oral, revelou-se que a maioria dos indivíduos com CCE de cavidade oral apresentou expressão aumentada do miR-155 (78%), miR-191 (72%) e miR-494 (68%), quando comparado com os indivíduos saudáveis (EMAMI et. al., 2020). Um estudo conduzido por Crimi et. al, 2020 associou a expressão reduzida do miR-133a-3p e miR-375-3p ao desenvolvimento do câncer oral e a um pior prognóstico. Neste último estudo, o objetivo era validar o potencial diagnóstico de quatro miRNAs, o miR-191a-5p, miR-503-5p, miR-375-3p e o miR-133a-3p em amostras de sangue total obtidas de pacientes com câncer oral e indivíduos saudáveis.

Em outra pesquisa, que tinha como objetivo explorar e validar o potencial de miRNAs circulantes detectados no soro de pacientes com câncer oral identificou-se, através do NGS, 4 miRNAs (mir-92a-3p, mir-92b-3p, mir-320c e mir-629-5p) como um conjunto promissor destes biomarcadores (PIAO et. al, 2023).

O NGS revolucionou o estudo do código genético humano, por ser considerado um método rápido, confiável e economicamente viável para leitura do genoma. Além disso, vantagens suplementares desta tecnologia incluem a habilidade de detectar alterações de sequências de nucleotídeo único e identificação de sequências novas. Como resultado, as moléculas alteradas identificadas mostram uma maior sensibilidade, especificidade e capacidade preditiva para detecção de doenças (POTLA, ALI, KAPOOR, 2021).

No contexto do câncer, essa tecnologia revolucionou nossa habilidade de investigar alterações genômicas em células tumorais, proporcionando uma compreensão mais profunda da biologia do tumor e facilitando o desenvolvimento de tratamentos direcionados e personalizados (SCHMID et. al., 2022). Para o CCE de cavidade oral e/ou orofaringe, a identificação de miRNAs por esta tecnologia possibilita uma análise global desses pequenos RNA's não codificantes em fluidos corporais, permitindo tanto a detecção daqueles com baixa expressão quanto de novos.

Embora o NGS desempenhe um papel crucial nessas novas descobertas, as abordagens mais utilizadas são o qRT-PCR ou microarranjos (GONZALEZ et.al, 2019; MUZUMDER et.al, 2019; KIM et.al, 2020). Essas técnicas diferem do NGS por permitirem apenas a identificação de miRNAs conhecidos e por apresentarem limitações na detecção de bons genes de referência, o que dificulta a comparação entre estudos (KIM et.al, 2020).

1.3 JUSTIFICATIVA

Apesar da identificação de perfis de miRNAs circulantes relacionados ao CCE em cavidade oral e orofaringe, mais pesquisas são necessárias para uma compreensão dos processos moleculares envolvidos, pois até o momento, não há um perfil definido que esteja associado ao comportamento clínico ou à resposta a terapias específicas para esse tipo de câncer. Além disso, também não há um consenso sobre o papel e relevância clínica desses miRNAs na biópsia líquida, um procedimento menos invasivo que pode superar a biópsia tradicional por viabilizar reanálises durante e após o tratamento e melhor refletir a heterogeneidade do tumor.

Dessa forma, enfatizando a relevância do sequenciamento de miRNAs nas pesquisas sobre câncer, nosso estudo buscou identificar miRNAs circulantes associados ao CCE em cavidade oral e orofaringe, por meio de biópsia líquida, usando a técnica de RNA-seq em amostras de plasma, visando identificar potenciais biomarcadores moleculares clinicamente úteis para esse tipo de câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil de miRNAs circulantes no plasma, por meio de biopsia líquida, usando a técnica de RNA-seq, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, dos subtipos de cavidade oral e orofaringe.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os miRNAs circulantes identificados que são conhecidos e os ainda não descritos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, dos subtipos de cavidade oral e orofaringe, a partir do sequenciamento;
- Analisar *in silico* os níveis de expressão de miRNAs selecionados entre os identificados no sequenciamento, no contexto do CCE oral e de orofaringe;
- Fazer previsão *in silico* dos genes-alvos de miRNAs selecionados entre os identificados no sequenciamento, identificando as vias biológicas que eles regulam.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (CEP/FM/UNB)

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo e exploratório que faz parte da pesquisa intitulada *Prospecção de marcadores moleculares para o câncer de cabeça e pescoço*. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da UnB (CAE: 58313116.500005558).

3.2 LOCAL DA PESQUISA

A parte de coleta de amostras de pacientes foi desenvolvida na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) e Serviço de Odontologia, situados no Hospital Universitário de Brasília (HUB). A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina (FM) da UnB.

3.3 SUJEITOS DA PESQUISA

A população do estudo foi constituída por pacientes com câncer de cabeça e pescoço, em cavidade oral e orofaringe, atendidos no HUB. Foram analisadas amostras sanguíneas de 12 pacientes antes de iniciar o tratamento, selecionados por ordem de admissão nos setores, e, desse grupo, 02 pacientes tiveram suas amostras coletadas após a radioterapia. Posteriormente, foram escolhidos 02 indivíduos para compor o grupo controle, com características compatíveis com as dos casos em termos de sexo e faixa etária.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Para compor o grupo de casos, foram incluídos, para realizar a primeira coleta, aqueles pacientes maiores de 18 anos, em que o exame histopatológico confirmou o diagnóstico de CCE em cavidade oral e/ou orofaringe e, para segunda coleta, os indivíduos que finalizaram o tratamento e/ou continuaram realizando consultas de seguimento no HUB.

Foram excluídos da primeira coleta, os menores de 18 anos e os pacientes cujo laudo histopatológico descartava o diagnóstico de CCE em cavidade oral e/ou orofaringe. E da segunda coleta, excluiu-se os pacientes que não finalizaram o tratamento, seja por óbito ou abandono, ou que não compareceram para as consultas de seguimento com os profissionais do hospital. Nos dois grupos foram excluídas, também, amostras de baixa qualidade e/ou com quantidade insuficiente para refazermos o sequenciamento quando necessário.

A fim de manter a correspondência entre os grupos, os critérios de inclusão para os controles foram indivíduos saudáveis do sexo masculino com idade dentro da média de faixa etária do grupo de casos.

3.5 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS E AMOSTRAS SANGUÍNEAS

3.5.1 Coleta de Dados

Os dados foram coletados por mim, pesquisadora e, no período da coleta, enfermeira da Radioterapia/UNACON.

A fim de confirmar se os sujeitos atendiam aos critérios de elegibilidade, foi realizada uma avaliação do documento de identificação e, para os pacientes do grupo de casos, uma avaliação do resultado do exame histopatológico. Posteriormente, foram apresentados os objetivos, procedimento, riscos e benefícios da pesquisa, convidando-os a participar.

A aquiescência dos participantes foi explicitada por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE A) que foi entregue em duas vias, uma para o sujeito da pesquisa e outra para arquivamento do grupo de pesquisa. Neste momento, a coleta de dados foi realizada, por meio do Instrumento de Caracterização dos Pacientes com Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe elaborado pelos autores (APÊNDICE B), sendo também informado o local e data de realização da primeira coleta de sangue, bem como dadas orientações para o preparo necessário para a realização do procedimento, como jejum absoluto por um período de 6 horas e o não consumo de bebida alcoólica e/ou qualquer tipo de cigarro por no mínimo 12 horas antes da coleta.

A segunda coleta, dos indivíduos do grupo de casos, foi realizada no último dia do tratamento ou na primeira consulta de retorno com o radioterapeuta, oncologista ou odontólogo, sendo este último para pacientes que realizaram tratamento radioterápico em outra instituição.

3.5.2 Coleta, Centrifugação e Armazenamento das Amostras Sanguíneas

No dia da coleta de sangue, realizada no Serviço de Radioterapia do UNACON/HUB, foi preenchido o Instrumento de Avaliação para Coleta Sanguínea de Pacientes Com Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe (APÊNDICE C), com informações sobre o período de jejum, consumo de bebida alcoólica e/ou cigarro, sinais vitais e medidas antropométricas do dia do procedimento.

No intuito de evitar lise das amostras, preservando-as ao máximo, os tubos continham o reagente anticoagulante EDTA e o escalpe possuía sistema vacutainer. Apenas após uma

avaliação criteriosa das condições do acesso venoso do paciente, foi selecionado o número do escalpe e o local de punção, que não poderia ter hematoma e/ou equimose. A antisepsia foi realizada com álcool a 70% e a punção ocorria quando a pele estivesse totalmente seca (tempo de espera de aproximadamente 30 segundos).

Durante o procedimento, o membro não permanecia garroteado por mais de 1 minuto e evitava-se o excesso de manipulação/pressão sobre a área a ser puncionada. Após a punção, foram descartados 5 ml de sangue e, em seguida, foram coletados dois tubos de 6 ml cada, sendo o primeiro destinado para extração de miRNA e o segundo para realização de hemograma completo e glicemia de jejum. As amostras foram homogeneizadas delicadamente dentro do tubo, por inversão, de 8 a 10 vezes.

O tubo destinado à realização de exames laboratoriais foi encaminhado para o laboratório de Análises Clínicas do HUB. A amostra para extração de miRNA foi centrifugada para separação do plasma. Antes da centrifugação, e apenas quando necessário, o tubo permanecia em posição vertical em temperatura ambiente por, no máximo, 30 minutos.

A fim de evitar a presença de células que poderiam sofrer lise, em um período de até 2 horas após a coleta, as amostras foram centrifugadas 2 vezes a 4000xg, por 10 minutos, em temperatura ambiente, sendo que após a primeira centrifugação, o sobrenadante era separado cuidadosamente e colocado em um novo tubo Falcon. Após a segunda centrifugação, foram feitas alíquotas de 2 ml do sobrenadante final em criotubos novos, que foram armazenados no laboratório de Pesquisa Clínica do HUB, em um freezer a - 45°C. Em um segundo momento, até no máximo 24 horas após a centrifugação, estas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia da UnB e armazenadas em um freezer -80°C até serem processadas. Durante o transporte, as amostras foram mantidas em temperaturas de 2 a 8° C por cerca de 10 a 15 minutos.

3.6 ANÁLISE DO PERFIL DE MIRNAS CIRCULANTES (MIRNOMA)

3.6.1 Processamento das Amostras de Plasma

Para isolamento e purificação de pequenas moléculas de RNA foi utilizado o MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) e, no intuito de melhorar a recuperação de miRNAs nas amostras, depois de vários testes, foram realizadas algumas modificações no protocolo do fabricante, como segue:

- Aumento na quantidade inicial da amostra de plasma usada de 100 para 200 µL; e

- Aumento na quantidade de solução de lavagem de 150 para 350 μ L, pois como não utilizamos uma microplaca com poços, como diz o protocolo, e sim microtubos avulsos, a quantidade descrita estava insuficiente para lavar o material.

Para analisar a quantificação e pureza dos miRNAs extraídos foi utilizado o espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare) e o fluorômetro QUBIT® (Thermo Fisher Scientific).

Com o Ion Total RNA-Seq Kit v2 s, os miRNAs isolados foram usados para transcrição reversa para obtenção de uma biblioteca de cDNA. Após a construção da biblioteca de cDNA, ainda na tentativa de melhorar a qualidade das amostras por meio da remoção dos adaptadores e de uma seleção precisa do tamanho desta biblioteca, utilizamos o E-gel™ Size Select™ II Agarose Gel, 2%. A biblioteca foi amplificada, as amostras preparadas e o chip (Ion 540) carregado utilizando-se o kit Ion 540 - Chef (Thermo Fisher Scientific). Nesta etapa, foi usado o kit Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 1-16 que possibilitou agregar as amostras da biblioteca usando os códigos de barra para fazer reação multiplex de sequenciamento, otimizando a corrida.

3.6.2 Sequenciamento de miRNAs

Foi utilizada a técnica de RNA-seq, com a plataforma Ion S5™ Sequencing System (Thermo Fisher Scientific) de sequenciamento por tecnologia de semicondutores. Esta tecnologia é baseada na liberação de um próton a cada vez que há a incorporação de um nucleotídeo, que são liberados em ciclos separados, na cadeia em extensão. Este íon liberado, ativa sensores de pH no chip e transforma esta informação em sinal detectável pelo equipamento. A presença e a intensidade dos picos de alteração do pH são utilizadas para a determinação da sequência das moléculas.

Todos os cDNAs de miRNAs foram sequenciados. As leituras de sequenciamento foram processadas no Torrent Suite Software e os fragmentos gerados foram alinhados com uma sequência de referência para identificação de espécies novas ou já descritas de miRNAs, conforme detalhado a seguir.

3.6.3 Análise dos dados gerados pelo sequenciamento

3.6.3.1 Pré-processamento

Após o sequenciamento, o Ion Torrent FASTQ gerou um arquivo com 26.244.922 leituras brutas, que foram enviadas para o software FastQC para realização do controle de qualidade pré e pós ajuste dos adaptadores, realizado pelo software Cutadapt. Posteriormente,

foram removidos os adaptadores e as leituras de baixa qualidade, com menos de 15 pares de bases, gerando um total de 6.666.510 leituras.

3.6.3.2 Detecção de miRNAs

Após a remoção das leituras de baixa qualidade foi gerado um arquivo **Binary Alignment Map (BAM)** que foi comparado ao genoma humano de referência (hg19) e ao banco de dados miRBase, resultando, respectivamente, em um total de 2.179.173 e 322.881 leituras de miRNAs anotados e conhecidos.

3.6.3.3 Critérios para seleção dos miRNAs

Para seleção dos miRNAs, inicialmente as amostras foram divididas em três grupos (indivíduos saudáveis, antes de iniciar qualquer tratamento e após a radioterapia), em que se fez a soma do número de leituras dos miRNAs duplicados, excluídos os com menos de 10 leituras e selecionados os que apareceram em mais de 80% das amostras do grupo de pacientes antes da radioterapia e todos que apareceram nas amostras pós-radioterapia e do grupo de indivíduos saudáveis. Por motivo de tamanho amostral, a análise pareada antes e depois da radioterapia não foi realizada.

Adicionalmente, no intuito de analisar apenas os miRNAs plasmáticos, foram retirados do estudo os miRNAs hsa-miR-486-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-451, que segundo RAJAKUMAR, T. et.al., 2022, são considerados miRNAs eritróides, dificultando a detecção e quantificação das espécies de miRNAs de interesse.

3.6.4 Análise de Bioinformática em amostras independentes de bancos de dados públicos

3.6.4.1 Seleção *in silico* dos miRNAs diferencialmente expressos em bancos de dados de acesso aberto

Inicialmente, foram gerados conjuntos de dados por meio da plataforma Gene Expression Omnibus (Geo) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), utilizando os termos de pesquisa ((“oral”[All Fields] OR “oropharyngeal”[All Fields]) AND (“Non-coding RNA profiling by array”[Filter] OR “Non-coding RNA profiling by high throughput sequencing”[Filter])) AND ((((((“carcinoma”[All Fields] OR “carcinomas”[All Fields]) OR “cancer”[All Fields]) OR “cancers”[All Fields]) OR “neoplasm”[All Fields]) OR “neoplasms”[All Fields]) AND (“Non-coding RNA profiling by array”[Filter] OR “Non-coding RNA profiling by high throughput sequencing”[Filter])) AND (“Non-coding RNA

profiling by array”[Filter] OR “Non-coding RNA profiling by high throughput sequencing”[Filter]).

Esta busca nos permitiu identificar 72 conjuntos de dados com diferentes perfis de miRNAs de câncer em cavidade oral e/ou orofaringe publicados até setembro de 2023. Para selecionar os que estavam relacionados com este estudo foram utilizados como **critérios de inclusão** os que apresentassem níveis de expressão de miRNAs de plasma de indivíduos com câncer em cavidade oral e/ou orofaringe e de amostras de plasma de indivíduos sem a doença e como **critérios de exclusão** aqueles conjuntos de dados sem grupo controle, conjuntos de dados de linhagens de células, conjuntos de dados em que não era possível realizar a análise pelo GEO2R e conjuntos de dados contendo informações sobre níveis de expressão de miRNAs de amostras de tumor, saliva e soro, sem dados sobre o plasma.

Após a aplicação desses critérios, 01 conjunto de dado foi selecionado (Tabela 1), sendo triados apenas aqueles miRNAs que também foram identificados, por meio do sequenciamento, no nosso grupo de casos. Para análise de expressão, foi empregada a ferramenta GEO2R que utiliza para identificação dos miRNAs com expressão diferencial o teste t de Student e teste de Benjamini & Hochberg. Considerou-se diferença estatisticamente significativa na expressão aqueles miRNAs com valor de $p < 0,05$. Foram considerados com expressão levemente aumentada, os miRNAs que apresentaram $\log FC \geq 1$, enquanto os com expressão levemente diminuída os que apresentaram $\log FC \leq -1$.

Tabela 1 Características do conjunto de dados selecionado no GEO DataSets.

Conjunto de dados	Autor (s) Ano País	Número de sujeitos			Técnica utilizada
		CCE em cavidade oral e/ou orofaringe	Normal	Total	
GSE209670	Hofmann et. al., 2022 Alemanha	8	5	13	<i>nCounter SPRINT system</i> Tecnologias de Barcode digital baseada em

					combinação de cores e da quantificação direta da expressão gênica. Essa tecnologia permite multiplex de Barcode de até 800 alvos de RNA, DNA ou proteínas em cada amostra (UNISCIENCE, 2024).
--	--	--	--	--	---

3.6.4.2 Previsão de genes-alvos

A busca pelos genes-alvos dos miRNAs selecionados foi iniciada no banco de dados TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) (MCGEARY et. al, 2019) e, a fim de mitigar a ocorrência de falsos positivos, utilizou-se adicionalmente outro banco de dados, o miRDB (<https://mirdb.org>), onde para fins de validação, foram classificados apenas os genes com pontuação superior a 80 (CHEN,WANG, 2020). Posteriormente, os dados obtidos nas duas plataformas foram comparados e apenas os genes preditos em ambas foram considerados como potenciais alvos dos miRNAs selecionados.

3.6.4.3 Análise funcional dos genes-alvos identificados, pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO)

Para obter informações sobre os papéis desempenhados pelos genes-alvos identificados anteriormente, foi utilizada a ferramenta de bioinformática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Esta ferramenta permitiu realizar análises de enriquecimento pela KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e anotação funcional pelo GO (Gene Ontology), abrangendo processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Foram consideradas significativas as anotações funcionais que apresentaram um valor de $p < 0,05$ (SHERMAN et.al, 2022; HUANG; SHERMAN; LEMPICK, 2009).

3.6.4.4 Rede de Interação Proteína-Proteína (PPI)

A análise da interação das proteínas codificadas pelos genes-alvos, identificados por meio do TargetScan e mirDB, foi realizada utilizando o banco de dados Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes - STRING (<https://string-db.org/>). Para construção de uma Rede de Interação Proteína-Proteína (PPI), foram consideradas significativas as interações com pontuação de confiança $\geq 0,7$ e excluídas aquelas proteínas desconectadas da rede (SZKLARCZYK et. al, 2019).

A fim de identificar as principais proteínas e as regiões mais densamente interconectadas, a rede de PPI foi importada para o software Cytoscape, versão 3.10.0 (<https://cytoscape.org/>) (SHANNON, P et. al, 2003), sendo utilizado o aplicativo cytoHubba em que a centralidade máxima (MCC) foi adotada como critério (CHIN, CH et.al, 2014). Também foi utilizado o aplicativo MCODE Cytoscape 2.0, com os seguintes critérios: *in whole network*, *degree cutoff* = 2, *node score cutoff* = 0.2, *k-core* = 2 e *max. depth* = 100 (BADER; HOGUE, 2014).

3.6.4.5 Interação miRNAs-Proteínas-Vias/Anotações

Para análise das relações entre os miRNAs-Proteínas-Vias/Anotações foram selecionados os miRNAs identificados via sequenciamento e validados pelo banco de dados GeoDataSets, os genes-alvos comuns às plataformas TargetScan e miRDB, as vias biológicas encontradas pela KEGG e as anotações do GO, com o menor valor mínimo de P e/ou valor máximo de genes agregados.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS SUJEITOS DA PESQUISA

Das amostras incluídas no grupo de casos, antes de iniciar qualquer tratamento e após a radioterapia, a localização mais prevalente do tumor foi a base da língua (4 indivíduos), enquanto o tamanho do tumor predominante foi T2 (5 indivíduos). O status dos linfonodos regionais revelou um número expressivo de casos classificados como N2 (5 indivíduos) e a maioria dos indivíduos não apresentava metástases (9 indivíduos). Dados relativos ao histórico de tabagismo e consumo de álcool foram meticulosamente registrados, enfatizando a presença significativa de ex-tabagistas e ex-etilistas nos casos analisados. Adicionalmente, foram identificadas outras condições de saúde, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), cardiopatia isquêmica, pneumonia e tuberculose (TB) pulmonar. A existência de casos de câncer na família também foi avaliada, com a maioria dos participantes reportando ausência de casos em familiares (Tabela 2).

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos indivíduos incluídos no grupo de casos da pesquisa.

AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS
1	Idade: 44 Localização primária do tumor: assoalho de boca Estadiamento: cT2N2M0 - IV Tabagismo: tabagista Etilismo: etilista Outras doenças: pneumonia e TB pulmonar Casos de câncer na família: não
2	Idade: 56 Localização primária do tumor: palato mole Estadiamento: T4N3M0 - IV Tabagismo: tabagista Etilismo: etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
3	Idade: 56

	Localização primária do tumor: amígdala esquerda Estadiamento: T3N3M0 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: HAS Casos de câncer na família: não
4	Idade: 56 Localização primária do tumor: base de língua Estadiamento: cT4acN3Mx Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
5	Idade: 58 Localização primária do tumor: base de língua Estadiamento: T2N1M0 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: sim
6	Idade: 60 Localização primária do tumor: base de língua Estadiamento: cT3N2cM0 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
7	Idade: 60 Localização primária do tumor: amígdala direita Estadiamento: cT4N1M0 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: DM II, HAS

	Casos de câncer na família: não Realizou a coleta antes de iniciar qualquer tratamento e após a radioterapia.
8	Idade: 65 Localização primária do tumor: assoalho de boca Estadiamento: cT2N0 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
9	Idade: 67 Localização primária do tumor: base de língua Estadiamento: T2N2Mx Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: nega Outras doenças: HAS, DM, IAM Casos de câncer na família: sim
10	Idade: 70 Localização primária do tumor: palato mole Estadiamento: T2N2c Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: sim
11	Idade: 85 Localização primária do tumor: trígono retromolar Estadiamento: não realizou Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não Realizou a coleta antes de iniciar qualquer tratamento e após a radioterapia.

12	Idade: 105 Localização primária do tumor: amígdala Estadiamento: TxN2 Tabagismo: ex-tabagista Etilismo: ex-etilista Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
----	--

Legenda: ¹Sistema TNM: T (extensão do tumor em cm), N (ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais) e M (ausência ou presença de metástase à distância).

As características clínicas dos indivíduos saudáveis incluídos no grupo controle, cujas amostras foram submetidas ao sequenciamento estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Características clínicas dos indivíduos saudáveis incluídos no grupo controle da pesquisa.

AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
1	Idade: 42 Tabagismo: não Etilismo: não Outras doenças: não Casos de câncer na família: não
2	Idade: 45 Tabagismo: não Etilismo: não Outras doenças: não Casos de câncer na família: sim

Dos indivíduos que realizaram a segunda coleta, pós-tratamento radioterápico, um dos pacientes foi submetido a radioterapia concomitante a quimioterapia e outro a radioterapia exclusiva, sendo que este último não realizou quimioterapia por apresentar um baixo *clearance* de creatinina (24,9 ml/min). Nas duas situações, a finalidade foi radical. A técnica utilizada foi a 3D, com a dose total de 70 Gy distribuídos em 35 sessões, que por sua vez foram divididas em duas fases, onde a primeira fase correspondia a dose na cadeia de drenagem, que em um paciente foi de 54 Gy, em 27 sessões, e no outro, 50 Gy, em 25 sessões, e a segunda fase que correspondia ao complemento de dose no tumor, que em um paciente foi de 16 Gy, em 8 sessões

e no outro de 20 Gy, em 10 sessões. O tratamento de quimioterapia foi realizado em 5 ciclos semanais com cisplatina (CDDP) 40mg/m².

4.2 MIRNAS IDENTIFICADOS NO SEQUENCIAMENTO

De todas as amostras incluídas no estudo, 2.873 miRNAs foram identificados, sendo que 2.593 foram detectadas no grupo de casos (2.311 em indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento e 282 em indivíduos após a radioterapia) e 280 foram detectadas no grupo controle (Figura 3), incluídos os miRNAs repetidos.

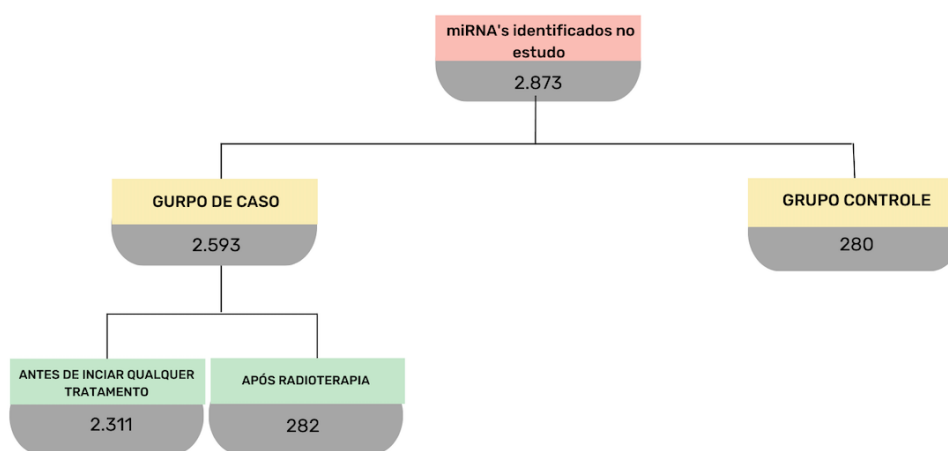


Figura 3 - Total de miRNAs identificados no estudo.

Em cada grupo foram identificados os miRNAs repetidos e realizada a soma do número destas leituras. Posteriormente, foi realizada a exclusão daqueles com menos de 10 leituras, identificando um total de 444 miRNAs, sendo que 339 miRNAs foram detectados no grupo de casos (262 em indivíduos antes da iniciar qualquer tratamento e 77 em indivíduos após radioterapia) e 105 no grupo controle (Figura 4).

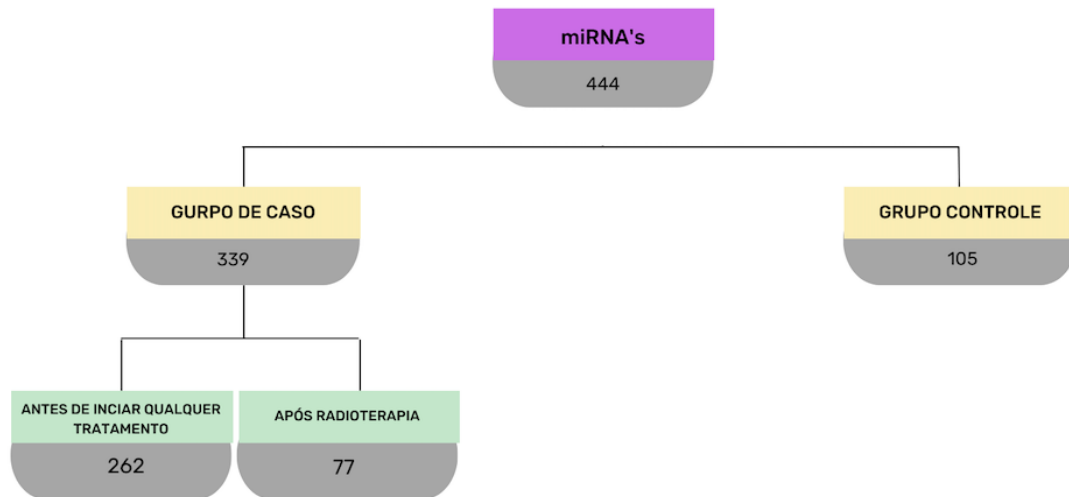


Figura 4- Total de miRNAs identificados no estudo após a exclusão dos que tinham menos de 10 leituras.

Desses 444 miRNAs, 156 foram visualizados exclusivamente no subgrupo de casos antes de iniciar qualquer tratamento (roxo), e 3 estavam presentes no grupo controle (verde). Aqueles identificados em indivíduos após a radioterapia (amarelo) também foram detectados nos demais grupos. Destes, 73 miRNAs foram identificados também no subgrupo de indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento e no grupo controle (amarelo, roxo e verde), enquanto 4 miRNAs foram comuns ao subgrupo de indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento (amarelo e roxo). Além disso, foram identificados 29 miRNAs comuns aos subgrupos de indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento e grupo controle (roxo e verde) (Figura 5).

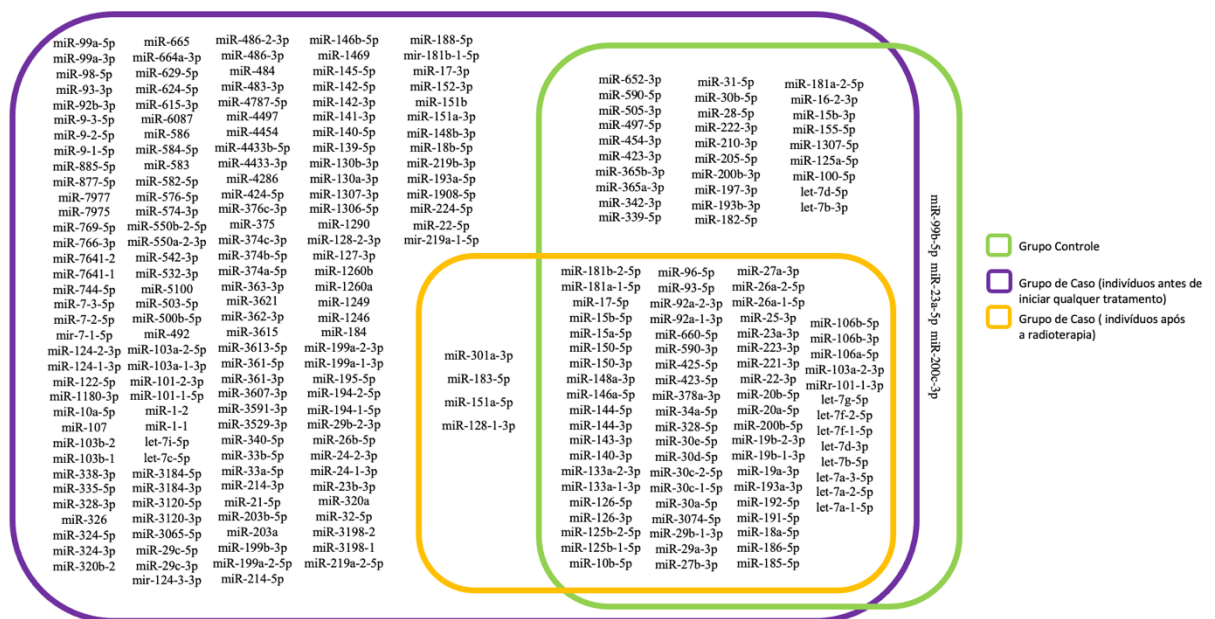


Figura 5 – Panorama dos miRNAs identificados nos grupos de casos e controle após a exclusão dos que tinham menos de 10 leituras.

Ao verificar em cada grupo os miRNAs com mais de 10 leituras e que apareceram em mais de 80% das amostras do grupo de casos antes de iniciar qualquer tratamento e em todas as amostras após a radioterapia e do grupo controle, foi possível identificar um total de 169, sendo 114 no grupo de casos (42 antes de iniciar qualquer tratamento e 72 após a radioterapia) e 55 no grupo controle (Figura 6).

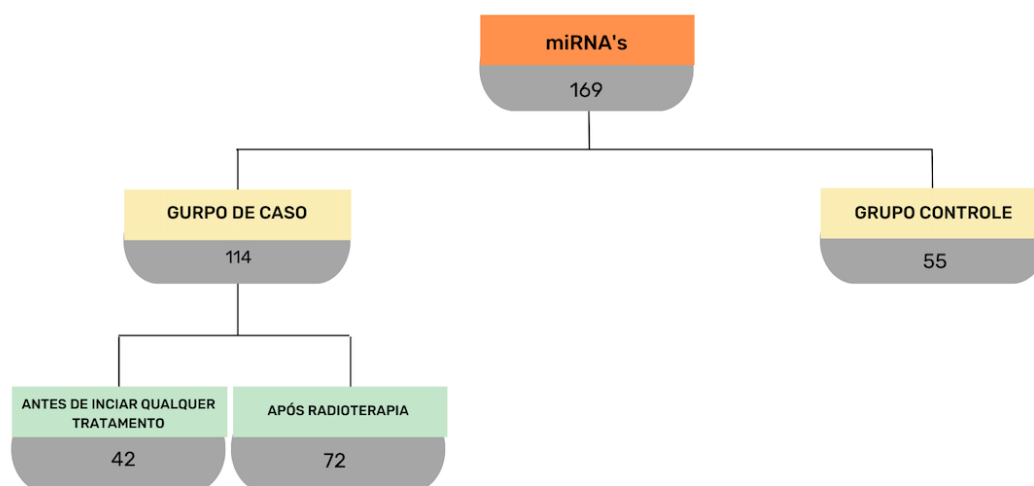


Figura 6 - MiRNAs com mais de 10 leituras e que apareceram em todas as amostras do grupo de casos pós-radioterapia e controle e em mais de 80% das amostras do grupo de casos antes da radioterapia.

Do total de 169 miRNAs selecionados após a aplicação dos critérios de seleção, 24 foram detectados em todos os grupos, 4 apareceram somente nos indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento e após a radioterapia e 22 apareceram no grupo controle e após a radioterapia. Quanto aos exclusivos em cada grupo, 14 apareceram nos indivíduos antes de iniciar qualquer tratamento, 22 nos pacientes após a radioterapia e 9 no grupo controle (Figura 7).

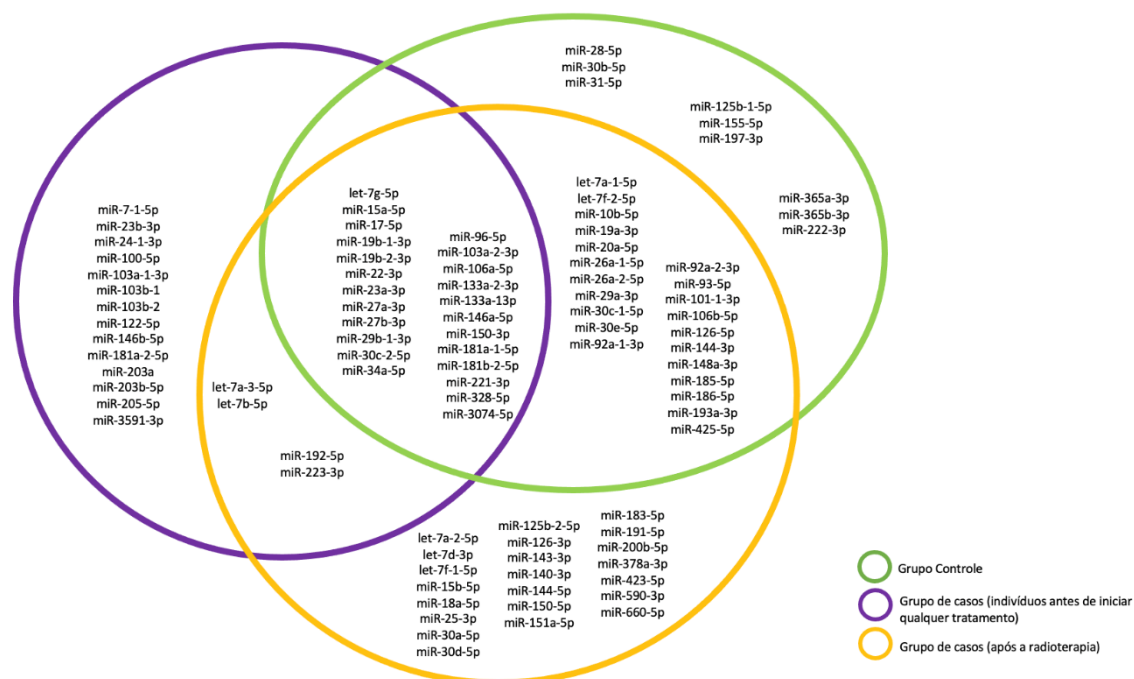


Figura 7 – Panorama dos miRNAs identificados em mais de 80% das amostras do grupo de casos antes da radioterapia e em todas as amostras do grupo de casos pós-radioterapia e controle.

4.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA EM AMOSTRAS INDEPENDENTES DE BANCOS DE DADOS

4.3.1 miRNAs diferencialmente expressos

Foram identificados diferentes miRNAs, tanto no conjunto de dados do GEO DataSets quanto no nosso sequenciamento. No entanto, considerando os miRNAs comuns aos dois estudos, pôde-se analisar a expressão dos seguintes pelo GEO DataSet. Os miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-191-5p e miR-223-3p estavam diferencialmente expressos nos grupos de pacientes com a doença (valor de $p < 0,05$) e foram considerados com expressão levemente aumentada, uma vez que apresentaram o valor de $\log FC > 1$, conforme Tabela 4. O miR-15b-5p e o miR-25-3p não apresentaram diferenças significativas em sua expressão (valor de $p > 0,05$).

Tabela 4 – Análise de expressão dos miRNAs identificados no conjunto de dados do GEO DataSets e no nosso sequenciamento.

miRNAs	logFC	p. Value
miR-15b-5p	1.12	0.07872
miR-25-3p	1.10	0.06553

miR-30d-5p	1.10	0.00692
miR-122-5p	1.15	0.00362
miR-126-3p	1.15	0.00049
miR-150-5p	1.01	0.02666
miR-191-5p	1.23	0.00319
miR-223-3p	1.23	0.01252

4.3.2 Previsão de genes-alvos

A partir dos miRNAs identificados acima, um total de 2.377 genes-alvos foram obtidos por meio da análise no TargetScan e miRDB, sendo 829 genes-alvos de miR-30d-5p, 318 genes-alvos de miR-122-5p, 31 genes-alvos de miR-126-3p, 540 genes-alvos de miR-150-5p, 83 genes-alvos de miR-191-5p e 576 genes-alvos de miR-223-3p. A previsão de genes-alvos não foi realizada para o miR-15b-5p e miR-25-3p por não apresentarem diferença de expressão significativa (valor de $p > 0,05$).

Após combinar os dados por miRNA, os genes comuns aos bancos TargetScan e miRDB foram selecionados, resultando em um total de 196 genes, sendo 6 genes-alvos de miR-30d-5p, 45 genes-alvos de miR-122-5p, 3 genes-alvos de miR-126-3p, 61 genes-alvos de miR-150-5p, 7 genes-alvos de miR-191-5p e 74 genes-alvos de miR-223-3p. Os genes PAX5 e HSP90B1 apareceram em mais de um miRNA (Figura 8), perfazendo assim um total de 194 genes comuns aos dois bancos.

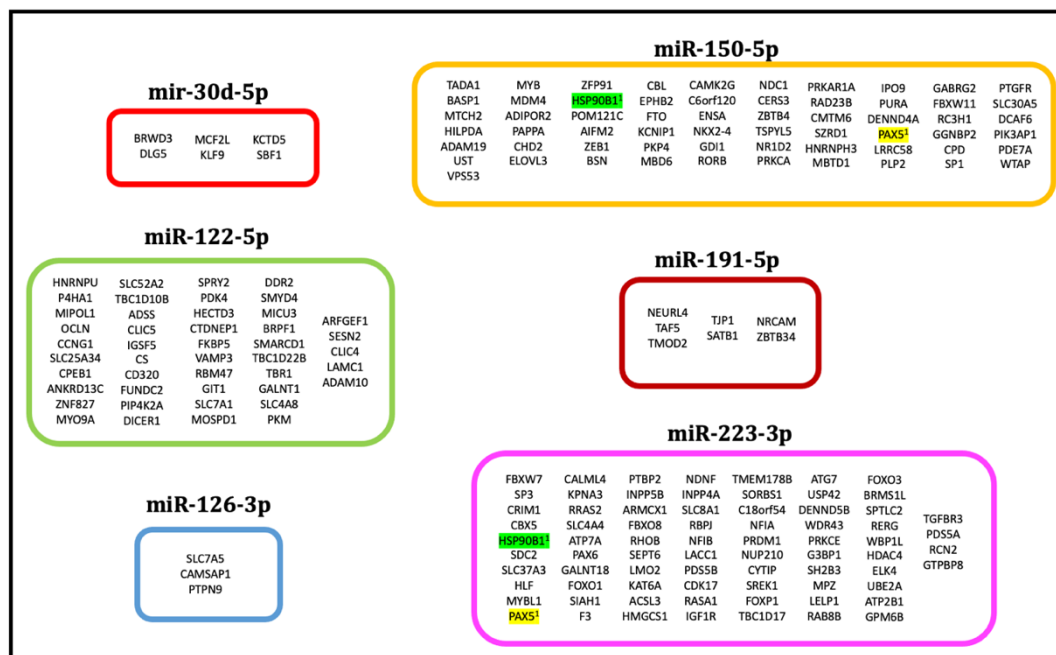


Figura 8 - Genes-alvos comuns aos bancos de dados TargetScan e miRDB. Legenda: 1. HSP90B1 e PAX5 identificados no miR-150-5p e no miR-223-3p.

4.3.3 Análise funcional dos genes-alvos identificados pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO)

A análise funcional dos 194 genes-alvos previstos para o miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-191-5p e miR-223-3p foi realizada pela ferramenta DAVID. Desta análise, foram detectadas 172 anotações do GO, sendo 94 na categoria de Processo Biológico (BP), 45 na categoria de Compartimento Celular (CC) e 33 na categoria de Função Molecular (MF), além de 16 vias biológicas pela KEGG.

A via biológica da KEGG que apresentou um enriquecimento significativo ($p < 0,05$) e agregou um maior número de genes foi a *MicroRNAs in cancer* ($p = 9,5E-3$ /contagem=10/194) e as anotações do GO foram *nucleus* na categoria CC (contagem=92/194; $p = 2,20E-8$) e *protein binding* na categoria MF (contagem=154/194; $p = 8,3E-7$). Na categoria BP, a via *Negative regulation of transcription DNA-templated* apresentou o enriquecimento mais significativo ($p = 1,30E-05$), envolvendo 19 genes. Por outro lado, a via *Regulation of Transcription RNA polymerase II promoter* evidenciou o maior número de genes enriquecidos, com um valor de $p = 1,8E-3$.

4.3.4 Rede de Interação Proteína-Proteína (PPI)

Para construção da Rede de Interação Proteína-Proteína, os 194 genes-alvos identificados na análise *in silico* foram exportados para o banco de dados STRING. Após a

aplicação dos critérios de seleção estabelecidos (pontuação de confiança $\geq 0,7$ e exclusão das proteínas desconectadas da rede), foi possível gerar uma rede com um número significativo de interações (50 arestas, grau médio de nó 0,518, coeficiente médio de agrupamento local 0,255, número de arestas esperado 34 e valor de p de enriquecimento 0,00638), conforme Figura 9.

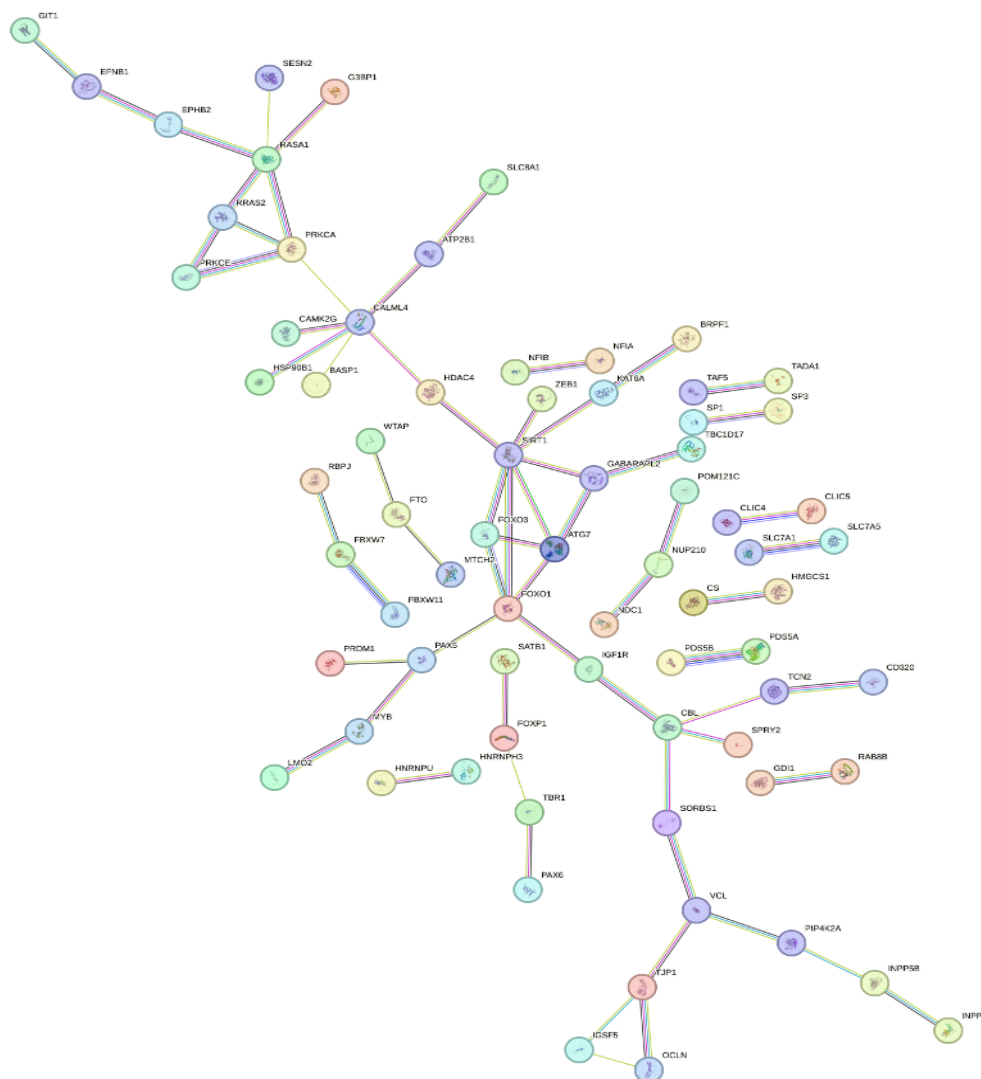


Figura 9 - Rede de Interação Proteína-Proteína, construída usando o STRING, com os 194 genes-alvos identificados por meio da ferramenta DAVID. Estatística da rede: 194 nós, 50 arestas, grau médio de nó 0,518, coeficiente médio de agrupamento local 0,255, número de arestas esperado 34 e valor de p de enriquecimento 0,00638.

No Cytoscape, utilizando o aplicativo MCODE, foi possível detectar e classificar uma rede de PPI em 03 regiões densamente interconectadas. Duas dessas regiões apresentaram pontuações de 3.000 (Figuras 10A e 10B), enquanto a terceira região, com melhor classificação, alcançou uma pontuação de 3.333 (Figura 10C). Os 10 genes principais foram obtidos usando o algoritmo MCC pelo cytoHubba (Figura 11), outro aplicativo disponível no Cytoscape.

Destes genes principais, 06 também foram identificados nas regiões interconectadas, sendo eles os genes PRKCA, RRAS2, RASA1, CALML4, PAX5 e FOXO1.

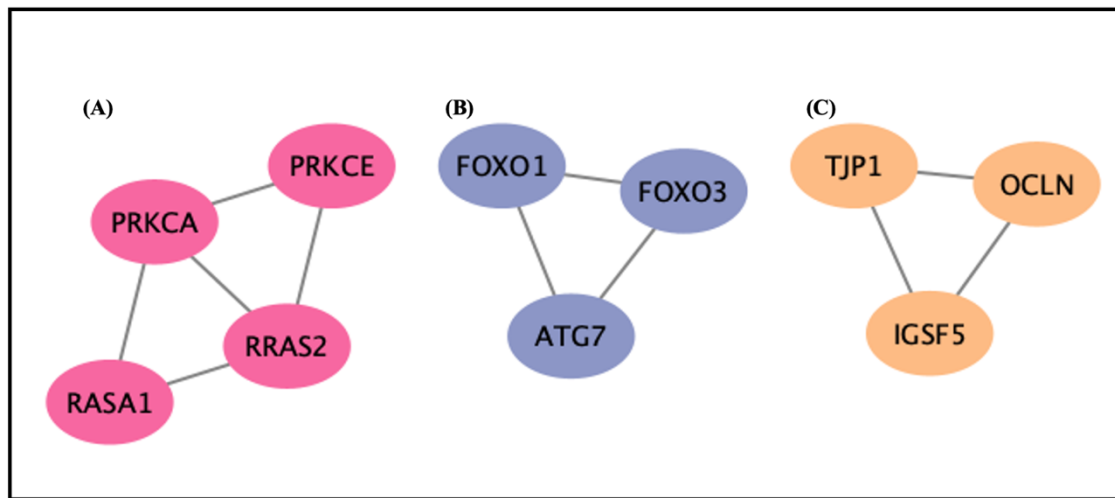


Figura 10 - As 03 regiões densamente interconectadas da rede de PPI identificadas pelo aplicativo MCODE do Cytoscape, em que (A) e (B) correspondem às regiões com pontuação de 3.000 e (C) a com a melhor classificação alcançando a pontuação de 3.333.

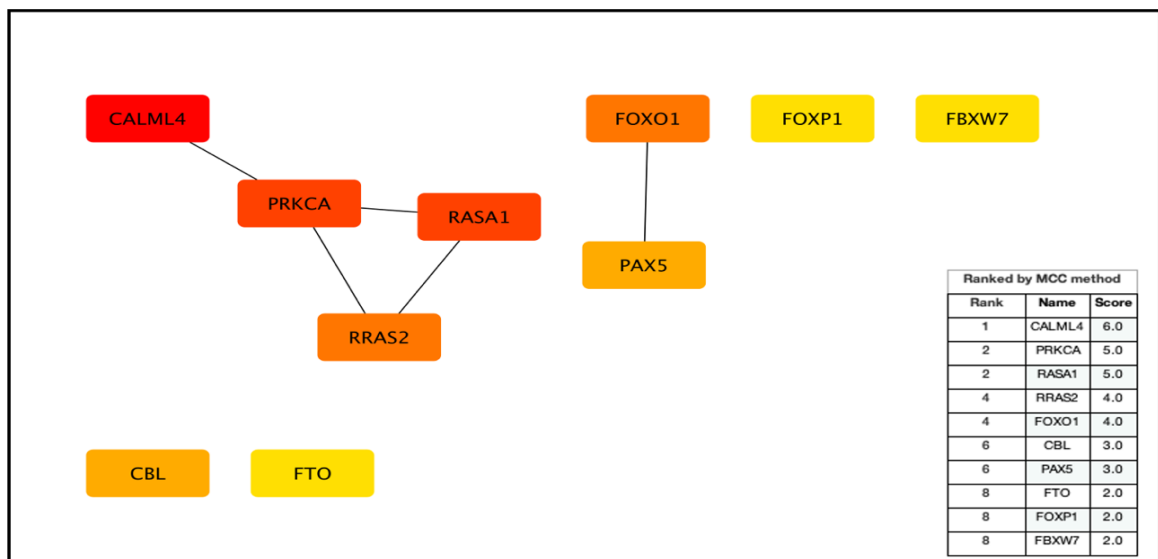


Figura 11 - Principais genes da rede PPI identificados pelo aplicativo cytoHubba do Cytoscape. A diferenciação de cores nos nós representam as pontuações geradas pelo método MCC, conforme apresentado no ranking da figura.

4.3.5 Interação miRNAs-Proteínas-Vias/Anotações

Todos os principais genes da rede PPI (Figura 11) foram previstos para o miR-150-5p e miR-223-3p, mesmo aqueles que não foram identificados nas regiões interconectadas (Figura 10). Dos genes detectados nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI, 04 se destacaram (PRKCA, FOXO1, RASA1 e RRAS2) por contribuírem significativamente para as

anotações e a via biológica que apresentaram o menor valor de p e maior número de genes, de acordo com a ferramenta DAVID (Figura 12).

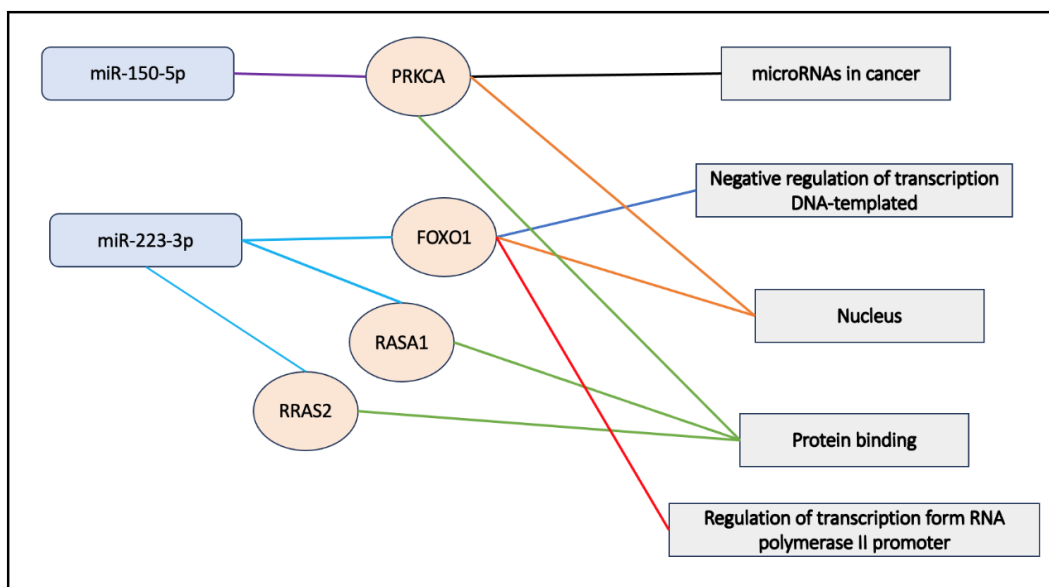


Figura 12 - Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/vias biológicas dos principais genes, detectados pelo aplicativo cytoHubba, que também foram localizados nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI, identificadas pelo aplicativo MCODE.

Dos genes principais que não foram identificados nas regiões interconectadas da Rede de PPI (Figura 13), o FTO, CBL, PAX5, FBXW7, FOXP1, e merecem destaque por contribuírem para anotações do GO, nas categorias CC e MF. Por outro lado, o gene CALML4 não teve contribuição para a via biológica e nem para as anotações funcionais apresentadas neste estudo.

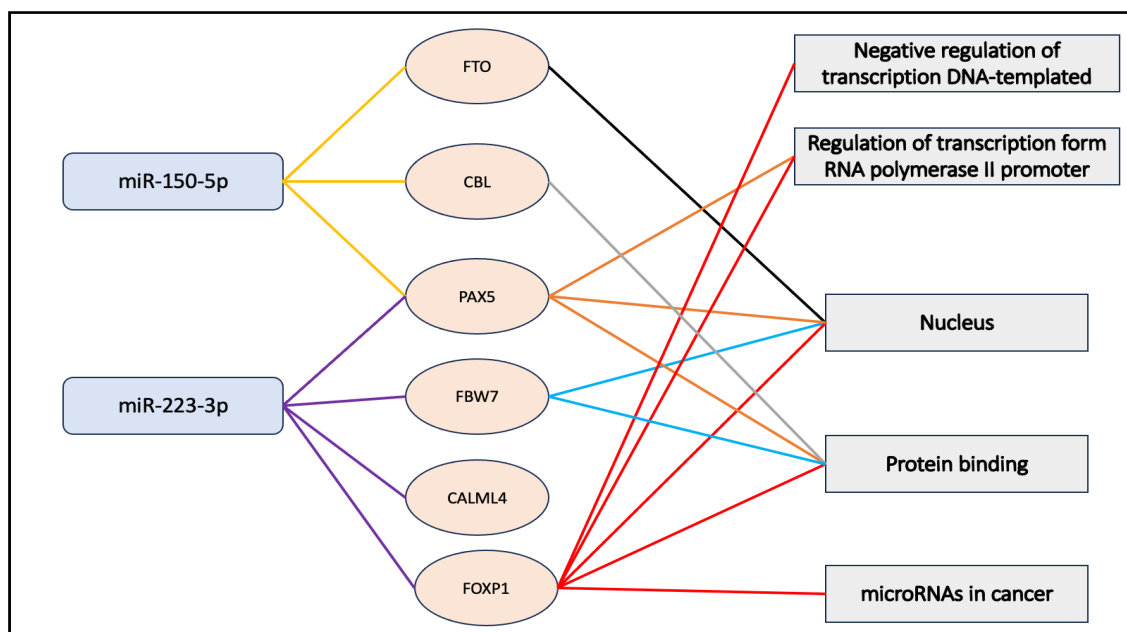


Figura 13 - Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/vias biológicas dos genes principais, detectados pelo aplicativo cytoHubba, que não foram identificados nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI conforme aplicativo MCODE.

Dos genes que apareceram somente nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI, o OCLN, IGSF5, TJP1, PRKCE, FOXO3 e ATG7, contribuíram para a via KEGG e as anotações do GO, na BP, CC e MF. Quanto a previsão dos miRNAs, esses genes foram previstos como alvos do miR-122-5p, miR-191-5p e miR-223-3p(Figura 14).

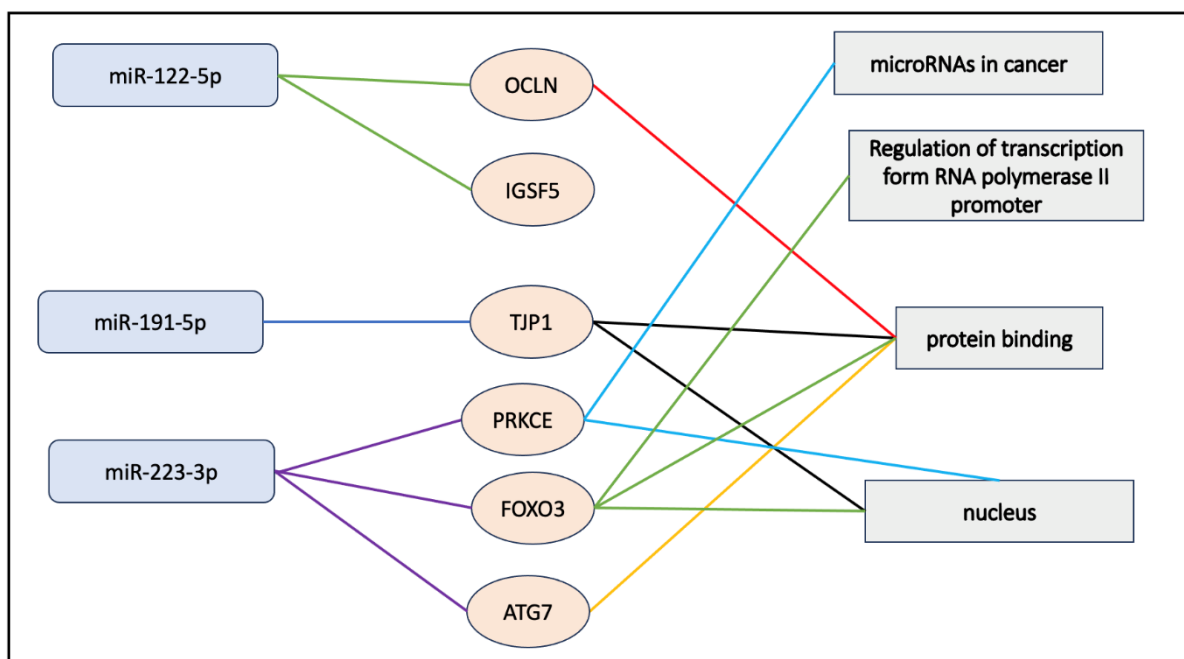


Figura 14- Interação entre miRNAs-proteínas-anotações/via biológica dos genes detectados exclusivamente nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI identificadas pelo aplicativo MCODE.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nas pesquisas em CCE de cavidade oral e/ou orofaringe, a taxa de sobrevivência destes pacientes em cinco anos segue preocupante. Em vista disso, identificar miRNAs associados a essa neoplasia e investigar os processos biológicos relacionados ao seu desenvolvimento podem viabilizar novas abordagens terapêuticas e auxiliar na detecção precoce e monitoramento.

Neste estudo, identificamos um conjunto de miRNAs, que de acordo com a literatura científica, desempenham papéis significativos nos mecanismos biológicos de vários tipos de câncer. Para uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos envolvidos no CCE em cavidade oral e/ou orofaringe, discorreremos sobre aqueles que foram detectados exclusivamente no grupo de casos do nosso sequenciamento e os comuns ao GEO que foram posteriormente analisados com ferramentas de bioinformática.

Entre os miRNAs identificados somente em nosso sequenciamento que também foram verificados em outros estudos sobre câncer podemos destacar o miR-7-1-5p (CARRON et. al, 2020), miR-23b-3p (RISHABH et.al, 2021), miR-100-5p (CARRON et. al, 2020; JACKOB et. al, 2019), miR-146b-5p (LI et. al, 2021; HE et. al, 2023), miR-203a e miR-203b-5p (CARRON et. al, 2020; RISHABH et.al, 2021), miR-205-5p (CARRON et. al, 2020; RISHABH et.al, 2021; AGOSTINO et. al, 2018; KOLEDA et.al, 2019; ZHOU et. al, 2020) que foram identificados antes de iniciar qualquer tratamento, o miR-192-5p (ZHU et. al, 2020) que foi identificado tanto antes de iniciar qualquer tratamento quanto após a radioterapia e o let-7d-3p (LAMPRESKA et. al, 2017), miR-125b-2-5p (CARRON et. al, 2020; RISHABH et.al, 2021), miR-200b-5p (CARRON et. al, 2020), miR-143-3p (SUN; ZHANG, 2017; GOLABEK et. al, 2023), miR-144-5p (MANASA; THOMAS; KANNAN, 2023), miR-378a-3p (LI et. al, 2021; GHFFAR et.al, 2022), miR-423-5p (PALAIA et. al, 2022) e miR-660-5p (RISHABH et.al, 2021) que foram identificados após a radioterapia.

Daqueles identificados nas amostras antes de iniciar qualquer tratamento, o miR-7-5p apresentou-se na literatura científica com expressão aumentada em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Em contraste, os demais miRNAs desse conjunto, como o miR-23b-3p (RISHABH et.al, 2021), miR-100-5p (CARRON et. al, 2020; JACKOB et. al, 2019), miR-146b-5p (HE et. al, 2023; LI; ZHOU; LI; XIANG, 2020), miR-200b-5p (CARRON et. al, 2020) e miR-203a (CARRON et. al, 2020; RISHABH et.al, 2021) e miR-203b-5p (CARRON et. al, 2020; RISHABH et.al, 2021) apresentaram diminuição na expressão em pacientes com carcinoma de células escamosas em cavidade oral. Para o miR-205-5p, foram identificadas evidências tanto de diminuição quanto de aumento em sua expressão no câncer.

Além da identificação dos níveis de expressão desses miRNAs, para melhor compreensão da função dessas moléculas no contexto do câncer, é de fundamental importância a avaliação dos desfechos clínicos dos pacientes destes estudos, uma vez que isso poderá viabilizar o desenvolvimento de abordagens voltadas para o diagnóstico, prognóstico e terapias personalizadas. Dessa forma, em algumas pesquisas destaca-se que o aumento da expressão do miR-7-5p pode estar associada a um prognóstico desfavorável para pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Por outro lado, os miRNAs mencionados na literatura tendo a expressão diminuída não apenas parecem estar relacionados a um pior prognóstico (como observado no miR-23b-3p e miR-100-5p), mas também à proliferação celular aumentada (miR-23b-3p), maior agressividade do tumor (miR-23b-3p e miR-100-5p), desenvolvimento e progressão tumoral (miR-200b e miR-203), ou inibição na proliferação, migração e capacidade de invasão celular (miR-146b-5p) (CARRON et. al, 2020; JACKOB et. al, 2019; RISHABH et.al, 2021; LI; ZHOU; LI; XIANG, 2020).

O miR-205-5p foi considerado um potencial biomarcador para pacientes com câncer de cabeça e pescoço e dependendo do contexto tumoral específico e dos genes-alvo, pode atuar tanto como um supressor tumoral quanto oncogene (AGOSTINO et. al, 2018). Nos pacientes com câncer oral e de orofaringe, principalmente em tumores avançados, a expressão diminuída deste miRNA está associada a diminuição da invasão tumoral (RISHABH et.al, 2021) e, de forma contrastante, a um pior prognóstico (CARRON et. al, 2020; KOLEDA et.al, 2019). Já a expressão aumentada, observada em amostras tumorais e de soro, foi significativamente associada a proliferação e invasão celular, podendo promover a oncogênese a partir da diminuição da expressão das proteínas PTEN e Bcl-6 (ZHOU et. al, 2020).

Do conjunto de miRNAs identificados em nosso estudo exclusivamente nas amostras após a radioterapia, o miR-125b-5p e miR-143-3p apresentaram expressão diminuída em algumas pesquisas realizadas em pacientes com câncer oral (CARRON et. al, 2020; JACKOB et. al, 2019; SUN; ZHANG, 2017; GOLABEK et. al, 2023) enquanto o let-7d-3p (LAMPRESKA et. al, 2017), o miR-144-5p (MANASA; THOMAS; KANNAN, 2023), miR-378a-3p (LI et. al, 2021; MANASA; THOMAS; KANNAN, 2023), miR-423-5p (PALAIA et. al. 2022) e miR-660-5p (RISHABH et.al, 2021) apresentaram aumento da expressão.

Quanto ao papel desses miRNAs no câncer oral, a expressão reduzida do miR-143 suprime a proliferação, migração e invasão de células de câncer oral (SUN; ZHANG, 2017) e a do miR-125b tem sido relacionada à agressividade tumoral, ao aumento da proliferação celular, a um pior prognóstico e, adicionalmente, está associada à resistência à radioterapia, provavelmente devido à modulação da sinalização da Molécula de Adesão Intercelular 2

(ICAM2) (CARRON et. al, 2020; JACKOB et. al, 2019). O miR-144-5p desempenha um papel supressor em tumores de câncer oral, inibindo a migração e invasão de células cancerígenas (MANASA; THOMAS; KANNAN, 2023) e o let-7d, está associado a um pior prognóstico (CARRON et. al, 2020; KOLEDA et.al, 2019).

Em um estudo realizado em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço, pôde-se observar que o aumento da expressão do let-7d influenciou a resposta à cisplatina. Isso sugere que o status deste miRNA pode afetar a eficácia desse medicamento, provavelmente através da regulação direta ou indireta de genes envolvidos na apoptose e da repressão de genes que promovem a autorrenovação. Além disso, em experimentos com irradiação, a hiperexpressão desse miRNA foi associada à radioresistência (KOLEDA et.al, 2019).

Todos os miRNAs identificados tanto no sequenciamento quanto no conjunto de dados do GEO (miR-15b-5p, miR-25p-3p, miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-191-5p e miR-223-3p) estão descritos na literatura científica.

O miR-15b-5p e o miR-25-3p, identificados em nosso estudo exclusivamente nos indivíduos pós-radioterapia, apresentaram expressão levemente aumentada ($p > 0,05$). De acordo com Ahmad et. al., 2019, a expressão aumentada do miR-15b-5p pode estar relacionada a uma sobrevida livre de recaída locorregional de pacientes com carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço. Ao realizar uma análise de regressão de Cox multivariável, juntamente com outros marcadores clínicos e patológicos, os autores revelaram que este miRNA está significativamente associado ao tempo de controle locorregional (LRC), mostrando-se como um biomarcador potencialmente útil para decisões de tratamento individualizadas relativas ao manejo de pacientes com este tipo de câncer.

Já o miR-25-3p, em um outro estudo destinado a investigar os seus efeitos na ocorrência, desenvolvimento e proliferação de carcinoma de células escamosas da língua evidenciou que sua expressão aumentada inibiu, na linhagem de células utilizada, a proliferação celular pela inibição da via de sinalização AKT/FOXO, regulando as proteínas relacionadas ao ciclo celular. (XU et.al, 2013).

Apesar da ausência de evidências científicas robustas que associem o miR-30d-5p, miR-122-5p e o miR-126-3p ao CCE em cavidade oral e/ou orofaringe, existem algumas publicações que prospectam sua relação com vários outros tipos de câncer. Para o miR-30d-5p, destaca-se o carcinoma de células escamosas pulmonar, em que a expressão diminuída pode estar relacionada a proliferação, migração e invasão de células tumorais (QI; HOU; QI, 2021; ZHAO; YAN; ZHENG; XUE, 2022), o carcinoma de células escamosas da vesícula biliar, onde a expressão diminuída pode estar associada a diminuição da sobrevida (ZHAO; YAN; ZHENG;

XUE, 2022; HE et. al, 2018) e o carcinoma de células escamosas do esôfago, em que a expressão aumentada pode estar associada a diminuição da proliferação e invasão tumoral (ZHAO; YAN; ZHENG; XUE, 2022; WANG et. al, 2020).

Estudos indicam que a expressão diminuída do miR-122-5p no câncer gástrico pode ser responsável por inibir a proliferação, migração e invasão celular (MENG et. al, 2020; JIAO; ZHANG; LI; HE; ZHANG; LI, 2021). Por outro lado, para o miR-126-3p destaca-se o carcinoma hepatocelular avançado, em que a elevada expressão deste miRNA pode estar relacionada a uma maior resistência ao medicamento sorafenibe, devido ao direcionamento do SPRED1 e da ativação da via de sinalização ERK (TAN et. al, 2021).

O miR-191-5p apresentou expressão aumentada em indivíduos com câncer de mama ($p=3,7e-10$). Além disso, a análise ROC mostrou que ele, individualmente ($AUC=0,904$) ou em combinação com o miR-145-5p ($AUC=0,984$), permite diferenciar com precisão os pacientes com câncer de mama de indivíduos saudáveis, sugerindo seu potencial como biomarcador diagnóstico para este tipo de câncer (ARSHIRBEKOV et. al, 2020).

Com o auxílio das análises de bioinformática realizadas neste estudo, verificamos que o miR-150-5p e miR-223-3p se destacaram devido à variedade de genes que possivelmente regulam, podendo desempenhar importantes papéis no desenvolvimento e progressão do CCE em Cavidade Oral e/ou Orofaringe. Contudo, é importante ressaltar que a relação destes miRNAs com esta doença ainda é pouco explorada pela literatura científica, sendo necessária a realização de mais estudos para validarmos esses achados.

Em um estudo prévio, o miR-150-5p estava entre os três miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos com leucoplasia oral, câncer oral e indivíduos saudáveis apresentando nível de expressão aumentada no grupo de indivíduos com câncer oral. Na análise de regressão logística conduzida para determinar a eficácia diagnóstica das três assinaturas, descobriu-se que este miRNA pode ser considerado um preditor independente significativo para o câncer oral ($RR=1.189$, $p<0.001$ para univariado; $RR=1.198$, $p=0.001$ para multivariado) (CHANG et. al, 2021).

Em um outro estudo, foi possível identificar 19 genes previstos para miR-150-5p e miR-150-3p em células de CCE de Cabeça e Pescoço. Notavelmente, 5 deles (SPOCK1, TIMP4, CAV2, NUBPL e KLHL29) foram associados a um prognóstico desfavorável para essa neoplasia. O SPOCK1 foi o gene que apresentou o maior impacto na taxa de sobrevivência, uma vez que os pacientes com alta expressão dele tiveram sobrevida significativamente menor do que aqueles com baixa expressão. Os resultados desta pesquisa indicaram que a regulação

negativa do miR-150-5p e a superexpressão de SPOCK1, podem potencializar a agressividade tumoral (KOSHIZUKA et. al, 2018).

Para o miR-223-3p, seus níveis elevados parecem estar associados a um mau prognóstico do CCE de cabeça e pescoço. Além disso, o miR-223-3p pode regular a progressão deste câncer ao mediar a Transição Epitelial-Mesenquimal (“Epithelial-Mesenchymal Transition” -EMT), bem como parece estar envolvido na regulação do metabolismo energético através da via de sinalização AMP-activated Protein Kinase (AMPK) (ZHAO et. al, 2020).

Em relação aos genes-alvos destacados em nosso estudo, o PRKCA, previsto para o miR-150-5p, e os RRAS2, RASA1 e FOXO1, previstos para o miR- 223-3p, foram considerados genes relevantes por serem identificados tanto no grupo de genes principais quanto nas regiões densamente interconectadas da rede de PPI. Além disso, contribuíram significativamente para anotações e via biológica designadas de acordo com os critérios pré-estabelecidos.

No CCE em cavidade oral, a superexpressão do PRKCA foi associada a uma pior sobrevida (PARAZEFALL et. al, 2021; SAPROO et. al, 2023) e à resistência terapêutica (SAPROO et. al, 2023). De maneira similar, a superexpressão de RRAS2 foi correlacionada com uma pior sobrevida geral dos indivíduos acometidos por esta neoplasia (WU et. al, 2020). O fator de transcrição FOXO1, por sua vez, tem relação com a regulação da progressão do ciclo celular, apoptose e estresse oxidativo. Além disso, outros estudos relatam miRNAs, como miR-196a, que regulam negativamente a expressão de FOXO1, inibindo posteriormente a apoptose e desencadeando a proliferação e a migração no OSCC (REMADEVI, MURALEEDHARAN, SREEJA, 2021; CHAN et. al, 2017).

O RASA1, pertencente à família RasGAP, desempenha um papel crucial como regulador do Ras GDP e GTP, influenciando inúmeros processos fisiológicos, como crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose. Além disso, contribui para processos patológicos, em doenças vasculares e formação de tumores. A mutação em RASA1 ou inativação epigenética foi revelada em vários cânceres, incluindo câncer de pulmão, colorretal, de fígado, de mama e tumores ginecológicos (ZHANG et. al, 2020).

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, identificamos uma complexa rede de miRNAs associados ao CCE em cavidade oral e/ou orofaringe. Os alvos gênicos, a análise funcional e a criação da rede de PPI para os miRNAs específicos identificadas, trouxeram como destaque o miR-150-5p e miR-223-3p, indicando como eles podem influenciar a expressão e função de genes no câncer oral e/ou

de orofaringe e sobre seus mecanismos moleculares na carcinogênese. Estas descobertas lançam base para realização de investigações mais aprofundadas, incluindo estudos que possam validar o potencial desses miRNAs como biomarcadores para diagnóstico, prognóstico ou no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHIORGHIESEI, O et.al. **The World of Oral Cancer and Its Risk Factors viewed from the aspect of microRNA.** *Expression Paterns Genes* (2022) 13: 594. doi: <https://doi.org/10.3390/genes13040594>
- AGOSTINO, SD et. al. **Long non-coding MIR205HG depletes hsa-miR-590-3p leading to unrestrained proliferation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Theranostics* (2018) 8(7):1850-1868. doi: <https://doi.org/10.7150/thno.22167>
- AHMAD, P et. al. **MicroRNA-15b-5p predicts locoregional relapse in Head and Neck Carcinoma Patients treated with intensity-modulated radiotherapy.** *Cancer Genomics Proteomics* (2019) 16(2):139-146. doi: <https://doi.org/10.21873%2Fcgp.20119>
- AHMAD, P et. al. **MicroRNAs involvement in Radioresistance of Head and Neck Cancer.** *Disease Markers* (2017) 2017: 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8245345>
- ALGUDAIBI, LY et. al. **Oral and oropharyngeal cancer: knowledge, attitude and pratices among medical and dental practitioners.** *Cancer Reports* (2021) 4: 110.3390/genes13040594-10. doi: <https://doi.org/10.1002/cnr2.1349>
- ARSHIRBEKOV, Y et. al. **Combination of circulating miR-145-5p/miR-191-5p as biomarker for breast cancer detection.** *Peer J* (2020) 8: e10494. doi: <https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.10494>
- BADER, GD; HOGUE, CWV. **Na automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks.** *BMC Bionformatics* (2003) 2: (2003). Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/2>
- BURCHER et. al. **Bioactive phytochemicals for oral cancer prevention and treatment: A comprehensive and critical evaluation.** *Med Res Rev* (2023) 43(6): 2025-2085. doi: <https://doi.org/10.1002/med.21969>
- CAO, M et. al. **Personalized Targeted Therapeutic Strategies against Oral Squamous Cell Carcinoma. An Evidence-Based Review of Literature.** *International Journal of Nanomedicine* (2022) 17:4293-4306. doi: <https://doi.org/10.2147/ijn.s377816>
- CARRON, J et. al. **microRNAs deregulation in head and neck squamous cell carcinoma.** *Head&Neck* (2020) 43(2):645-667. doi: <https://doi.org/10.1002/hed.26533>
- CHAN, CY et. al. **Transcription factor HBP1 is a direct anti-cancer target of transcription factor FOXO1 in invasive oral cancer.** *Oncotarget* (2017) 8(9):14537-14548. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14653>
- CHANG, YA et. al. **A three-microRNA signature as a potential biomarker for the early detection of oral cancer.** *International Journal of Molecular Sciences MDPI* (2021) 19(3):758. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19030758>
- CHEN, Y; WANG, X. **miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets.** *Nucleic Acids Research* (2020) 48(D1): D127-D131. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1104>
- CHIN, CH et.al. **cytoHubba: identifying hub objects and subnetworks from complex interactome.** *BMC Systems Biology* (2014) 8(Suppl 4): S11. doi: <https://doi.org/10.1186%2F1752-0509-8-S4-S11>

- CRIMI S et. al. **Droplet Digital PCR Analysis of liquid biopsy samples unveils the diagnostic role of has-miR-133a-3p and has-miR-375-3p in Oral Cancer.** *Biology (Basel)* (2020) 6:9(11):379. doi: <https://doi.org/10.3390/biology9110379>
- DASHANTAN, NA et. al. **Integrated bioinformatics analysis of mRNAs and miRNAs identified potential biomarkers of oral squamous cell carcinoma.** *Asian Pac J Cancer Prev* (2020) 21(6): 1841-1848. doi: <https://doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.6.1841>
- DHARMAWARDANA, N et.al. **Circulating microRNAs in Head and Neck cancer: a scoping review of methods.** *Clinical Exp. Metastasis* (2019) 36(3): 291-302. doi: <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09961-6>
- EMAMI et. al. **miR-155, miR-191 and miR-494 as diagnostic biomarkers for oral squamous cell carcinoma and the effects of Avastin on these biomarkers.** *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* (2020) 46:341-347. doi: <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2020.46.5.341>
- ERVE, I et. al. **Metastatic colorectal cancer treatment response evaluation by ultra-deep sequencing of cell-free DNA and matched white blood cells.** *Clin Cancer Res* 2023 29(5): 899-909. doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2538>
- ESLAMI M et. al. **miRNA-related metastasis in oral cancer: moving and shaking.** *Cancer Cell Int.* (2023) 23:182. doi: <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03022-5>
- FASANO, M et. al. **Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Elderly Patients: Role of Radiotherapy and Chemotherapy.** *Cancers* (2022) 14(3): 472. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers14030472>
- FAGERY et. al. **Health economic evidence and modeling challenges for liquid biopsy assays in cancer management: a systematic literature review.** *Pharmacoeconomics* 2023 41(10):1229-1249. doi: <https://doi.org/10.1007/s40273-023-01292-5>
- FELICE et. al. **Xerostomia and clinical Outcomes in Definitive Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) versus Three-dimensional Conformal Radiotherapy (3D-CRT) for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A meta-analysis.** *Invivo* 2020 34 (2): 623-629. doi: <https://doi.org/10.21873/invivo.11816>
- FU et. al. **Clinical analysis of second primary gingival squamous cell carcinoma after radiotherapy.** *Oral Oncology.* (2018) 84:20-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.06.018>
- GHFFARI, M et.al. **Aberrant Expression of miR-103, miR-184, miR-378, miR-497 e miR-506 in tumor tissue from patients with oral squamous cell carcinoma regulates the clinical picture of the patients.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (2022) 21(5):2020. doi: <https://doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.5.1311>
- GOLABEK, K et. al. **miR-125b-5p, miR-155-3p, and target E2F2 gene in oral squamous cell carcinoma.** *International Journal of Molecular Sciences* (2023) 24, 6320. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24076320>
- GONZALEZ, OR et.al. **miRNAs in liquid biopsy for oral squamous cell carcinoma diagnosis: Systematic review and meta-analysis.** *Oral Oncology* (2019) 99: 104465. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104465>
- HE, L et. al. **Exosomal miR-146b-5p derived from cancer associated fibroblasts promotes progression of oral squamous cell carcinoma by downregulating HIPK3.** *Cellular Signalling* (2023) 106:110635. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110635>

HE, Y et. al. **LDHLA is a direct target of miR-30d-5p and contributes to aggressive progression of gallbladder carcinoma.** *Mol Carcinogenesis* (2018) 57(6):772-783. doi: <https://doi.org/10.1002/mc.22799>

HOFMANN et. al. **Comparison of plasma – and saliva – derived Exosomal miRNA profiles reveals diagnostic potential in head and neck cancer.** *Front Cell Dev Biol* (2022) 22 (10): 971596. doi: [10.3389/fcell.2022.971596](https://doi.org/10.3389/fcell.2022.971596)

HUANG, DW; SHERMAN, BT; LEMPICK, RA. **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nature Protocols* (2009) 4:44-57. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Cancer Tomorrow.** France: IARC, 2023. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em 20 de novembro de 2023.

IRANI S. **New insights into Oral Cancer – Risk Factors and Prevention: A review of literature.** *Int J Prev Med* (2020) 11:202. PMCID: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc8000242/>

JACKOB, M. al. **MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer.** *Head&Neck* (2019) 41(10):3499-3515. doi: <https://doi.org/10.1002/hed.25866>

JAMAL Z, ANJUM F. **Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.** *StarPearls* (2023). Bookshelf ID: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk563268/>

JIAO, Y; ZHANG, L; LI, J; HE, Y; ZHANG, X; LI, J. **Exosomal miR-122-5p inhibits tumorigenicity of gastric cancer by downregulating GIT1.** *Int J Biol Markers* (2021) 36(1):36-46. doi: <https://doi.org/10.1177/1724600821990677>

KATIRACHI SK et. al. **The prevalence of HPV in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma.** *Viruses* (2023) 15(2):451. doi: <https://doi.org/10.3390/v15020451>

KIM, S; LEE, JW; PARK, YS. **The application of next-generation sequencing to define Factors related to oral cancer and discover novel biomarkers.** *Life* (2020) 10(10):228. doi: <https://doi.org/10.3390%2Flife10100228>

KOLEDA, T et.al. **Low let-7d and high miR-205 expression levels positively influence HNSCC patient outcome.** *Journal of Biomedical Science* (2019) 26:17. doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0511-3>

KOSHIZUKA, K et. al. **Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma.** *Auris Nasus Larynx* (2018) 45 (4): 854-865. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.11.019>

LAMPRESKA, KM et. al. **Different levels of let-7d expression modulate responde of FaDu cells to irradiation and chemotherapeutics.** *PLoS One* (2017) 12(6). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180265>

- LANG, K et.al. **Definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity: a single-institution experience.** *Radiology and Oncology* (2021) 55:467-473. doi: <https://doi.org/10.2478/raon-2021-0041>
- LI, J et. al. **NCAPG, mediated by mirR-378a-3p, regulates cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma through the GSK-3 β/β – catenin signaling.** *Neoplasms* (2021) 68(6):1201-1211. doi: https://doi.org/10.4149/neo_2021_210421n544
- LI, K; ZHOU, Z; LI, J; XIANG, R. **miR-146b- functions as an oncogene in oral squamous cell carcinoma by Targeting HBPI.** *Technology in Cancer Research&Treatment* (2020) 19:1-10. doi: <https://doi.org/10.1177/1533033820959404>
- MANASA, VG; THOMAS, S; KANNAN, S. **MiR-144/451a cluster synergistically modulates growth and metastasis of Oral Carcinoma.** *Oral Diseases* (2023) 29(2):584-594. doi: <https://doi.org/10.1111/odi.13984>
- MCGEARY, SE et. al. **The biochemical basis of microRNA targeting efficacy.** *Science* (2019) 366(6472). doi: <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- MENG, L et. al. **MiR-122-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting LYN.** *Acta Biochim Biophys Sin* (2020) 52(1):49-57. doi: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz141>
- MUZUMDER, S et.al. **Liquid biopsy: miRNAs as a potential biomark in oral cancer.** *Cancer Epidemiology* (2019) 58:137-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.12.008>
- NIÑO et. al. **HPV infection in oral cancer, our experience: prevalence, clinical implications, and current vaccination program in Spain.** *J Clin Exp Dent* (2023) 15(7): e584-e589. doi: <https://doi.org/10.4317/jced.60514>
- PALAIA, G et. al. **Liquid biopsy in the assessment of microRNAs in oral squamous cell carcinoma: a systematic review.** *J Clin Exp Dent* (2022) 14(10): e875-84. doi: <https://doi.org/10.4317/jced.59736>
- PANELA Q et. al. **Exosomal miRNAs are potential diagnostic biomarkers between malignant and benign thyroid nodules based on next-generation sequencing.** *Carcinogenesis* (2020) 13:41(1):18-24. doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz160>
- PARAZEFALL, T et. al. **PRKCA overexpression is frequent in young oral tongue squamous cell carcinoma patients and is associated with poor prognosis.** *Cancers* (2021) 13 (9):2082. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13092082>
- PARMAR, A. et. al. **Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy.** *Cochrane Database Sys Rev* (2021) 2021(12). doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd006386.pub4>
- PEDERSEN, NJ et. al. **MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma.** *Oral Oncology* (2018). 83: 46-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.05.020>
- PIAO, Y et. al. **A circulating microRNA panel as a novel dynamic monitor for oral squamous cell carcinoma.** *Scientific Reports Nature Research* (2023) 13:2000. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28550-y>

- POTLA P, ALI SA, KAPOOR M. **A Bioinformatics approach to microRNA-sequencing analysis.** *Osteoarthritis Cartilage Open* (2021) 3(1):100131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100131>
- QI, Y; HOU, Y; QI, L. **miR-30d-5p represses the proliferation, migration, and invasion of lung squamous cell carcinoma via targeting DBF4.** *Journal of Environmental Science and Health* (2021) 39(3):251-268. doi: <https://doi.org/10.1080/26896583.2021.1926855>
- RAJAKUMAR, T et. al. **A blood-based miRNA signature with prognostic value for overall survival in advanced stage non-small cell lung cancer treated with immunotherapy.** *NPJ Precision Oncology* (2022) 6:19. doi: <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00262-y>
- REMADEVI V, MURALEEDHARAN P, SREEJA S. **FOXO1: a pivotal pioneer factor in oral squamous cell carcinoma.** *Am J Cancer Res.* (2021) 11(10): 4700-4710. PMID: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34765288>
- RISHABH, K et.al. **MicroRNAs as modulators of oral tumorigenesis – a focused review.** *International Journal of Molecular Sciences MDPI* (2021) 22(5): 2561. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22052561>
- SANKAR, V. XU, Y. **Oral Complications from Oropharyngeal Cancer Therapy.** *Cancers (Basel)* (2023) 15 (18): 4548. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers15184548>
- SAPROO, S et. al. **Salivary protein kinase C alpha and novel microRNAs as diagnostic and therapeutic resistance markers for oral squamous cell carcinoma in Indian cohorts.** *Front. Mol. Biosci* (2023) 10:9:1106963. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1106963>
- SCHMID S et. al. **How to read a next-generation sequencing report – what oncologists need to know.** *ESMO Open* (2022) 7 (5):100570. doi: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100570>
- SCHNEIDER, A et. al. **Tissue and serum microRNA profile of oral squamous cell carcinoma patients.** *Scientific Reports Nature Research* (2018) 8(1): 675. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18945-z>
- SHANNON, P et. al. **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Research* (2003) 13:2498 – 2504. doi: <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- SHERMAN, BT et.al. **DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update).** *Nucleic Acids Research* (2022) 50(W1): W216-W221. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- SUN, X; ZHANG, L. **MicroRNA-143 suppresses oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion, and glucose metabolism through targeting hexokinase 2.** *Bioscience Reports* (2017) 37. doi: <https://doi.org/10.1042/BSR20160404>
- SZKLARCZYK, D et. al. **STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets.** *Nucleic Acids Research* (2019) 47(D1): D607-D613. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- TAN, W et. al. **miR-126-3p contributes to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma via downregulation of SPRED1.** *Ann. Transl. Med* (2021) 9(1):38. doi: <https://doi.org/10.21037/atm-20-2081>

TORAIH, et. al. **Diagnostic and prognostic performance of liquid biopsy-derived exosomal microRNAs in Thyroid Cancer Patients: a systematic review and meta-analysis.** *Cancers (Basel)* (2021) 13 (17):4295. doi: 10.3390/cancers13174295

UNISCIENCE. **nCounter Analysis System by NanoString.** Uniscience (2024). Disponível em: <https://www.uniscience.com.br/ncounter-analysis-system-nanostring/p>. Acesso em 14 de fevereiro de 2024.

WANG J et. al. **Diagnostic and therapeutic role of miRNAs in oral cancer.** *Oncol Rep.* (2021) 45(1):58-64. Doi: <https://doi.org/10.3892%2For.2020.7854>

WANG, G et. al. **A novel long noncoding RNA, LOC440173, promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modulating the miR-30d-5p/HDAC9 axis and the epithelial-mesenchymal transition.** *Molecular Carcinogenesis* (2020) 59(12):1392-1408. doi: <https://doi.org/10.1002/mc.23264>

WU, CS et. al. **ASC modulates HIF-1 α stability and induces cell mobility in OSCC.** *Cell Death Dis* (2020) 11(9):721. doi: <https://doi.org/10.1038%2Fs41419-020-02927-7>

XING, L et. al. **Research progress and clinical application prospects of miRNAs in oral cancer.** *Molecular Biology Reports* (2022) 49:10653-10665. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07604-w>

XU, JY et.al. **MiR-25-3p attenuates the proliferation of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2013) 6:9. doi: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60130-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60130-3)

ZHANG, Y et. al. **Role of RASA 1 in cancer: a review and update (Review).** *Oncol Rep* (2020) 44(6): 2386-2396. doi: <https://doi.org/10.3892/or.2020.7807>

ZHAO, L et. al. **Clinical significance and potential mechanisms of miR-223-3p and miR-204-5p in squamous cell carcinoma of head and neck: a study based on TCGA and GEO.** *Open Medicine (Wars)* (2020) 15(1):728-738. doi: <https://doi.org/10.1515%2Fmed-2020-0146>

ZHAO, Q; YAN, X; ZHENG, L; XUE, M. **miR-30d-5p: A non-coding RNA with potential diagnostic, prognostic, and therapeutic applications.** *Frontiers in cell and developmental biology* (2022) 10 – 2022. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.829435>

ZHOU, Z et. al. **Expression and possible molecular mechanisms of microRNA-205-5p in patients with head and neck squamous cell carcinoma.** *Tecnology in Cancer Research & Treatment* (2020) 19:1-14. doi: <https://doi.org/10.1177/1533033820980110>

ZHU, G et. al. **Small extracellular vesicles containing miR-192/215 mediate hypoxia-induced cancer-associated fibroblast development in head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancer Letters* (2021) 506:11-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.006>

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo **Prospecção de marcadores moleculares para o câncer de cabeça e pescoço**, como voluntário, tendo toda a liberdade para decidir se deseja participar ou não do mesmo.

No Brasil, o câncer de cabeça e pescoço se tornou um problema de saúde pública, com um número cada vez maior de casos. Alguns hábitos, como o uso de tabaco (cigarros, charutos, cachimbos) e o uso de bebidas alcoólicas podem levar ao aparecimento desta doença, junto com outros fatores. Mas ainda não entendemos muitos aspectos desta doença, que precisam ser estudados. Este projeto vai estudar fatores que podem levar ao câncer de cabeça e pescoço, em amostras de sangue e de tumor, buscando encontrar novas e melhores formas de identificar e tratar a doença.

Não haverá nenhuma consequência negativa ou prejuízo no seu atendimento e tratamento caso decida não participar. Caso concorde em participar, o procedimento será o seguinte:

- Como em todos os atendimentos de rotina do Hospital Universitário de Brasília (HUB), o(a) senhor(a) responderá um questionário, que fará parte do prontuário médico. Serão coletadas informações como idade, local da lesão, uso de tabaco e álcool, entre outros.
- Estes dados só serão usados para este estudo se obtida a sua permissão, com garantia de sigilo e privacidade. As informações pessoais como nome e endereço serão tratadas com extremo sigilo e não aparecerão, tornando sua participação confidencial.
- Durante sua consulta no HUB, será coletado um pouco do seu sangue para estudarmos porque o seu organismo desenvolveu este tumor. Também será analisado um pedacinho do seu tumor, que já foi coletado antes, no momento de fazer o diagnóstico.
- O material coletado será utilizado apenas para este estudo, que será feito no Laboratório da Área de Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.
- Este material coletado deverá ser todo utilizado. Se após o término deste estudo ainda houver material, este será descartado conforme as normas vigentes.
- Sua participação é voluntária e não há pagamento por sua colaboração. O(a) senhor(a) pode desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem prejudicar o seu tratamento. Basta comunicar ao pesquisador responsável.
- As análises deste estudo não acarretarão ônus financeiro para o(a) senhor(a) e/ou sua família.
- Possíveis riscos e desconfortos serão devidos aos procedimentos de rotina do atendimento e da coleta de sangue.
- Por ser uma pesquisa inovadora, de mecanismos básicos, não houve planejamento para aconselhamento genético. Os benefícios que podem vir deste estudo serão indiretos, como a identificação de possíveis novas formas de diagnóstico, prevenção e tratamento deste câncer a serem testadas.
 - Os resultados desta pesquisa serão divulgados em revistas e congressos científicos.

Uma via deste Termo ficará com o(a) senhor(a) ou seu representante legal.

As 02 (duas) folhas deste termo devem ser assinadas e/ou rubricadas.

Concordo em participar do estudo e autorizo a utilização das amostras coletadas para a pesquisa **“Prospecção de marcadores moleculares para o câncer de cabeça e pescoço”**, a ser realizada na Universidade de Brasília nos termos descritos acima. Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios do estudo e sei que minha participação é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família/tutelado legal. Sei ainda que, em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação, sem que isso traga prejuízos para mim. Também fui informado que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília – DF, CEP: 70.910-900. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou aos direitos do sujeito da pesquisa podem ser esclarecidas pelo telefone: (61) 3107-1918 ou pelo e-mail cepfm@unb.br.

Brasília, _____ de _____ de 20____.

Nome /Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome /Assinatura do pai/mãe ou responsável legal

Os pesquisadores abaixo se comprometem a manter o sigilo e a privacidade das informações utilizadas nesta pesquisa e a esclarecer quaisquer eventuais dúvidas.

Anna Karolina de Carvalho Abreu

Pesquisadora Responsável

Enfermeira Supervisora da Radioterapia

Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON)

Hospital Universitário de Brasília (**HUB**)

Av. L2 Norte, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília – DF

Tel.: (61) 3107-1998

Doralina do Amaral Rabello Ramos CRO-DF 8820

Pesquisadora Responsável

Professora adjunta

Faculdade de Medicina – Área de Patologia

Av. L2 Norte, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília – DF

Tel.: (61) 3107-1998

APÊNDICE B - Instrumento de caracterização dos pacientes com câncer de cavidade oral e orofaringe

1) Dados institucionais:

		Data da coleta da amostra sanguínea: / /	
Nome:			
CPF:		Registro no HUB:	
Radioterapeuta:		Data de admissão:	/ /
Hosp. de origem:		Registro do HO:	

2) Dados sociodemográficos:

Gênero:	() masculino	() feminino	Data de Nascimento:	/ /
Estado civil:		Naturalidade:		
Endereço:				
Telefones:				
Escolaridade:		Ocupação:		

3) Sinais Vitais e Medidas Antropométricas:

SINAIS VITAIS		MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS	
Pressão Arterial:		Peso:	
Temperatura:		Altura:	
Frequência Cardíaca:		IMC:	
Frequência Respiratória:			
Dor*:			

*Para avaliação de dor a escala utilizada será a Escala Visual Analógica de Dor

4) Dados clínicos:

Data provável do início dos sintomas:			
Diagnóstico:		CID-10:	
Histopatológico:			
Data do hist.:	/ /	Estadiamento:	
Localização do tumor primário:			
Casos de câncer na família?		Parentesco:	
Tabagista?		Ex-tabagista?	
Tipos de cigarro?		Carga-tabagica	
Se tabagista, quando fumou o último cigarro?			
Etilista?		Ex-etilista?	
Tipo de bebida:		Quanto tempo:	
Se etilista, qual a última vez que bebeu?			
Outras doenças?		Quais?	
Medicamentos em uso?		Quais?	

5) Dados laboratoriais:

HEMOGRAMA COMPLETO			
Série Vermelha	Resultados	Série Branca	Resultados
Hemácias		Leucócitos	
Hemoglobina		Basófilos	
Hematócrito		Eosinófilos	
VCM		Blastos	

HCM		Promielócitos	
CHCM		Metamielocitos	
RDW		Mielocitos	
Eritroblastos			
		Segmentados	
		Linfócitos	
		Linfócitos atípicos	
		Monócitos	
Contagem de plaquetas:	Resultado		
	VPM		
Glicemia de jejum:			

6) Dados terapêuticos:

6.1) Tratamentos anteriores:

CIRURGIAS			
QUIMIOTERAPIA			
Data de início:	__ / __ / __	Data de término:	__ / __ / __
Protocolo:			
Número de ciclos:			

6.2) Tratamentos atuais:

6.2.1) Radioterapia:

Data da simulação:	__ / __ / __	Data da 1ª sessão:	__ / __ / __
Finalidade:		Técnica de tratamento:	
Dose (cGy) total:		Dose (cGy) total:	
Número de sessões por fases de tratamento:	1	2	3
Dose (cGy) cadeia de drenagem:			

6.2.3) Quimioterapia:

Data de início:	__ / __ / __	Data de término:	__ / __ / __
Protocolo:			
Número de ciclos:			

APÊNDICE C - Instrumento para coleta de dados dos pacientes com câncer de cavidade oral e orofaringe submetidos à radioterapia

Segunda Coleta

1) Dados institucionais:

		Data da coleta da amostra sanguínea:		_ / _ / _	
Nome:					
CPF:			Registro no HUB:		
Tratamento de radioterapia suspenso:			Quantos dias:		
Motivos:					

2) Sinais Vitais e Medidas Antropométricas:

SINAIS VITAIS		MEDIDAS ANTROPOMÊTRICAS	
Pressão Arterial:		Peso:	
Temperatura:		Altura:	
Frequência Cardíaca:		IMC:	
Frequência Respiratória:			
Dor*:			

3) Dados clínicos durante o tratamento:

Diagnóstico:				CID-10:	
Tabagista?			Quant. diária:		
Tipos de cigarro?					
Etilista?					
Tipo de bebida:				Quantidade diária:	
Outras doenças?			Quais?		
Medicamentos em uso?			Quais?		

4) Dados laboratoriais:

HEMOGRAMA COMPLETO			
Série Vermelha	Resultados	Série Branca	Resultados
Hemácias		Leucócitos	
Hemoglobina		Basófilos	
Hematócrito		Eosinófilos	
VCM		Blastos	
HCM		Promielócitos	
CHCM		Metamielócitos	
RDW		Mielócitos	
Eritroblastos		Bastonetes	
		Segmentados	
		Linfócitos	
Contagem de plaquetas:	Resultado		
	VPM		
Glicemia de Jejum:			