



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE

POLIANA RAMOS BRAGA SANTOS

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS RELACIONADOS À
ATIVACÃO DE MASTÓCITOS E À ANGIOGÊNESE EM TUMORES DE
GLÂNDULA SALIVAR**

Salvador

2014

POLIANA RAMOS BRAGA SANTOS

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS RELACIONADOS À
ATIVACÃO DE MASTÓCITOS E À ANGIOGÊNESE EM TUMORES DE
GLÂNDULA SALIVAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Salvador

2014



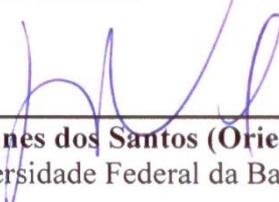
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

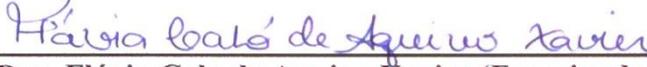
C.D. POLIANA RAMOS BRAGA SANTOS

“PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAs RELACIONADOS À
ATIVACÃO DE MASTÓCITOS E À ANGIOGÊNESE EM TUMORES
DE GLÂNDULA SALIVAR”

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Orientador)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



Profa. Dra. Flávia Calo de Aquino Xavier (Examinador Interno)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



Profa. Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo - (Examinador Externo)
Pesquisadora do Hospital A. C. Camargo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e por me proporcionar todos estes momentos;

Aos meus pais, Maria Emilia e José Valdemir, e à minha irmã e melhor amiga Sara, pelo amor, carinho, incentivo, companheirismo e, principalmente, por todo o apoio que sempre me deram. Vocês são a razão da minha vida e sem vocês nada disso teria sido possível;

Ao meu amor, Pedro, pela compreensão e por permanecer ao meu lado quando precisei. Obrigada por me completar, eu te amo;

A todos da minha família, em especial aos meus avós: Ana, Eunice (*in memoriam*) e Zequinha (*in memoriam*), sei que acreditaram em mim e torceram para o meu sucesso;

Ao meu orientador Jean, por acreditar no meu potencial e por ser um profissional admirável e competente. Obrigada pela oportunidade;

Aos meus colegas do mestrado, por tornarem meus momentos mais divertidos; em especial à Lívia, pela amizade desde a graduação, conversas e apoio; à Adna e Leonardo, obrigada pelos conselhos e amizade;

A todos do Hospital do Câncer AC Camargo, obrigada pela oportunidade e atenção durante minha estadia em São Paulo. Especialmente à Cláudia, pela dedicação e auxílio e à amiga Bárbara, por transformar meus momentos de dúvidas e angústias, em alegrias;

Aos professores da pós-graduação e a professora Clarissa e, em especial, a professora Deise e a professora Valéria, pela dedicação e auxílio,

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste trabalho,

À Universidade Federal da Bahia, faculdade na qual me formei e tive a oportunidade de perpetuar meus estudos, amadurecer e me encontrar como profissional;

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação de mestrado.

SANTOS, Poliana Ramos Braga. Perfil de expressão de microRNAs relacionados à ativação de mastócitos e a angiogênese em tumores de glândula salivar. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de expressão dos microRNAs: miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 relacionados à ativação de mastócitos e a angiogênese em 31 amostras de tumores de glândulas salivares parafinadas, sendo 11 carcinomas adenóides císticos (CAC), 9 carcinomas mucoepidermóides (CME) e 11 adenomas plaomórficos (AP). Em adição, foi realizada uma investigação imuno-histoquímica para a detecção de mastócitos e de microvasos utilizando os marcadores mast cell tryptase e CD-34. Foi possível observar uma maior densidade de mastócitos entre os controles normais ($2,12\text{células/mm}^2$) e os CME ($10,55\text{células/mm}^2$) e, entre este último e o CAC ($6,27\text{células/mm}^2$) e o AP ($5,97\text{células/mm}^2$), sendo que o CME apresentou as maiores concentrações tanto peri ($16,8\text{células/mm}^2$) quanto intratumorais ($4,29\text{células/mm}^2$). Uma diferença significativa na densidade de microvasos foi observada entre os tumores malignos e benignos ($p < 0,001$), bem como entre os controles ($3,06\text{microvasos/mm}^2$) e os tumores, sendo que o CME ($21,53\text{microvasos/mm}^2$) apresentou os maiores índices quando comparado ao CAC ($10,92\text{microvasos/mm}^2$) e ao AP ($2,63\text{microvasos/mm}^2$). Foi observada também uma forte correlação positiva entre a densidade mastocitária e a densidade de microvasos nos tumores analisados ($\rho = 0,601$, Coeficiente de Spearman, $p < 0,001$). Os microRNAs: miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 apresentaram uma expressão diminuída, enquanto, o miR-9 apresentou uma expressão aumentada na maioria dos tumores quando comparados aos tecidos normais. Observou-se também uma diferença significativa na média de expressão do miR-9 ($p = 0,003$), miR-17 ($p = 0,013$), miR-132 ($p = 0,040$) e miR-221 ($p = 0,032$) entre os tumores e controles. Apenas o miR-9 apresentou uma correlação negativa estatisticamente significativa com a densidade de microvasos nos tumores estudados ($\rho = -0,533$, Coeficiente de Spearman, $p = 0,001$). Sendo assim, o estudo genético dos microRNAs parece contribuir para o entendimento de algumas das anormalidades que ocorrem em tumores de glândulas salivares podendo tornar-se fortes alvos terapêuticos no futuro.

Palavras-chave: microRNAs, mastócitos, angiogênese, tumores de glândula salivar.

SANTOS, Poliana Ramos Braga. MicroRNA expression profile related to mast cell activation and angiogenesis in salivary gland tumors. Master Dissertation – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate profile expression of six microRNAs: miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 and miR-221 related to mast cells activation and angiogenesis in 31 paraffin salivary glands tumor samples, 11 adenoid cystic carcinomas (ACC), 9 mucoepidermoid carcinomas (MEC), and 11 pleomorphic adenomas (PA). In addition, immunohistochemical investigation was performed to detect mast cells and microvessel using mast cell tryptase and CD-34 biomarkers. It was observed a higher density of mast cells in normal controls (2.12 cells/mm²) when compared to MEC (10.55 cells/mm²), and also between MEC and ACC (6.27 cells/mm²) or MEC and PA (5.97 células/mm²). Furthermore, MEC showed the highest concentrations of mast cells both peri (16.8 cells/mm²) and intratumoral (4.29 cells/mm²). Significant difference ($p < 0.001$) was observed in microvessel density between malignant and benign tumors, as well as between controls (3.06 microvessels/mm²) and tumors. MEC (21,53 microvessels/mm²) showed higher rates when compared to ACC (10.92 microvessels/mm²) or PA (2.63 microvessels/mm²). A strong positive correlation was also observed between mast cell and microvessel density ($\rho = 0.601$, Spearman coefficient, $p < 0.001$) for all tumors. With respect to gene expression, microRNAs: miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 and miR-221 showed a decreased expression, whereas miR-9 showed an increased expression in most cases compared to normal tissues. We also observed a significant difference in mean expression of miR-9 ($p = 0.003$), miR-17 ($p = 0.013$), miR-132 ($p = 0.040$) and miR-221 ($p = 0.032$) between tumors and controls. However, in all tumors studied only miR-9 showed a statistical significant negative correlation with microvessel density ($\rho = -0.533$, Spearman coefficient, $p = 0.001$). In conclusion, the genetic study of microRNAs appears to contribute to understand some abnormalities that occur in salivary glands tumors, and it may become strong therapeutic targets in the future.

Keywords: microRNAs, mast cell, angiogenesis, salivary gland tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Mecanismos utilizados pelo complexo RISC para regular a expressão gênica: clivagem, desadenilação e degradação do mRNA, recrutamento do mRNA para corpos de processamento, bloqueio da circularização e da função cap 5 e alteração da associação das subunidades ribossômicas ou proteólise da proteína nascente. Fonte: Kwak, Iwasaki et al., 2010. 24
- Figura 2. Esquema demonstrando as possíveis funções do cluster miR-17-19. Dependendo do tipo celular o microRNA pode assumir diferentes funções. Fonte: Olive, Jiang, He et al., 2010. 32
- Figura 3. Coloração imuno-histoquímica em tumores de glândula salivar. a. Acúmulo de mastócitos em tecido glandular bem diferenciado com predomínio de ácinos serosos. b. ADENOMA PLEOMÓRFICO - Presença de células mastocitárias em área peritumoral, especialmente, na cápsula fibrosa. c. ADENOMA PLEOMÓRFICO – Células mastocitárias em torno de células mioepiteliais. d. CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO - Presença de numerosas células mastocitárias distribuídas por entre arranjo cribriforme. e. CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO - Presença de numerosas células mastocitárias distribuídas por entre arranjo tubular. f. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE – Acúmulo de mastócitos em área peritumoral. g. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE – Presença de mastócitos intraparenquimais (células intermediárias) em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau. h. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE – Células mastocitárias intraparenquimais próximas a vasos sanguíneos em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário. i. Células mastocitárias alongadas distribuídas por entre estroma fibrosa de carcinoma mucoepidermóide de baixo grau. 58
- Figura 4. Densidade total de mastócitos segundo controles e tipo de tumor. Salvador, BA, 2014. 60
- Figura 5. Densidade total de mastócitos segundo grupo de tumores malignos e benignos. 60
- Figura 6. Coloração imuno-histoquímica em tumores de glândula salivar. a. Tecido glandular bem diferenciado apresentando ácinos mucosos, permeados por vasos sanguíneos CD34 positivos. b. ADENOMA PLEOMÓRFICO - Acúmulo de microvasos CD34 positivos no estroma fibrocelular; notar ausência de microvasos na matriz mixóide. c. CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO - Estroma hialino permeado por vasos sanguíneos CD34 positivos. d. CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO - Numerosos microvasos no estroma fibroso do carcinoma adenoide cístico tubular. e. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE - Carcinoma mucoepidermóide de baixo grau com vasos sanguíneos CD34 positivos distribuídos por delgados septos fibrosos e em áreas de estroma mais abundante. f. Proliferação microvascular CD34 positiva em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário; notar abundância de microvasos em área composta por células epidermóides (do centro para esquerda), ao contrário da área composta por células intermediárias (do centro para direita). 62

Figura 7. Densidade de microvasos entre tumores malignos e benignos. Salvador, BA, 2014.	63
Figura 8. Densidade de microvasos e densidade total de mastócitos. Salvador, BA, 2014.	64
Figura 9. Perfil de expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em TGS (n=31). Salvador, BA, 2014.	65
Figura 10. Expressão do miR-9 em adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides. Salvador, BA, 2014.	67
Figura 11. Comparação da expressão do miR-221 e do miR-16 em carcinomas adenóides císticos, carcinomas mucoepidermóides e adenomas pleomórficos. Salvador, BA, 2014.	67
Figura 12. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em carcinomas adenóides císticos (n=11). Salvador, BA, 2014.	68
Figura 13. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em carcinomas mucoepidermóides. Salvador, BA, 2014.	69
Figura 14. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em adenomas pleomórficos (n=11). Salvador, BA, 2014.	69
Figura 15. Expressão relativa dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em adenomas pleomórficos (n=11), carcinomas adenóides císticos (n=11) e carcinomas mucoepidermóides (n=9) apresentadas em uma escala logaritmica de base 2. Salvador, BA, 2014.	70
Figura 16. Expressão relativa dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em tumores benignos (n=11) e tumores malignos (n=20) apresentadas em uma escala logaritmica de base 2. Salvador, BA, 2014	71
Figura 17. Densidade de microvasos e expressão do miR-9. Salvador, BA, 2014.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos, diluição, recuperação antigênica e marca comercial.	43
Tabela 2. Dados dos ensaios dos microRNAs avaliados.	48
Tabela 3. Dados clínicos e histopatológicos segundo tipo de tumor de glândula salivar, sexo, idade, localização anatômica, tamanho da lesão, padrão histológico e gradação histológica. Salvador, BA, 2014.	51
Tabela 4. Densidade de total de mastócitos segundo grupos de controle e tumor. Salvador, BA, 2014.	59
Tabela 5. Densidade de mastócitos em áreas peritumorais e intratumorais segundo o tipo histológico tumoral. Salvador, BA, 2014.	59
Tabela 6. Densidade de microvasos segundo controles e o tipo histológico tumoral. Salvador, BA, 2014.	63
Tabela 7. Perfil da expressão gênica do miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-192 e miR-221 em tumores de glândulas salivar. Salvador, 2014.	66
Tabela 8. Média geométrica dos níveis de expressão do miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 segundo o tipo histológico de tumor. Salvador, BA, 2014.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

miRNA	ou miR, microRNA maduro
<i>mir</i> ou MIR	gene codificador de miRNA
pre-miR	ou pre-microRNA, microRNA precursor
mRNA	RNA mensageiro
gene <i>lin-4</i>	gene envolvido no desenvolvimento do <i>C. elegans</i>
<i>let-7</i>	microRNA percussor
<i>RNA</i>	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
tncRNA	<i>tiny noncoding RNA</i>
smRNA	<i>small RNA sequencing</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNAs</i>
piRNAs	<i>piwi-interacting RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ncRNAs	RNAs não codificantes
miRBase	banco de dados biológicos, arquivo de sequência de microRNAs
<i>harpins</i>	estruturas em forma de grampo
RNA polimerase II	enzima que atua na transcrição do RNA
RNase III Drosha	enzima, RNase
RNase III <i>Dicer</i>	enzima, RNase
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
Argonauta 2	proteína, principal componente do RISC
miRISC	microRNA maduro associado ao RISC
miRtron	via alternativa para a formação de miRNAs
RNPs	complexos RNA-proteínas
<i>seed region</i>	ou “região semente”, local de ligação entre miRNA e RNAm algo
<i>P-bodies</i>	<i>Processing Bodies</i> ou corpos de processamento
miR-9	microRNA-9
PTEN	gene supressor tumoral
miR-16	microRNA-16
miR-17	microRNA-17

cluster miR-17-92	referente aos miRNAs: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1
fator VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
miR-132	microRNA-132
miR-195	microRNA- 195
Bcl-2	proteína anti-apoptótica
miR-221	microRNA-221
FFPE	tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina
CD-134	anticorpo, avaliação microvasos
Mast-cell	anticorpo, avaliação mastócitos
qPCR	do inglês " <i>quantitative PCR, quantitative polymerase chain reaction</i> "
<i>RNase-free</i>	livres de RNases
C _q	<i>Quantification Cycles</i>
$2^{-\Delta\Delta C_q}$	método comparativo utilizado na avaliação qPCR
RNU44 e RNU48	RNA ribossomais 44 e 48, respectivamente
C _q alvo	referente as amostras de tumores de glândula salivar
C _q referência	referente aos RNU44 e RNU48
C _q calibrador	referente ao <i>pool</i> de glândulas normais
AP	adenoma pleomórfico
CAC	carcinoma adenóide cístico
CME	carcinoma mucoepidermóide
CCE	carcinoma de células escamosas
miRNA subexpresso	expressão diminuída em relação ao controle normal
miRNA superexpresso	expressão aumentada em relação ao controle normal
MDV	microdensidade vascular
MC _T	mastócitos triptase-positivos
MC _{TQ}	mastócitos triptase-quimase-positivos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. MicroRNAs	18
2.2. Nomenclatura dos microRNAs	19
2.3. Biogênese dos micro-RNAs: transcrição, exportação, processamento e maturação	20
2.4. Mecanismo de ação: regulação pós-transcricionais pelos micro-RNAs	23
2.5. MicroRNA e câncer	26
2.6. MicroRNA-9	30
2.7. MicroRNA-16	31
2.8. MicroRNA-17	32
2.9. MicroRNA-132	33
2.8. MicroRNA- 195	34
2.11. MicroRNA-221	34
2.12. MicroRNAs e tecidos parafinados	35
2.13. Tumores de glândulas salivares	38
3. OBJETIVOS DA PESQUISA	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA DE PESQUISA	41
4.1. Considerações Éticas	41
4.2. Critérios de seleção da amostra	41
4.3. Avaliação dos parâmetros clínicos	41

4.4. Obtenção da amostra	42
4.5. Exame histomorfológico	42
4.6. Técnica Imuno-histoquímica	42
4.6.1. Análise imuno-histoquímica	44
4.7. Estudo do Perfil de Expressão Gênica pela Técnica do <i>Quantitative Real-time</i> PCR (qPCR)	45
4.7.1. Extração dos miRNAs das amostras parafinadas	45
4.7.2. Transcrição Reversa e DNA complementar (cDNA)	47
4.7.3. Amplificação do cDNA por Reações de qPCR	47
4.7.4. Análise da expressão gênica	48
4.8. Análise estatística	49
5. RESULTADOS	51
5.1. Avaliação dos parâmetros clínicos	51
5.2. Análise histomorfológica	54
5.3. Análise da densidade de mastócitos	56
5.4. Análise da densidade de microvasos	61
5.5. Análise da expressão gênica dos microRNA	65
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

MicroRNAs ou miRNAs são sequências curtas de ribonucleotídeos não codificadoras de proteínas com importantes funções regulatórias pós transcricionais. O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por (LEE *et al.*, 1993) em um estudo genético sobre alterações no desenvolvimento pós-embriônico do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. O estudo demonstrou que a transcrição do gene *lin-4*, em vez de produzir um RNA-mensageiro (mRNA) para a codificação de uma proteína, expressou um segmento de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos (um miRNA), não codificante. Este miRNA regulava negativamente a tradução do transcrito do gene *lin-14* ao se emparelhar à região 3'URT deste mRNA, diminuindo os níveis da proteína LIN-14 sem alterar de forma detectável a quantidade do mRNA e afetando diretamente a diferenciação celular e o desenvolvimento larval do nematódeo. (LEE *et al.*, 1993)

Passados 14 anos, outro miRNA, o *let-7*, que também atua no desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi descoberto (REINHART *et al.*, 2000). Somando-se a isso, nos anos seguintes, muitos miRNAs foram descobertos em outras espécies, não apenas relacionados a estágios de desenvolvimento, mas a outras funções celulares como apoptose, proliferação e diferenciação celular, permitindo supor que estas moléculas devem fazer parte de uma classe com amplas funções regulatórias. (HUSSAIN *et al.*, 2012)

O miRNA pode atuar de diversas formas no genoma e o mecanismo pelo qual ele irá impedir a tradução do mRNA alvo dependerá do grau de complementariedade das bases nucleotídicas destas moléculas. Ao se ligar com um mRNA alvo, a regulação da expressão pelo miRNA pode se dar através de dois mecanismos diferentes: ou o miRNA reprime a tradução da proteína correspondente ao mRNA sem degradar sua fita (complementariedade imperfeita) ou destrói o mRNA alvo (complementariedade perfeita). (ZHANG *et al.*, 2007)

Além disso, sabe-se que um único miRNA pode se ligar e regular diferentes mRNAs alvos, ou ainda, diferentes miRNAs podem se ligar de forma cooperativa e controlar um mRNA alvo (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006). Esta capacidade de provocar mudanças sutis na atividade dos genes confere aos miRNAs a capacidade

de modular a proliferação e a diferenciação das células de um organismo bem como o seu desenvolvimento (AMBROS *et al.*, 2011). Aliado a isso, sabe-se que, apesar dos miRNAs constituírem apenas 1 à 3% do genoma humano, atualmente, dos mais de 1.800 miRNAs descobertos nesta espécie, estima-se que eles regulem aproximadamente 30% dos genes humanos, ratificando a sua importância em diversas vias regulatórias. (HUSSAIN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2005)

A conservação de alguns microRNAs durante a evolução dos organismos está diretamente relacionada a sua importante função nos processos regulatórios das células animais (AMBROS *et al.*, 2011). As sequências codificadoras de microRNAs (genes de miRNA) podem atuar em processos fisiológicos normais e anormais e em várias doenças humanas como os cânceres (KIM *et al.*, 2005). Estas sequências estão localizadas em íntrons ou éxons de genes codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2004). Além disso, a maioria dos miRNAs conhecidos estão localizados próximos a outros miRNAs formando *clusters*. (KIM *et al.*, 2005).

A carcinogênese é entendida como um processo multifatorial, em que células com expressão gênica alterada proliferam-se devido à presença de oncoproteínas e proteínas supressoras tumorais mutadas. Mutações iniciais nos genes são importantes para manter o genoma instável, o que poderá levar a formação das células transformadas oncogenicamente (LOPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2012). Esse conhecimento, entretanto, tem começado a se modificar devido à descoberta de novas moléculas que atuam no processo de formação e progressão dos tumores, sugerindo um nível maior de complexidade nos mecanismos da carcinogênese.

Estudos demonstram que os microRNAs, agentes fundamentais na regulação da expressão gênica, apresentaram alterações nos níveis de expressão em alguns tumores, relacionando esses padrões aberrantes de expressão e regulação gênica à processos de tumorigênese, iniciação e progressão dos tumores. Os microRNAs que atuam no processo neoplásico, dependendo do seu alvo e do tecido em que estão presentes, regulam negativamente os mRNA alvos transcritos dos genes supressores de tumor ou dos oncogenes (KIM *et al.*, 2005). Assim, uma redução na transcrição de alguns microRNAs pode acelerar uma transformação oncogênica enquanto que o aumento de outros microRNAs pode inativar genes supressores de tumor (ZHANG *et al.*, 2007).

Notavelmente, de todos os miRNAs humanos mapeados, metade deles estão localizados em regiões do cromossomo associadas a vários tumores humanos (LOPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2012). Sabe-se que o desenvolvimento tumoral inicia-se em decorrência de alterações prévias no genoma celular ou mais frequentemente em genes relacionados com a comunicação anormal entre o componente epitelial e o componente estromal (CONTI *et al.*, 2007).

Dentre os componentes celulares estromais destacam-se os mastócitos, células derivadas da medula óssea e amplamente encontradas nos tecidos humanos, com importantes funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como na cicatrização e remodelação tecidual, reações alérgicas, nos processos inflamatórios ou na biologia do câncer. (CONTI *et al.*, 2007) Ao exercer suas funções biológicas, o mastócito produz, armazena e libera mediadores químicos que, ao interagirem com o microambiente, desenvolvem uma cascata de interações celulares e moleculares que disparam mecanismos para o desenvolvimento de processos fisiológicos ou patológicos (CONTI *et al.*, 2007). As células mastocitárias desenvolvem importante papel na dinâmica de crescimento do tumor, uma vez que secretam enzimas, fatores de crescimento ou citocinas que apresentam importantes ações na angiogênese, na remodelação tecidual e na resposta imunológica do hospedeiro (MALTBY *et al.*, 2009; NORRBY, 2002; ROJAS *et al.*, 2005).

O processo de angiogênese interfere diretamente na invasão e na agressividade tumoral, uma vez que, ao formar novos vasos sanguíneos, fornece oxigênio e nutrientes fundamentais à sobrevivência das novas células tumorais (CH'NG *et al.* 2006; NORRBY 2002; RIBATTI *et al.* 2001).

Um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (VIDAL *et al.*, 2013) a respeito da distribuição das células mastocitárias em tumores de glândulas salivares, observou a presença de mastócitos, frequentemente encontrados em áreas peritumorais, tanto nos tumores benignos, como o adenoma pleomórfico, como também nos tumores malignos, a exemplo do carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenoide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau. Os autores ainda demonstraram que a quantidade de mastócitos e de microvasos eram maiores nos tumores malignos, sugerindo uma íntima associação entre a os mastócitos e os vasos sanguíneos nos tumores. Em outro trabalho realizado pela nossa equipe

(PEREIRA *et al.*, 2012) esta distribuição das células mastocitárias foi observada em 45 tumores odontogênicos benignos, sendo que os mastócitos estavam presentes em 96% destes tumores.

A identificação dos miRNAs que possam interferir na biologia do câncer e a sua expressão podem fornecer informações quanto a classificação, determinação e o estágio, progressão, o diagnóstico e o prognóstico do câncer além de fornecer potentes marcadores tumorais, os quais podem funcionar como alvos importantes de ação terapêutica (LOPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2012). Entretanto, poucos estudos na literatura científica (ALEVISOS *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013; MATSE *et al.*, 2013; PAULEY *et al.*, 2011; TANDON *et al.*, 2012) investigam o papel dos miRNAs em tumores de glândula salivar. Portanto, a compreensão dos aspectos moleculares sobre o papel dos microRNAs relacionados à angiogênese e mastócitos nos tumores de glândula salivar poderá contribuir para o diagnóstico desses tumores, bem como possibilitará o fornecimento de dados para guiar possíveis abordagens terapêuticas contra esses tumores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MicroRNAS

Com a descoberta da estrutura do DNA, em 1953 por Watson e Crick, tornou-se mais claro como a informação hereditária contida nos genomas das células é codificada em sequências de nucleotídeos. Parte da informação genética contida no DNA codifica sequências lineares de aminoácidos que, unidos por ligações peptídicas, formam proteínas como produto final. Para isso, entretanto, é necessário que ocorra a transcrição de uma fita molde de DNA em um mRNA e posteriormente a tradução do mRNA maduro em uma cadeia peptídica. Esses mRNAs são portanto carreadores intermediários da informação genética e as proteínas traduzidas a partir deles, servem como componentes estruturais e enzimáticos para uma gama de processos na célula. (WATSON E CRICK, 1953; ALBERTS *et al.*, 2010; SHRUTI SHREY *et al.*, 2011)

Sabe-se que alguns genes do DNA codificam RNAs que não produzem proteínas, como por exemplo os genes que codificam tncRNA, smRNA, snoRNA, siRNA e microRNA. (SHRUTI *et al.*, 2011). Os RNAs não codificantes, denominados de ncRNAs, a depender do tamanho das suas moléculas, podem ser divididos em três grandes grupos. O primeiro grupo, composto por miRNAs e siRNAs, apresentam moléculas com tamanho aproximado de 20 à 30 nucleotídeos e são bem conservados entre as espécies. Apesar de fazerem parte do mesmo grupo, esses dois tipos de RNA apresentam diferenças quanto à origem das suas moléculas, enquanto os miRNAs são produtos do genoma do próprio organismo (endógenos), os siRNAs são derivados de vírus, transgenes ou transposons (exógenos) (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009). Segundo alguns autores, os miRNAs originam-se de uma única molécula que se dobra formando uma estrutura com formato de grampo (ou *hairpin*), já os siRNAs são RNAs processados pela endonuclease Dicer de um híbrido entre dois transcritos antiparalelos, ou seja a partir das cadeias senso e antisense (AMBROS *et al.*, 2003). O segundo grupo é formado por RNA nucleares pequenos, os snoRNAs (small nucleolar RNAs), cujas moléculas apresentam entre

60 e 300 nucleotídeos. O último grupo é formado por RNAs não codificantes longos com um comprimento médio de 2.000 pares de bases. (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009).

Sabe-se que os miRNAs são importantes reguladores da expressão gênica e portanto de proteínas, desempenhando também um importante e complexo papel tanto em processos como diferenciação, crescimento e apoptose como em várias doenças (GARZON *et al.*, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2012). Desde a descoberta do primeiro miRNA em 1993, por Lee e colaboradores, vários outros microRNAs tem sido sequenciados e estudados. Atualmente, o miRBase (Fonte: <http://www.mirbase.org>), um banco de dados biológicos que atua como um arquivo de sequência de microRNAs, disponibiliza *online* gratuitamente as sequências publicadas de microRNAs e seus alvos preditos ou validados experimentalmente, somando mais de 1.800 sequências humanas de microRNAs.

2.2. Nomenclatura dos microRNAs

Em 2003, Ambros e colaboradores publicaram um *guideline*, “A uniform system for microRNA annotation”, com orientações para a identificação e nomenclatura dos novos microRNAs descobertos nos diferentes organismos animais e vegetais (AMBROS *et al.*, 2003). Descreveu critérios específicos para a verificação experimental dos miRNA, os quais eram detectados pela técnica Northern blotting e suas sequências eram verificadas em um banco de dados de cDNA específico para cada espécie estudada. Além disso, estabeleceu algumas convenções para a nomenclatura dos microRNAs e dos genes de microRNAs.

A nomenclatura dos microRNAs é dada através de um prefixo “mir” seguido por um hífen e um número identificador (ex. miR-1, miR-2,... miR-89, etc.), o qual geralmente indica a ordem da descoberta do microRNA. Os genes codificadores de miRNAs também utilizam o mesmo prefixo, em caixa alta, com hífen e em itálico de acordo com a convenção para cada organismo (ex: *mir-1* ou MIR156). (AMBROS *et al.*, 2003).

Em outro artigo publicado em 2006, “*miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*” os autores apresentaram a miRBase, base de dados dos miRNAs disponível gratuitamente na internet, bem como abordaram aspectos da identificação, nomenclatura e validação dos miRNAs.

Para a nomenclatura dos miRNAs validados e disponíveis nesta base de dados, são usados como prefixo 3 ou 4 letras para designar a espécie a qual o miRNA pertence (ex: hsa-miR-101, na qual “hsa” designa a espécie *Homo sapiens*). O prefixo “miR”, refere-se aos microRNAs maduros, já o prefixo “mir” aos pre-microRNAs correspondentes. Para as sequências parálogas, em que os miRNAs diferem em apenas uma ou duas posições, é adicionado um sufixo a nomenclatura (ex: mmu-miR-a e mmu-miR-b). (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006)

MiRNAs maduros idênticos, mas oriundos de grampos diferentes, recebem um número como sufixo (ex: dme-miR281-1 e dme-miR281-2). Já, microRNAs maduros idênticos oriundos do mesmo pre-microRNA, pela excisão e manutenção de ambas as fitas, podem receber nomenclaturas diferentes. Recebem o sufixo 5p, indicando o miRNA correspondente à fita da região 5’ do grampo, ou o sufixo 3p correspondente a região 3’ do grampo (ex: miR-7-5p e miR-7-3p). (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006). Uma outra nomenclatura pode ser dada quando se conhecem os níveis de expressão relativos destes miRNAs oriundos do mesmo pre-microRNA. É acrescentado um asterisco após o nome para indicar o miRNA expresso em níveis baixos em relação ao miRNA do braço oposto de um mesmo grampo. O miRNA com maiores níveis de expressão relativa, e que fará parte do complexo RICS, seguirá todas as regras supracitadas sem o acréscimo do asterisco (ex: miR-56 e miR56*) (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2004)

2.3. Biogênese dos micro-RNAs: transcrição, exportação, processamento e maturação

Os miRNAs formam-se inicialmente no núcleo das células, onde a transcrição de um gene miRNA específico pela RNA polimerase II gera um longo transcrito primário com algumas centenas de nucleotídeos (nt), o pri-miRNA. Este apresenta uma ou mais estruturas em forma de grampo (*hairpins*), também denominadas de

stem-loop, em seu arcabouço, além de uma extremidade cap 5' e uma cauda poli A na extremidade 3' adicionadas pela RNA polimerase II (CHAN E SLACK 2007; DU E ZAMORE 2005; LEE *et al.* 2004) . Na conformação do pri-miRNA, dois segmentos de RNA com bases complementares estão pareados formando a região “stem” e as regiões não pareadas, onde os pares de bases não são complementares, formam alças circulares denominadas de regiões “loop” (ZHANG *et al.*, 2007).

Ainda no núcleo das células, essa estrutura em grampo é reconhecida e clivada próximo a base da região *stem* pela RNase III Droscha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita, Pasha (também conhecido como DGCR8), gerando uma molécula com aproximadamente 55 à 70 nucleótídeos, o pre-miRNA (LEE *et al.*, 2004). Em seguida, uma proteína de exportação celular, a Exportina-5, uma exportina RanGTP - dependente, transporta este miRNA precursor, do núcleo para o citoplasma (ZHANG *et al.*, 2007). A clivagem pela enzima *Droscha* define um dos terminos do miRNA maduro, gerando uma extremidade fosfato 5' e outra hidroxilada 3', além de 2 ou 3 nucleótídeos presos nas regiões terminais (CHAN E SLACK 2007; DU E ZAMORE 2005). Alguns autores ainda sugerem que um mecanismo adicional para a remoção da extremidade cap5' deve existir, antes da clivagem pela enzima *Droscha* (LEE *et al.*, 2004).

No citoplasma, as estruturas em grampo do pre-microRNA serão reconhecidas e clivadas próximo ao *loop* pela RNase III *Dicer* e seu cofator TRBP (*trans-activate RNA-binding protein*), definindo o outro término do microRNA maduro e gerando um microRNA de fita-dupla (miRNA/miRNA* duplex) de aproximadamente 22 nucleótídeos (CHAN E SLACK 2007; DU E ZAMORE 2005; WESTHOLM E LAI 2011). Uma fita do duplex é então incorporada a um conjunto de proteínas para formar um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, *RNA-induced silence complex*) que tem como principal componente a proteína Argonauta 2. As duas fitas do miRNA são separadas e apenas uma delas, dependendo da sua estabilidade termodinâmica, permanece no complexo miRISC constituindo o miRNA maduro pois, para exercer sua atividade guia no miRISC e reconhecer um mRNA alvo, a fita de miRNA deve estar desenrolada. A outra fita complementar sofre degradação (DU AND ZAMORE 2005, GAROFALO *et al.*, 2011).

Uma vez formado, o miRISC procura sequências nucleotídicas complementares em um mRNA alvo; este processo é facilitado pela proteína Argonata presente na região 5' do miRNA, a qual está posicionada de maneira a otimizar o pareamento com outra molécula de RNA (GU *et al.*, 2010). Quando o miRNA guia do miRISC pareia com o mRNA alvo, o complexo miRISC funciona como uma endonuclease, clivando o mRNA entre os nucleotídeos pareados (DU E ZAMORE 2005). Este pareamento ocorre na região 3' URT (*untranslated region*) do mRNA alvo e, geralmente, se dá através do pareamento de apenas 7 nucleotídeos. Como resultado, muitos miRNAs são capazes de se ligar a centenas de diferentes mRNA alvos conservados (GU *et al.*, 2010, GAROFALO *et al.* 2011). Estudos estruturais indicam que a proteína argonata apresenta dois domínios, um domínio central PAZ, que se liga a região 3' do mRNA alvo, e outro domínio PIWI terminal ligado a região 5' do miRNA, confirmando assim que a proteína argonata é a endonuclease presente no complexo miRISC responsável pela clivagem do alvo (DU AND ZAMORE 2005; PARKER *et al.* 2004). Baseado nessa complementariedade, o miRISC, que contém o miRNA específico, pode promover a repressão da tradução ou direcionar a clivagem do mRNA (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006).

Recentemente, uma via alternativa para a formação de miRNAs, a via miRtron, foi descoberta em diversos mamíferos, dosófilas e nematódeos (CHAN AND SLACK, 2007). Ambas as vias levam à formação de pre-miRNAs com comprimento de 70 nucleotídeos, diferindo na clivagem ou não pela enzima *Drosha* (SHRUTI *et al.*, 2011). MiRtrons são tipos de miRNAs que possuem esse nome por apresentarem características de íntrons e de pre-miRNAs, mas não apresentando no seu arcabouço a haste inferior da estrutura *stem loop* que é responsável pelo reconhecimento e clivagem pela enzima *Drosha*. São processados inicialmente por *splicing* de pequenos íntrons, formados a partir do transcrito primário, com potencial para formação de *hairpins*. Estes, imitando características estruturais dos pre-miRNAs, entram na via tradicional de formação dos miRNAs sem a clivagem pela enzima *Drosha* e produzem um miRNA maduro com capacidade regulatória (RUBY *et al.* 2007; WESTHOLM AND LAI 2011).

Existem 3 classes principais de pequenos RNAs em animais: os microRNAs, os RNAs de interferência (siRNAs) e os RNAs de interação piwi (piRNAs). Estes RNAs diferem-se uns dos outros na sua origem e biogênese, nas proteínas que irão

regular, no mecanismo de ação e na natureza dos seus alvos, entretanto, durante a tradução são incorporados a complexos RNA-proteínas (RNPs) com a finalidade de mediar o pareamento específico entre os ácidos nucleicos alvos. (LIBRI *et al.*, 2013)

2.4. Mecanismo de ação: regulação pós-transcricional pelos micro-RNAs

A regulação pós-transcricional pelos miRNAs se dá pelo pareamento da região 3'UTR-*untranslated region* do alvo com a região 5' do miRNA maduro (também chamada de *seed region* ou “região semente”) guiado pela proteína Argonauta presente no complexo miRISC. A região semente compreende os nucleotídeos 2 à 7 da extremidade 5' do miRNA e determina a qual mRNA o miRNA se ligará. Os mecanismos subsequentes de regulação gênica promovidos pelo miRISC dependerão diretamente do grau de complementariedade entre as bases nucleicas podendo seguir duas vias regulatórias: a via do RNA interferente pequeno (siRNA) e a via do miRNA. Alguns autores sugerem que esse pareamento, mediado pela Argonauta, deve ser influenciado por outras proteínas de ligação específica ao RNA, promovendo um nível adicional de especificidade a essas interações (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006).

O mecanismo exato da repressão da tradução mediada pelo miRNA ainda é uma questão de debate entre os autores (Figura 1) (KWAK *et al.*, 2010). Quando, durante o pareamento, a complementariedade entre as bases é imperfeita (maioria dos mamíferos), ocorrerá a inibição da tradução da proteína correspondente ao mRNA (OLSEN AND AMBROS 1999; PILLAI, *et al.* 2007). Autores demonstraram que a repressão da tradução pelos miRNAs pode estar associada a polirribossomos envolvidos no alongamento da proteína. A inibição pode ocorrer no início da tradução e antes de se completar a cadeia polipeptídica nascente como em etapas mais tardias. Quando a repressão ocorre no início da tradução, o RISC pode bloquear o recrutamento da subunidade ribossômica 60S ao complexo de pré-iniciação 40S, comprometer a função cap 5' ou induzir a desadenilação, que afeta a circularização do RNA alvo e da qual participam várias proteínas (TREVISAN, 2011). Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem dissociação prematura dos ribossomos, diminuição da taxa de alongamento e degradação do polipeptídeo

nascente (TREVISAN, 2011). A repressão pelos miRNAs podem levar a dissociação mais rápida dos poliribossomos, promovendo um despreendimento destes durante o alongamento da proteína (PETERSEN, BORDELEAU *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que os RNAm silenciados pelos miRNAs, juntamente com as proteínas silenciadoras Argonautas, se acumulam em compartimentos no citoplasma denominados *P-bodies* (*Processing Bodies* ou corpos de processamento). Nestes compartimentos, enzimas podem promover a desadenilação, o decapeamento ou a degradação do mRNA alvo, além disso os mRNAs também podem ser temporariamente estocados no interior destas estruturas, sendo dessa forma um importante mecanismo de controle do processo de tradução (VALENCIA-SANCHEZ *et al.* 2005; LIU *et al.*, 2008). (Figura 1)

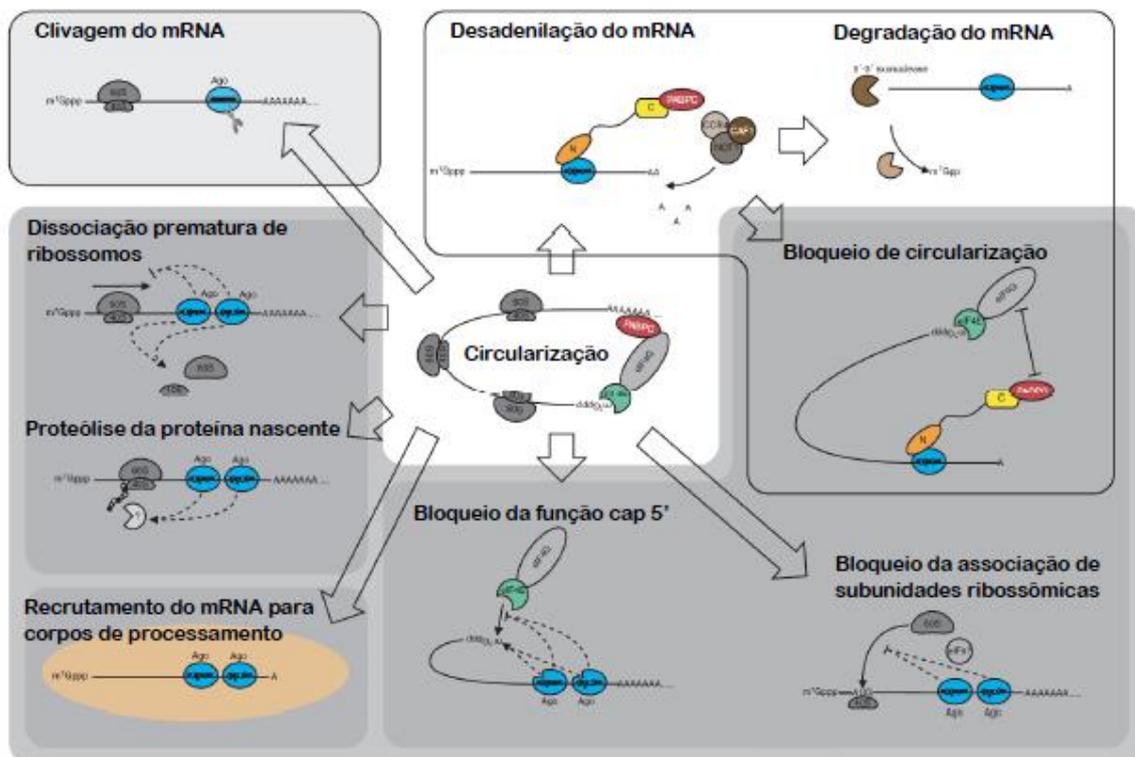


Figura 1. Mecanismos utilizados pelo complexo RISC para regular a expressão gênica: clivagem, desadenilação e degradação do mRNA, recrutamento do mRNA para corpos de processamento, bloqueio da circularização e da função cap 5 e alteração da associação das subunidades ribossômicas ou proteólise da proteína nascente. Fonte: KWAK *et al.*, 2010.

Uma outra ação do microRNA pode se dar através da via siRNA, na qual ocorre uma complementariedade perfeita ou quase perfeita entre as bases. Neste caso, o complexo RISC promove uma clivagem endonucleoásica no mRNA e, conseqüentemente, sua degradação (LLAVE *et al.* 2002; COWLAND *et al.* 2007; ZHANG *et al.* 2007). Essa complementariedade perfeita nem sempre é suficiente para induzir a clivagem do mRNA. Alguns autores tem sugerido que devem existir fatores adicionais que influenciam na atividade catalítica induzida pelo complexo RISC (CHEN *et al.*, 2004; VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2005; DU e ZAMORE *et al.*, 2005). A proteína Argonata2, presente em mamíferos, por exemplo, tem sido identificada como a única capaz de direcionar a clivagem endonucleoásica do mRNA. Esta proteína apresenta um domínio semelhante a RNaseH que contem os ativos que determinarão a clivagem do alvo. Uma mutação neste domínio está diretamente ligada a perda da capacidade catalítica da proteína (LIU *et al.* 2005; GU AND KAY 2010). Este modelo de pareamento perfeito e conseqüente clivagem do mRNA alvo é observado na maioria das plantas (LEWIS *et al.* 2003; ZHANG *et al.* 2007; AMBROS 2011). Entretanto, alguns miRNAs presentes em animais, como miR-127, miR-136, miR-196, miR-431, miR-433-3p, miR-433-5p, miR-434-3p e miR-434-5, também podem promover a clivagem dos seus alvos (DU AND ZAMORE, 2005) .

Sabe-se que um único microRNA pode se ligar e regular diferentes mRNA alvo, ou ainda, diferentes miRNAs podem se ligar de forma cooperativa e controlar um mRNA alvo, resultando em uma complexa rede de regulação (LEWIS *et al.* 2003; VALENCIA-SANCHEZ *et al.* 2006). Tal fato pode ser explicado devido aos miRNAs possuírem sequências pequenas nas regiões 5' que serão pareadas (ou *seed region*) (DU AND ZAMORE, 2005) e agirem sem a necessidade de pareamento completo na região 3' não traduzida dos alvos (BRENNECKE, STARK *et al.* 2005, SHRUTI *et al.* 2011), confirmando assim sua capacidade de regular vários genes envolvidos nas diversas funções biológicas.

MicroRNAs regulam milhares de genes humanos, os quais podem estar envolvidos na regulação gênica ou em outras funções básicas da célula como o controle do ciclo celular (ZHANG *et al.*, 2007). Acredita-se que tenham um papel importante em diversas vias regulatórias incluindo o controle do desenvolvimento, diferenciação de células hamatopoiéticas, apoptose, proliferação celular e

organogênese. Em mamíferos, miRNAs podem regular a diferenciação celular em diferentes tipos de tecidos, além de regularem a homeostasia e o crescimento celular (ZHANG, DAHLBERG *et al.*, 2007; SHRUTI, SHREY *et al.*, 2011).

Os perfis de expressão de miRNA variam nos diferentes tipos celulares. Alguns miRNAs são expressos em apenas um ou alguns poucos tecidos, outros podem exibir diferenças de níveis entre tecidos adultos e células embrionárias, já outros mostram uma regulação temporal (LIU ET AL., 2010). Devido a sua participação nos diversos processos biológicos, anormalidades na expressão dos miRNAs contribuem significativamente para o desenvolvimento de diversos processos patológicos, como doenças infecciosas, desordens cardiovasculares e neurológicas além do câncer. (TREVISAN, 2011)

As características e o desenvolvimento das doenças são resultados de diferentes padrões de diferenciação celular que são mantidos por um complexo mecanismo regulatório. O controle da expressão gênica é diversificado por processos subcelulares como “splicing” alternativo, remodelação da cromatina, estabilidade do mRNA, interações entre proteínas e entre DNA e proteínas, além do controle pós transcricional de outros transcritos de RNA mediado pelos miRNAs (SHRUTI, SHREY *et al.*, 2011).

2.5. MicroRNA e câncer

O câncer é uma doença multifatorial que depende de mutações em diferentes genes e culmina na alteração fenotípica de células. O seu início e progressão envolvem um processo complexo de várias etapas, que implica em uma progressiva aquisição de alterações genéticas e epigenéticas, nas quais são necessárias a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes. Neste processo, sequências de DNA mutadas são transcritas em mRNA e posteriormente traduzidas em proteínas funcionalmente aberrantes. (GOMES *et al.*, 2008; CIVETTA *et al.*, 2011;).

Os microRNAs são importantes reguladores da expressão gênica e atuam em vários processos celulares como diferenciação, crescimento e morte celular. Além disso, alterações na expressão de alguns microRNAs são comuns em cânceres humanos e estão diretamente relacionadas a iniciação e progressão dos tumores. (VALENCIA-SANCHEZ *et al*, 2005)

Muitos autores têm relatado alterações na expressão de miRNAs que contribuem para a patogênese de várias doenças malignas (CROCE *et al.*, 2004; VALENCIA-SANCHEZ *et al*, 2005; DU e ZAMORE *et al.*, 2005; TREVISAN, 2011; CHEN *et al.*, 2012). Estas alterações podem ser resultantes de mecanismos como deleções, ampliações e translocações genéticas, aumento do número de cópias ou mutações envolvendo *loci* de miRNAs, silenciamento epigenético, desregulação na maquinaria da biogênese do miRNA ou até mesmo interações entre microRNAs diferentes.

Para alguns autores os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos miRNAs em câncer são similares aos que afetam a expressão dos genes que codificam proteínas, como por exemplo as modificações epigenéticas ou mutações nas sequências de DNA como as deleções substituições, inserções, translocações e ampliações (TREVISAN *et al*, 2011; CRWLAND *et al.*, 2007)

Aberrações cromossômicas podem alterar a ação do miRNA mudando a sua expressão no tipo celular ou no tempo (MAVARKIS *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012). O aumento ou a diminuição da expressão de alguns miRNAs também podem estar relacionados a processos envolvidos no câncer, como a proliferação celular. Mutações pontuais nos sítios de ligação podem comprometer a capacidade de silenciamento do miRNA e levar a alterações na sua biogênese e na repressão de vários genes, além de contribuir para a tumorigênese (CALIN *et al.*, 2005). Alterações epigenéticas como metilação do DNA e modificações das histonas podem afetar a expressão dos miRNAs. Além disso, alterações quantitativas e qualitativas dos componentes protéicos envolvidos na biogênese dos miRNAs, como por exemplo alterações na fosforilação da TRBP, podem afetar na regulação pós-transcricional dos miRNAs (PAROO *et al*, 2009; IORIO AND CROCE 2012).

A primeira descrição do envolvimento de miRNAs no processo de tumorigênese foi publicado por Calin *et al.* em 2002. Neste estudo, os autores

demonstraram que determinada região do cromossomo 13q14, não continha um gene supressor de tumor, mas sim codificava 2 microRNAs, o miR-15a e o miR-16-1. Esta região do cromossomo estava frequentemente deletada em mais de 50% dos casos de leucemia linfocítica crônica, resultando na perda ou diminuição da expressão destes microRNAs e conseqüentemente atuando na patogênese e progressão da doença (CALIN *et al.*, 2002). Em adição Zhang *et al.*, demonstraram que a deleção do cluster miR-17-92 foi encontrada em melanomas, câncer de ovário e pulmão. (ZHANG *et al.*, 2007). A partir daí, vários miRNAs envolvidos em processos tumorais vem sendo codificados e estudados, sendo de extrema importância para o diagnóstico, a classificação e o prognóstico do câncer.

Alterações epigenéticas como metilações de “ilhas CpG” ou modificações nas histonas podem ocorrer em alguns genes de microRNAs e estarem relacionadas com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, como por exemplo a supressão do tumor (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Saito *et al.* em 2006 identificaram um fenômeno similar no qual alguns miRNAs poderiam ser regulados por metilações no DNA ou desacetilação das histonas (SAITO *et al.*, 2006).

As “ilhas CpG” são regiões do DNA maiores do que 200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG, as quais, geralmente, encontram-se desmetiladas. (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG de células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica, na qual, a adição de um radical metil (-CH₃) sobre uma citosina que precede a uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a essas regiões resultando na ausência de transcrição. Um exemplo é a repressão da transcrição do miR-127 em células tumorais devido a hipermetilação de “ilhas CpG” na região promotora do gene, alterando a sua função e dificultando, assim, a expressão deste miRNA. (SAITO *et al.*, 2006)

A expressão de alguns miRNAs também pode ser regulada por fatores de transcrição, a exemplo da proteína p53, um supressor tumoral que regula centenas de genes codificadores de proteínas (CHEN *et al.*, 2012). He *et al.*, em 2007 analisaram o perfil de expressão de uma família de genes codificadores de miRNAs

os quais também são regulados pela p53. Os autores descobriram que a p53 reconhece os promotores e ativa a transcrição destes miRNAs miR-34-a-c, os quais funcionam como potentes inibidores do ciclo celular e da apoptose atuando em conjunto com outros fatores que auxiliam a inibição da proliferação dos tumores. (HE *et al.*, 2007)

Sabe-se hoje que várias proteínas de ligação ao RNA podem afetar a maturação ou o processamento dos miRNAs atuando diretamente na sua biogênese, algumas envolvidas na regulação da progressão do câncer. (CHEN *et al.*, 2012). Um exemplo é a superexpressão da proteína Lin-28 que ao se ligar ao pre-let-7 altera a estrutura molecular deste premiRNA inibindo a ligação da enzima Dicer e o seu processamento. Tal mecanismo leva a baixa expressão do miRNA maduro, o let-7, levando a progressão do câncer. (CHEN *et al.*, 2012).

Recentemente Chen *et al.*, 2011 identificaram uma outra forma de regulação dos miRNAs através da interação direta entre eles devido a complementariedade de suas bases. Os mesmos autores demonstram que o let-7 é um miRNA endógeno com a capacidade de suprimir a expressão de múltiplos oncogenes relacionados com o desenvolvimento do câncer. Durante a progressão do câncer o mir-107 liga-se ao let-7, desestabilizando-o e permitindo que as oncoproteínas escapem da supressão mediada pelo let-7. (CHEN *et al.*, 2011)

Os miRNAs que atuam no processo neoplásico são denominados de oncomiRs, podendo funcionar semelhante a um oncogene, no qual anormalidades genéticas levam ao incremento do controle positivo da proliferação celular, ou os miRNAs podem também funcionar como genes supressores de tumor, nos quais anormalidades genéticas tornam-os incapazes de regular negativamente a atividade proliferativa (ESQUELA-KERSCHER *et al.*, 2006). Comparado com tecidos normais, os miRNAs oncogênicos, podem estar com a expressão aumentada em tumores malignos atuando na estimulação e proliferação celular e inibindo a ação de genes supressores tumorais e de genes que controlam a apoptose. Já os miRNAs supressores tumorais apresentam uma expressão reduzida em tumores malignos comprometendo sua atuação contra o desenvolvimento de neoplasias através da inibição de oncogenes (LOPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2012, ZEN AND ZHANG 2012). Recentemente, descobriu-se que um microRNA pode exibir tanto atividade

oncogênica como supressora tumoral; um único microRNA pode também ser capaz de regular diversos genes-alvo e controlar simultaneamente atividades como proliferação celular e apoptose (KOTA *et al.*, 2010).

Uma outra classe de miRNAs, os “metastamiRs”, tem sido relacionada ao processo de metástase dos tumores, podendo ter efeito pro ou anti-metástase. Embora não influenciem o desenvolvimento ou a iniciação dos tumores, estão diretamente ligados a regulação de importantes passos no processo de metástase como a apoptose e a angiogênese (LOPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2012).

A maioria dos genes que codifica os microRNAs estão localizadas em sítios frágeis ou em regiões associadas ao câncer. (CALIN *et al.*, 2002). Podem se localizar em regiões não codificantes ou em íntrons de codificação de proteínas, além disso podem estar em locais separados de outros miRNAs, sugerindo que formam sua própria unidade transcricional, ou podem estar agrupados formando os *clusters*, que são transcritos juntamente (CULLEN *et al.*, 2004; DU AND ZAMORE 2005; CHAN AND SLACK 2007).

Recentemente, os microRNAs tem sido identificados como importantes biomarcadores tumorais. O perfil de expressão de alguns miRNAs pode distinguir os tecidos normais dos tumores, como também os diferentes tipos de câncer, além de classificar os subtipos, identificar os tecidos de origem dos tumores e facilitar o diagnóstico (HU *et al.*, 2011).

2.6. MicroRNA-9

O miR-9, bem como o seu homólogo o miR-79, é um curto RNA não codificantes envolvido na regulação da expressão gênica. A sua forma madura é formada por aproximadamente 21 nucleotídeos, processado pela enzima Dicer, da fita 5´ do pre-miR-9 e da fita 3´ do pre-miR-79. Nos vertebrados o miR-9 apresenta uma expressão elevada em células cerebrais, sugerindo uma possível regulação na diferenciação neuronal. (mirbase.com). A redução da expressão do miR-9 já foi reportada em vários cânceres humanos como o câncer de mama, de pâncreas, o de

rim e também no câncer de boca. Entretanto a metelição deste miRNS, que estaria relacionada com a sua desregulação nos tumores, não foi completamente estudada. (MINNOR *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Minor et al., em 2012, foi estudado a expressão do miR-9 em 107 casos de carcinoma de células escamosas (CCE) de boca e de orofaringe. Este estudo avaliou as alterações genéticas e epigenéticas envolvidas no silenciamento do mir-9 as quais seriam responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento em CCE. Os autores concluíram através de análises de expressão pelo método de PCR que que metilações no miR-9 em células tumorais, especialmente no miR-9-1 e miR-9-3, reduzem a expressão destes miRNAs e conseqüentemente a proliferação celular. Assim o miR-9 funciona como um supressor tumoral em CCE de boca e orofaringe inibindo a proliferação celular e elevando a expressão do gene supressor tumoral PTEN. (MINNOR *et al.*, 2012)

2.7. MicroRNA-16

O miR-16 juntamente com o miR-15, o mir-195 e o miR-457, fazem parte de um grupo de miRNAs que estão relacionados à sequência percussora da família genética do mir-15. É um RNA não codificante com funções de regulação gênica. Esta família de miRNAs é específica de vertebrados tendo os seus membros validados experimentalmente em várias espécies. (mirBase.com). O artigo original que identificou e validou o miR-16, juntamente com o miR-15, foi publicado em 2002 por Calin et al., num estudo sobre a leucemia linfóide cônica de células B. Esta doença caracteriza-se pela proliferação e acúmulo progressivo dos linfócitos B no sangue periférico e a expressão do antígeno CD5⁺ de forma aberrante. Os autores sugeriram que estes miRNAs atuavam como supressores tumorais e que mutações nos seus genes, localizados na região cromossômica 13q14.3, inativariam sua expressão. Uma mutação pontual no pre-miR-16-1, com a troca de uma base C por uma base T, reduziria a expressão do miR-16-1 nas células dos pacientes com leucemia quando comparados a pacientes normais, sugerindo que o gene envolvido

na transcrições do miR-16 atuam de forma importante na homeostasia das células CD5⁺. (CALIN *et al.*, 2002)

2.8. MicroRNA-17

O cluster miR-17-92 está localizado na região cromossômica 13q31.3, uma região amplificada em várias doenças malignas hematopoiéticas e em tumores sólidos. O seu pri-miRNA apresenta uma estrutura contendo seis grampos que, após o processamento, irão dar origem a 6 miRNAs maduros, com a capacidade de regular diferentes mRNAs alvos: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92-1 (OLIVE *et al.*, 2010)

A exata atividade de cada miRNA presente no cluster miR-17-92 ainda não foi completamente esclarecida. Entretanto alguns autores sugeriram, através de estudos feitos em ratos, que estes miRNAs devem atuar de forma conjunta e sobreposta. (HAAFTEN *et al.*, 2010; OLIVE *et al.*, 2010). O miR-17-92 pode ter diversas funções no desenvolvimento tumoral, a sua superexpressão pode reprimir a apoptose modulada pela proteína c-myc e encurtar a latência do tumor, pode ainda se ligar ao fator de transcrição E2F1 e E2F3 promovendo a proliferação celular, além de ser capaz de mediar o fator VEGF aumentando a angiogênese e proporcionando a sobrevivência de células malignas. (OLIVE *et al.*, 2010; DEWS *et al.*, 2006) (Figura 2)

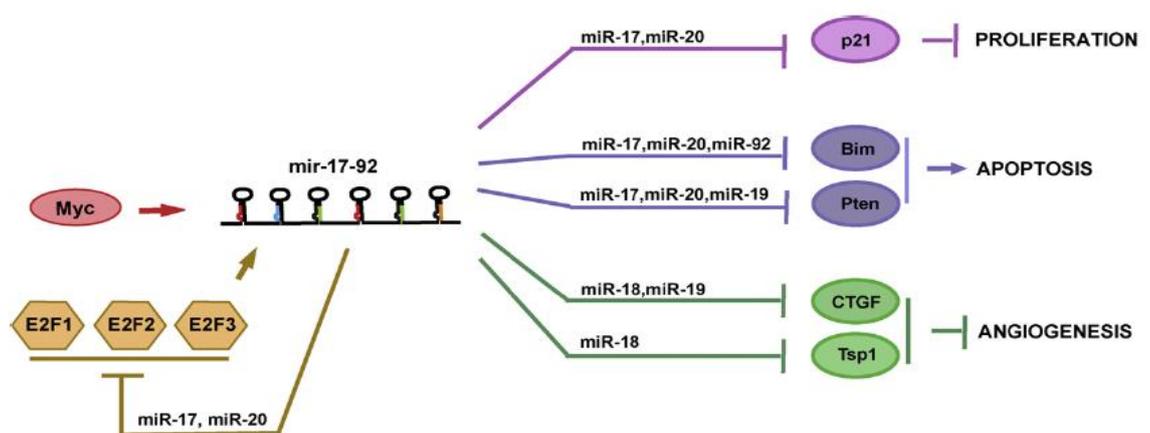


Figura 2. Esquema demonstrando as possíveis funções do cluster miR-17-19. Dependendo do tipo celular o microRNA pode assumir diferentes funções. Fonte: Olive, Jiang, He et al., 2010

Em um estudo realizado por Chang et al., 2013, a expressão do cluster miR-17-92 foi estudada em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal (CCE). Os autores concluíram que esta família de miRNAs encontrava-se com a expressão significativamente reduzida em pacientes com CCE, especialmente o miR-17 e o miR-20a, além disso os pacientes que apresentaram baixos níveis de expressão do miR-17-20 apresentaram também um prognóstico ruim, estágio clínico avançado da doença e metástase nos linfonodos. Pode-se perceber que apesar da sua conhecida capacidade oncogênica, o miR-17-20a também pode apresentar capacidade supressora tumoral, e a sua mutação e baixa expressão pode implicar no desenvolvimento tumoral. (CHANG *et al.*, 2013)

2.9. MicroRNA-132

O miR-132 é um pequeno RNA não codificante com importantes funções de regulação da expressão gênica de vários processos incluindo o desenvolvimento neurológico, transmissões sinápticas, inflamação, proliferação de células endoteliais e angiogênese (ANAND *et al.*, 2010). O miR-132 é transcrito de uma região intergênica (região localizada entre genes codificantes, diferente de introns) do cromossomo humano 17 com o auxílio do fator de transcrição CREB, uma proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (mirbase.com).

Em um estudo realizado por Anand et al., 2010, visando identificar os miRNAs responsáveis pela ativação da proliferação das células endoteliais, os autores demonstraram que o processo de formação de novos vasos em patologias poderia ser regulado pelo miR-132. Já, Wong et al., 2008 ao pesquisarem o perfil de expressão de diversos microRNAs em câncer de células escamosas de língua encontraram uma expressão aumentada do miR-132 nesses tumores.

2.10. MicroRNA- 195

O miR-195, localizado na região cromossômica 17p13.1, faz parte da família precursora miR-15 juntamente com o miR-15-a, miR-15-B, miR-16-1, miR-16-2 e o miR-495. Esse *cluster* pode estar relacionado a processos de proliferação celular através da modulação de genes que controlam o ciclo celular, além de funcionar como um supressor tumoral do oncogene BCL2, estando com sua expressão diminuída em células tumorais. (mirbase.com)

Alguns estudos têm sido feitos visando detectar miRNAs em tecidos tumorais e também na circulação. Tais estudos são de grande importância pois são capazes de identificar quais miRNAs estão presentes no tipo de câncer estudado, bem como podem sugerir o prognóstico da doença. Em 2010 Heneghan *et al.*, estudaram a expressão do miR-195 em câncer de mama. Os autores observaram que amostras sanguíneas colhidas no pré-operatório de pacientes com a doença apresentaram uma expressão elevada deste miRNA, bem como após a remoção do tumor os níveis de expressão voltaram ao normal, indicando uma alta correlação do miR-195 com a presença do tumor. (HENEGHAN *et al.*, 2010)

Em outro estudo realizado por Scapoli *et al.*, em 2010 os autores estudaram 15 perfis de miRNAs relacionados ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Dos miRNAs estudados miR-489, miR-129, miR-23a, miR-214, miR-23b, miR-92, miR-25, miR-210, miR-212, miR-515, miR-146b, miR-21, miR-338 estavam superexpressos no tumor, já os miR-520h, miR-195, miR-378, miR-135b, miR-224, miR-34a apresentavam-se com a expressão reduzida. Os autores concluíram que anormalidades na expressão destes miRNAs estavam intimamente ligadas com a progressão do câncer. (SCAPOLI *et al.*, 2010)

2.11. MicroRNA-221

O miR-221 é um curto RNA de aproximadamente 20-24 nucleotídeos, transcrito em conjunto com o miR-222 e localizado no cromossomo X. Vários estudos

tem apontado papéis diferentes deste microRNA, ora como oncogene ora como supressor tumoral. (KOELZ *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2009; GAROFALO *et al.*, 2013)

Yang *et al.*, 2010 realizaram um estudo sobre a expressão do miR-221 e miR-222 em carcinoma de células escamosas orais. Nesse estudo os autores concluíram que o aumento da expressão destes miRNAs estava diretamente relacionada ao desenvolvimento desta neoplasia. O miR-221, juntamente com o miR-222, fazem parte de um *cluster* localizado no cromossomo X, o qual, ao sofrer alterações gênicas e estímulos oncogênicos podem contribuir para o aumento da expressão destes miRNAs. A expressão desregulada e elevada dos miR-221/222 no CCE, os quais ligam-se a proteínas alvo p27 e p57, está relacionada a progressão do ciclo celular, oncogênese, apoptose e resistência das células tumorais a drogas. A família de proteínas Cip/Kip incluem a p21(cip1), p27(kip1) e p57(kip2), representam as proteínas que interagem de forma não específica com CDKs (cinases dependentes de ciclinas) ou com complexos ciclina-CDK bloqueando sua atividade de cinase o que determina a parada do ciclo celular e a apoptose. A desregulação da atividade das ciclinas e a baixa expressão da p27 e p57 devido a expressão elevada do miR-221/222 favorece a progressão do ciclo celular, evasão da apoptose e está associada a um pior prognóstico em pacientes com CCE. (Yang *et al.*, 2010)

Estudos diversos vêm apontando o papel importante do miR-221 e o seu homólogo, o miR-222, como reguladores dos mastócitos, tanto em tecidos normais, como também em doenças (MAYORAL *et al.*, 2009; CALIN *et al.*, 2013). Um estudo realizado por MONTICELLI *et al.*, 2011 os autores demonstraram que a regulação pós-transcricional pelo miR-221 estaria relacionada a ativação de checkpoints no ciclo celular dos mastócitos.

2.12. MicroRNAs e tecidos parafinados

Atualmente, o desenvolvimento de métodos de extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina tem possibilitado estudos retrospectivos de biologia molecular. Através deste processo, amostras de tecidos humanos obtidos em procedimentos cirúrgicos são arquivadas por longo prazo,

representando grandes bancos de dados e possibilitando um estudo futuro deste material biológico (RIBEIRO-SILVA AND GARCIA; 2008).

A fixação é um processo de modificações químicas complexas das macromoléculas presentes nas células e tecidos, com a finalidade de preservar a estrutura e os componentes funcionais impedindo que os tecidos deterioreem. A formalina ou formol cria pontes de metileno entre as proteínas promovendo a fixação e, quando não preparada adequadamente, pode resultar na fragmentação dos ácidos nucleicos ou na degradação dos tecidos devido ao ácido fórmico proveniente do formaldeído (ARTZ *et al.*, 2011).

Alguns autores afirmam entretanto, que os tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) representam uma forma estável, barata e fácil de armazenamento de material biológico. (ARTZ *et al.*, 2011).

As análises de microRNA em tecidos FFPE durante muito tempo foram desconsideradas devido principalmente as dúvidas sobre os efeitos da fixação causados nos tecidos pelo formol, como também, sobre a quantidade, qualidade e grau de correlação entre os tecidos parafinados e os tecidos frescos (Xi *et al.*, 2007). Diferentes métodos de extração de miRNA de tecidos parafinados tem sido desenvolvidos com a finalidade de melhorar e elucidar tais questões.

Um estudo realizado por Art *et al.*, 2011, avaliou a quantidade e a qualidade de RNA extraído e a expressão, através de qPCR, dos miR-155 e miR-160a em amostras de tecidos de câncer de pulmão que foram submetidas a fixação por formol à 10% ou a fixadores livres de formol (FineFix, RCL-2 e HOPE). O RNA das amostras foi extraído utilizando dois kits para extração de RNA em material parafinado: RNeasy FFPE Kit (Quiagen) ou o RcoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion). Para avaliar a influência do tempo de estocagem dos blocos parafinados e a possível degradação do RNA dos tecidos, foram avaliados blocos estocados a 1 ano e a 13 anos. Foram observados maiores rendimentos, ou seja, maiores quantidades de RNA extraídos nos tecidos parafinados fixados em formol. Tal achado pôde ser atribuído ao fato dos kits de extração serem específicos para materiais fixados em formol. Além disso, o rendimento foi menor para blocos estocados a mais tempo (13 anos). Já, quando analisada a pureza das extrações, através da razão A260/280 e a260/230, as amostras fixadas em parafina apresentaram menores escores quando comparada aos métodos livres de parafina.

Os autores concluem comentando que, apesar da fixação em formalina poder levar a uma degradação do RNA da amostra, a quantificação dos miRNAs não foi afetada pelo método, possivelmente devido a pequeno tamanho desta molécula, o que torna possível ser detectado pelo TaqMan, independente do método de fixação. (ARTZ *et al.*, 2011)

Segundo os autores supracitados, os diferentes métodos de extração de microRNA disponíveis podem afetar os resultados das extrações, sendo que a melhor qualidade e integridade do RNA foi alcançada com o uso de kits que continham de colunas de sílica, como o miRNeasy FFPE Kit (Quiagen, Hilden, Germany).

Em 2007 Xi *et al.* realizaram um estudo sistemático visando avaliar a expressão do hsa-miR-16 em 40 amostras de tumor colorretal fixados em formol e embebidos em parafina. Além disso, para analisar a influência do tempo de fixação na formalina nos tecidos, avaliaram através de PCR quantitativo a expressão deste miRNA em amostras de pulmão de camundongo frescas e fixadas em parafina por 1, 2, 3, 4 ou 5 dias. Os autores concluíram que a expressão do miRNA estudado apresentou-se relativamente estável e não foi afetada significativamente pela fixação em formalina até 5 dias. Atribuem esse achado ao pequeno tamanho desta molécula bem como a sua estrutura secundária o que confere uma maior estabilidade ao miRNA quando comparado ao RNA. Ao analisarem a expressão do miRNA extraído de amostras de câncer colorretal estocadas à 10 anos, foi demonstrado uma relativa estabilidade desta molécula. Os autores sugerem que o estudo da expressão de miRNA estocados em amostras fixadas em formol e embebidas em parafina é possível e constitui uma grande promessa de biomarcadores e para futuras pesquisas relacionadas ao câncer e outras doenças. (XI *et al.*, 2007)

O DNA extraído de tecidos parafinados fixados em formalina tem sido usado para diferentes análises com grande sucesso, principalmente devido a estabilidade desta molécula. Entretanto, as modificações químicas provocadas pela formalina na fixação dos tecidos pode acelerar a degradação do RNA, comprometendo as análises de expressão gênica. Em contrapartida, devido ao pequeno tamanho e a sua estrutura secundária, o microRNA tem se mostrado uma molécula mais estável e passível de ser utilizada em estudos de expressão gênica. (XI *et al.*, 2007; ARTZ *et al.*, 2011; MENG *et al.*, 2013)

2.13. Tumores de glândula salivar

Os tumores de glândula salivar englobam mais de 40 neoplasmas, muitos dos quais apresentam uma significativa diversidade morfológica (BARNES *et al.*, 2005; PAPADOGEORGAKIS *et al.*, 2011). Por representar cerca de 3-5% de todos os tumores de cabeça e pescoço, as neoplasias de glândula salivar são consideradas incomuns. Os tumores originados de glândulas salivares menores constituem 10 a 15% dos tumores de glândula salivar, podendo se localizar no palato, lábios, mucosa jugal, língua, assoalho de boca, entre outras regiões (TOIDA *et al.*, 2005; VICENTE *et al.*, 2008). É considerado um grupo de tumores bastante heterogêneo, uma vez que apresentam inúmeros tipos histológicos e comportamentos biológicos distintos (YIH *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008).

Esses tumores geralmente são assintomáticos e acometem mulheres entre a terceira e sexta década de vida, podendo exibir aumento da região afetada. Desenvolvem-se principalmente nas glândulas parótida, submandibular e glândulas menores da região do palato (JABER *et al.*, 2006; OCHICHA *et al.*, 2009). Dados epidemiológicos mostraram que o principal tumor benigno que acomete as glândulas salivares é o adenoma pleomórfico, enquanto que o carcinoma mucoepidermóide e o carcinoma adenoide cístico se alternam como mais frequentes no grupo dos tumores malignos que acometem essas glândulas. (BARROS *et al.*, 2010; MELO-FILHO *et al.*, 2011, BJORDAL *et al.* 2011,LUKSIC *et al.*, 2012; JAAFARI-ASHKAVANDI *et al.*, 2013).

O adenoma pleomórfico (AP) é caracterizado pela sua diversidade histológica, contendo células epiteliais e mioepiteliais dispostas por entre as matrizes de tipos variados: fibrosa, mixóide, cartilaginosa ou hialina. É a neoplasia benigna mais comum de glândula salivar (SWELAM *et al.*, 2005; MENDENHALL *et al.*, 2008).

Dos tumores malignos que acometem as glândulas salivares menores, o carcinoma mucoepidermóide (CME) é o mais comum deles, sendo composto por diferentes proporções de células epidermóides, mucosas, intermediárias, colunares e células claras, com presença ou não de formações císticas (LUNA, 2006; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2006). Com base nas características morfológicas e

citológicas, são divididos em baixo, intermediário e alto grau (LUNA, 2006; RAPIDIS *et al.*, 2006). Menos freqüente, apresenta-se o carcinoma adenóide cístico (CAC), um tumor de crescimento lento, com altos índices de recorrência, invasão local e metástase à distância, que exhibe três padrões histológicos: cribriforme, tubular e sólido (TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2006). Por outro lado, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) é um tumor de crescimento infiltrativo e comportamento pouco agressivo, que acomete quase que exclusivamente as glândulas salivares menores. Possui diversos padrões histológicos, podendo estar disposto em cordões, túbulos, arranjo papilífero ou em agregados sólidos (PALERI *et al.*, 2008).

As células mioepiteliais são encontradas ao redor de ductos e ácinos das glândulas (EL-NAGGAR e HUVOS, 2005) e compartilham características de células do músculo liso, como a propriedade contrátil (OGAWA, 2003). Elas podem ser encontradas em uma série de neoplasias (EL-NAGGAR e HUVOS, 2005). Quando transformadas, podem aumentar a capacidade de síntese da membrana basal tornando os tumores com diferenciação mioepitelial de caráter único de acumuladores de matriz (COSTA, 2009). Os tumores que possuem componentes mioepiteliais podem apresentar duas populações celulares: epiteliais e mioepiteliais ou apenas uma população de células mioepiteliais (NEVES, 2009).

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão gênica de microRNAs relacionados à ativação de mastócitos e a angiogênese em tumores de glândula salivar, na tentativa de contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese desta doença.

3.2. Objetivos específicos

- Localizar, por imuno-histoquímica, a presença de células mastocitárias em 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11 carcinomas adenóides císticos, 9 carcinomas mucoepidermóides e 11 adenomas pleomórficos;
- Localizar, por imuno-histoquímica, a presença de vasos sanguíneos em 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11 carcinomas adenóides císticos, 9 carcinomas mucoepidermóides e 11 adenomas pleomórficos;
- Comparar a densidade dos mastócitos com a densidade dos vasos sanguíneos em 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11 carcinomas adenóides císticos, 9 carcinomas mucoepidermóides e 11 adenomas pleomórficos;
- Analisar por qPCR o perfil de expressão do miR-221 relacionado com a ativação de mastócitos e os microRNAs: miR-9, miR-16, miR-17, miR-132 e miR-195 relacionados com a angiogênese em 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11 carcinomas adenóides císticos, 9 carcinomas mucoepidermóides e 11 adenomas pleomórficos;
- Associar o perfil de expressão gênica dos miRNAs estudados com a densidade de mastócitos e a densidade dos vasos sanguíneos nos tumores de glândula salivar.

4. METODOLOGIA DE PESQUISA

4.1. Considerações Éticas

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi elaborado considerando-se as Resoluções 466/12 e 347/05, as quais tratam respectivamente sobre os aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e da utilização ou armazenamento de material biológico em pesquisas. O mesmo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia, UFBA, com número SISNEP CAA2 14963313.6.0000.5024 e parecer favorável número 487.2995.1.

4.2. Critérios de seleção da amostra

As amostras foram obtidas a partir de arquivos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (Salvador, Bahia) em parceria com instituições privadas. A amostra foi composta de 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11 casos de carcinoma adenóide cístico, nove casos de carcinoma mucoepidermóide e 11 casos de adenoma pleomórfico. Para o controle normal, no estudo do perfil de expressão gênica foram utilizados dois casos de glândulas salivares normais, enquanto que, para o estudo imuno-histoquímico, foram utilizados cinco controles que incluíam os dois casos de glândulas salivares normais supracitados e três casos que apresentavam tecido glandular na periferia dos espécimes de alguns dos tumores estudados.

4.3. Avaliação dos parâmetros clínicos

A avaliação dos parâmetros clínicos dos indivíduos foi realizada através dos dados coletados nas fichas clínicas e prontuários dos pacientes selecionados.

Foram investigadas características como gênero, idade, localização e tamanho do tumor primário.

4.4. Obtenção da amostra

Os espécimes fixados em formol e emblocados em parafina disponibilizados foram encaminhados para a verificação da existência de material biológico no Serviço de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFBA (FOUFBA).

4.5. Exame histomorfológico

Para a revisão do diagnóstico e seleção de áreas representativas de cada um dos tumores, foram feitos cortes de 5 µm de espessura nos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. Após, foram corados pela técnica hetatoxilina-eosina (H/E) e analisados por um patologista bucal experiente. Os aspectos mais representativos das lesões foram descritos, bem como foram realizadas suas graduações histológicas baseada na classificação da Organização Mundial de Saúde (BARNES *et al.*, 2005)

4.6. Técnica Imuno-histoquímica

Para a realização da técnica imuno-histoquímica foram realizados cortes de 3µm de espessura. Primeiramente, o material biológico foi fixado em formol, desidratado em álcool, clarificado com xilol e emblocado em parafina. Por fim, os blocos de parafina foram cortados e os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas.

Os cortes dispostos nas lâminas foram desparafinados. Para isso foram feitos dois banhos de xilol durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram re-hidratados em dois banhos de álcool absoluto durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi feita uma lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada para a hidratação total. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se a solução de Citrato monohidratado, pH 6.02 em calor úmido à 98°C por 40 minutos ou solução de Tripsina à 1% em calor úmido à 37°C durante 30 minutos, a depender do anticorpo.

Em seguida, foi necessário esperar os cortes atingirem a temperatura ambiente, para então serem novamente lavados em água corrente, acompanhados de duas passagens em água destilada e do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual foi realizado um banho de 40 minutos protegido da luz.

Bloqueada a peroxidase endógena, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada para retirada do excesso de H₂O₂ e imersas em solução de PBS/BSA 1% (solução salina fosfatada/ soro albumina bovina) sendo dois banhos, cada um por 5 minutos. Em seguida realizou-se a diluição do anticorpo primário com solução redutora de background (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Os anticorpos primários foram incubados em cuba úmida, em temperatura ambiente. Os anticorpos, diluição, recuperação antigênica e marca comercial estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos, diluição, recuperação antigênica e marca comercial.

<i>Anticorpos</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação Antigênica</i>	<i>Marca Comercial</i>
CD-134	1:50	Citrato pH 6,0	Dako Cytomation Glostrup, Dinamarca
Mast-cell	1:50	Tripsina 1%	Dako Cytomation Glostrup, Dinamarca

Depois, as amostras foram lavadas e as lâminas foram imersas em dois banhos da solução PBS/BSA 1% durante 5 minutos, para então ser aplicado o polímero do Kit Envision (Dako Corporation, Carpinteria, USA), à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida foi feita uma nova imersão em solução

PBS/BSA 1%. Para a revelação da reação foi empregado o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina, Dako Corporation, Carpinteria, USA) em câmara escura por 5 minutos.

Após nova lavagem com água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos. Após desidratação e diafanização seguiu-se a montagem das lâminas com colocação da lamínula sobre o tecido para a conservação da amostra.

4.6.1. Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica das células mastocitárias foi realizado identificando a presença ou ausência destas células entre diferentes tumores de glândula salivar e glândula normal. Foram considerados positivos os casos onde as células mastocitárias exibiram marcação de cor castanha (UENO *et al.*, 2000). Para o anticorpo CD34, foi realizado o exame imuno-histoquímico, identificando a presença ou ausência dos vasos sanguíneos com um lúmen de até 50 μm nos diferentes tumores e em glândula salivar normal (WEIDNER *et al.*, 1995; MAEDA *et al.*, 1995; VIDAL *et al.*, 2013). Foram considerados positivos os casos onde as células endoteliais exibiram marcação de cor castanha. Posteriormente, foi estabelecido o índice angiogênico por meio da determinação da microdensidade vascular (MVC).

A análise das células marcadas positivamente foi realizada por dois observadores previamente treinados, através de microscopia de luz de alta definição (AXIOSTARPLUS, ZEISS, Germany 2008), com um aumento de 400x em 10 campos de maior imunorreatividade (hot spots), evitando áreas de inflamação e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado. Após a captura através de uma câmera digital (AXIOCAM ICc3, ZEISS, Germany 2008), foi realizada a contagem manual das células mastocitárias e dos vasos sanguíneos imunomarcados por mm^2 , utilizando-se de um software (AXIOVISION Rel 4.8, ZEISS, Germany 2008).

A quantificação das células mastocitárias e vasos sanguíneos positivos foi calculada pela proporção do número médio de células e vasos por 10 campos para cada caso. Foi descrito também a localização das células mastocitárias imunomarcadas nas áreas intratumoral e peritumoral dos diferentes tumores. Para os vasos sanguíneos considerou-se também as células imunopositivas isoladas, bem como os grupos de células imunopositivas, com um lúmen de até 50 μm localizados preferencialmente em áreas intratumorais (WEIDNER et al., 1995, MAEDA et al., 1995). Em adição, foi feita uma comparação entre a densidade de mastócitos e de vasos sanguíneos entre os diferentes tumores.

4.7. Estudo do Perfil de Expressão Gênica pela Técnica do Quantitative real-time PCR (qPCR)

A Técnica do qPCR foi desenvolvida no Laboratório de Patologia Investigativa do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital A.C. Camargo (São Paulo). A realização da Técnica qPCR, bem como a análise dos resultados obtidos foi supervisionada por pesquisador (C.M.C.C.) com ampla experiência no tema.

4.7.1. Extração dos miRNAs das amostras parafinadas

Foram feitos 4 cortes de 5 μ em cada bloco de parafina contendo o material biológico a ser analisado. Inicialmente, o micrótomo foi limpo com xilol e, para cada corte, foi utilizada uma nova navalha evitando contaminação entre os espécimes. Os cortes foram armazenados em microtubos *RNase-free* estéril de 1,5mL com o auxílio de palitos de dente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado com EPIs adequados e luvas para procedimento sem pó. Os microtubos foram identificados e imediatamente armazenados em temperatura de -80°C até o momento do transporte em gelo seco para a realização da extração do RNA e técnica do qPCR.

Para o isolamento do microRNA foi utilizado o Kit miRNeasy FFPE Kit (Quiagen, Tokyo, Japan). Todo o procedimento foi realizado em laboratório apropriado com temperatura ambiente entre 15 e 25°C. Inicialmente a parafina foi removida das secções cortadas do material através de 1000µL de Solução de Desparafinização (xilol), agitadas vigorosamente por 10 segundos e centrifugada por 2 minutos, a 14.000 rpm, em temperatura ambiente para o material depositar-se no fundo do tubo. Posteriormente foi adicionado 1000 µL de etanol a solução, a qual foi agitada e centrifugada por 2 minutos, a 14.000 rpm, em temperatura ambiente. Todo o etanol foi removido com o auxílio de uma centrifuga à vácuo.

Foi adicionado ao microtubo 240µL de uma solução tampão PKD, agitada e centrifugada por 1 minuto. Ao mesmo microtubo foi adicionado 10 µL de Proteinase K (*Proteinase K*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan), incubou-se à 56°C por 15 minutos e após 80°C por 15 minutos. Posteriormente o material foi incubado em gelo por 3 minutos e após centrifugado por 15 minutos, a 13.500 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo *RNase-free* de 2mL e submetido ao tratamento com 25µL de reforço de solução tampão para DNase (*DNase Booster Buffer*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan) e 10 µL de solução de DNase (*RNase-Free DNase*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan). Em seguida, foi adicionado também à amostra 500µL do Tampão RBC (*Buffer RBC*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan) e 1750µL de etanol com concentração de 100%. Setecentos microlitros do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e centrifugado por 15 segundos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. Neste microtubo o sobrenadante passou por uma coluna composta por membrana de sílica (*RNeasy MinElute spin column*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan) por qual todo o RNA foi separado dos contaminantes. Após, 500 µL do tampão RPE (*Buffer RPE*, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan) foi adicionado a coluna, centrifugado por 15 segundos e, posteriormente, por 2 minutos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. Por último, o RNA preso à membrana de sílica foi eluído em 25 µL de água livre de RNase (RNase-Free Water, miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Tokyo, Japan), centrifugado por 60 segundos, a 14.000 rpm, em temperatura ambiente e armazenado em temperatura de -80°C .

Para mensurar a quantidade, qualidade e pureza do RNA extraído dos tecidos parafinados, 1,5 µL do RNA total extraído de cada amostra foi analisado em um

aparelho de espectrofotometria (NanoDrop™, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Foi considerada satisfatória, para tecidos parafinados, uma pureza (A260/280) acima de 1,5. (LI *et al.*, 2007; PENLAND *et al.*, 2007; XI *et al.*, 2007)

4.7.2. Transcrição Reversa e DNA complementar (cDNA)

A reação de síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA extraído das amostras, via transcrição reversa, utilizando kit para a transcrição (TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems Foster City, CA) em conjunto com assays específicos para cada microRNA (TaqMan MicroRNA Assays, Applied Biosystems Foster City, CA). A reação foi realizada em um volume final de 15µL contendo: 9,16ng de amostra (RNA previamente extraído e diluído em água RNase free); 1 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase contida no TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Foster 32 City, CA); 1,5 µL de RT Buffer; 0,15 µL de NTP Mix (100mM); 3,0 µL Primer e 0,19 µL de inibidor de RNase, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram incubadas a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA foi estocado a temperatura de -20°C.

4.7.3. Amplificação do cDNA por Reações de qPCR

O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante do Kit TaqMan Universal PCR Master Mix 2X. A reação foi feita em um volume final de 20µL contendo 1,33 µL de cDNA, 10 µL do TaqMan Universal Master Mix 2X, 1 µL de cada ensaio (TaqMan MicroRNA Assays) (Tabela 2) e 7,67µL de água livre de RNase . A amplificação foi realizada no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster 32 City, CA), seguindo um protocolo de termociclagem em 3 estágios: no primeiro estágio 1 ciclo de 50°C por 2 minuto; no segundo estágio, no qual foi ativada a Ampli TaqGold, 1 ciclo em 95°C por 10 minutos e, no último estágio, responsável pela

desnaturação e consequente anelamento e extensão, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 1 ciclo de 60°C por 1 minuto

A detecção dos produtos foi realizada pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Os valores quantitativos C_q foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começou a ser detectado.

Tabela 2. Dados dos ensaios dos microRNAs avaliados

MicroRNA	Nome do assay	Sequência madura	Número de acesso na mirBase
miR-9	hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	MI0000466
miR-16	hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	MI0000070
miR-17	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU	MI0002977
miR-132	hsa-miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	MI0000449
miR-195	hsa-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	MI0000489
miR-221	hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	MI0000298

* TaqMan MicroRNA Assays, Applied Biosystems™, Foster 32 City, CA.

4.7.4. Análise da expressão gênica

Após as corridas de amplificação, as quais foram feitas em duplicata, os valores de *Quantification Cycles* (C_q) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional 7500™ System SDS (Applied Biosystems™, Foster 32 City, CA).

Para a análise da quantificação relativa foi utilizado o método comparativo de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (LIVAK SCHMITTGEN, 2001). A expressão de cada miRNA foi normalizada utilizando a média dos valores de C_q dos RNAs ribossomais RNU44 e RNU48, os quais apresentam expressão regular nos tecidos analisados (VANDESOMPELE et al., 2002; HUGGETT et al., 2005). O valor de C_q normalizado foi obtido utilizando o valor calculado do C_q da amostra de cada tumor subtraído da média dos C_q dos RNU44 e RNU48. Com o valor de C_q normalizado foi realizada uma comparação

com ao calibrador escolhido, de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_q}$. O calibrador foi composto por um *pool* de amostras composta por dois casos controle de glândulas normais. O resultado final foi expresso como aumento ou diminuição da expressão de um gene *n* vezes quando comparado ao controle (calibrador).

A fórmula matemática usada está descrita abaixo:

$$\Delta C_q \text{ alvo} = C_q \text{ alvo} - C_q \text{ referência}$$

$$\Delta C_q \text{ calibrador} = C_q \text{ calibrador} - C_q \text{ referência}$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ alvo} - \Delta C_q \text{ calibrador}$$

$$\text{Valor final de expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Na avaliação da expressão dos microRNAs foram utilizados como valores de referência para uma expressão normal quando estes encontrava-se entre 0,5 e 2,0; acima de 2,0 foram considerados microRNAs com expressão aumentada e abaixo de 0,5 foram considerados com uma expressão diminuída. (KOZAKI et al., 2008; NINOMIYA et al., 2013)

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados e o procedimento de análise dos dados foi realizado com o auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Inicialmente foi realizada a caracterização da amostra através de uma análise descritiva dos parâmetros clínicos. Em seguida, os dados referentes a expressão gênica e imuno-histoquímica foram analisados em relação à normalidade, utilizando o Teste Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição era significativamente diferente de uma distribuição normal ($p < 0,05$) foram aplicados testes não paramétricos, considerando um *p*-valor menor que 0,001 para o nível de significância. Para analisar se as medianas da variável dependente diferiam entre os grupos estudados foram utilizados os testes de Mann-Whitney, para dados não pareados, e Teste de Wilcoxon, para dados pareados. Para comparar mais de dois grupos de variáveis foi

utilizado o Teste de Kruskal-Wallis (dados não pareados) e realizado um pós-teste, o Teste de Mann-Whitney utilizando a correlação de Bonferroni, de modo a indicar onde ocorreu a diferença entre os pares de tumores estudados. Para mensurar a correlação das variáveis densidade de mastócitos, densidade de microvasos e expressão dos mRNAs foi calculada a Correlação de Spearman

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos parâmetros clínicos

A presente amostra foi constituída de 31 casos de tumores de glândulas salivares maiores e menores, que incluíam 11 casos (30,6%) de CAC, nove casos (25%) de CME e 11 casos (30,6%) de AP (Tabela 3). Adicionalmente, foram utilizados cinco controles (13,9%) que incluíam dois casos de glândula salivar normal e três casos que apresentavam tecido glandular na periferia dos espécimes de alguns tumores estudados para análise imuno-histoquímica (densidade de mastócitos e densidade de microvasos) e dois controles de glândula salivar normal para análise da expressão gênica dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221.

Do total de tumores analisados, 22 casos (71%) estavam localizados em glândulas salivares maiores, tendo como sítio de predileção a glândula parótida. Cinco casos de AP envolviam a glândula parótida, três casos a glândula submandibular, dois casos o palato mole e um caso o palato duro. Dos CACs avaliados, três casos estavam localizados na glândula parótida, três casos na glândula submandibular, dois casos no lábio, um caso no palato duro, um caso em comissura labial e um caso em mucosa oral em local não especificado. O CME apresentou as maiores dimensões entre os tumores estudados, sendo que oito casos deste tumor foram diagnosticados na parótida e um caso no palato duro (Tabela 3).

Os dados da Tabela 3 também mostram que a maioria dos casos de tumores malignos foi diagnosticada em indivíduos do sexo masculino e a maioria dos benignos no sexo feminino. Dos 20 casos de tumores malignos, sete casos de CAC e sete casos CME ocorreram homens, enquanto que dos 11 casos de AP, nove deles foram encontrados em mulheres. A relação masculino/feminino nos CAC e CME foi, respectivamente, de 7:4 e 7:2, enquanto que no APs esta relação foi de 2:9.

A idade mínima e máxima dos indivíduos diagnosticados com AP variou de 12 a 67 anos, nos portadores de CAC de 33 a 78 anos, enquanto que no CME está variação foi de 22 a 59 anos (Tabela 3). A média de idade dos indivíduos acometidos por estas neoplasias no momento do diagnóstico para o AP, CAC e CME foram, respectivamente, $45,6 \pm 17,3$; $51,8 \pm 14,1$ e $38,8 \pm 13,1$ anos.

Tabela 3. Dados clínicos e histopatológicos segundo tipo de tumor de glândula salivar, sexo, idade, localização anatômica, tamanho da lesão, padrão histológico e gradação histológica. Salvador, BA, 2014.

Caso	Tipo tumor	Sexo	Idade	Localização anatômica	Tamanho da lesão (cm)	Padrão histológico/ gradação histológica
01	AP	F	21	Glândula parótida	3,5x2x1,5	NA
02	AP	F	45	Glândula submandibular	2,2x2x1,8	NA
03	AP	F	31	Glândula parótida	7x4,5x2	NA
04	AP	M	57	Glândula submandibular	4,3x4x2,3	NA
05	AP	F	51	Glândula parótida	4,8x3,5x2,4	NA
06	AP	F	55	Glândula submandibular	5x4x3	NA
07	AP	F	67	Glândula parótida	5,5x3,5x2,0	NA
08	AP	F	12	Glândula parótida	3,3x3,2x2	NA
09	AP	F	45	Palato mole	2,2x2x1,5	NA
10	AP	F	59	Palato mole	4x2,8x2,2	NA
11	AP	M	59	Palato duro	2,6x2,2x1,9	NA
12	CAC	M	47	Boca/lábio	2x0,8x1,5	Cribriforme
13	CAC	F	33	Glândula parótida	5x3,5x2,9	Cribriforme
14	CAC	M	73	Glândula submandibular	8,2x5,3x4,5	Cribriforme
15	CAC	M	59	Lábio superior	3,9x2,7x1,4	Cribriforme
16	CAC	M	78	Glândula parótida	4,5x3x2,7	Sólido
17	CAC	M	47	Palato duro	3,7x3,2x2,6	Cribriforme
18	CAC	F	56	Glândula submandibular	2x1,5x1,5	Cribriforme
19	CAC	F	53	Glândula submandibular	2,4x1,6x1,4	Cribriforme e sólido
20	CAC	M	42	Mucosa oral	8x6x2,5	Cribriforme
21	CAC	M	47	Glândula parótida	5x4x2,2	Tubular
22	CAC	F	35	Comissura labial	2	Cribriforme
23	CME	M	29	Glândula parótida	3,5	Baixo grau
24	CME	M	36	Glândula parótida	13x12,5x8,5	Baixo grau
25	CME	F	44	Glândula parótida	6x5x1,7	Grau intermediário
26	CME	M	22	Glândula parótida	6,5x5,5x5	Grau intermediário
27	CME	M	48	Glândula parótida	6,5x5x3,5	Baixo grau
28	CME	M	31	Glândula parótida	4,5x3,5x3,2	Grau intermediário
29	CME	M	59	Glândula parótida	4x3x2	Baixo grau
30	CME	M	55	Glândula parótida	6x4x2,5	Grau intermediário
31	CME	F	26	Palato duro	1,5	Baixo grau

Sendo:

AP adenoma pleomórfico

CAC carcinoma adenóide cístico

CME carcinoma mucoepidermóide

NA – não se aplica

5.2. Análise histomorfológica

O estudo microscópico dos APs revelou aspecto histológico característico para estas neoplasias, onde o parênquima exibia proliferação de células epiteliais e mioepiteliais, dispostas em lençóis sólidos, cordões e ninhos, com quantidade variável de estruturas ductiformes, revestidas por duas ou mais camadas de células, as quais revelavam freqüentemente material eosinofílico amorfo em sua porção luminal. O componente epitelial apresentava uma variedade de tipos celulares incluindo células plasmocitóides, basalóides, fusiformes, poligonais, cuboidais e escamosas.

Os tumores apresentava-se delimitado perifericamente por uma cápsula fibrosa, por vezes delgada e incompleta em seis (54%) dos casos analisados. Foi possível observar a infiltração da cápsula por células tumorais, distribuídas de forma dispersa ou organizadas principalmente sob a forma de ninhos e cordões, observando-se penetração capsular em cinco casos (45,5%).

A matriz extracelular nestes tumores apresentou-se bastante variável, incluindo os tipos hialino, fibroso, mixóide e condroide, sendo observado, nas glândulas salivares maiores uma maior quantidade de componente estromal. Normalmente era evidenciado em um mesmo tumor diferentes proporções de mais de um tipo estromal. Dos tumores analisados nove (81,8%) casos apresentaram grande quantidade de componente estromal

Os CACs avaliados apresentavam um arranjo arquitetural característico com proliferação de células epiteliais redondas e cuboidais com núcleos ovais, hipercromáticos e citoplasma frequentemente escasso. As células proliferantes apresentavam-se organizadas em espaços pseudocísticos, estruturas tubulares, trabeculares, ninhos e cordões, originando os três padrões histológicos: cribriforme, tubular e sólido. Os casos analisados ora exibiam um exclusivo padrão histológico ora se intercalavam em uma mistura com variadas proporções de mais de um padrão de crescimento. Dos espécimes analisados, oito casos apresentavam um padrão cribriforme, um caso o padrão tubular, um caso o padrão sólido e um caso o padrão predominantemente era cribriforme com áreas sólidas (Tabela 3).

Os CME avaliados apresentavam-se sob a forma de espaços císticos revestidos por células mucosas ao lado de células escamosas e intermediárias. Lençóis, ninhos e ilhas de células epidermóides e intermediárias também eram vistos. Dos tumores avaliados, 05 foram classificados quanto à gradação histológica como de baixo grau e 04 como de grau intermediário (Tabela 3).

5.3. Análise da densidade de mastócitos

Os mastócitos apresentaram morfologia variável (oval, alongadas e arredondadas), estavam localizadas frequentemente próximas a vasos sanguíneos. Os mastócitos também foram detectados ocasionalmente no parênquima de glândulas salivares normais e em tecido glandular presente na periferia dos espécimes de alguns dos tumores estudados, utilizados como controles. (Figura 3)

A diferença de densidade total de mastócitos foi significativa entre os tumores e controles ($p < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 4 e Figura 4). Para as múltiplas comparações entre os pares de tumores foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney utilizando a correção de Bonferroni com o nível de significância $\alpha = 0,0167$ para resultados significativos, sendo observada uma diferença significativa na densidade total de mastócitos entre AP e CME ($p = 0,001$) e entre CAC e CME ($p = 0,006$), sendo que os casos de CME apresentaram a maior densidade total de células com $10,55$ células/ mm^2 , entretanto, não foi verificada uma diferença significativa na densidade total de mastócitos entre AP e CAC ($p = 1,000$),

Quando comparada a densidade total de mastócitos entre o grupo de tumores malignos e benignos não foi verificada uma diferença significativa ($p = 0,095$, Teste de Mann-Whitney) (Figura 5).

Os mastócitos apresentavam-se marcadamente distribuídos em áreas peritumorais de tumores malignos e benignos, bem como, dispersos de forma heterogênea nos padrões morfológicos dos tumores, com exceção dos APs onde estas células concentravam-se mais frequentemente na cápsula fibrosa. Foi observada uma diferença significativa na densidade de mastócitos entre as áreas peritumorais e intratumorais nos grupos de tumores estudados ($p < 0,001$, Teste de Wilcoxon) (Tabela 5). Além disso, também foi verificada uma diferença significativa entre a densidade peri e intratumoral de mastócitos no AP ($p = 0,003$), CAC ($p = 0,003$) e no CME ($p = 0,008$) (Teste de Wilcoxon).

Os dados da Tabela 5 também revelam uma maior densidade de mastócitos em áreas peritumorais de todos os tipos tumores estudados e especialmente do CME quando comparado a áreas intratumorais. Comparando os múltiplos pares de

tumores utilizando o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni (valor de significância $\alpha=0,0167$) foi observada uma diferença significativa na densidade de mastócitos peritumorais entre o AP e o CME ($p=0,001$) e entre o CAC e o CME ($p=0,012$), sendo que os casos de CME apresentaram a maior densidade peritumoral de mastócitos $16,82$ células/ mm^2 , seguido do CAC $9,62$ células/ mm^2 e do AP $8,73$ células/ mm^2 .

A densidade total de mastócitos no padrão cribriforme do CAC foi de $6,24$, no tubular $7,13$, no sólido $5,03$ e no cribriforme com áreas sólidas $6,90$, não sendo demonstrada diferença significativa da densidade total de mastócitos entre estes padrões histológicos ($p=0,926$, Teste de Kruskal-Wallis). Além disso, também não foi encontrada diferença significativa quando comparada a densidade de mastócitos em áreas peri ($p=0,980$, Teste de Kruskal-Wallis) e intratumorais ($p=0,841$, Teste de Kruskal-Wallis) dos referidos padrões.

Quando comparada a densidade total de mastócitos considerando a gradação histológica do CME, os de baixo grau apresentaram uma densidade de $10,19$ e os de grau intermediário uma densidade de $11,01$. Nestes tumores, não foi observada diferença significativa na densidade total de mastócitos entre estes dois tipos de gradação histológica ($p=1,000$, Teste de Mann-Whitney), bem como, na densidade de mastócitos peri ($p=0,389$, Teste de Mann-Whitney) e intratumoral ($p=0,624$, Teste de Mann-Whitney) entre estes graus de gradação.

Prancha mastócitos fig 3 – conferir legenda

Tabela 4. Densidade de total de mastócitos segundo grupos de controle e tumor. Salvador, BA, 2014.

Controle/tipo de tumor	Densidade total (células/mm²)	p-valor*
Controle	2,12	
Adenoma pleomórfico	5,97	
Carcinoma adenoide cístico	6,27	p<0,001
Carcinoma mucoepidermóide	10,55	

* Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 5. Densidade de mastócitos em áreas peritumorais e intratumorais segundo o tipo histológico tumoral. Salvador, BA, 2014.

Tipo de tumor	Densidade peritumoral (células/mm²)	Densidade intratumoral (células/mm²)	p-valor*
Adenoma pleomórfico	8,73	3,22	0,003
Carcinoma adenoide cístico	9,62	2,79	0,003
Carcinoma mucoepidermóide	16,82	4,29	0,008
TOTAL	11,44	3,38	p<0,001

* Teste de Wilcoxon

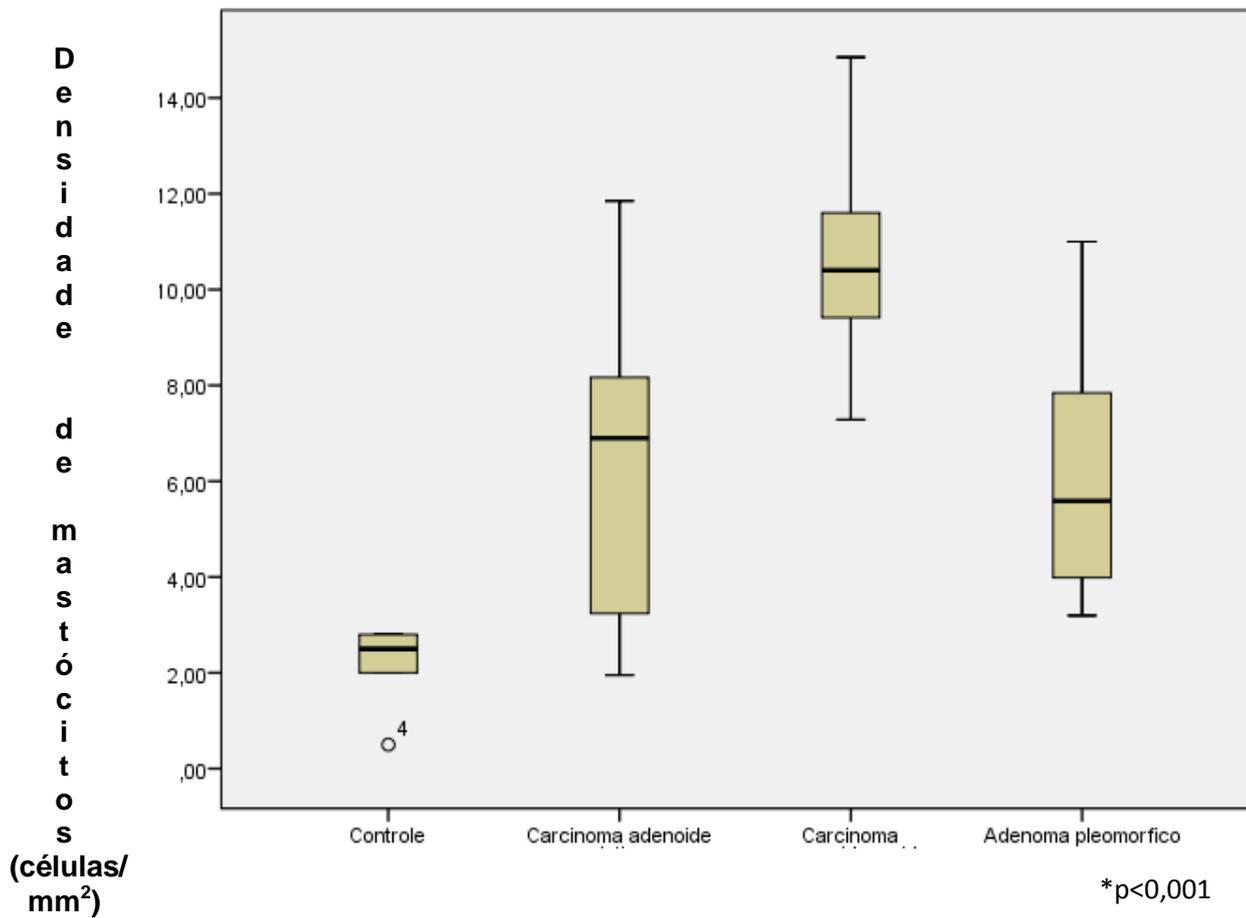


Figura 4. Densidade total de mastócitos segundo controles e tipo de tumor. Salvador, BA, 2014

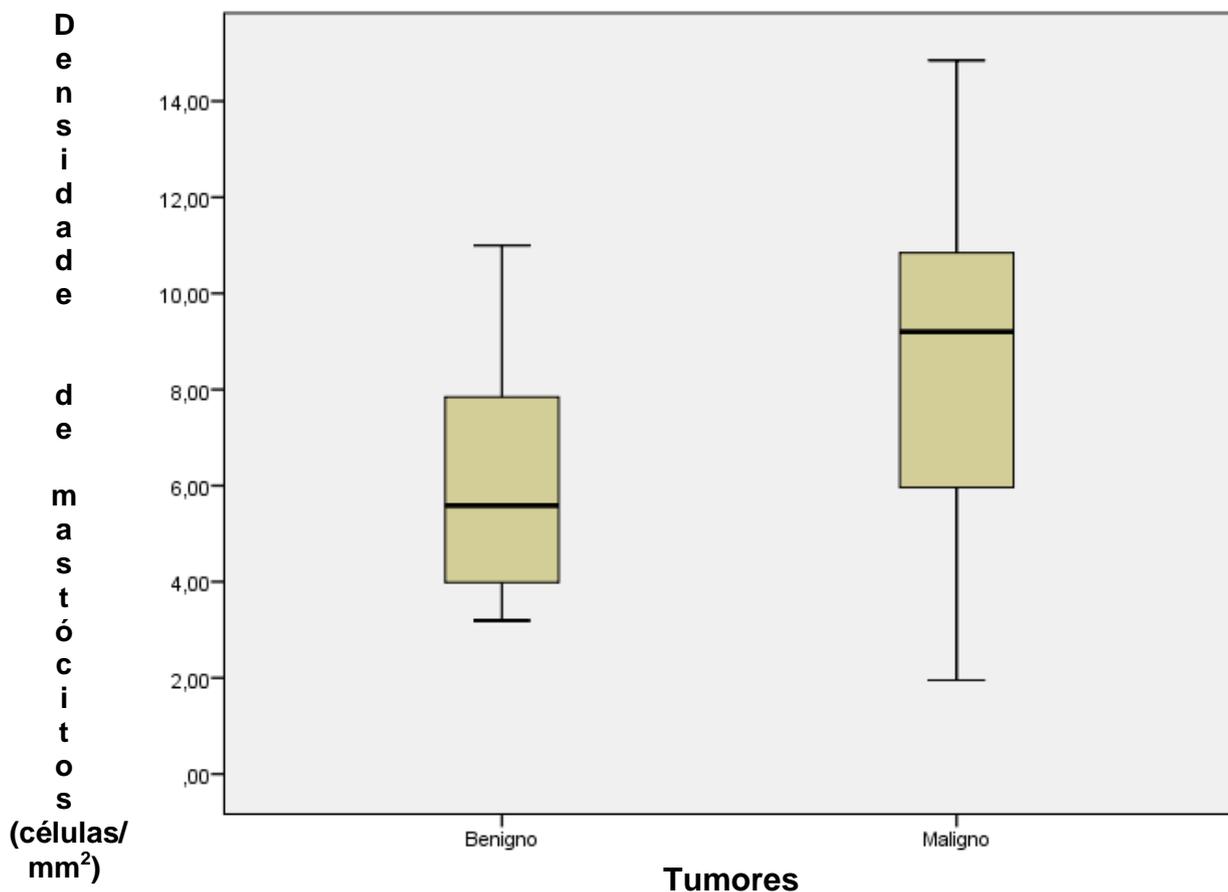


Figura 5. Densidade total de mastócitos segundo grupo de tumores malignos e benignos. Salvador, BA, 2014

5.4. Análise da densidade de microvasos

As células endoteliais apresentaram morfologia alongada ou arredondada e algumas vezes vasos sem lúmen eram visualizados principalmente próximos a áreas peritumorais e nos variados padrões morfológicos dos tumores estudados. (Figura 6)

A densidade de microvasos foi significativa entre os tumores analisados e controles ($p < 0,001$, Teste Kruskal-Wallis). Uma maior densidade de microvasos foi evidenciada nos tumores malignos, especialmente o CME (Tabela 6). Para as múltiplas comparações entre os pares foi realizado o teste de Mann-Whitney utilizando a correção de Bonferroni com o valor de $\alpha = 0,0083$ para resultados significativos, sendo observada uma diferença significativa na densidade de microvasos entre o CAC e controles ($p < 0,001$), CME e controles ($p = 0,001$), CAC e CME ($p < 0,001$), AP e CAC ($p < 0,001$) e finalmente entre AP e CME ($p < 0,001$). Essas médias de densidade de mastócitos podem ser comparadas na Tabela 6.

Foi observada também uma diferença significativa na densidade de microvasos entre os tumores malignos e benignos ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney) (Figura 7). Entretanto, não foi encontrada uma diferença significativa da densidade de microvasos entre os padrões histológicos do CAC ($p = 0,707$, Teste de Kruskal-Wallis) ou entre os graus de gradação histológica do CME ($p = 0,085$, Teste de Mann-Whitney).

Foi demonstrada uma forte correlação positiva entre a densidade mastocitária e a densidade de microvasos ($\rho = 0,601$, Coeficiente de Spearman, $p < 0,001$) entre os tumores de glândula salivar analisados, como pode ser observado no Figura 8.

Fig 6 PRANCHA CD34 – conferir legenda

Tabela 6. Densidade de microvasos segundo controles e o tipo histológico tumoral. Salvador, BA, 2014.

Controle/Tipo de tumor	Densidade microvasos	p-valor*
Controle	3,06	p<0,001
Adenoma pleomórfico	2,63	
Carcinoma adenoide cístico	10,92	
Carcinoma mucoepidermóide	21,53	

* Teste de Kruskal-Wallis

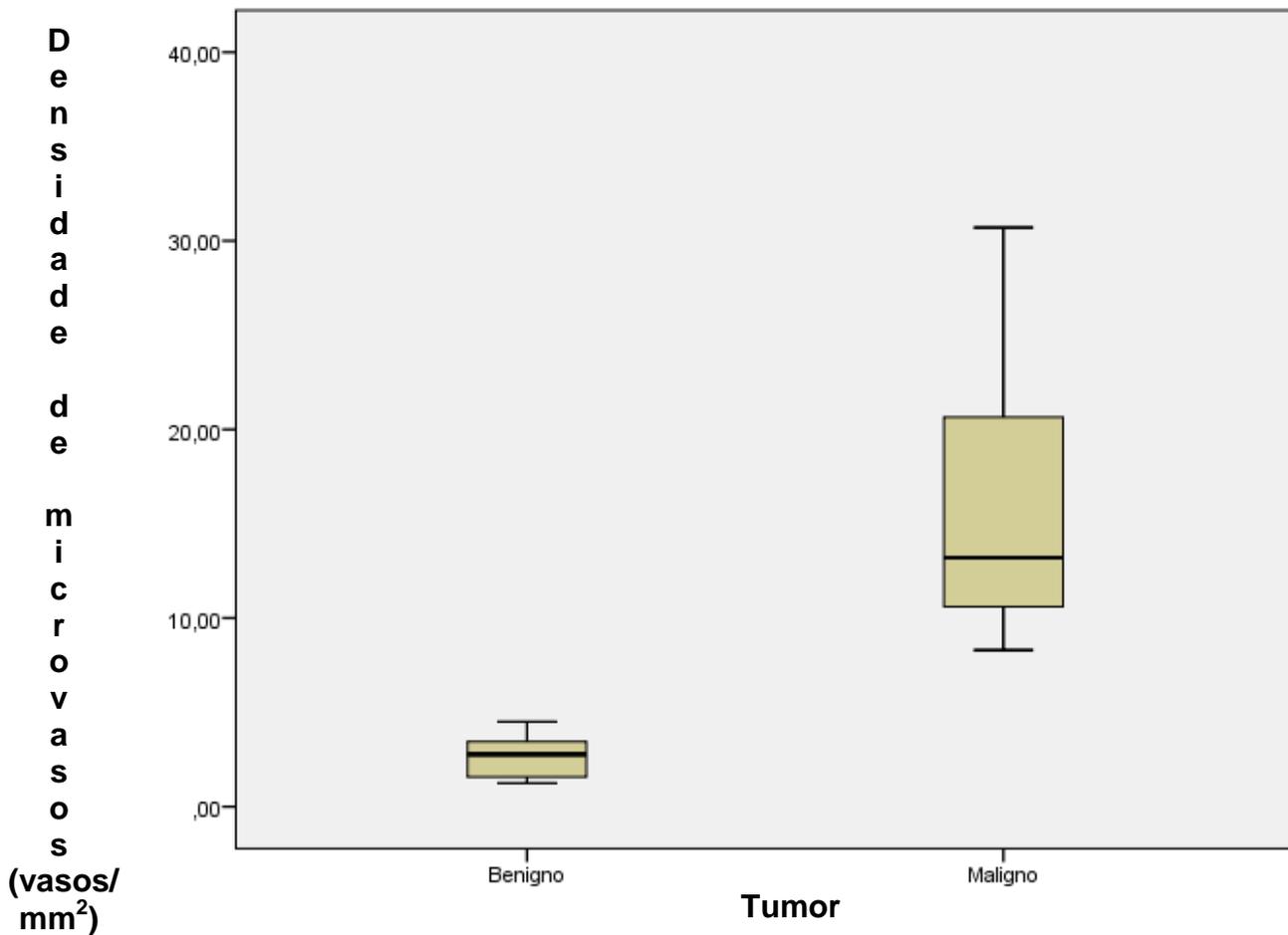


Figura 7. Densidade de microvasos entre tumores malignos e benignos. Salvador, BA, 2014.

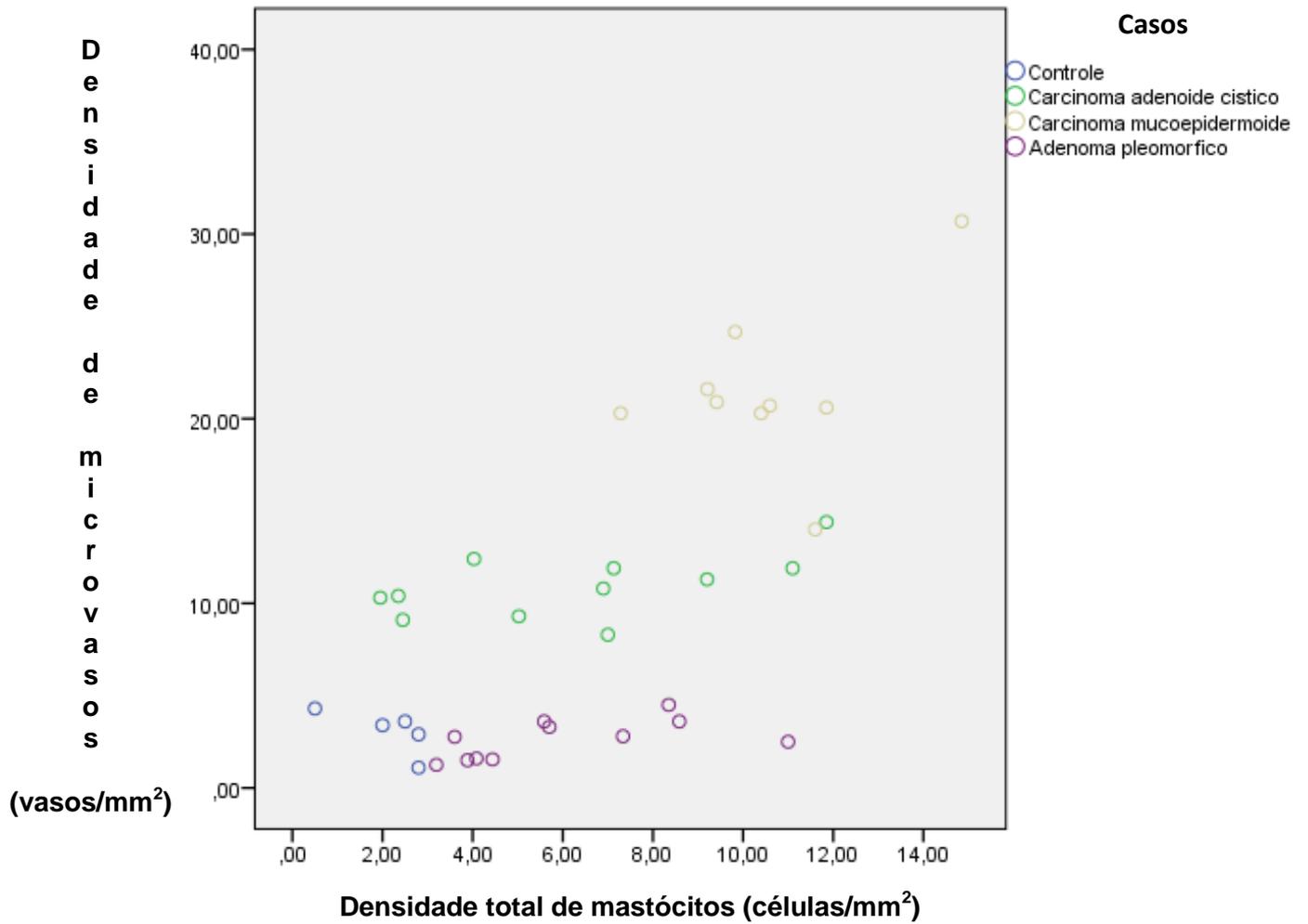


Figura 8. Densidade de microvasos e densidade total de mastócitos. Salvador, BA, 2014

5.5. Análise da expressão gênica dos microRNA

O perfil da expressão gênica dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 nos tumores de glândula salivar maiores e menores está apresentado na Tabela 5.

Pode-se observar uma expressão aumentada do miR-9 e uma expressão diminuída dos miR-132, miR-16 e miR-221 na maioria dos tumores estudados (Figura 9)

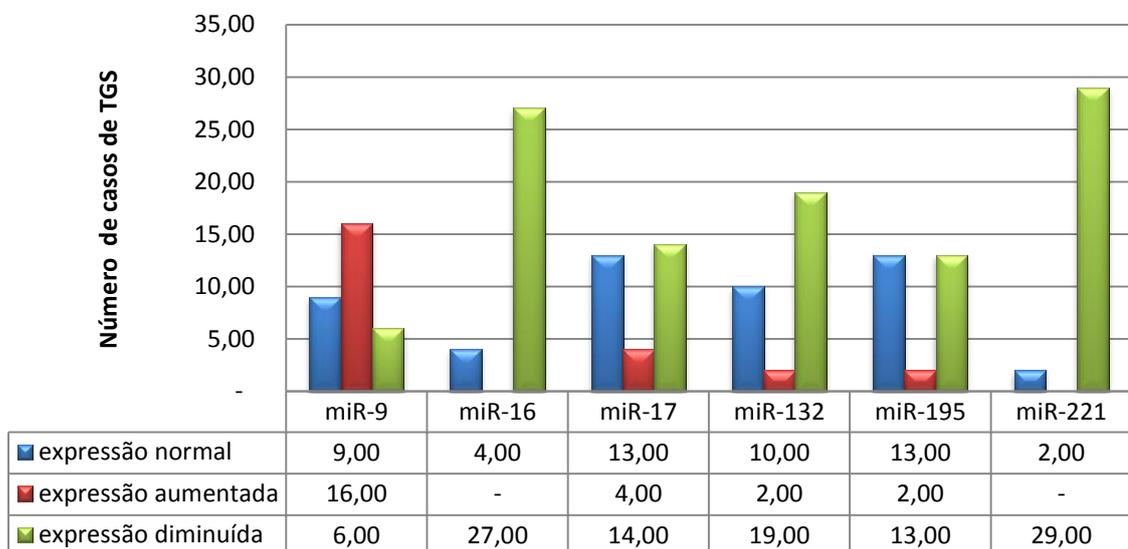


Figura 9. Perfil de expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em TGS (n=31). Salvador, BA, 2014.

Dentre os microRNAs estudados, apenas o miR-9 encontrou-se com uma expressão aumentada ou superexpresso, especialmente nos casos de adenoma pleomórfico (82%) (Figura 10). Em nenhum dos casos estudados (n=31) observou-se uma expressão aumentada para os miR-16 e miR-221, sendo que para o miR-221, todos os casos de AP e todos os casos de CAC bem como 78% dos casos de CME apresentaram-se com uma expressão diminuída ou subexpressos. Para o miR-16 foi observada uma subexpressão em todos os casos de CAC, 82% dos casos de AP e 78% dos casos de CME. (Figura 11)

Tabela 7. Perfil da expressão gênica do miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-192 e miR-221 em tumores de glândulas salivar. Salvador, 2014.

Expressão microRNA						
Tipo tumor	mir-9	mir16	mir-17	mir-132	mir-195	mir-221
CAC	0.993	0.078	1.812	0.656	0.387	0.099
CAC	0.796	0.114	0.469	0.405	0.425	0.045
CAC	12.734	0.232	0.720	0.340	0.533	0.054
CAC	3.198	0.073	0.597	0.204	0.154	0.029
CAC	11.070	0.413	3.402	1.009	0.498	0.148
CAC	0.149	0.119	0.213	0.374	0.196	0.080
CAC	1.006	0.061	0.357	0.136	0.219	0.045
CAC	4.346	0.125	0.942	0.185	0.479	0.037
CAC	3.680	0.094	0.775	0.466	0.297	0.040
CAC	21.750	0.304	2.023	0.710	1.647	0.120
CAC	7.373	0.416	2.091	0.460	1.329	0.089
CME	0.031	0.040	0.125	0.097	0.066	0.023
CME	0.443	0.102	0.285	0.705	0.685	0.101
CME	0.166	0.198	0.740	1.427	0.396	0.080
CME	0.099	0.077	0.185	0.150	0.149	0.017
CME	0.354	0.639	1.771	1.616	2.069	0.168
CME	1.707	0.990	0.978	2.743	2.172	0.580
CME	0.860	0.480	0.966	0.668	0.887	0.134
CME	1.053	0.258	3.009	2.637	1.087	0.948
CME	1.081	0.297	0.516	0.690	3.569	0.232
AP	5.124	0.149	0.101	0.242	0.386	0.029
AP	61.111	0.482	0.198	0.466	3.7089	0.026
AP	22.148	0.140	0.067	0.108	0.915	0.012
AP	1.158	0.610	0.643	0.694	1.142	0.185
AP	2.811	0.582	1.241	0.812	1.395	0.238
AP	16.996	0.262	0.651	0.335	1.487	0.088
AP	0.617	0.093	0.282	0.362	0.271	0.081
AP	36.333	0.445	0.209	0.375	1.336	0.051
AP	2.757	0.066	0.049	0.069	1.590	0.018
AP	9.677	0.245	0.109	0.295	3.396	0.048
AP	12.103	0.028	0.019	0.045	0.667	0.008

Normal: $0,5 > x > 2,0$ CAC – carcinoma adenoide cístico
 Superexpressos: $x > 2,0$ CME – carcinoma mucoepidermóide
 Subexpressos: $x < 0,5$ AP – adenoma pleomórfico

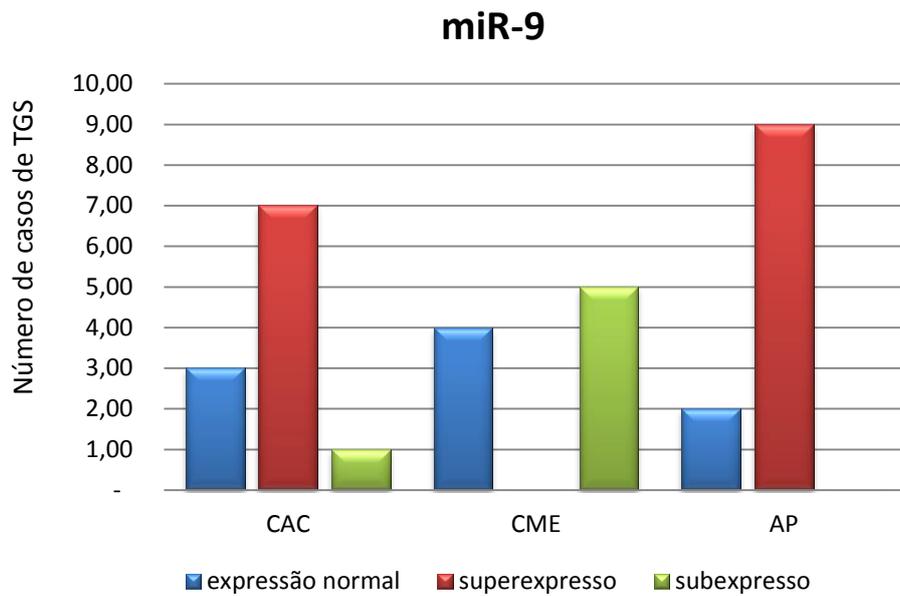


Figura10. Expressão do miR-9 em adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e carcinomas mucoepidermóides. Salvador, BA, 2014.

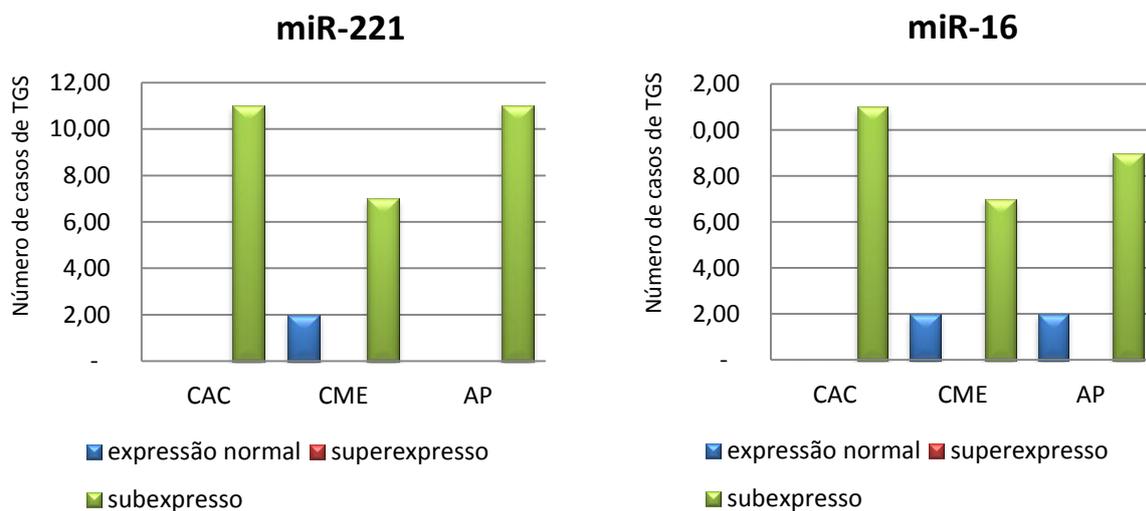


Figura 11. Comparação da expressão do miR-221 e do miR-16 em carcinomas adenóides císticos, carcinomas mucoepidermóides e adenomas pleomórficos. Salvador, BA, 2014.

Comparando-se os perfis de expressão de cada microRNA nos subtipos de tumores estudados, algumas particularidades foram encontradas. Nos casos de CAC, foi observada a superexpressão apenas do miR-9 e miR-17 em, respectivamente, 64% e 27% dos casos. Além disso, foi observada uma subexpressão em 100% dos casos de miR-16 e do miR-221, 73% dos casos de miR-132 e do miR-195, 27% dos casos de miR-17 e 9% dos casos de miR-9 (Figura 12).

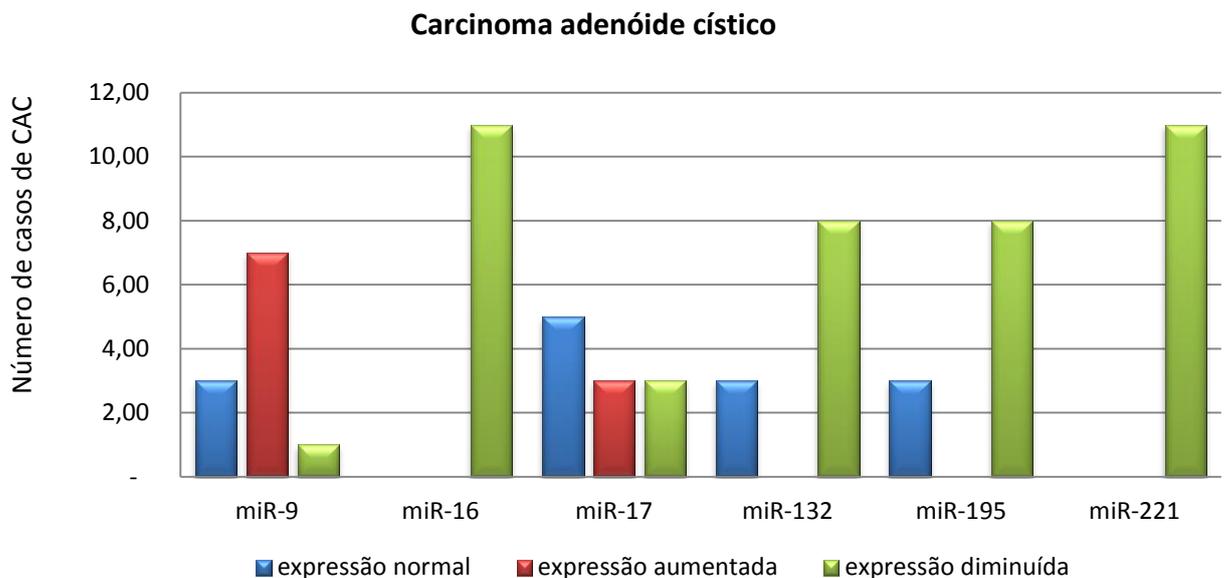


Figura 12. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em carcinomas adenóides císticos (n=11). Salvador, BA, 2014.

Entretanto, quando comparamos a expressão dos mesmos microRNAs nos casos de CME, observamos a expressão diminuída de ambos microRNAs, miR-16 e miR-221, em 78% dos casos, sendo que em nenhum caso de CME teve uma superexpressão do miR-9, como foi observado nos demais tumores estudados. (Figura 13)

Nos CME foi observada a superexpressão apenas do miR-195 em 33% dos casos, do miR-132 em 22% dos casos e do miR-17 em 11% dos casos. Além disso, foi verificada uma subexpressão do miR-16 e do miR-221 em 78% dos casos, do miR-9 em 56% dos casos, do miR-17 e do miR-195 em 33% dos casos e do miR-132 em 22% dos casos, sendo que em nenhum caso de CME observou-se uma superexpressão do miR-9, como nos demais tumores estudados. (Figura 13).

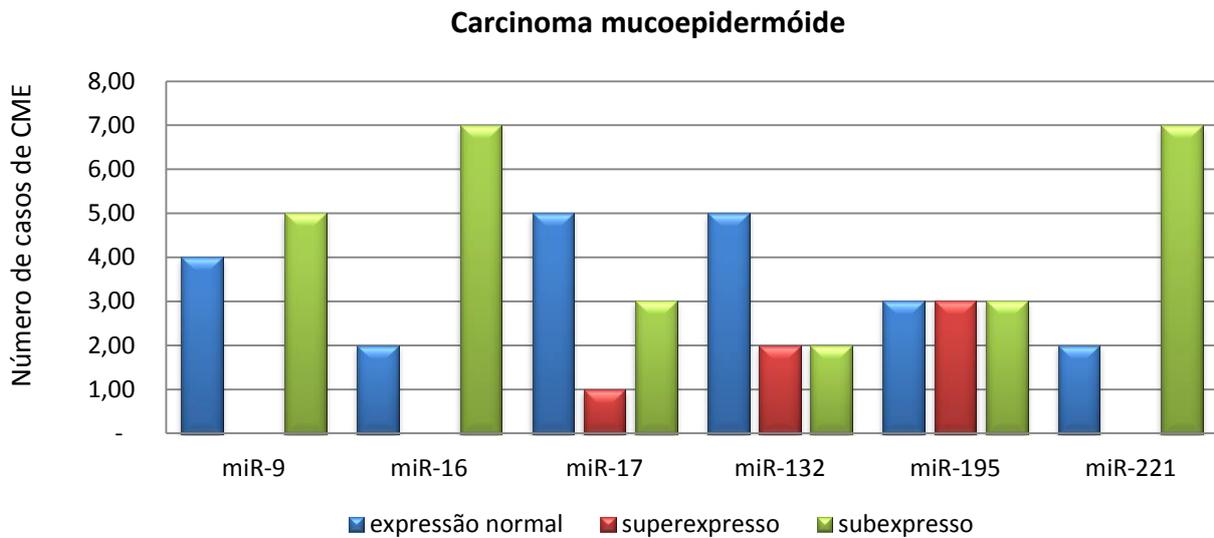


Figura 13. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em carcinomas mucoepidermóides. Salvador, BA, 2014.

Nos APs foi observada a superexpressão apenas do miR-9 em 82% dos casos de tumores e do miR-195 em 18% dos casos. Nestes tumores foi verificada uma subexpressão do miR-221 em 100% dos casos, do miR-16 e do miR-132 em 82% dos casos, do miR-17 em 73% dos casos e do miR-195 em 18% dos casos, o qual manteve-se mais próximo do controle normal. (Figura 14).

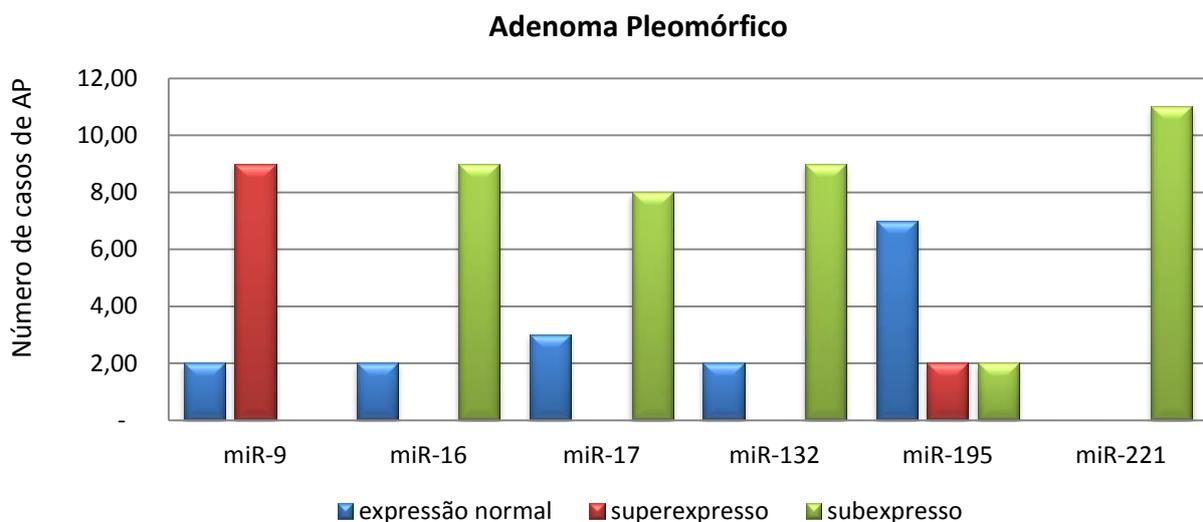


Figura 14. Expressão dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em adenomas pleomórficos (n=11). Salvador, BA, 2014.

A tabela 8 mostra uma diferença significativa na expressão do miR-9 ($p=0,003$), miR-17 ($p=0,013$), miR-132 ($p=0,040$) e miR-221 ($p=0,032$) entre os tumores e controles (Teste Kruskal-Wallis). Nos demais miRNA estudados não foram encontradas diferenças significativas na expressão. Para as múltiplas comparações entre os pares de tumores foi realizado o teste de Mann-Whitney utilizando a correção de Bonferroni com o nível de significância $\alpha=0,0083$ para resultados significativos, sendo observada uma diferença significativa apenas na expressão miR-17 entre o AP e o CAC ($p=0,002$) e a expressão do miR-9 entre AP e CME ($p<0,001$), como pode ser observado no Figura 15.

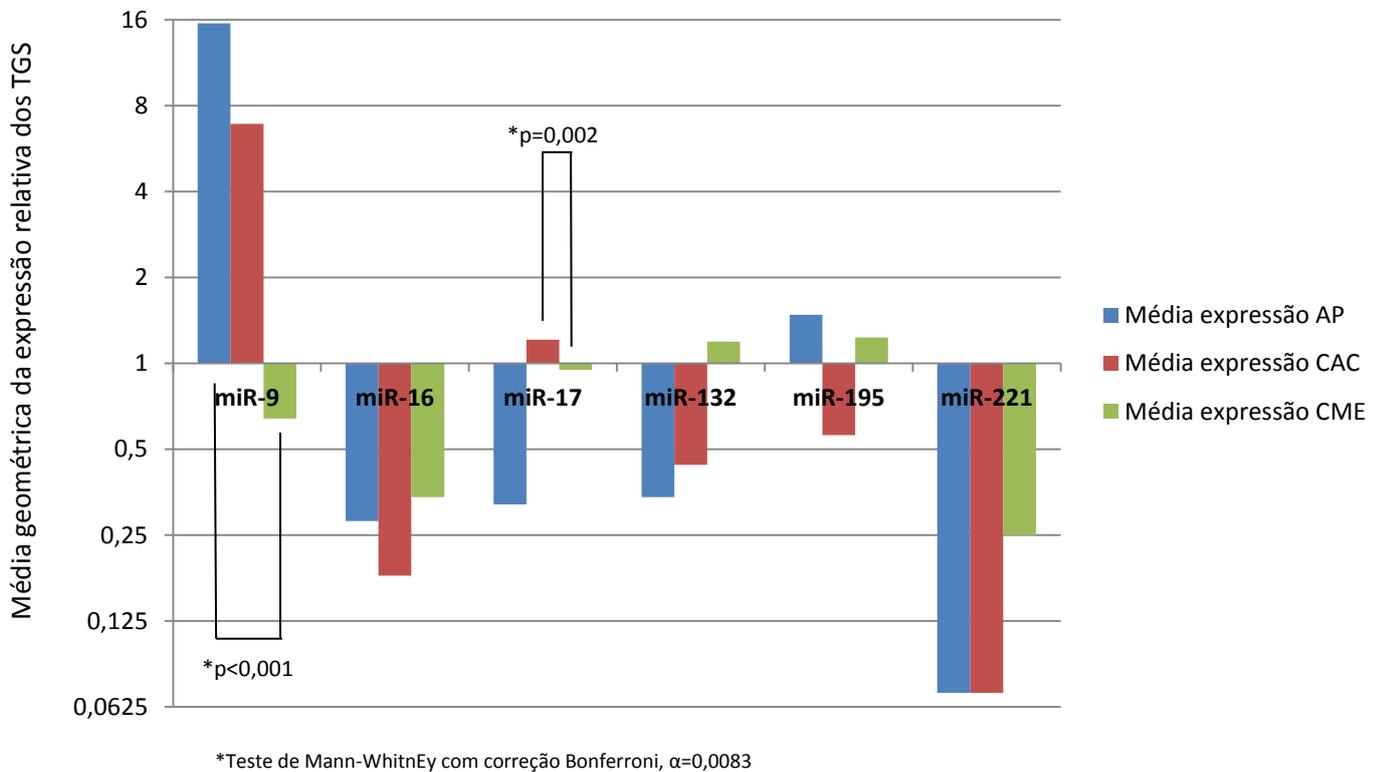


Figura 15. Expressão relativa dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em adenomas pleomórficos (n=11), carcinomas adenóides císticos (n=11) e carcinomas mucoepidermóides (n=9) apresentadas em uma escala logarítmica de base 2. Salvador, BA, 2014.

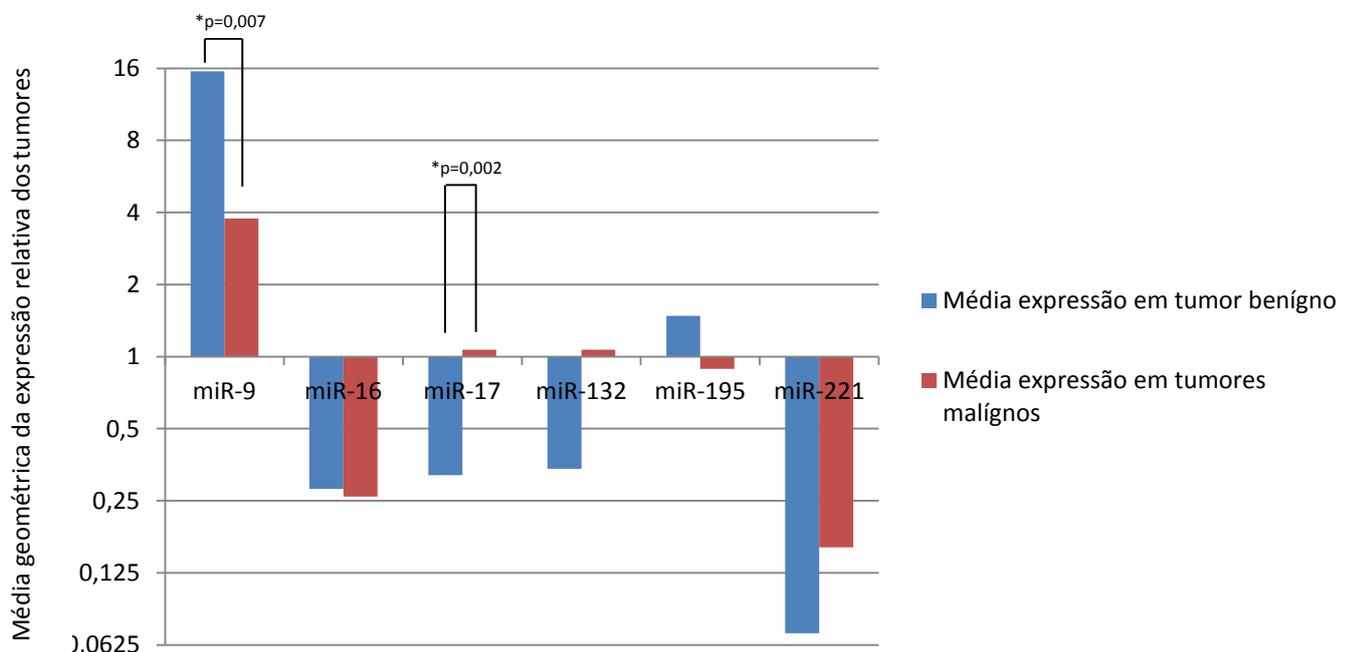
Tabela 8. Média geométrica dos níveis de expressão do miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 segundo o tipo histológico de tumor. Salvador, BA, 2014.

miR	Adenoma pleomórfico			Carcinoma adenoide cístico			Carcinoma mucoepidermóide			p-valor*
	Média	95% IC		Média	95% IC		Média	95% IC		
miR-9	15.53	3.02	28.03	6.09	1.60	10.59	0.64	0.20	1.07	p=0.003
miR-16	0.28	0.13	0.42	0.18	0.09	0.27	0.34	0.10	0.58	p=0.077
miR-17	0.32	0.07	0.57	1.21	0.55	1.88	0.95	0.24	1.66	p=0.013
miR-132	0.34	0.18	0.50	0.44	0.27	0.62	1.19	0.43	1.95	p=0.040
miR-195	1.48	0.73	2.23	0.56	0.23	0.88	1.23	0.34	2.12	p=0.129
miR-221	0.07	0.02	0.12	0.07	0.04	0.09	0.25	0.01	0.49	p=0.032

* Teste de Kruskal-Wallis

** Os dois controles apresentaram valor constante 1 para todos os mRNA estudados.

Quando comparados, tumores malignos versus benignos apenas foi observada uma diferença significativa na expressão do miR-9 ($p=0,007$) e miR-17 ($p=0,002$) (Teste de Mann-Whitney). (Figura 16)



*Teste de Mann-Whitney, $p=0,007$ e $p=0,002$

Figura 16. Expressão relativa dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221 em tumores benignos ($n=11$) e tumores malignos ($n=20$) apresentadas em uma escala logarítmica de base 2. Salvador, BA, 2014

Não foi observada diferença significativa na expressão do miR-9 ($p=0.251$), miR-16 ($p=0.378$), miR-17 ($p=0.251$), miR-132 ($p=0.141$), miR-195 ($p=0.327$) e miR-221 ($p=0.139$) entre os padrões histológicos do CAC (Teste Kruskal-Wallis), bem como, entre a expressão do miR-9 ($p=0.806$), miR-16 ($p=1.000$), miR-17 ($p=0.462$), miR-132 ($p=0.221$), miR-195 ($p=0.806$) e miR-221 ($p=0.806$) e os graus de gradação histológica do CME (Teste Kruskal-Wallis) (Tabela 7 e Figura 18)

Foi observada uma forte correlação negativa apenas entre a expressão do miR-9 e a densidade de microvasos ($\rho = -0.533$, Coeficiente de Spearman, $p=0.001$), sendo que os casos de CME apresentaram uma menor superexpressão do miR-9 entretanto, apresentaram uma maior densidade de microvasos, como demonstrado no Figura 17. Além disso, não foi observada nenhum tipo de correlação entre a densidade de mastócitos e a expressão dos mRNA estudados.

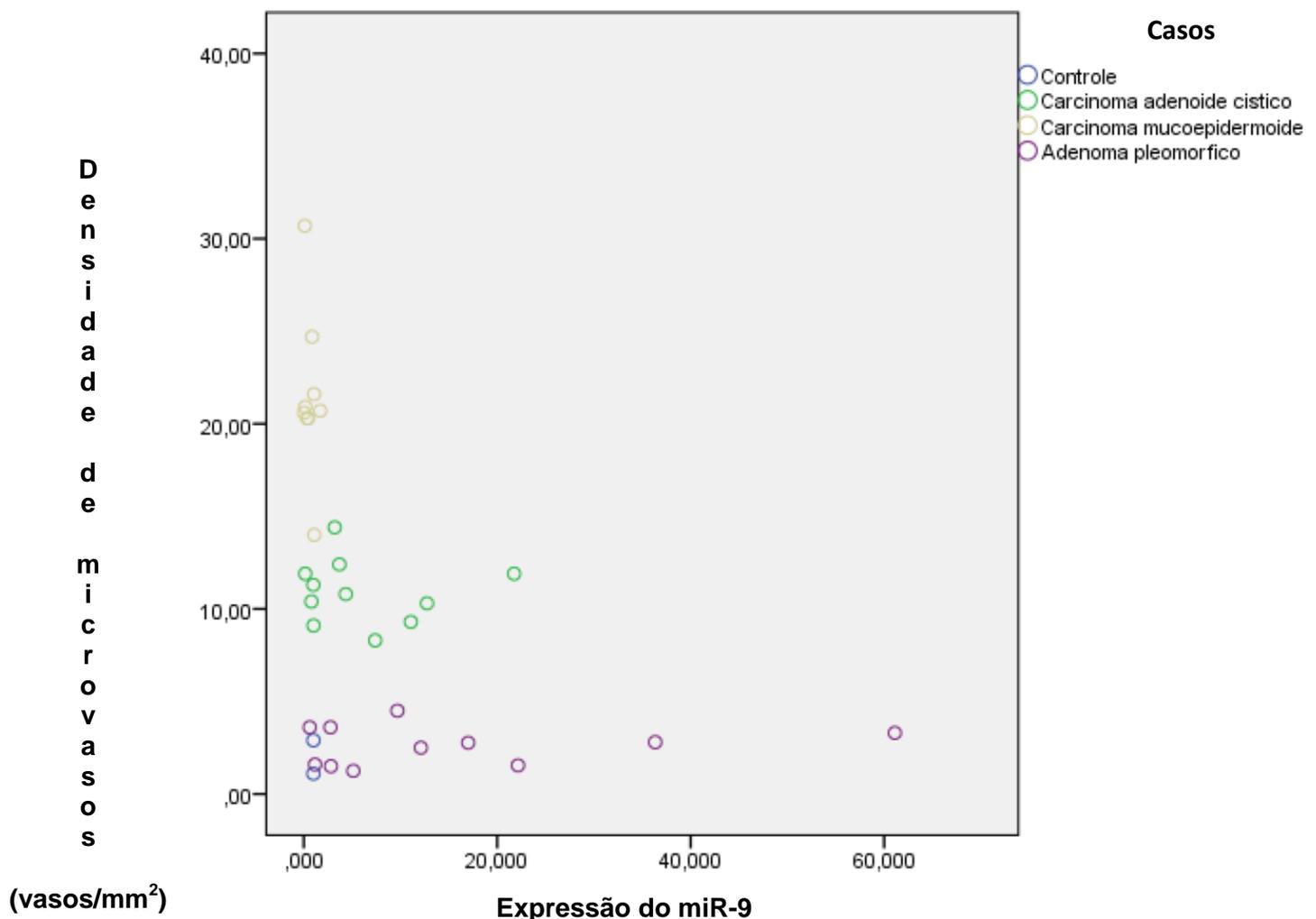


Figura 17. Densidade de microvasos e expressão do miR-9. Salvador, BA, 2014

Perfil da expressão gênica dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-192 e miR-221

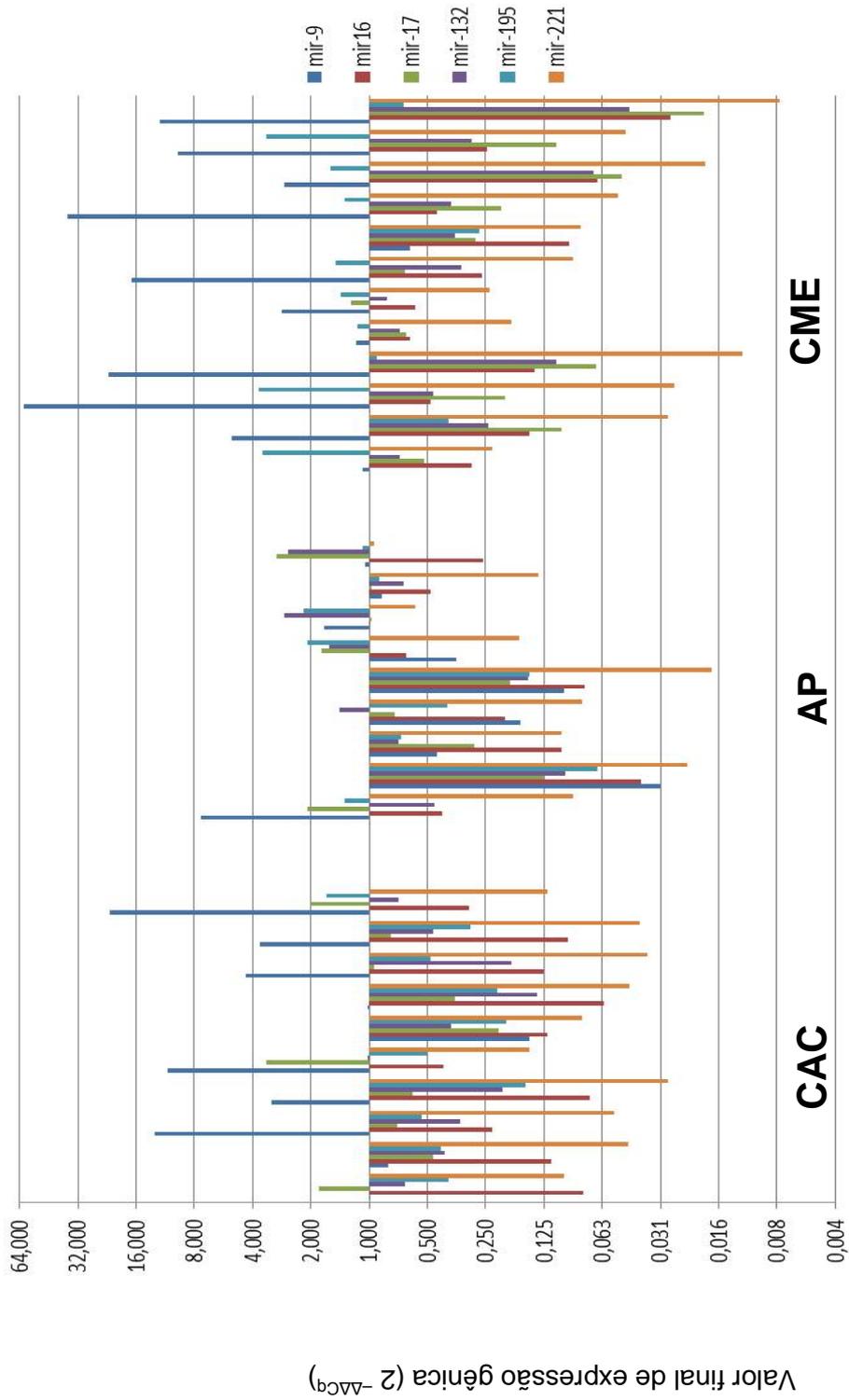


Figura 18. Perfil da expressão gênica dos miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-192 e miR-221 em tumores de glândulas salivares. Salvador, 2014.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos o perfil de expressão de seis microRNAs relacionados a ativação de mastócitos e à angiogênese: miR-9, miR16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221; e dois marcadores imuno-histoquímicos, CD-34 e mast cell tryptase, em uma série de tumores de glândula salivar.

A partir dos nossos resultados, foi possível observar uma maior densidade de mastócitos e microvasos na maioria dos tumores estudados quando comparados aos controles, bem como uma maior quantidade de mastócitos nas áreas peritumorais, além de uma maior densidade de microvasos em tumores malignos, especialmente no CME. Foi possível observar também uma diferença significativa na expressão dos microRNAs: miR-9, miR-17, miR-132 e miR-221 entre os tumores e os controles. Todavia, apenas o perfil de expressão do miR-9 apresentou correlação negativa estatisticamente significativa com a densidade de microvasos nos tumores estudados.

Os mastócitos originam-se de células pluripotentes hematopoiéticas presentes na medula óssea, que ainda indiferenciados, migram para os tecidos e sofrem maturação em dependência das condições do microambiente. Quando maduros, colonizam a maioria dos tecidos humanos, sendo encontrados principalmente na pele e nos tratos respiratório e digestivo, localizando-se, principalmente, próximos a vasos e a neurônios (METCALFE *et al.*, 1997; CONTI *et al.*, 2007; MALTBY, KHAZAIE, MCNAGNY, 2009; RIBATTI *et al.*, 2012). O papel destas células é importante e bem descrito nas reações alérgicas, na resposta inflamatória, reparação tecidual, respostas imunes mediadas por células T e, atualmente, estudos têm associado os mastócitos ao desenvolvimento tumoral (CH'NG *et al.*, 2006; RIBATTI *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013).

As células mastocitárias, aqui estudadas, foram detectadas em todos os tumores do presente trabalho. Outros autores também demonstraram a presença de mastócitos em tumores de glândula salivar (KATOPODI *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2013) e em diferentes tipos tumorais, como no câncer de próstata (AYDIN *et al.*, 2002), de ovário (JOHANSSON *et al.*, 2010), de pulmão (XIANG *et al.*, 2010), de fígado (JU *et al.*, 2000) e em melanomas (TIBOR TOTH *et al.*, 2000) Essas células

estavam localizadas próximas a vasos sanguíneos, como mostram diferentes trabalhos prévios (CONTI *et al.*, 2007, MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY *et al.*, 2009; ANTONIADES *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2013; KATOPODI *et al.*, 2004 PYZIAK *et al.*, 2013). Para Maltby, Khazaie e McNagny, 2009 a localização dos mastócitos em regiões periféricas dos tumores, sugere que o recrutamento dessas células pode ocorrer de duas formas: a partir da migração dos mastócitos de tecidos vizinhos saudáveis, ou a partir da migração de progenitores das células mastocitárias via vasos sanguíneos próximo ao tumor. Observamos neste trabalho uma concentração maior dessas células nas áreas peritumorais das neoplasias estudadas, independente do tipo histológico do tumor. Apesar disso, outros autores também encontraram uma maior concentração dessas células em áreas peritumorais (KANKKUNEN *et al.*, 1997; TIBOR TOTTH *et al.*, 2000; AYDIN *et al.*, 2002; THEOHARIS e CONTI, 2004; JOHANSSON *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2013)

Tibor-Toth *et al.*, 2000 analisaram o papel dos mastócitos no desenvolvimento tumoral em 35 pacientes com melanoma maligno primário e 20 pacientes com nevos intradérmicos benignos. Através de análise imunohistoquímica, os autores notaram uma densidade mastocitária maior em melanomas (197,6 mastócitos/mm²) quando comparada ao nevo intradérmico (95,7 mastócitos/mm²), além de um acúmulo significativamente maior de mastócitos em áreas peritumorais quando comparado a áreas intratumorais (197,6 x 13,7 mastócitos/mm² para mastócitos triptase-positivos e 71,9 x 3,9 mastócitos/mm² para triptase-quimase-positivos).

A densidade de mastócitos em tumores tem sido associada com crescimento, metástases, invasão e prognóstico de diversos tipos de neoplasias benignas e malignas, que se desenvolvem em órgãos como o pulmão (THEOHARIDES, CONTI, 2004; CONTI *et al.*, 2007), rins (MALTBY, KHAZAIE, MCNAGNY, 2009) e pele (SAIGUSA *et al.*, 2013). Associado a isso, recentemente, MA *et al.*, 2013 demonstrou o papel dos mastócitos nas alterações ocorridas no microambiente tumoral que promoveriam o desenvolvimento do tumor.

No nosso estudo, foi observada uma diferença significativa entre a densidade de mastócitos quando foram comparados os controles normais e o CME e, entre este último e o CAC e o AP, sendo que o CME apresentou as maiores concentrações de mastócitos tanto peri quanto intratumorais, sugerindo o possível papel dessas células na agressividade tumoral. Tais achados estão em

concordância com um trabalho realizado pelo nosso grupo (VIDAL *et al.*, 2013) o qual avaliou a densidade de mastócitos e vasos sanguíneos em tumores de glândula salivar e encontraram uma maior concentração de mastócitos peritumorais em todos os tumores estudados. Além disso, quando Vidal *et al.*, 2013 compararam o CME a outros tumores como o CAC, o AP e O APLG, uma quantidade maior de mastócitos, tanto peri quanto intratumorais, foram observados nos casos de CME.

Um achado interessante observado no nosso estudo foi a presença marcante de células mastocitárias na pseudo-cápsula dos AP, as quais parecem contribuir para a formação dessa estrutura em AP. Um estudo prévio mostrou que as células mastocitárias contribuíam para a expansão de tumores odontogênicos benígnos devido, principalmente, a capacidade destas células na síntese de colágeno e na liberação de substâncias tais como a heparina, ácido hialurônico, proteoglicanos, enzimas proteolíticas e fator de crescimento de fibroblasto. (PEREIRA *et al.*, 2012)

Em um estudo realizado por Katopodi *et al.* (2004), a frequência e a distribuição de mastócitos em 22 casos de AP de glândula salivar maior e menor foram analisada. Os autores observaram uma maior concentração de mastócitos peritumorais especialmente em casos de glândula menor, entretanto foram detectados poucos ou nenhum mastócito em áreas intratumorais. Este último achado está em contraste com nosso estudo, pois nos casos de AP analisados, apesar de uma maior quantidade de MC peritumorais, especialmente próximos ou na pseudo-cápsula fibrosa destes tumores, também foram observados mastócitos intratumorais, mesmo que em menor quantidade. Tais achados discrepantes podem ser justificados pelo método de coloração das células mastocitárias, o qual, no estudo supracitado, foi feito através do método histoquímico. No nosso estudo, foi utilizando a técnica de imuno-histoquímica.

O aumento local do tumor, bem como a sua disseminação, são processos dependentes do crescimento e suprimento vascular dos tecidos circunvizinhos ao tumor (TÓTH-JAKATICS *et al.*, 2000). A angiogênese é um dos principais fatores que contribui para o crescimento da maioria dos tumores benignos e malignos, uma vez que, para o tumor ultrapassar o tamanho de 2 mm³, é necessário um maior aporte de oxigênio e nutrientes (FOLKMAN, COLE, ZIMMERMAN, 1966; FOLKMAN 1989). A formação de novos vasos facilita a entrada de células tumorais na

circulação, desempenhando papel fundamental na metástase tumoral à distância (RIBATTI 2001; CRIVELLATO *et al.*, 2008).

O CD-34 é uma glicoproteína transmembrana presente em células endoteliais e percussores hematopoiéticos que tem sido empregada para mensurar o índice de angiogênese em diversas neoplasias, com excelentes resultados de marcação. (TIBOR-TOTH *et al.*, 2000; FOX *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008; KADEMANI *et al.*, 2009; LUUKKAA *et al.*, 2009; FAUR *et al.*, 2013). De acordo com os protocolos estabelecidos no consenso internacional acerca de critérios de avaliação em tumores, é um dos principais anticorpos recomendados para a identificação de vasos sanguíneos em material parafinado. (BALUK, MCDONALD, 2008; VERMEULEN *et al.*, 2002)

No nosso estudo, o CD-34 foi utilizado como marcador imuno-histoquímico na análise da microdensidade vascular sendo encontrada uma marcação positiva em todos os tumores analisados. Na literatura, vários estudos reportados têm utilizado o imunomarcador CD-34 na análise da angiogênese em tumores de glândula salivar (ZHANG *et al.*, 2005; SI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008; LUUKKAA *et al.* 2009; VIDAL *et al.*, 2013; FAUR *et al.*, 2013).

Uma diferença significativa na densidade de microvasos foi observada no nosso estudo entre os tumores malignos e benignos, bem como, entre os controles e os tumores. Entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significantes na densidade de vasos entre os padrões histológicos do CAC e entre os graus de gradação histológica do CME, possivelmente devido ao número reduzido da amostra. A despeito desses achados, em um estudo realizado por Shi *et al.*, 2007 foi avaliada a microdensidade vascular em 75 casos de CME segundo os quais a angiogênese foi maior nos tumores em estágios mais avançados e de alto grau histológico, bem como em tumores localizados em glândulas salivares menores. A mesma associação foi encontrada no estudo de Zhang, Peng e Chen, 2005, no qual foram avaliados 80 casos de CAC revelando que o padrão histológico sólido exibiu maior vascularização que os outros padrões. Luukkaa *et al.*, 2009 avaliou a MDV em CAC e CME, relatando um maior intensidade e um maior MDV nos casos de CME em comparação aos casos de CAC. Souza *et al.*, 2007 ao analisar o marcador endotelial CD-34 em tumores de glândula salivar encontrou uma maior MDV nos

APBG (média 11,3 vasos/mm²), CAC (média 12,9 microvasos/mm²) e CME (média 17,0 microvasos/mm²) quando comparados ao AP (média 9,9 microvasos/mm²), sendo essa diferença estatisticamente significante entre o CME e os demais tumores.

No nosso trabalho, foi observada uma maior MDV nos tumores malignos quando comparados aos controles (3,06microvasos/mm²) e ao AP (2,63microvasos/mm²), além disso, corroborando com estudos prévios (SOUZA *et al*, 2007; LUUKKAA *et al.*, 2009; VIDAL *et al*, 2013), foi observado também uma maior MDV nos casos de CME (21,53 microvasos/mm²), a qual pode estar associada a influencia das células mioepiteliais na angiogenese e na agressividade destes tumores. (SOUZA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008; VIDAL *et al*, 2013)

Nguyen *et al.*, 2000 analisou a influência das células mioepiteliais na angiogenese através de um estudo *in vitro*. Foi demonstrado neste estudo que as células mioepiteliais que derivam de diversas neoplasias benignas expressam altas taxas de inibidores da angiogênese como Inibidor de Metaloproteinase (TIMP1), receptores solúveis FGF e maspin, e baixas taxas de fatores angiogênicos (NGUYEN *et al.*, 2000). Dessa maneira, comparando-se as expressões gênicas das linhagens de células não mioepiteliais e mioepiteliais, essas últimas apresentam maior expressão de genes pertencentes à classe dos inibidores angiogênicos e pequena expressão dos fatores angiogênicos (BARSKY e KARLIN, 2006).

No estudo de Vidal *et al.*, 2013, também foi observado uma maior microdensidade vascular nos casos de CME, sugerindo o comportamento agressivo deste tumor e uma possível influência das células mioepiteliais (falta de diferenciação mioepitelial) na angiogênese e na agressividade dos tumores de glândula salivar. Tais achados também foram reportados por Costa *et al.*, 2008 que, ao analisar tumores de glândulas salivares com e sem diferenciação mioepitelial, sendo eles respectivamente CAC, carcinoma epitelial mioepitelial e o CME, evidenciaram que a MDV foi menor no grupo de tumores com diferenciação mioepitelial, sugerindo que carcinomas salivares com componente mioepitelial, como CAC e o carcinoma epitelial mioepitelial poderiam estar associados a um menor

índice angiogênico em comparação com aqueles sem tal diferenciação, como o CME.

Um achado interessante no nosso estudo foi a baixa microdensidade vascular do AP (média de 2,63 microvasos/mm²) quando comparado a tumores malignos como o CAC (média de 10,92 microvasos/mm²) e ao CME (média de 21,53 microvasos/mm²), além de uma maior concentração dos microvasos na cápsula fibrosa do AP em relação ao interior do tumor. Tal achado corrobora com os dados encontrados no estudo realizado por Souza *et al.*, 2007, no qual os autores relataram que em AP as áreas próximas à capsula fibrosa apresentavam uma maior imunomarcção para o CD-34 quando comparados a áreas intratumorais. Em um outro estudo realizado por Soares *et al.*, 2007 os autores compararam a microdensidade vascular de 10 casos de AP sem transformação maligna com 16 casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) com e sem diferenciação mioepitelial. Os autores demonstraram que em AP sem transformação maligna os vasos sanguíneos eram raros e geralmente pequenos, entretanto, nos casos intracapsulares ou minimamente invasores de CXAP a quantidade de vasos era mais numerosa, sugerindo uma correlação positiva entre a angiogênese e o desenvolvimento tumoral. Os autores ainda relataram uma menor quantidade de vasos neoformados no carcinoma ex-adenoma pleomórfico com diferenciação mioepitelial quando comparados ao sem essa diferenciação, sendo observado que nos tumores com diferenciação mioepitelial as células neoplásicas geralmente formavam grandes agregados celulares hipovascularizados. Tais resultados corroboram com a hipótese de que o microambiente tumoral das células mioepiteliais poderia estar relacionado com a baixa atividade angiogênica observada nos tumores. (SOUZA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008)

Um outro achado no nosso estudo foi o forte componente de matriz extracelular observado nos casos de AP estudados, o que poderia ser atribuído a significativa redução do número de vasos encontrado nesses tumores quando comparados aos outros tumores de glândula salivar e aos controles. Para Skalova *et al.* 1992 as células mioepiteliais são diretamente responsáveis pela formação e variedade estromal do AP. Zhang *et al.*, 2009 ainda sugerem que o componente estromal tem um papel crucial no comportamento biológico do AP, observando uma superexpressão de MMP-2, MMP-9 TIMP-1e TIMP-2 no mioepitélio. Tais achados

também puderam ser observados em estudos com vasos linfáticos, como reportado por Soares *et al.*, 2007 os quais, ao compararam a densidade dos vasos linfáticos em casos de AP e de CXAP em estágios precoces e tardios, observaram um aumento do número de vasos na fase tardia sugerindo que o estroma do AP, por ser produzido pelas próprias células do tumor, não continha vasos linfáticos. Além disso, na fase precoce, o CXAP está contido dentro do adenoma e, portanto, nestes tumores, os vasos linfáticos são raros ou inexistentes. Entretanto, na fase avançada, ocorre uma progressiva substituição do estroma pelo epitélio tumoral sendo possível observar vasos linfáticos no CXAP francamente invasor.

Também, um achado importante no nosso estudo foi a forte correlação positiva entre a densidade mastocitária e a densidade de microvasos nos tumores de glândula salivar analisados. Segundo Ribatti *et al.*, 2012 a angiogênese pode ser induzida e modulada pelos mastócitos, que além de importante fonte de citocinas, produzem fatores pro-angiogênicos. Os fatores angiogênicos produzidos pelos mastócitos são: fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), fator de transformação do crescimento-beta (TGF-beta interleucina-8 (IL-8), metaloproteinase-2 (MMP-2), metaloproteinase-9 (MMP-9), fator de crescimento de neurônios (NGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoetina-1 (Ang-1), leptina, adrenomedulina, triptase, quimase, histamina e heparina (CRIVELLATO *et al.*, 2008; RIBATTI *et al.*, 2012).

Em um estudo desenvolvido por Ribatti *et al.* 2007, os autores correlacionaram a angiogênese com a densidade de mastócitos positivos para triptase e para leptina em 14 amostras de pacientes com leiomioma, 14 pacientes com prolapso genital (controle) e 4 pacientes com cisto ovariano (controle). Os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência para triptase e leptina e imuno-histoquímica com anticorpos anti-triptase, anti-CD31 e anti-leptina. Os resultados mostraram maior densidade de mastócitos nos leiomiomas, quando comparados aos controles, e maior densidade de vasos em leiomiomas em relação aos controles. As densidades de mastócitos positivos para triptase e para leptina foram significativamente maiores no grupo leiomioma em relação aos controles, sugerindo assim que a angiogênese em leiomiomas uterinos está relacionada a maior densidade de mastócitos triptase+ e leptina+. (RIBATTI *et al.*, 2007)

Kankkunen *et al.* 1997, realizaram a análise quantitativa dos mastócitos triptase-positivos (MC_T) e triptase-quimase-positivos (MC_{TQ}) em 98 casos de lesões benignas e 30 de lesões malignas de pulmão. Os autores demonstraram que em tumores malignos, MCs contendo triptase são duas a três vezes mais numerosos, além disso, a triptase presente nos grânulos dos MCs foi um potente agente angiogênico. No estudo realizado por Benitez-Bribiesca *et al.*, 2001, foram analisadas biópsias obtidas de 21 pacientes com câncer e de 63 pacientes com displasia e carcinoma espinocelular. Os autores evidenciaram o aumento dos MCs triptase-positivos e a correlação positiva deste aumento com a angiogênese tecidual, sugerindo que os MCs triptase-positivos poderiam atuar na regulação da angiogênese.

Estudos recentes têm demonstrado o papel dos mastócitos na angiogênese de vários tumores localizados na região de cabeça e pescoço (BENITEZ-BRIBIESCA, 2001; CHEEMA *et al.*, 2012; PYZIAK, *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2013). Pyziak *et al.*, 2013 avaliaram 47 casos de CECO, através de técnica imunohistoquímica utilizando os anticorpos mast cell triptase e CD-31 para a identificação de mastócitos e microvasos, respectivamente. Os autores além de observarem uma maior concentração de mastócitos em áreas peritumorais, também relataram uma correlação positiva significativa entre a concentração de mastócitos e a densidade microvascular em áreas peri e intratumorais dos casos de CCE orais. Em contraste, Cheema *et al.*, 2012 ao avaliarem 102 casos de carcinomas escamocelulares orais graduados em bem, moderadamente e pouco diferenciados, observaram uma diminuição da quantidade de mastócitos sugerindo uma correlação negativa entre a quantidade de MC e a progressão do tumor. Entretanto, os mesmos autores afirmam que esse resultado pode ter ocorrido devido a degranulação nos mastócitos nos estágios mais avançados da doença, sendo que a falta de grânulos nos mastócitos teria levando a não coloração pelo azul de toluidina. Ainda para Pyziak *et al.*, 2013, a técnica empregada na análise de mastócitos pode levar a interpretações equivocadas, os corantes histoquímicos como o azul de toluidina reduzem o risco de análises errôneas, entretanto, o melhor método continua sendo a identificação das células mastocitárias através da imunohistoquímica.

Em contraste com os achados de VIDAL *et al.*, 2013, no qual não foram detectadas diferenças significativas quando comparada a densidade de mastócitos

com a densidade de vasos sanguíneos em todos os tumores de glândula salivar, os achados em nosso estudo, demonstraram uma forte correlação da angiogênese tumoral com a densidade mastocitária nos tumores de glândula salivar estudados. É possível que o marcador utilizado no nosso estudo tenha influenciado nesse resultado, uma vez que Vidal *et al.*, 2013 utilizaram o fator VIII para o estudo em tumores de glândulas salivares.

O estudo da expressão gênica em tumores de glândula salivar ainda é uma área pouco explorada e com poucas publicações na literatura atual. Dentre os métodos de avaliação da expressão gênica, o Real Time qPCR associado a análises utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, sugerido por Livak, têm sido amplamente utilizados em estudos de expressão gênica com resultados positivos na literatura (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; VANDERSOMPELE *et al.*, 2009; BUSTIN *et al.*, 2009; WITTEWER *et al.*, 2009; GAROFALO e CROCE, 2011; GLUD e GNIADCKI, 2012; WEN *et al.*, 2013). O método Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) é um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostras estudadas, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo controle (Applied Biosystems User Bulletin N°2 – P/N 4303859). A identificação de perfis de expressões de microRNAs nos diferentes cânceres tem sido importante para o estabelecimento de “assinaturas moleculares” dos tumores sendo fundamentais na descoberta das vias de regulação do câncer e também no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, prognóstico e terapêutica (AQEILAN *et al.*, 2010)

Estudos demonstram que os microRNAs, agentes fundamentais na regulação da expressão gênica, apresentaram alterações nos níveis de expressão em alguns tumores, relacionando esses padrões aberrantes de expressão e regulação gênica à processos de tumorigênese, iniciação e progressão dos tumores (CALIN *et al.*, 2006; ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006; KWAK *et al.*, 2010; IORO e CROCE, 2012; GLUD e GNIADCKI, 2012). Os microRNAs que atuam no processo neoplásico, dependendo do seu alvo e do tecido em que estão presentes, regulam negativamente os transcritos dos genes supressores de tumor ou dos oncogenes (KIM *et al.*, 2005). Uma redução na transcrição de alguns microRNAs pode acelerar uma transformação oncogênica enquanto que o aumento de outros microRNAs pode inativar genes supressores de tumor (ZHANG *et al.*, 2007).

No nosso estudo foram utilizados 31 amostras de tumores de glândula salivar fixados em formol e embebidos em parafina, que, através da extração de RNA utilizando kits específicos que continham colunas de sílica, tiveram seus perfis de expressão gênica avaliados por qPCR. As análises de expressão gênica em material parafinado, durante muito tempo foram desconsideradas devido às dúvidas que permeavam sobre o efeito da fixação no material genético, o que poderia comprometer a qualidade e a veracidade dos resultados. (ARTZ *et al.*, 2011; KOELZ *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto, a comprovada estabilidade do microRNA extraído de tecidos parafinados tem proporcionado o desenvolvimento de uma série de estudos que avaliam o papel dessas moléculas tanto em tecidos normais quanto em diversas lesões, tipo o câncer. (XI *et al.*, 2007; LUI *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2010; ARTZ *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; KOELZ *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 2012; PATNAIL *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2013; GROELZ *et al.*, 2013; KOLBERT *et al.*, 2013). Um estudo recente de Peiró-Chova *et al.*, 2013, ao avaliar a integridade de pequenos RNAs (miRNAs), observou uma alta correlação da detecção de miRNAs entre tecidos parafinados e amostras criopreservadas, demonstrando o alto grau de estabilidade dessas moléculas, sendo detectados em várias amostras, independente da qualidade do tecido analisado.

No nosso estudo, microRNAs relacionados a ativação de mastócitos, miR-221, e ao processo de angiogênese, miR-9, miR-16, miR-17, miR-132 e miR-195, tiveram o perfil de expressão gênica avaliados em 31 casos de TGS. Comparados a tecidos normais, cinco desses seis microRNAs (miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221), apresentaram expressão diminuída na maioria dos casos. Tais achados estão de acordo com outros autores na literatura, os quais afirmam que na maioria dos tumores os microRNAs encontram-se subexpressos, atuando como supressores tumorais ligando-se a oncogenes e diminuindo a sua expressão. (LU *et al.*, 2005; ZHANG, DAHLBERG *et al.* 2007; TOMYIAMA, 2010; TIMOSZCZUK, 2012; CHEN *et al.*, 2012)

Dentre os microRNAs analisados no nosso estudo, apenas o miR-9 apresentou uma forte correlação negativa significativa com a densidade de vasos sanguíneos nos tumores de glândula salivar analisados. O miR-9, cuja sequência de nucleotídeos foi extremamente conservada entre as espécies, assume diversas funções nos vertebrados, como a regulação da neurogênese, da apoptose ou da

angiogênese e pode apresentar um perfil de expressão diferente nas diversas populações celulares (YUVA-AYDEMIR *et al.*, 2011). A subexpressão do miR-9 para os casos de CME correlacionada ao aumento da angiogênese observada no nosso estudo, também foi relatada por Zhang *et al.*, 2012. Esses autores avaliaram o perfil de expressão do miR-9 foi através da extração de RNA obtido de material biológico parafinado de 42 casos de neuroblastomas. Observaram também que o miR-9 ligava-se a região 3'URT do RNAm que codifica a MMP-14. A MMP-14 é uma metaloproteinase de matriz que tem um papel crucial na remodelação e penetração da matriz extracelular pelas células tumorais, promovendo invasão tumoral, angiogênese e metástase. Os autores ainda observaram, através de cultura de células, que a superexpressão do miR-9 resultou na diminuição da densidade dos vasos sanguíneos positivos para o imunomarcados CD-31, concluindo que o aumento da expressão do miR-9 estava diretamente ligado a diminuição da adesão, migração, invasão e angiogênese em neuroblastomas.

A expressão do miR-9 já foi estudada previamente por Minor *et al.*, em 2011 em 107 casos de carcinoma de células escamosas de boca e de orofaringe. Este estudo avaliou as alterações genéticas e epigenéticas envolvidas no silenciamento do miR-9 as quais seriam responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento em CCE. Os autores concluíram que metilações no gene que codifica o miR-9 em células tumorais reduzem a expressão deste miRNA e conseqüentemente a proliferação celular. Assim o miR-9 funcionaria como um supressor tumoral em CCE de boca e orofaringe inibindo a proliferação celular e elevando a expressão do gene supressor tumoral PTEN. (MINOR *et al.*, 2011).

Um outro estudo realizado por Cheung *et al.*, 2012, foram analisados 12 miRNAs com perfil de expressão aberrante em 48 neoplasias cervicais intraepiteliais e 51 CCE orais. Diferindo dos resultados supracitados, os autores demonstraram que quando comparado a células epiteliais normais, as neoplasias estudadas apresentaram uma significativa superexpressão do miR-9, a qual estava diretamente relacionada a patogênese e a progressão desta doença. Os autores ainda comentam que o perfil de expressão dos miRNAs são fortes delineadores da identidade do tecido, sendo capazes de funcionar de forma específica em diferentes órgãos e tipos celulares. Tais dados estão de acordo com MONTICELLI *et al.*, 2013, pois para esses autores, enquanto alguns miRNAs são amplamente expressos em

um tipo específico de células ou tecidos, outros exibem uma expressão limitada nestes mesmos tecidos ou células.

No nosso estudo, foram observadas diferenças significativas de expressão do miR-17 entre os tecidos normais e tumorais e entre AP e CAC, apresentando-se subexpresso em 73% dos casos e superexpresso em 27% dos casos, respectivamente. O miR-17 é transcrito em um pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos e forma o *cluster* miR-17-92, um miRNA policistrônico também chamado de oncomiR-1, bem descrito e estudado na literatura devido a sua atuação como oncogene. A exata atividade de cada um dos 6 miRNAs presente no *cluster* miR-17-92 ainda não foi completamente esclarecida (HAAFTEN *et al.*, 2010). Entretanto, alguns autores sugeriram, através de estudos feitos em ratos, que estes miRNAs devem atuar de forma conjunta e sobreposta e a sua ação depende tanto do tipo celular quanto do contexto fisiológico. (OLIVE *et al.*, 2010). O miR-17-92 pode ter diversas funções no desenvolvimento tumoral, a sua superexpressão pode ser capaz de mediar o fator VEGF aumentando a angiogênese e proporcionando a sobrevivência de células malignas além de reprimir a apoptose modulada pela proteína c-myc e encurtar a latência do tumor, podendo ainda se ligar ao fator de transcrição E2F1 e E2F3 promovendo a proliferação celular. (DEWS *et al.*, 2006; OLIVE *et al.*, 2010).

O perfil expressão do miR-17 assume um papel controverso em diferentes tumores, podendo apresentar-se ora subexpresso ora superexpresso (DEWS *et al.*, 2006; HAAFTEN *et al.*, 2010; OLIVE *et al.*, 2010). Tal fato pode ser justificado devido ao perfil de expressão de cada miRNA ser característico e dependente do tipo de tecido ou célula (O'CONNEL *et al.*, 2010). Enquanto alguns autores observaram a superexpressão deste miRNA em diferentes neoplasias (CALIN *et al.*, 2006; OLIVE *et al.*, 2010), resultados diferentes foram observados em um estudo recente realizado por Chang *et al.*, 2013, no qual a expressão do miR-17 foi avaliada em 98 casos de CCE orais. Chang *et al.*, 2013 observaram uma subexpressão do miR-17 nos tumores em estágios mais avançados significativamente associada a um pobre prognóstico. Além disso, através de culturas de células, os autores reportaram o decréscimo da capacidade migratória das células tumorais devido a expressão aumentada do miR-17, demonstrando a relevância clínica desse miRNA na metástase tumoral.

Um outro microRNA relacionado ao processo de angiogênese e analisado no nosso estudo foi o miR-132, o qual apresentou diferenças significativas de expressão quando comparados aos controles. O miR-132 assume diferentes funções fisiológicas e é transcrito em vários tipos celulares. (ANAND *et al*, 2011 a). Recentemente, Anand *et al.*, 2010 demonstraram que o processo de formação de novos vasos em patologias poderia ser regulado pelo miR-132. Nesse estudo, visando identificar os miRNAs responsáveis pela ativação da proliferação das células endoteliais, foram usadas células endoteliais umbilicais humanas tratadas com VEGF ou com bFGF em um modelo de vasculogênese de células embrionárias indiferenciadas humanas, no qual corpos embrióides (corpos esféricos com grande quantidade de células em avançado estágio de diferenciação) derivados do cultivo de células tronco embrionárias humanas formavam um endotélio bem definido após 14 dias de cultivo. Este estudo demonstrou que o miR-132 estava expresso em células endoteliais ativadas, o qual suprimia a expressão (silenciava) do p120RasGAP permitindo a ativação da proteína Ras e promovendo a neovascularização. Além disso, os mesmos autores demonstraram que a neutralização deste miRNA com o antagoniR-132 suprimiu a angiogênese. (ANAND *et al.*, 2010). Tais achados corroboram com os observados no nosso estudo, onde um perfil de expressão diminuído foi observado em 61% dos tumores de glândula salivar estudados.

Caporali e Emanuelli, 2011 sugerem outros microRNAs, como o miR-16 também teria um papel decisivo na ativação de genes envolvidos no processo de angiogênese. No nosso estudo, apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas na expressão do miR-16 quando comparado aos controles normais, foi observado a expressão diminuída deste microRNA em 87% dos tumores de glândula salivar estudados, sendo que em nenhum dos casos esse miRNA mostrou-se sobrerregulado, independente do padrão histológico ou gradação do tumor. Esses dados corroboram com os achados de Bonci *et al.*, 2008 quem analisaram a expressão por qPCR do miR-16 e do miR-15 (transcritos juntos no cluster miR-15a – miR-16-1), em 20 casos de câncer de próstata. Concluíram que, quando comparados a tecidos normais, aproximadamente 80% dos casos apresentavam uma regulação negativa desses miRNAs.

Em 2005, Cimmino *et al.* utilizando ferramentas de bioinformática, descobriram que a sequência do miR-16 e a sequência do RNAm para BCL2 apresentavam pares de bases complementares, sugerindo que a oncoproteína Bcl2 deveria ser um alvo de repressão pós transcricional deste miRNA. Dessa forma, o miR-16, subexpresso em uma grande maioria de tumores, atuaria como um supressor tumoral e, alterações genéticas envolvidas na região cromossomal 13q14 onde se localiza, muito comum em vários tumores como no linfoma linfocítico, na leucemia e em tumores sólidos como no câncer de próstata ou no tumor odontogênico ceratocístico, alterariam o perfil de expressão deste miRNA e consequentemente elevariam a expressão da proteína Bcl2 nestes tumores. (CALIN *et al.* 2006; AQELIAN *et al.*, 2010; DINIZ *et al.*, 2012). A expressão da Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria impedindo a apoptose. Essa capacidade de resistir a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos, pois a expansão clonal de uma célula transformada depende tanto de um descontrole da sua capacidade proliferativa, como também da crescente incapacidade de morrer por apoptose. (GRIVICICH *et al.*, 2007). Assim, a expressão diminuída do miR-16 inversamente correlacionada a superexpressão da proteína Bcl-2 tem sido associada a resistência à apoptose podendo contribuir para a progressão dos tumores (CIMMINO *et al.*, 2005; AQELIAN *et al.*, 2010)

O papel do miR-16 e sua ação supressora tumoral ao se ligar ao oncogene BCL2, promovendo a apoptose, proliferação e desenvolvimento tumoral já foi bem relatado na literatura. Entretanto, um estudo recente relatou também o papel deste microRNA na angiogênese tumoral.(SUN *et al.*, 2013). Nesse último estudo, as expressões do miR-15 e do miR-16 foram avaliadas em 23 casos de mieloma múltiplo. Comparado com indivíduos saudáveis, a expressão desses miRNAs apresentavam-se extremamente baixa nos estágios de mieloma múltiplo avançado, nesse estágio observa-se o aumento da angiogênese na medula óssea. Os autores comprovaram que a região 3'URT do RNAm VEGF é alvo direto dos miR-15 e miR-16. Observaram também uma relação inversa entre a expressão destes microRNAs com os níveis de proteína VEGF, relatando que em células normais, estes miRNAs reprimiam a expressão da proteína VEGF a nível de tradução.

Um outro microRNA analisado no nosso estudo foi o miR-195, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada no perfil de expressão deste microRNA nos tumores entre si, ou entre os tumores e os tecidos normais. Em contrapartida, foi observado a subexpressão do miR-195 em 8 casos de CAC, 3 casos de CME e 2 casos de AP. Tais achados estão em concordância com o estudo de Deng *et al.*, 2013 os quais estudaram a expressão do miR-195 no câncer de estômago. O estudo demonstrou que o miR-195 tinha sua expressão reduzida nesses tumores, devido possivelmente a metilação de “ilhas CpG” nos genes promotores deste miRNA, funcionando como supressor tumoral. Os autores ainda sugerem que o miR-195 pode atuar regulando negativamente a expressão tanto da CDK6, uma proteína envolvida na progressão do ciclo celular, quanto do VEGF, fator importante na angiogênese e apoptose. (DENG *et al.*, 2013)

Na literatura, poucos estudos tem elucidado o papel dos microRNAs na ativação dos mastócitos e outras células imunes. (O’CONNELL *et al.*, 2010; MONTICELLI *et al.*, 2013). O’Connell *et al.*, 2010 relatam que alguns miRNAs tem um perfil de expressão típico em células dos sistema imunológico, tendo um papel central na regulação do desenvolvimento celular e da função, além disso, os mesmos autores comentam que a expressão aberrante destes miRNAs pode contribuir no desenvolvimento de condições patológicas associadas ao sistema imune, como o câncer ou doenças auto-imunes. Um mesmo miRNA pode exercer efeitos diferentes nas diferentes linhagens celulares, evidenciando assim que os seus alvos podem diferir entre os diferentes tipos de células. Em algumas células do sistema imune, miRNAs tem mostrado a capacidade de regular a proliferação, as funções efetoras e a diferenciação.(O’CONNEL *et al.*, 2010)

O miR-221 tem dois papéis principais na biologia dos mastócitos: quando não ativados, o miR-221 contribui na regulação do ciclo celular e para a organização do citoesqueleto destas células; entretanto, quando estimulados, os efeitos do miR-221 contribuem para a regulação da degranulação, produção de citocinas e aderência celular. (MAYORAL *et al.*, 2009; MAYORAL *et al.* 2011; CALIN *et al.*, 2013). Estudos diversos vêm apontando o papel importante do miR-221 e o seu homólogo, o miR-222, como reguladores dos mastócitos, tanto em tecidos normais, como também em doenças (MAYORAL *et al.*, 2009; MONTICELLI *et al.*, 2011; MAYORAL *et al.* 2011). No nosso estudo, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre

os níveis de expressão do miR-221 com a densidade mastocitária nos tumores de glândula salivar analisados.

Por outro lado, o perfil de expressão do miR-221 apresentou uma expressão significativamente diminuída nos tumores de glândula salivar quando comparados aos controles. Dos tumores estudados, 93,5% dos casos estavam subexpressos, sendo que nenhum mostrou-se com uma expressão aumentada. Estes achados estão em concordância com o estudo realizado por Liu et al., 2009, onde o perfil de expressão do miR-221 e miR-222 foi estudado em carcinomas escamocelulares de língua sendo observado uma expressão diminuída destes miRNAs. Em um estudo mais recente realizado por Koelz et al., em 2011, foram analisados os perfis de expressão destes dois miRNAs em 54 tumores do estroma gastrointestinal, localizados no estômago, intestino delgado, reto, mesentério e esôfago, e comparados com os tecidos normais correspondentes. Os autores observaram que a maioria significativa dos tumores apresentavam um baixo nível de expressão para estes miRNAs.

Outros estudos, entretanto, demonstraram uma expressão aumentada do miR-221 em alguns tumores como, hepatocarcinoma, carcinoma papilar de tireóide (KOELZ et al., 2001), glioblastoma (ZHANG *et al.*, 2010); câncer de próstata e pulmão (GAROFALO *et al.*, 2013). No estudo realizado por Yang *et al.*, 2011, os autores analisaram a expressão do miR-221 e miR-222 em 37 casos de carcinoma de células escamosas orais, localizados principalmente em mucosa jugal, língua e gengiva. Dos casos analisados, 46% apresentavam uma expressão aumentada para o miR-221 e 40% para o miR-222; entretanto, outros 40% dos casos apresentaram uma expressão diminuída para miR-221/miR-222. Esses dados tornam evidente o papel dual de um mesmo microRNA em diferentes tipos tumorais, podendo agir tanto como supressores ou como oncogenes, indicando assim, que a função do miRNA está intimamente relacionado com o contexto celular e com o tipo de tumor.

Por fim, o estudo genético dos microRNAs: miR-9, miR-16, miR-17, miR-132, miR-195 e miR-221, parece contribuir para o entendimento de algumas das anormalidades que ocorrem em tumores de glândulas salivares aqui estudados. No entanto, mais estudos nesse campo são necessários uma vez que os microRNAs podem ser fortes alvos terapêuticos no futuro.

7. CONCLUSÕES

Foi observada uma maior quantidade de mastócitos, especialmente aqueles localizados em áreas peritumorais, em todos os tumores analisados quando comparados aos controles.

Foi observada também, uma diferença significativa de microvasos entre os tumores benignos e malignos.

O CME apresentou a maior densidade de mastócitos em áreas peritumorais e a maior densidade de microvasos.

Observou-se uma forte correlação positiva entre a densidade mastocitária e a densidade de microvasos nos tumores avaliados

Cinco dos seis microRNAs estudados apresentaram um perfil de expressão diminuído, sendo que uma diferença significativa no perfil de expressão dos miR-9, miR-17, miR-132 e miR-221 foi observada entre os tumores e os controles normais.

Percebeu-se uma forte correlação negativa entre o perfil de expressão do miR-9 e a densidade de microvasos entre tumores analisados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B. et al. *Biologia Molecular da célula*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
- Ambros, V. (2011). "MicroRNAs and developmental timing." *Curr Opin Genet Dev* **21**(4): 511-517
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9** (3):277-9.
- Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG (2011). MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **63**(2):535-44.
- Anand, S. and D. A. Cheresh (2011). "MicroRNA-mediated regulation of the angiogenic switch." *Curr Opin Hematol* **18**(3): 171-176.
- Anand, S., B. K. Majeti, L. M. Acevedo, E. A. Murphy, R. Mukthavaram, L. Schepke, M. Huang, D. J. Shields, J. N. Lindquist, P. E. Lapinski, P. D. King, S. M. Weis and D. A. Cheresh (2010). "MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis." *Nat Med* **16**(8): 909-914.
- Aqeilan, R. I., G. A. Calin and C. M. Croce (2010). "miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives." *Cell Death Differ* **17**(2): 215-220.
- Arzt, L., H. Kothmaier, F. Quehenberger, I. Halbwedl, K. Wagner, T. Maierhofer and H. H. Popper (2011). "Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies." *Exp Mol Pathol* **91**(2): 490-495
- Aydin, O., D. Dusmez, L. Cinel, E. Doruk and A. Kanik (2002). "Immunohistological analysis of mast cell numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia." *Pathol Res Pract* **198**(4): 267-271.
- Barros, a. C. *Estudo Clínico-Epidemiológico de Neoplasias de Glândula Salivar Menor no Estado da Bahia*. Salvador, 2008. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia.
- Baluk, P. and D. M. McDonald (2008). "Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **1131**: 1-12.
- Barnes, I.; everson, j. W.; reichart, p.; sidransky, d. (Eds.): World Health Organization

Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours IARC Press: Lyon 2005.

Barros AC, Gurgel CAS, Gomes MC, Agra IMG, Kruschewsky LS, Santos JN. Minor salivary gland tumors in a South American population. *Arch Oncol.* 2010;18:56–9.

Bonci, D., V. Coppola, M. Musumeci, A. Addario, R. Giuffrida, L. Memeo, L. D'Urso, A. Pagliuca, M. Biffoni, C. Labbaye, M. Bartucci, G. Muto, C. Peschle and R. De Maria (2008). "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities." *Nat Med* **14**(11): 1271-1277.

Barsky sh, karlin nj. Mechanisms of disease: breast tumor pathogenesis and the role of the myoepithelial cell. *Nat Clin Pract Oncol.* v. 3, n. 3, p. 138-51, 2006.

Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell and S. M. Cohen (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* **3**(3): e85.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele and C. T. Wittwer (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* **55**(4): 611-622

Calin, G. A. (2009). "MicroRNAs and cancer: what we know and what we still have to learn." *Genome Med* **1**(8): 78.

Calin, G. A. and C. M. Croce (2009). "Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes." *Blood* **114**(23): 4761-4770.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-15529.

Calin, G. A., R. Garzon, A. Cimmino, M. Fabbri and C. M. Croce (2006). "MicroRNAs and leukemias: how strong is the connection?" *Leuk Res* **30**(6): 653-655.

Caporali, A. and C. Emanuelli (2011). "MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* **21**(6): 162-166.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* **136**(4): 642-655.

Chan, S. P. and F. J. Slack (2007). "And now introducing mammalian mirtrons." *Dev Cell* **13**(5): 605-607.

- Chang, C. C., Y. J. Yang, Y. J. Li, S. T. Chen, B. R. Lin, T. S. Wu, S. K. Lin, M. Y. Kuo and C. T. Tan (2013). "MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma." *Oral Oncol* **49**(9): 923-931.
- Cheema, V. S., V. Ramesh and P. D. Balamurali (2012). "The relevance of mast cells in oral squamous cell carcinoma." *J Clin Diagn Res* **6**(10): 1803-1807.
- Chen, P. S., J. L. Su, S. T. Cha, W. Y. Tarn, M. Y. Wang, H. C. Hsu, M. T. Lin, C. Y. Chu, K. T. Hua, C. N. Chen, T. C. Kuo, K. J. Chang, M. Hsiao, Y. W. Chang, J. S. Chen, P. C. Yang and M. L. Kuo (2011). "miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans." *J Clin Invest* **121**(9): 3442-3455.
- Chen, X. (2004). "A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development." *Science* **303**(5666): 2022-2025.
- Cheung, T. H., K. N. Man, M. Y. Yu, S. F. Yim, N. S. Siu, K. W. Lo, G. Doran, R. R. Wong, V. W. Wang, D. I. Smith, M. J. Worley, Jr., R. S. Berkowitz, T. K. Chung and Y. F. Wong (2012). "Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm." *Cell Cycle* **11**(15): 2876-2884.
- Ch'ng, S., R. A. Wallis, L. Yuan, P. F. Davis and S. T. Tan (2006). "Mast cells and cutaneous malignancies." *Mod Pathol* **19**(1): 149-159.
- Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13944-13949.
- Conti, P., M. L. Castellani, D. Kempuraj, V. Salini, J. Vecchiet, S. Tete, F. Mastrangelo, A. Perrella, M. A. De Lutiis, M. Tagen and T. C. Theoharides (2007). "Role of mast cells in tumor growth." *Ann Clin Lab Sci* **37**(4): 315-322.
- Costa, A. F., A. P. Demasi, V. L. Bonfitto, J. F. Bonfitto, C. Furuse, V. C. Araujo, K. Metze and A. Altemani (2008). "Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation." *Virchows Arch* **453**(4): 359-367.
- Costa, N. L.; Oton-leite, F.; Cheim-júnior, P.; Alencar, R. De C.; Bittar, O.; Silva, A.; Batista, A. C. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol.*, Goiás, v. 24, n. 4, p. 457-65, 2009.
- Cowland, J. B., C. Hother and K. Gronbaek (2007). "MicroRNAs and cancer." *APMIS* **115**(10): 1090-1106.
- Crivellato, E., B. Nico and D. Ribatti (2008). "Mast cells and tumour angiogenesis: new

- insight from experimental carcinogenesis." *Cancer Lett* **269**(1): 1-6.
- Croce, C. M. and G. A. Calin (2005). "miRNAs, cancer, and stem cell division." *Cell* **122**(1): 6-7.
- De Pereira, F., C. A. Gurgel, E. A. Ramos, M. T. Vidal, A. L. Pinheiro, V. Jurisic, C. B. Sales, P. R. Cury and J. N. dos Santos (2012). "Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors." *Tumour Biol* **33**(2): 455-461.
- Deng, H., Y. Guo, H. Song, B. Xiao, W. Sun, Z. Liu, X. Yu, T. Xia, L. Cui and J. Guo (2013). "MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer." *Gene* **518**(2): 351-359.
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell and A. Thomas-Tikhonenko (2006). "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster." *Nat Genet* **38**(9): 1060-1065.
- Diniz, M. G., C. C. Gomes, W. H. de Castro, A. L. Guimaraes, A. M. De Paula, H. Amm, C. Ren, M. MacDougall and R. S. Gomez (2012). "miR-15a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors." *Cell Oncol (Dordr)* **35**(4): 285-291.
- Du, T. and P. D. Zamore (2005). "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA." *Development* **132**(21): 4645-4652.
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(4): 259-269.
- Faur, A. C., E. Lazar and M. Cornianu (2013). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvascular density in salivary gland tumours." *APMIS*.
- Folkman, J. (1989). "Successful treatment of an angiogenic disease." *N Engl J Med* **320**(18): 1211-1212.
- Folkman, J., P. Cole and S. Zimmerman (1966). "Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment." *Ann Surg* **164**(3): 491-502.
- Fox, S. B. and A. L. Harris (2004). "Histological quantitation of tumour angiogenesis." *APMIS* **112**(7-8): 413-430.
- Garofalo, M. and C. M. Croce (2011). "microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**: 25-43.
- Garofalo, M. and C. M. Croce (2013). "MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance." *Drug Resist Updat* **16**(3-5): 47-59.

- Garzon R, Calin GA, Croce CM. (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Ver Med.* 60:167-79
- Glud, M. and R. Gniadecki (2012). "MicroRNAs in the pathogenesis of malignant melanoma." *J Eur Acad Dermatol Venereol.*
- Gomes, M. P., Y. Cordeiro and J. L. Silva (2008). "The peculiar interaction between mammalian prion protein and RNA." *Prion* **2**(2): 64-66.
- Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D109-111.
- Gu, S. and M. A. Kay (2010). "How do miRNAs mediate translational repression?" *Silence* **1**(1): 11.
- Hall, J. S., J. Taylor, H. R. Valentine, J. J. Irlam, A. Eustace, P. J. Hoskin, C. J. Miller and C. M. West (2012). "Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation." *Br J Cancer* **107**(4): 684-694.
- He, L., X. He, S. W. Lowe and G. J. Hannon (2007). "microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 819-822.
- Heneghan, H. M., N. Miller, R. Kelly, J. Newell and M. J. Kerin (2010). "Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease." *Oncologist* **15**(7): 673-682.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." *Genes Immun* **6**(4): 279-284.
- Hui, A., C. How, E. Ito and F. F. Liu (2011). "Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies." *BMC Cancer* **11**: 500.
- Hussain, M., T. Walker, S. L. O'Neill and S. Asgari (2013). "Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*." *Insect Biochem Mol Biol* **43**(2): 146-152.
- Hussain M.U. (2012). "Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action". *Cell Tissue Res* **349**(2):405-13.
- Iorio, M. V. and C. M. Croce (2012). "microRNA involvement in human cancer." *Carcinogenesis* **33**(6): 1126-1133.
- Jaber, M. A. (2006). "Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population." *Int J Oral Maxillofac Surg* **35**(2): 150-154.

Johansson a, rudolfsson s, hammarsten p, halin s, pietras k, jones j, stattin p, egevad l, granfors t, wikström p, bergh a. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am J Pathol.* v.177, n. 2, p. 1031-41, 2010.

Kademani, D., J. T. Lewis, D. H. Lamb, D. J. Rallis and J. R. Harrington (2009). "Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma." *J Oral Maxillofac Surg* **67**(9): 1800-1805.

Katopodi, E., N. Kavantzias, P. M. Pavlopoulos, V. Papanikolaou, A. Saetta, P. Korkolopoulou, E. Douzinas and E. Patsouris (2004). "The frequency and distribution of mast cells in pleomorphic adenomas of salivary glands." *Pathology* **36**(3): 258-261.

Kankkunen jp, harvima it, naukkarinen a. Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer.* v. 29, n. 3, p. 385-8, 1997

Kozaki k, imoto i, mogi s, omura k, inazawa j. Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics:Exploration of Tumor-Suppressive MicroRNAs Silenced by DNA Hypermethylation in Oral Cancer. *Cancer Res* v. 68, p. 2094-2105, 2008.

Kwak, P. B., S. Iwasaki and Y. Tomari (2010). "The microRNA pathway and cancer." *Cancer Sci* **101**(11): 2309-2315.

Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5): 376-385.

Koelz, M., J. Lense, F. Wrba, M. Scheffler, H. P. Dienes and M. Odenthal (2011). "Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors." *Int J Oncol* **38**(2): 503-511.

Kolbert, C. P., R. M. Feddersen, F. Rakhshan, D. E. Grill, G. Simon, S. Middha, J. S. Jang, V. Simon, D. A. Schultz, M. Zschunke, W. Lingle, J. M. Carr, E. A. Thompson, A. L. Oberg, B. W. Eckloff, E. D. Wieben, P. Li, P. Yang and J. Jen (2013). "Multi-platform analysis of microRNA expression measurements in RNA from fresh frozen and FFPE tissues." *PLoS One* **8**(1): e52517.

Kota, S. K. and S. Balasubramanian (2010). "Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future." *Drug Discov Today* **15**(17-18): 733-740.

Lee R L and Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-854.

- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* **23**(20): 4051-4060.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* **115**(7): 787-798.
- Luna, A. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: Revisited. *Adv Anat Pathol*, Houston, v. 13, n. 6, p. 293-307, Nov. 2006.
- Li, J., P. Smyth, R. Flavin, S. Cahill, K. Denning, S. Aherne, S. M. Guenther, J. J. O'Leary and O. Sheils (2007). "Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells." *BMC Biotechnol* **7**: 36.
- Libri, V., P. Miesen, R. P. van Rij and A. H. Buck (2013). "Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses." *Cell Mol Life Sci* **70**(19): 3525-3544.
- Liu, J. (2008). "Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs." *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 214-221.
- Liu L, Hu Y, Fu J, Yang X, Zhang Z. (2013). MicroRNA155 in the growth and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* **42**(2):140-7.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon and R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-723.
- Liu, X., J. Yu, L. Jiang, A. Wang, F. Shi, H. Ye and X. Zhou (2009). "MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines." *Cancer Genomics Proteomics* **6**(3): 131-139.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Llave, C., K. D. Kasschau, M. A. Rector and J. C. Carrington (2002). "Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants." *Plant Cell* **14**(7): 1605-1619.
- Lopez-Camarillo, C., L. A. Marchat, E. Arechaga-Ocampo, C. Perez-Plasencia, O. Del Moral-Hernandez, E. J. Castaneda-Ortiz and S. Rodriguez-Cuevas (2012). "MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis." *Int J Mol Sci* **13**(2): 1347-1379.
- Luksic, I., M. Virag, S. Manojlovic and D. Macan (2012). "Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia." *J Craniomaxillofac Surg* **40**(3): e75-81.
- Luukkaa, H., J. Laitakari, T. Vahlberg, P. Klemi, F. Stenback and R. Grenman (2009).

"Morphometric analysis of CD34-positive vessels in salivary gland adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas." *J Oral Pathol Med* **38**(9): 695-700.

Ma, Y. and S. E. Ullrich (2013). "Intratumoral mast cells promote the growth of pancreatic cancer." *Oncoimmunology* **2**(10): e25964.

Maeda, K., Y. S. Chung, S. Takatsuka, Y. Ogawa, T. Sawada, Y. Yamashita, N. Onoda, Y. Kato, A. Nitta, Y. Arimoto and et al. (1995). "Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma." *J Clin Oncol* **13**(2): 477-481.

Maltby, S., K. Khazaie and K. M. McNagny (2009). "Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation." *Biochim Biophys Acta* **1796**(1): 19-26.

Martin de Civetta, M. T. and J. D. Civetta (2011). "[Carcinogenesis]." *Salud Publica Mex* **53**(5): 405-414.

Mayoral, R. J., L. Deho, N. Rusca, N. Bartonicek, H. K. Saini, A. J. Enright and S. Monticelli (2011). "MiR-221 influences effector functions and actin cytoskeleton in mast cells." *PLoS One* **6**(10): e26133.

Mayoral, R. J., M. E. Pipkin, M. Pachkov, E. van Nimwegen, A. Rao and S. Monticelli (2009). "MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells." *J Immunol* **182**(1): 433-445.

Matse JH, Yoshizawa J, Wang X, Elashoff D, Bolscher JG, Veerman EC, Bloemena E, Wong DT. (2011) Discovery and prevalidation of salivary extracellular microRNA biomarkers panel for the noninvasive detection of benign and malignant parotid gland tumors. *Clin Cancer Res.* 1;19(11):3032-8.

Meng, W., J. P. McElroy, S. Volinia, J. Palatini, S. Warner, L. W. Ayers, K. Palanichamy, A. Chakravarti and T. Lautenschlaeger (2013). "Comparison of microRNA deep sequencing of matched formalin-fixed paraffin-embedded and fresh frozen cancer tissues." *PLoS One* **8**(5): e64393.

Mendenhall, w. M.; mendenhall, c. M.; werning, j. W.; malyapa, r. S.; mendenhall, n. P. Salivary Gland Pleomorphic Adenoma. *Am J Clin Oncol*, Gainesville, v. 31, n. 1, p. 95-99, Feb. 2008.

Metcalfe, D. D., D. Baram and Y. A. Mekori (1997). "Mast cells." *Physiol Rev* **77**(4): 1033-1079.

Michailidou, E. Z., A. K. Markopoulos and D. Z. Antoniadis (2008). "Mast cells and angiogenesis in oral malignant and premalignant lesions." *Open Dent J* **2**: 126-132.

- Minor, J., X. Wang, F. Zhang, J. Song, A. Jimeno, X. J. Wang, X. Lu, N. Gross, M. Kulesz-Martin, D. Wang and S. L. Lu (2012). "Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas." *Oral Oncol* **48**(1): 73-78.
- Montagner, S., E. M. Orlandi, S. Merante and S. Monticelli (2013). "The role of miRNAs in mast cells and other innate immune cells." *Immunol Rev* **253**(1): 12-24.
- Nguyen, M., M. C. Lee, J. L. Wang, J. S. Tomlinson, Z. M. Shao, M. L. Alpaugh and S. H. Barsky (2000). "The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype." *Oncogene* **19**(31): 3449-3459.
- Ninomiya m; kondo y; funayama r; nagashima t; kogure t; t shimosegawa. Distinct MicroRNAs Expression Profile in Primary Biliary Cirrhosis and Evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as Novel Biomarkers. *PLoS ONE* v. 8, n. 6, 2013.
- Norrby, K. (2002). "Mast cells and angiogenesis." *APMIS* **110**(5): 355-371.
- Ochicha, O., S. Malami, A. Mohammed and A. Atanda (2009). "A histopathologic study of salivary gland tumors in Kano, northern Nigeria." *Indian J Pathol Microbiol* **52**(4): 473-476.
- O'Connell, R. M., D. S. Rao, A. A. Chaudhuri and D. Baltimore (2010). "Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system." *Nat Rev Immunol* **10**(2): 111-122.
- Olive, V., I. Jiang and L. He (2010). "mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(8): 1348-1354.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." *Dev Biol* **216**(2): 671-680.
- Papadogeorgakis, N., E. Parara, V. Petsinis, E. Pappa, A. Nikolaidis and K. Alexandridis (2011). "A retrospective review of malignant minor salivary gland tumors and a proposed protocol for future care." *Craniofac Trauma Reconstr* **4**(1): 1-10.
- Parker, J. S., S. M. Roe and D. Barford (2004). "Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity." *EMBO J* **23**(24): 4727-4737.
- Paroo, Z. and A. Pertsemlidis (2009). "microRNAs mature with help from cancer biology." *Genome Biol* **10**(7): 310.
- Patnaik, S. K., E. Kannisto and S. Yendamuri (2012). "Factors affecting the yield of microRNAs from laser microdissectates of formalin-fixed tissue sections." *BMC Res Notes* **5**: 40.
- Pauley KM, Stewart CM, Gauna AE, Dupre LC, Kuklani R, Chan AL, Pauley BA, Reeves

- WH, Chan EK, Cha S. (2011). Altered miR-146a expression in Sjögren's syndrome and its functional role in innate immunity. *Eur J Immunol.* 41(7):2029-3.
- Peiro-Chova, L., M. Pena-Chilet, J. A. Lopez-Guerrero, J. L. Garcia-Gimenez, E. Alonso-Yuste, O. Burgues, A. Lluch, J. Ferrer-Lozano and G. Ribas (2013). "High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality." *Virchows Arch* **463**(6): 765-774.
- Penland, S. K., T. O. Keku, C. Torrice, X. He, J. Krishnamurthy, K. A. Hoadley, J. T. Woosley, N. E. Thomas, C. M. Perou, R. S. Sandler and N. E. Sharpless (2007). "RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors." *Lab Invest* **87**(4): 383-391.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier and P. A. Sharp (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* **21**(4): 533-542.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya and W. Filipowicz (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" *Trends Cell Biol* **17**(3): 118-126.
- Paleri, v.; robinson, m.; bradley, p. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, Newcastle*, v. 16, p. 163-169, 2008.
- Pyziak, L., O. Stasikowska-Kanicka, M. Danilewicz and M. Wagrowska-Danilewicz (2013). "Immunohistochemical analysis of mast cell infiltrates and microvessel density in oral squamous cell carcinoma." *Pol J Pathol* **64**(4): 276-280.
- Rapidis, a. D.; givalos, n.; gakiopoulou, h.; stavrianos, s. D.; faratzis, g.; lagogiannis, g. A.; katsilieris, i.; patsouris, e. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncology, Athens*, v. 43, n. 2, p. 130-136, 2006.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*". *Nature.* 24;403(6772):901-6.
- Ribatti, D. and E. Crivellato (2012). "Mast cells, angiogenesis, and tumour growth." *Biochim Biophys Acta* **1822**(1): 2-8.
- Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, E. Crivellato, L. Roncali and F. Dammacco (2001). "The role of mast cells in tumour angiogenesis." *Br J Haematol* **115**(3): 514-521.
- Ribatti, D., A. Vacca, G. De Falco, A. Roccaro, L. Roncali and F. Dammacco (2001). "Angiogenesis, angiogenic factor expression and hematological malignancies." *Anticancer Res* **21**(6b): 4333-4339.
- Ribeiro-Silva, A. and S. B. Garcia (2008). "Comparative study of three different procedures

for RNA extraction from formalin-fixedparaffin-embedded samples." *J Bras Patol Med Lab* **44**(2): 123 - 130.

Rojas, I. G., M. L. Spencer, A. Martinez, M. A. Maurelia and M. I. Rudolph (2005). "Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer." *J Oral Pathol Med* **34**(5): 268-273.

Ruby, J. G., C. H. Jan and D. P. Bartel (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." *Nature* **448**(7149): 83-86.

Saigusa, S., K. Tanaka, M. Ohi, Y. Ishino, H. Yasuda, Y. Okugawa, Y. Toiyama, Y. Inoue, K. Uchida, Y. Mohri and M. Kusunoki (2013). "Clinical significance of peritumoral mast cells in esophageal squamous cell carcinoma with neoadjuvant chemoradiotherapy." *Esophagus* **10**(1): 12-19.

Saito, Y. and P. A. Jones (2006). "Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells." *Cell Cycle* **5**(19): 2220-2222.

Shi, L., X. M. Chen, L. Wang, L. Zhang and Z. Chen (2007). "Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome." *Cancer* **109**(8): 1523-1531.

Shruti, K., K. Shrey and R. Vibha (2011). "Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential." *Biochem Biophys Res Commun* **407**(3): 445-449.

Skalova, A., I. Leivo, M. Michal and E. Saksela (1992). "Analysis of collagen isotypes in crystalloid structures of salivary gland tumors." *Hum Pathol* **23**(7): 748-754.

Soares, A. B., P. B. Juliano, V. C. Araujo, K. Metze and A. Altemani (2007). "Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma." *Virchows Arch* **451**(1): 65-71.

Souza, Kelen Christine do Nascimento. *Avaliação do Potencial Metastático e da vascularização nas Neoplasias Epiteliais de glândulas salivares* / Kelen Christine do Nascimento Souza. 2007.

Srivastava, A., P. Laidler, R. P. Davies, K. Horgan and L. E. Hughes (1988). "The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study." *Am J Pathol* **133**(2): 419-423.

SScapoli, L., A. Palmieri, L. Lo Muzio, F. Pezzetti, C. Rubini, A. Girardi, F. Farinella, M. Mazzotta and F. Carinci (2010). "MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression." *Int J Immunopathol Pharmacol* **23**(4): 1229-1234.

Sun, C. Y., X. M. She, Y. Qin, Z. B. Chu, L. Chen, L. S. Ai, L. Zhang and Y. Hu (2013). "miR-

15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF." *Carcinogenesis* **34**(2): 426-435.

Sun, T., M. Yang, P. Kantoff and G. S. Lee (2009). "Role of microRNA-221/-222 in cancer development and progression." *Cell Cycle* **8**(15): 2315-2316.

Suzuki, H., A. Ueno, M. Takei, K. Shindo, T. Higa and H. Fukamachi (2000). "The effects of S1319, a novel marine sponge-derived beta2-adrenoceptor agonist, on IgE-mediated activation of human cultured mast cells." *Inflamm Res* **49**(2): 86-94.

Tandon M, Gallo A, Jang SI, Illei GG, Alevizos I. (2011) Deep sequencing of short RNAs reveals novel microRNAs in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Dis.* **18**(2):127-31.

Theoharides, T. C., J. M. Donelan, N. Papadopoulou, J. Cao, D. Kempuraj and P. Conti (2004). "Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides." *Trends Pharmacol Sci* **25**(11): 563-568.

Triantafillidou, k.; dimitrakopoulos, j.; iordanidis, f.; koufogiannis, d. Management of Adenoid Cystic Carcinoma of Minor Salivary Glands. *J Oral Maxillofac Surg*, Thessaloniki, v. 64, p. 1114-1120, 2006.

Tomiyama, A.H. Micro RNA em adenoma de próstata: caracterização da expressão em tumores de baixo grau, orgaos confinados/ Alberto Hiroyuki Tomiyama, São Paulo, 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

Toth-Jakatics, R., S. Jimi, S. Takebayashi and N. Kawamoto (2000). "Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor." *Hum Pathol* **31**(8): 955-960.

Trevisa, F. T. B. S. Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Flavio Trevisan Barbosa Sandoval.

Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, G. J. Hannon and R. Parker (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." *Genes Dev* **20**(5): 515-524.

Vermeulen, P. B., G. Gasparini, S. B. Fox, C. Colpaert, L. P. Marson, M. Gion, J. A. Belien, R. M. de Waal, E. Van Marck, E. Magnani, N. Weidner, A. L. Harris and L. Y. Dirix (2002). "Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours." *Eur J Cancer* **38**(12): 1564-1579.

Vicente, o. P.; marqués, n. A.; aytés, I. B.; escoda c. G. Minor salivary gland tumors: A clinicopathological study of 18 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, Barcelona, v. 13, n. 9, p. 582-8, Sep. 2008

- Vidal, M. T., I. B. de Oliveira Araujo, C. A. Gurgel, A. Pereira Fde, D. S. Vilas-Boas, E. A. Ramos, I. M. Agra, A. C. Barros, V. S. Freitas and J. N. Dos Santos (2013). "Density of mast cells and microvessels in minor salivary gland tumors." *Tumour Biol* **34**(1): 309-316.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "The structure of DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**: 123-131.
- Weidner, N. (1995). "Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors." *Breast Cancer Res Treat* **36**(2): 169-180.
- Wen, K. C., P. L. Sung, M. S. Yen, C. M. Chuang, W. S. Liou and P. H. Wang (2013). "MicroRNAs regulate several functions of normal tissues and malignancies." *Taiwan J Obstet Gynecol* **52**(4): 465-469.
- Westholm, J. O. and E. C. Lai (2011). "Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing." *Biochimie* **93**(11): 1897-1904.
- Wong, T. S., X. B. Liu, B. Y. Wong, R. W. Ng, A. P. Yuen and W. I. Wei (2008). "Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue." *Clin Cancer Res* **14**(9): 2588-2592.
- Xi, Y., G. Nakajima, E. Gavin, C. G. Morris, K. Kudo, K. Hayashi and J. Ju (2007). "Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples." *RNA* **13**(10): 1668-1674.
- Xiang, M., Y. Gu, F. Zhao, H. Lu, S. Chen and L. Yin (2010). "Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion." *Oncol Rep* **23**(3): 615-619.
- Yih, w. Y.; kratochvil, f. J.; stewart, j. C. B. Intraoral Minor Salivary Gland Neoplasms: Review of 213 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, Portland, v. 63, p. 805-810, 2005.
- Yuva-Aydemir, Y., A. Simkin, E. Gascon and F. B. Gao (2011). "MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA." *RNA Biol* **8**(4): 557-564.
- Zen, K. and C. Y. Zhang (2012). "Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers." *Med Res Rev* **32**(2): 326-348.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb and T. A. Anderson (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." *Dev Biol* **302**(1): 1-12.
- Zhang, C. Z., J. X. Zhang, A. L. Zhang, Z. D. Shi, L. Han, Z. F. Jia, W. D. Yang, G. X. Wang, T. Jiang, Y. P. You, P. Y. Pu, J. Q. Cheng and C. S. Kang (2010). "MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma." *Mol Cancer* **9**: 229.

Zhang, W., J. E. Dahlberg and W. Tam (2007). "MicroRNAs in tumorigenesis: a primer." *Am J Pathol* **171**(3): 728-738.

Zhang, X., Y. Wang, G. Yamamoto and T. Tachikawa (2009). "Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas." *Histopathology* **55**(3): 250-260.