

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PATRICIA DE CASSIA DE MORAIS PEREIRA SANCHES

PROSPECÇÃO DE miRNAs REGULADORES DE
MOLÉCULAS DE *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS EM
CÉLULAS LINFOIDES INFECTADAS PELO EBV

Botucatu, SP

2026

PATRICIA DE CASSIA DE MORAIS PEREIRA SANCHES

**PROSPECÇÃO DE miRNAs REGULADORES DE
MOLÉCULAS DE *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS
EM CÉLULAS LINFOIDES INFECTADAS PELO EBV**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada. Trabalho desenvolvido junto ao grupo *ViriCan*, no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP Botucatu, SP.

Área de concentração: Biologia de Micro-organismos e Imunidade

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Botucatu, SP

2026

S211p

Sanches, Patricia de Cassia de Moraes Pereira

Prospecção de miRNAs reguladores de moléculas de checkpoints imunológicos em células linfoides infectadas pelo EBV / Patricia de Cassia de Moraes Pereira Sanches. -- Botucatu, 2026

78 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

1. Checkpoints imunológicos. 2. miRNAs. 3. Linfomas. 4. EBV. 5. Imunobiologia. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

A presente pesquisa investiga a regulação de *checkpoints* imunológicos por miRNAs endógenos em linfomas associados ao EBV por meio da análise computacional de bancos de dados públicos. A abordagem empregada otimiza o ciclo de descoberta científica, permitindo a identificação e priorização racional de alvos moleculares de forma custo-efetiva em contextos de recursos limitados. Além disso, os achados desse estudo podem subsidiar a identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos, contribuindo com o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais precisas, favorecendo futuramente a melhoria do cuidado e da qualidade de vida de indivíduos acometidos por esses cânceres.

Potential impact of this research

This research investigates the regulation of immune checkpoint molecules by endogenous miRNAs in EBV-associated lymphomas through the computational analysis of public databases. The proposed approach optimizes the scientific discovery process by enabling the identification and rational prioritization of molecular targets in a cost-effective manner, particularly in resource-limited settings. Furthermore, the findings may support the identification of biomarkers and therapeutic targets, contributing to the development of more precise diagnostic and therapeutic strategies promoting improvements care and quality of life for individuals affected by these cancers.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Prospecção de miRNAs reguladores de moléculas de checkpoints imunológicos em células linfóides infectadas pelo EBV

AUTORA: PATRICIA DE CASSIA DE MORAIS PEREIRA SANCHES

ORIENTADOR: DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB

Profa. Dra. GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Research Associate BÁRBARA GRASIELE MÜLLER COAN (Participação Virtual)
CREO - Centro di Ricerca Emato-Oncologico / Università Degli Studi di Perugia

Botucatu, 04 de maio de 2026.



Renan Codeco da Silva

Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/> - CNPJ: 48031918002259.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me permitiu, me sustentou e me deu sabedoria para chegar até aqui.

Ao meu esposo Samuel, por compartilhar a vida comigo e sempre me apoiar, por acreditar nos meus sonhos. Obrigada por ser meu porto seguro e caminhar ao meu lado em cada alegria e cada lágrima desta “aventura” chamada mestrado.

À minha mãe por ser o meu motivo diário.

Aos pais do meu esposo, Gercira e Adilson, obrigada por serem minha segunda família e por todo incentivo e acolhimento.

Às minhas amigas Patrícia e Caroline, que escutam desde os tempos de faculdade o quanto eu queria fazer o mestrado. Obrigada por sempre me ouvirem, me apoiarem, por torcerem por mim e por estarem ao meu lado em cada tropeço e em cada vitória nestes últimos anos.

Às amigas que o Lutz me deu, Vanessa e Gabriele, ingressar no mestrado ao lado de vocês, mesmo que “longe” transformou um desafio solitário em uma jornada mais leve.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, por ter aceitado me orientar, pela paciência e ensinamentos compartilhados nesses dois anos.

Aos meus colegas do grupo ViriCan: Aline, Anderson, Beatriz, Diego, Maiara e Silvia. Por muito tempo, a minha jornada no grupo foi solitária, mas a chegada de vocês transformou isso. Obrigada por preencherem o laboratório não apenas com experimentos de bancada, mas com conversas, apoio, risadas, café e momentos de leveza que tornaram os dias muito mais felizes. Ter tido colegas como vocês fez toda a diferença.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), pela oportunidade de formação e pelo espaço democrático de produção de conhecimento.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), sede do meu programa de pós-graduação, pela excelência no ensino e por todo o suporte administrativo e acadêmico.

Ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC), por disponibilizar a infraestrutura laboratorial e o suporte técnico, essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Estender meus agradecimentos a todos os docentes e funcionários do instituto.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha trajetória. Expresso minha gratidão a cada pessoa que cruzou o meu caminho e me estendeu a mão, seja por meio de um suporte técnico, de uma escuta atenta ou de uma palavra de incentivo nos momentos de incerteza. Meu agradecimento especial àqueles que decidiram acreditar no meu potencial, muitas vezes antes mesmo de eu fazê-lo. Aos que me ouviram nos dias difíceis e aos que, com pequenos gestos, me apoiaram quando a jornada parecia pesada demais, o meu muito obrigada. O mestrado é uma conquista acadêmica, mas foi sustentado, sobretudo, pela minha persistência e por aqueles que, ao longo desse percurso, escolheram me impulsionar. Por muitas vezes, o caminho foi árduo e a felicidade pareceu distante, mas o desejo profundo de concluir esta etapa me fez continuar. Aprendi muito!!

"Enquanto houver a possibilidade de um resultado favorável, não pensemos em fraquejar, mas em resistir"— Arthur Schopenhauer

Resumo

Linfomas humanos são cânceres classificados em dois grupos fundamentais: linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin. Em ambos os grupos, uma parcela dos casos de linfomas está associada à infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) e/ou o herpesvírus do sarcoma de Kaposi (KSHV). Esses herpesvírus gama humanos manipulam o sistema imunitário, o que pode se dar por regulação de *checkpoints* imunológicos (ICs). Assim como em outros cânceres, o desenvolvimento dos linfomas inclui a participação de microRNAs (miRNAs) como reguladores de diversos aspectos de sua patogênese, incluindo sua imunobiologia. Entretanto, o papel dessas pequenas moléculas na regulação de ICs ainda é pouco explorado, especialmente no contexto dos linfomas associados ao EBV. Assim, este estudo teve como objetivo prospectar miRNAs candidatos a apresentar alto potencial de regulação de ICs em modelos de linfomas associados à infecção pelo EBV, empregando análise exploratória de *datasets* públicos de expressão gênica. Como principal fonte de dados foi utilizado o *dataset* NCBI GEO #GSE147228, que contém dados de transcriptoma de células da linhagem Akata de linfoma de Burkitt. Os dados brutos de expressão em nível transcricional foram extraídos do *dataset*, tratados e processados para avaliação dos miRNAs mais abundantes. Subsequentemente foi realizada análise de componentes principais (PCA), predição de interações dos miRNAs com moléculas de ICs e análise de literatura para levantamento de evidências sobre as propriedades biológicas dos principais miRNAs identificados, a saber: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p e hsa-miR-142-5p. A partir desses dados foi realizada combinação dos resultados da PCA com informações sobre o potencial regulatório dos miRNAs, o que resultou na identificação do hsa-miR-92a-3p como alvo particularmente promissor na regulação de ICs. Esse resultado foi reforçado com as informações obtidas a partir de dados experimentais de literatura sobre as atividades biológicas dos 6 miRNAs identificados como mais abundantes, o que fortaleceu a hipótese do hsa-miR-92a-3p apresentar papel relevante para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas pela regulação de ICs. Em síntese, os resultados deste trabalho indicam o hsa-miR-92a-3p como o alvo de maior relevância e potencial regulatório na modulação de ICs em modelo de linfoma associado ao EBV. Como desdobramentos, este estudo fornece uma base para a validação *in vitro* da interação entre o hsa-miR-92a-3p e seus genes-alvo. Etapas experimentais subsequentes, são essenciais para confirmar o papel deste miRNA na modulação da evasão imune e consolidar sua importância na imunobiologia dos linfomas associados ao EBV.

Abstract

Human lymphomas are cancers essentially classified into two groups: Hodgkin lymphomas and non-Hodgkin lymphomas. A proportion of cases in both groups is associated with infection by Epstein–Barr virus (EBV) and/or Kaposi’s sarcoma–associated herpesvirus (KSHV). These human gammaherpesviruses modulate the immune system, partly through the regulation of immune checkpoints (ICs). As in other cancers, the development of lymphomas involves the participation of microRNAs (miRNAs) as regulators of multiple aspects of their pathogenesis, including their immunobiology. However, the role of these small non-coding molecules in the regulation of ICs remains underexplored, particularly in the context of EBV-associated lymphomas. Therefore, this study aimed to identify candidate miRNAs with high potential to regulate ICs in models of lymphomas associated with EBV infection, using exploratory analysis of public gene expression datasets. The main data source was the NCBI GEO dataset #GSE147228, which contains transcriptomic data from the Akata Burkitt lymphoma cell line. Raw transcription-level expression data were extracted, processed, and analyzed to identify the most abundant miRNAs. Subsequently, principal component analysis (PCA), miRNA–IC interaction prediction, and literature review were performed to gather evidence on the biological properties of the main miRNAs identified, namely: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p, and hsa-miR-142-5p. The integration of PCA findings with information on the regulatory potential of these miRNAs led to the identification of hsa-miR-92a-3p as a particularly promising candidate in IC regulation. This result was further supported by experimental evidence from the literature on the biological activities of the six highly abundant miRNAs, strengthening the hypothesis that hsa-miR-92a-3p plays a relevant role in the development of hematological malignancies through the regulation of ICs. In summary, the results of this work indicate hsa-miR-92a-3p as the most relevant target and with the greatest regulatory potential in the modulation of ICs in an EBV-associated lymphoma model. These results provides a basis for the in vitro validation of the interaction between hsa-miR-92a-3p and its target genes. Subsequent experimental steps are essential to confirm the role of this miRNA in modulating immune evasion and to consolidate its importance in the immunobiology of EBV-associated lymphomas.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURA 1- Síntese do delineamento geral do estudo.....	33
FIGURA 2- Análise de Componentes Principais (PCA) de 2.400 miRNAs a partir de dados do <i>dataset</i> GSE147228. Resultado baseado em contagens normalizadas (CPM) e log-transformadas. Observa-se que o primeiro componente (PC1) segrega um pequeno grupo de miRNAs (círculo em azul). A cor dos pontos remete à qualidade da representação na PCA ($\cos^2$). Em ordem decrescente de PC1, os seis miRNAs são: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p e hsa-miR-142-5p. Análise e visualização geradas com R+RStudio.....	39
FIGURA 3- Análise da abundância de miRNAs expressos em células Akata EBV-positivas com base no <i>dataset</i> GSE147228. Representação dos 20 miRNAs mais abundantes identificados, com base em suas contagens normalizadas (CPM) para cada uma das replicatas biológicas (S1, S2 e S3) e valor médio (marcação com “x”, em vermelho) e desvio padrão. Análise e visualização geradas com R+RStudio.....	40
FIGURA 4- Estimativa do potencial regulatório dos 6 miRNAs identificados como mais abundantes em células Akata EBV-positivas (dados do <i>dataset</i> GSE147228) em relação a genes selecionados que codificam moléculas com papel em <i>checkpoints</i> imunitários (ICs). A intensidade da cor vermelha na intersecção de cada miRNA (eixo das ordenadas) com uma molécula de IC (eixo das abcissas) correspondem ao valor do score integrado (IS) obtido na plataforma mirDip. Os miRNAs estão listados em ordem decrescente de acordo com seu <i>Score</i> Ponderado de Regulação (SPR), calculado com base nos resultados de abundância do miRNA no modelo experimental indicado (análise PCA) e a força de predição em relação a genes participantes de ICs (IS do mirDip). Análise e visualização geradas com R+RStudio.....	41
FIGURA 5- Processo de revisão sistematizada da literatura para contextualizar a relevância biológica dos 6 miRNAs identificados como mais abundantes em células Akata EBV-positivas, conforme dados do <i>dataset</i> GSE147228. A seleção dos estudos foi efetuada pela filtragem dos estudos de acordo com os critérios definidos para as categorias de relevância C1- Estudos com evidência direta de regulação de ICs; C2- Estudos com evidência funcional/mecanicista do miRNA com fenômenos relevantes na biologia dos cânceres; C3- Estudos com evidência funcional/mecanicista de envolvimento de lncRNAs/circRNAs; e C4- Estudos com informações correlacionais/descritivas. Os estudos que se enquadravam em múltiplas categorias foram classificados na categoria de maior prioridade; por exemplo, trabalhos focados	

em lncRNA (C3) com dados de interação com moléculas de ICs (C1) foram classificados na categoria C1, de maior nível de relevância frente aos objetivos deste trabalho..... 42

FIGURA B1- Eletroforese de produto de PCR convencional para validação de iniciadores para amplificação de cDNA proveniente de transcritos de moléculas selecionadas de *checkpoints* imunitários. Foram utilizados pools de cDNA das seguintes linhagens celulares: a) BC1 para os alvos 18S (169 pb), RPS13 (87 pb), HSPCB 90 (80 pb) e CTLA4 (93 pb); b) RAEL para BTLA (97 pb); c) NP69 para PDL1 (114 pb); d) THP1 para os alvos PDL2 (190 pb), VISTA (90 pb) e TIM3 (189 pb); e) MCF7 para B7H4 (100 pb) e B7H3(164 pb). Produtos de PCR avaliados em gel de agarose 2% corado com corante intercalante Brilliant Green. PM: Marcador de peso molecular (50pb)..... 73

FIGURA B2- Curvas de amplificação, dissociação e curvas padrão dos iniciadores para os alvos B7H3, B7H4 e VISTA por qPCR para análise de eficiência. Em cada painel observam-se: (A1, B1, C1) Curvas de amplificação por fluorescência; (A2, B2, C2) Curvas de dissociação (Melting Curves) e (A3, B3, C3) Curvas padrão calculadas a partir de diluições seriadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas técnicas e as linhagens utilizadas para os alvos foram MCF7 (1:5) para B7H3 e B7H4; THP1 (1:10) para VISTA..... 76

QUADRO 1- Classificação de prioridade de análise dos *datasets* identificados conforme critérios de seleção..... 34

QUADRO 2- Estudos que investigam a relação entre os miRNAs selecionados e moléculas de *checkpoint* imunológico (ICs) identificados após sistematização de evidências da literatura. 44

QUADRO A1- Características metodológicas, plataformas de análise e impacto das publicações científicas associadas aos *datasets* obtidos no repositório GEO..... 67

QUADRO B1- Painel de alvos moleculares proposto por BIGGI, 2021 para análise da expressão de moléculas com papel em *checkpoints* imunológicos potencialmente relevantes para a linfomagenese..... 71

TABELA A1- Extrato dos dados utilizados no gráfico de dispersão dos 20 miRNAs endógenos mais abundantes em linhagem Akata a partir de dados do <i>dataset</i> GSE147228.....	62
TABELA A2- Coordenadas da PCA para os 20 miRNAs mais abundantes do <i>dataset</i> GSE147228.....	63
TABELA A3- Ranqueamento dos 6 miRNAs mais abundantes em células Akata a partir de dados do <i>dataset</i> GSE147228 de acordo com o <i>Score</i> Ponderado de Regulação (SPR).....	63
TABELA A4- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-92a-3p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	64
TABELA A5- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-127-3p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	64
TABELA A6- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-181a-5p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	65
TABELA A7- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-1247-3p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	65
TABELA A8- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-16-5p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	65
TABELA A9- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-142-5p com genes relacionados a <i>checkpoints</i> imunológicos.....	66
TABELA B1- Parâmetros de linearidade e eficiência de amplificação por RT-qPCR para os alvos B7H3, B7H4 e VISTA.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definição por extenso ¹	Em inglês
ALL	Leucemia Linfoblástica Aguda	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
AML	Leucemia Mielóide Aguda	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
BL	Linfoma de Burkitt	<i>Burkitt Lymphoma</i>
BTLA	Atenuador de linfócitos B e T	<i>B and T Lymphocyte Attenuator</i>
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer	<i>Cancer-Associated Fibroblasts</i>
CircRNA	RNA Circular	<i>Circular RNA</i>
CD28	Glicoproteína de Superfície Específica de Célula T	<i>T-Cell-Specific Surface Glycoprotein</i>
CD27	Membro 7 da Superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 7</i>
CD40	Membro 5 da Superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 5</i>
CD80	Molécula Coestimuladora B7-1	<i>Costimulatory Molecule, B7-1</i>
CD85	Receptor B1 de Leucócitos Semelhante à Imunoglobulina	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor B1</i>
CD226	Antígeno 1 de Ativação de Linhagem T-Específica	<i>T Lineage-Specific Activation Antigen 1</i>
CD274	Ligante 1 de Morte Celular Programada 1-PDL-1	<i>Programmed Cell Death-Ligand 1-PDL-1</i>
CD276	Homologo 3 de B7 (B7H3)	<i>B7 Homolog 3 (B7H3)</i>
CLL	Leucemia Linfocítica Crônica	<i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
CML	Leucemia Mielóide Crônica	<i>Chronic Myeloid Leukemia</i>
CPM	Contagem por milhão	<i>Counts Per Million</i>
CTLA4	Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4-Immunoglobulin</i>
DLBCL	Linfoma Difuso de Grandes Células B	<i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i>
EBV	Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr Virus</i>
ENKTL	Linfoma Extranodal de Células T/NK	<i>Extranodal T/NK Cell Lymphoma</i>
FBS	Soro Bovino Fetal	<i>Fetal Bovine Serum</i>

¹ Descritor em Português conforme Descritores em Ciência da Saúde (DECS - <https://decs.bvsalud.org/>), quando disponível.

Abreviatura	Definição por extenso¹	Em inglês
GEO	Repositório de Expressão Gênica	<i>Gene Expression Omnibus</i>
HAVCR2	Proteína 3 contendo imunoglobulina de células T e domínio de mucina-TIM3	<i>T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain Containing Protein 3-TIM3</i>
HHV-4	<i>Herpesvírus Humano 4</i>	<i>Human Gammaherpesvirus 4</i>
HHV-8	<i>Herpesvírus Humano 8</i>	<i>Human Gammaherpesvirus 8</i>
HL	Linfoma de Hodgkin	<i>Hodgkin Lymphoma</i>
ICOS	Proteína Coestimuladora de Linfócitos T induzíveis	<i>Inducible T-Cell Co-Stimulator Protein</i>
ICs	<i>Checkpoints</i> Imunológicos	<i>Immune checkpoints</i>
KICS	Síndrome Inflamatória de Citocinas Associada ao KSHV	<i>KSHV-Associated Cytokine Inflammatory Syndrome</i>
KSHV	<i>Herpesvírus do Sarcoma de Kaposi</i>	<i>Kaposi's Sarcoma Herpesvirus</i>
LAG3	Proteína do Gene 3 de Ativação de Linfócitos	<i>Lymphocyte Activation Gene 3 Protein</i>
LANA	Antígeno Nuclear Associado à Latência	<i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i>
LAIR1	Receptor 1 semelhante à imunoglobulina associada a leucócitos	<i>Leukocyte Associated Immunoglobulin Like Receptor 1</i>
lncRNA	RNA Longo Não Codificante	<i>Long Non-Coding RNA</i>
MDSCs	Células Mielóides Supressoras	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MEC	Matriz Extracelular	<i>Extracellular Matrix</i>
miRNA	MicroRNA	<i>MicroRNA</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNAs	RNAs Não Codificantes	<i>Non-Coding RNAs</i>
NHL	Linfomas Não Hodgkin	<i>Non-Hodgkin Lymphomas</i>
PCA	Análise de Componentes Principais	<i>Principal Component Analysis</i>
PDCD1	Proteína 1 da Morte Celular Programada	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PDCD1LG2	Ligante 2 da Morte Celular Programada 1-PDL-2	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand 2-PDL-2</i>

Abreviatura	Definição por extenso¹	Em inglês
PEL	Linfoma de Efusão Primária	<i>Primary Effusion Lymphoma</i>
RISC	Complexo de Inativação Induzido por RNA	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA-seq	Sequenciamento de RNA de Alto Rendimento	<i>High Throughput RNA Sequencing</i>
SIGLEC10	Lectina 10 Semelhante à Ig de Ligação de Ácido Siálico	<i>Sialic Acid Binding Ig-like Lectin 10</i>
SPR	Score Ponderado de Regulação	<i>Weighted Regulation Score</i>
SIRPA	Proteína Tirosina Fosfatase, Substrato do Tipo Não Receptor 1	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type Substrate 1</i>
TAMs	Macrófagos Associados a Tumor	<i>Tumor-Associated Macrophages</i>
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumor	<i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
TIGIT	Receptor Imunológico de Células T com Domínios Ig e ITIM	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TKIs	Inibidores de Tirosina Quinase	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
TNFRSF9	Membro 9 da Superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 9</i>
TNFRSF4	Membro 4 da Superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4</i>
TME	Microambiente Tumoral	<i>Tumor Microenvironment</i>
vGPCR	Proteína G Viral Acoplada a Receptor	<i>Viral G Protein-Coupled Receptor</i>
vIRFs	Fatores Reguladores de Interferon Virais	<i>Viral Interferon Regulatory Factors</i>
VSIR	Receptor Imunorregulador do Tipo V-VISTA	<i>V-set Immunoregulatory Receptor-VISTA</i>
VTCN1	Inibidor 1 da ativação de células T contendo domínio V-set-B7H4	<i>V-set domain containing T cell activation inhibitor 1-B7H4</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde	<i>World Health Organization</i>

Prospecção de miRNAs reguladores de moléculas de *checkpoints* imunológicos em células linfoides infectadas pelo EBV

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Linfomas	19
1.2 Modulação de resposta imunológica	20
1.3 Infecção por vírus oncogênicos e linfomagênese	24
1.4 Imunomodulação em linfomas associados à infecção viral.....	26
1.5 microRNAs: Papel no câncer, na regulação imune e implicações em linfomas virais	27
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 Material e Métodos.....	32
3.1 Preâmbulo	32
3.2 Seleção de conjunto públicos de dados	34
3.3 Normalização, análise exploratória e visualização dos dados	35
3.4 Predição de Alvos	36
3.5 Revisão sistematizada da literatura.....	37
4 Resultados.....	39
4.1 Perfil de expressão e abundância de miRNAs em células Akata	39
4.2 Predição de interações entre os miRNAs e genes de moléculas de ICs	40
4.3 Prospecção de evidências biológicas por revisão sistematizada da literatura	41
5 Discussão.....	46
6 Considerações finais	50
Referências Bibliográficas	51
Apêndices.....	61
Parte A - Material Suplementar	62
Parte B - Relatório Experimental.....	70
Análise de funcionalidade dos iniciadores por PCR convencional	72
Linhagens celulares e condições de cultivo.....	73
Isolamento de RNA total e síntese de cDNA	74
Ensaio de qPCR e curvas de eficiência de amplificação	75

1. Introdução

1.1 Linfomas

O termo “linfoma” é aplicado para se referir a neoplasias malignas originadas de células linfoides transformadas. Sua apresentação clínica mais habitual é na forma de tumores em tecidos linfoides (linfonodos, principalmente), frequentemente manifestos como linfadenopatias. As células neoplásicas dos linfomas tendem a exibir imunofenótipo equivalente aos de células B, T ou *natural killer* (NK), o que possibilita classificar essas doenças e inferir a situação preponderante no câncer em termos de diferenciação celular.^[1,2]

Segundo dados do programa GLOBOCAN da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO, Genebra, Suíça), cerca de 635.858 novos casos de linfomas e 273.412 óbitos por essas doenças em todo o mundo em 2022.^[3] Em geral, a incidência dos linfomas é maior em regiões economicamente desenvolvidas e em indivíduos de elevada condição socioeconômica. Embora os linfomas não estejam dentre os principais cânceres que ocorrem em humanos, esse grupo de neoplasias malignas se destaca pela elevada heterogeneidade clínica e patológica. Adicionalmente, os linfomas apresentam etiopatogenia complexa, que compreende fatores genéticos, imunológicos, exposições ambientais diversas (e.g., radiação UV, produtos químicos, infecções), exposições ocupacionais e hábitos de vida (e.g., tabagismo), além de comorbidades (e.g., diabetes, sobrepeso etc.)^[4,5]

Com base em sua apresentação clinicopatológica, imunofenótipo e alterações moleculares subjacentes, os linfomas são discriminados em dois grupos principais: os linfomas de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma* - HL) e os linfomas não-Hodgkin (*Non-Hodgkin lymphomas* - NHL). Os linfomas de Hodgkin têm apresentação morfológica distintiva e patogênese mais bem delineada. Os NHLs, por sua vez, são um grupo heterogêneo de cânceres do sistema linforreticular, com propriedades clinicopatológicas e etiopatogenéticas muito distintas para cada entidade^[6]

Os HL constituem cerca de 10% de todos os linfomas. Comparativamente aos NHLs, geralmente se manifestam em faixas etárias mais jovens, sendo que a maioria dos pacientes é diagnosticada antes dos 40 anos de idade. A forma pediátrica do HL é o câncer mais comum entre adolescentes de 15 a 19 anos, perfazendo cerca de 15% de todas as neoplasias malignas nessa população^[7]. Na maioria dos casos o curso clínico do HL é indolente, posicionando esses linfomas dentre os que apresentam maiores taxas de cura, alcançando 80-90% na forma clássica da doença (cHL). Ainda, mesmo casos avançados do HL podem apresentar altos índices de sucesso terapêutico. Em termos morfológicos, os tumores no HL são formados por população

heterogênea de células, com uma fração apenas (até 10% do tumor) de células neoplásicas malignas, inseridas em um microambiente complexo contendo células reativas^[8,9]. As células malignas no HL são tipicamente descritas como grandes e posicionadas em um espectro morfológico que oscila de formas mononucleares, conhecidas como “células de Hodgkin”, até células com grandes núcleos bilobados e nucléolos evidentes, denominadas de “células de Reed-Sternberg”^[10].

Cerca de 90% de todos os linfomas são NHL, mais comuns no sexo masculino, principalmente após os 65 anos de idade. A proporção entre os sexos pode variar consideravelmente dependendo do NHL específico. A mortalidade por NHL é mais elevada entre brancos, comparativamente a outros grupos étnicos.^[11,12] Os NHL são um grupo diverso e heterogêneo de linfomas, sendo discriminadas mais de 50 entidades distintas. Para fins de facilitação do entendimento do curso clínico e manejo terapêutico da doença, os NHL são comumente divididos em linfomas de baixo grau, mais indolentes, como o linfoma folicular, e os de alto grau, mais agressivos, tipificados pelos linfomas difusos de grandes células B (*Diffuse Large B-Cell Lymphomas* - DLBCL)^[6]. Combinados, o linfoma folicular e os DLBCL constituem a maioria (90%) dos NHL^[1,11].

Comparativamente ao HL, a evolução clínica dos NHL é menos previsível e essas doenças têm maior propensão para disseminação extranodal e frequentemente se disseminam para linfonodos não-contíguos^[1,12]. A maioria dos NHL se origina de linfócitos B maduros e mais raramente de linfócitos T ou células NK. Geralmente os NHL apresentam translocações cromossômicas recorrentes não-hereditárias, cuja repercussão biológica costuma propiciar conversão de proto-oncogenes em oncogenes ou comprometer a atividade de genes supressores de tumor – ambas alterações condutoras (*drivers*) na linfomagenese^[9].

A patogênese dos linfomas está diretamente relacionada ao comprometimento da regulação da homeostasia do sistema imunitário. Avanços recentes no entendimento dos mecanismos dessa regulação têm proporcionado abordagens terapêuticas mais promissoras para controle desses cânceres. A seguir serão apresentados alguns elementos sobre a regulação do sistema imunitário, a fim de subsidiar a percepção de seu papel crítico na linfomagenese.

1.2 Modulação de resposta imunológica

O sistema imunitário compreende moléculas, células e processos finamente articulados para proteger o indivíduo contra estímulos potencialmente nocivos, incluindo antígenos estranhos, substâncias tóxicas ou mesmo células malignas. As respostas do sistema imunitário em metazoários são discriminadas em duas categorias básicas, denominadas imunidade inata e

adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, sendo responsável por respostas rápidas e inespecíficas (ou pouco específicas). Embora tradicionalmente considerada incapaz de gerar memória imunológica, a imunidade inata pode desenvolver um estado funcional, conhecido como imunidade treinada, decorrente de reprogramações metabólicas e epigenéticas que aprimoram e modulam o perfil das respostas imunes após reexposição a estímulos. Este fenômeno ocorre principalmente em células da linhagem mieloide, como monócitos e macrófagos, além de células dendríticas, células NK e células linfoides inatas.^[13,14] A imunidade adaptativa, por sua vez, dependente de reconhecimento de antígenos, é mais específica e pode gerar memória imunológica duradoura^[15]. A coordenação entre imunidades inata e a adquirida é necessária para uma proteção abrangente e eficaz do organismo em relação a estímulos potencialmente nocivos. Entretanto, essas mesmas respostas podem ser a base para o adoecimento em situações de comprometimento da homeostase imunológica, quer seja na forma de processos patológicos agudos ou doenças crônicas^[16,17].

Diferentes tipos celulares desempenham papéis específicos nas respostas imunitárias. Por exemplo, basófilos e mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK atuam fundamentalmente na imunidade inata. Por sua vez, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B, e plasmócitos diferenciados células são mais especializadas e participam da resposta imune adaptativa. A função e importância de cada um desses tipos celulares pode variar de acordo com o contexto da resposta imunitária; ademais, alguns fenômenos das respostas imunitárias são desempenhados fundamentalmente por determinados tipos celulares. É o caso da apresentação de antígenos, por exemplo – fenômeno exercido principalmente por células dendríticas, macrófagos e células B. Essas células capturam, processam e apresentam em sua superfície peptídeos derivados de antígenos, associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II (MHC-II). A apresentação de antígenos exercida por essas células no contexto MHC-II aos linfócitos T é elemento central para o desencadeamento de respostas de imunidade adaptativa.^[15]

O desenvolvimento de cânceres em um organismo imunocompetente envolve uma complexa interação entre as células do sistema imunitário, quer seja em processos de imunidade inata ou adaptativa. Essas células atuam na imunovigilância tumoral, diretamente na detecção e eliminação de células transformadas ou interagindo com o microambiente tumoral (*Tumor Microenvironment* - TME), de modo a dificultar o desenvolvimento de cânceres. Por outro lado, os cânceres podem se apropriar de diferentes mecanismos de evasão imunológica. Por exemplo,

citocinas liberadas pelas células neoplásicas podem induzir tolerância imunológica periférica, o que dificulta sua detecção e destruição imunomediada. [18]

A capacidade das células malignas em evitar sua destruição pelo sistema imunitário, é reconhecida como uma das características distintivas centrais do desenvolvimento do câncer, sendo a imunoevasão tumoral resultado da interação dinâmica entre as células neoplásicas, o sistema imunitário e o microambiente celular circundante. Para escapar da vigilância imunológica, essas células podem adotar diferentes estratégias, como a indução de um nicho imunossupressor que impede a função das células de defesa, a secreção de fatores imunomoduladores, alterações na apresentação e no reconhecimento de antígenos, reprogramação metabólica, e modificações genéticas e epigenéticas que reduzem sua imunogenicidade, além da alta heterogeneidade celular. Esses mecanismos atuam de forma coordenada, permitindo a persistência e progressão da doença, mesmo diante de uma resposta imune potencialmente eficaz. [19–21]

Os processos de imunoevasão tumoral podem ainda contar com a distúrbios na regulação exercida por moléculas de reconhecimento imunológico e de ativação celular que coletivamente constituem as chamadas vias de *checkpoint* imunológico (*Immune Checkpoints* - ICs) [18]. Os ICs são mecanismos regulatórios dependentes de moléculas expressas em células inerentes ao sistema imunitário, mas também outros tipos celulares normais e células neoplásicas. Em síntese, as moléculas reguladoras de ICs atuam inibindo ou estimulando fenômenos relacionados às respostas imunitárias, particularmente os da imunidade adaptativa mediados por células T. Em condições fisiológicas, por exemplo, as moléculas de ICs regulam a autotolerância pela modulação da interação célula-célula, propiciando proteção dos tecidos saudáveis de ataques imunomediados que poderiam causar doenças autoimunitárias [22,23]. Uma grande variedade de moléculas regulatórias dos ICs contribui na imunopatogênese de diferentes cânceres. A superexpressão dessas moléculas durante a carcinogênese contribui para a supressão de respostas antitumorais e imunoevasão. [21,23]

Além do protagonismo em mecanismos de imunoevasão, as moléculas de ICs expressas por células neoplásicas ou no TME podem contribuir em outros fenômenos da biologia dos cânceres, tais como modificações de rotas metabólicas, elevação da sobrevivência de células neoplásicas e evasão da apoptose, tumorigênese, remodelamento vascular no TME e a disseminação neoplásica. Dentre as moléculas de ICs já documentadas em um ou mais desses fenômenos podem ser mencionadas a PD-1 (codificada pelo gene *PDCD1*; [HGNC:8760](#)), PD-L1 (gene *CD274*; [HGNC:17635](#)), PD-L2 (gene *PDCD1LG2*; [HGNC:18731](#)), B7-H3 (gene

CD276; [HGNC:19137](#)), CTLA-4 (gene *CTLA4*; [HGNC:2505](#)), LAG-3 (*LAG3*; [HGNC:6476](#)), TIM3 (*HAVCR2*; [HGNC:18437](#)), B7-H4 (gene *VTGNI*; [HGNC:28873](#)) e a BTLA (gene *BTLA*; [HGNC:21087](#)).^[24]

Ainda são escassas as informações sobre a expressão de moléculas de ICs nos cânceres em geral. Entretanto, sabe-se que moléculas reguladoras de ICs frequentemente são hiperreguladas no TME, influenciadas por fatores como a hipóxia, citocinas inflamatórias, a atividade de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos intratumorais, presença de células T em situação de exaustão biológica, ativação de vias oncogênicas intracelulares e regulações epigenéticas^[21,25,26].

O TME nos linfomas é dado por uma rede dinâmica e organizada composta por células imunitárias, células estromais e componentes de matriz extracelular (*Extracellular Matrix* - MEC), além de múltiplos fatores solúveis, incluindo diversos mediadores químicos com ação imunorreguladora, como as citocinas. Essa composição é indispensável para a sobrevivência, crescimento e migração das células neoplásicas e escape imunológico. Consequentemente, o TME é fundamental na linfomagenese, com reflexos na resposta da doença ao tratamento antineoplásico. A diversidade celular e dinamismo da composição do TME nos linfomas tem como elementos básicos a expansão e recrutamento de diversos tipos celulares com ação imunomoduladora, tais como macrófagos associados ao tumor (*Tumor Associated Macrophages* - TAMs), linfócitos T reguladores (Tregs), linfócitos T foliculares (Tfh) e células mielóides supressoras (*Myeloid-derived Suppressor Cells* - MDSCs)^[27,28].

A expressão de moléculas de ICs como PD-L1 e PD-L2 em linfomas compromete as respostas imunitárias do organismo contra as células malignas, podendo inclusive levar os linfócitos T à exaustão ou apoptose^[29]. As moléculas PD-L1 e PD-L2 são ligantes para o receptor PD-1, expresso nos linfócitos infiltrantes do tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocytes* - TILs), TAMs, mastócitos, células mesenquimais e nas próprias células neoplásicas^[27,28]. Outra molécula relevante na regulação dos ICs em linfomas é TIM-3; a expressão de Gal-9, seu ligante, em alguns linfomas pode comprometer a sobrevivência de células Th1 e causar a exaustão de linfócitos T^[30].

Além do comprometimento da homeostasia do sistema imunitário, algumas infecções virais também contribuem substancialmente na linfomagenese. Isso é particularmente relevante para vírus linfotrópicos, como o EBV e o vírus do sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma Herpesvirus* - KSHV). Ambos são herpesvírus humanos gama e sua participação no desenvolvimento de linfomas em humanos será explorada na seção a seguir.

1.3 Infecção por vírus oncogênicos e linfomagenese

Cerca de 10% de todos os cânceres humanos podem ser associados a infecções virais, sendo o EBV responsável por aproximadamente 1,5% desses casos. O KSHV possui uma participação variável, representando uma fração ainda menor desse total.^[31,32]

Os herpesvírus se destacam como uma família de vírus que evoluíram em concomitância com seus hospedeiros há muito tempo, o que lhe confere propriedades de elevada adaptação com esses organismos. Em comum, os herpesvírus têm uma partícula viral formada por um capsídeo icosaédrico, tegumento e um envelope lipídico derivado da célula hospedeira. O genoma herpesviral é relativamente extenso (125-240 kbp), dado por uma molécula de DNA de dupla hélice (dsDNA), frequentemente mantida em estrutura circular (epissoma) no núcleo das células infectadas. Adicionalmente, o ciclo de vida dos herpesvírus é bifásico, com uma etapa de latência e uma de replicação lítica. A latência é a fase predominante, na qual o vírus permanece em estado de quiescência biológica nas células infectadas no hospedeiro, com expressão restrita dos produtos virais. Por outro lado, na fase lítica o genoma viral é amplamente expresso e o vírus replica ativamente seu genoma, de modo a propiciar a formação e liberação de novas partículas infecciosas.^[33]

Atualmente são descritas três subfamílias de herpesvírus, denominadas α , β , e γ . As infecções por herpesvírus γ são altamente prevalentes e podem estar relacionadas a diversas doenças, quer sejam ou não neoplásicas, benignas e cânceres. São membros dessa subfamília o EBV, ou gammaherpesvirus humano 4 (HHV-4) e o KSHV, ou gammaherpesvirus humano 8 (HHV-8) ^[34]. Ambos apresentam tropismo por linfócitos sendo hábeis em manipular respostas imunitárias do hospedeiro. Além disso, interferem em várias vias de sinalização intracelular relevantes para a linfomagenese, tais como PI3K/Akt/mTOR, MAPK e NF- κ B^[35,36].

O EBV foi o primeiro gammaherpesvirus humano descoberto, identificado em 1964 em células derivadas de Linfoma de Burkitt (*Burkitt lymphoma*-BL) cultivadas *in vitro* e avaliadas com microscopia eletrônica^[37]. O EBV é um dos patógenos humanos mais bem-sucedidos, infectando mais de 95% da população adulta mundial. Sua infecção está associada a um amplo espectro de doenças, incluindo a mononucleose infecciosa, diversas condições autoimunitárias, distúrbios linfoproliferativos, linfomas e vários outros cânceres^[38]. Dentre os linfomas associados ao EBV estão a forma clássica do HL e vários NHL, tais como BL, DLBCL e o Linfoma de Células T/NK Extranodal (*Extranodal T/NK Cell Lymphoma*-ENKTL).^[39]

O genoma do EBV possui cerca de 172 kb, com aproximadamente 85 genes que codificam uma variedade de proteínas. Dentre elas, ativadores transcricionais (e.g., BZLF1 e

BRLF1), proteínas anti-apoptóticas (e.g., BHRF1 e BALF1) e proteínas de latência viral inseridas na membrana plasmática da célula infectada (e.g., LMP1 e LMP2). Além disso, o vírus codifica por meio do gene BCRF1, um homólogo viral da interleucina-10 (vIL-10), que apresenta propriedades imunossupressoras semelhantes às da IL-10 celular, contribuindo para a evasão imunológica e persistência da infecção. Em conjunto, esses produtos virais desempenham funções cruciais na replicação viral, na modulação da expressão gênica e na carcinogênese.^[34,36,40] Admite-se que os linfomas associados ao EBV possuem caminhos patogênicos distintos, com reflexos nos padrões de expressão gênica viral. Por exemplo, o fenótipo tumoral no BL pode ser determinado por eventos independentes de translocação/mutação no genoma celular, sendo que o EBV parece exercer uma sutil proteção contra a morte celular das células que sofreram os rearranjos gênicos. Por outro lado, no cHL, nos DLBCLs e em linfomas de células T/NK observa-se expressão constitutiva de EBV LMP1, com consequente ativação das vias NF-κB e JAK/STAT, o que pode auxiliar as células malignas proliferarem e se evadirem da imunovigilância.^[34]

Em 1872, o dermatologista Moritz Kaposi descreveu pela primeira vez tumores cutâneos em idosos europeus, uma condição que ficou conhecida como Sarcoma de Kaposi. Décadas depois, esses tumores foram também observados em pacientes na África e eventualmente associados principalmente à AIDS. No entanto, a causa exata desses tumores só foi identificada em 1994, quando pesquisadores sugeriram origem infecciosa aos tumores. Tal pesquisa levou ao descobrimento do KSHV, nomeado em homenagem ao pesquisador que primeiro descreveu a doença. O vírus está associado a 3 principais tipos de doenças: sarcoma de kaposi (*Kaposi's sarcoma-KS*), doença de castleman multicêntrica (*Multicentric Castleman Disease- MCD*) e o linfoma de efusão primária (*Primary Effusion Lymphoma-PEL*). Além disso, também é o agente causador da síndrome inflamatória de citocinas KSHV (*KSHV-Associated Cytokine Inflammatory Syndrome-KICS*), um distúrbio grave e raro. O genoma do KSHV possui cerca de 165 Kb e dentre as proteínas expressas, destacam-se: o antígeno nuclear associado à latência (*Latency-Associated Nuclear Antigen - LANA*), kaposinas, a interleucina-6 Viral (*Viral Interleukin-6 - vIL-6*), um receptor viral acoplado à proteína G Viral (*Viral G Protein-Coupled Receptor - vGPCR*) e fatores virais reguladores de interferon (*Viral Interferon Regulatory Factor - vIRFs*)^[41,42]

De modo geral, células infectadas por vírus e células malignas compartilham a necessidade de desenvolverem estratégias de sobrevivência frente aos mecanismos de defesa do organismo. Uma dessas estratégias reside na manipulação de ICs para imunoevasão, o que pode se dar pela hiperexpressão de proteínas reguladoras dos ICs, ocasionando inibição ou

comprometimento das atividades dos linfócitos T. Maiores detalhes sobre o atual conhecimento sobre a regulação de ICs em contextos de cânceres associados à infecção viral serão apresentados a seguir.

1.4 Imunomodulação em linfomas associados à infecção viral

Nos últimos anos tem sido demonstrado que cânceres associados ao EBV, por exemplo, exibem padrões específicos de modulação de ICs^[43]. De fato, o EBV se destaca pela capacidade de explorar o sistema imunitário de seus hospedeiros, atuando de modo a gerar um ambiente favorável à persistência viral e à evasão imunitária.

Dados sobre como o EBV pode modular a expressão de diversas moléculas reguladoras de ICs (e.g. PD-1, CTLA-4, LAG-3 e TIM-3 e outras foram compilados em uma revisão publicada em 2022 por nosso grupo de pesquisa^[44]. O vírus também pode influenciar a expressão de ligantes como PD-L1, PD-L2 e B7-H3, os quais interagem com seus respectivos receptores nas células do sistema imunitário. Em última análise, as ações do EBV podem alterar a disponibilidade de moléculas de ICs tanto nas células malignas infectadas como também em células não-neoplásicas do microambiente tumoral. Consequentemente, a infecção viral pode contribuir para disfunção das células T, afetando a capacidade dessas células em reconhecer e destruir as células infectadas pelo vírus e promovendo a tolerância imunológica, com reflexos no favorecimento da progressão tumoral de cânceres associados ao vírus.^[44]

As moléculas reguladoras de ICs apresentam uma atividade diferenciada em cânceres associados à infecção pelo EBV. LAG-3, por exemplo, foi encontrada em níveis elevados em linfócitos T que combatem o EBV^[45]. Outro estudo relatou a superexpressão de PD-Ls 1 e 2 em linfomas em decorrência de ativação do fator de transcrição AP-1, mediada pela infecção por EBV^[46]. O vírus também é capaz de regular a expressão proteica (produtos virais e celulares) de modo a modular o fenótipo tumoral, além de influenciar a interação das células neoplásicas como seu microambiente, afetando a composição e função do TME^[27,47,48]

Além dos produtos virais, a modulação de ICs em cânceres pode se dar por ação de RNAs não-traduzidos, comumente referidos como RNAs não-codificantes (*Non-coding RNAs* - ncRNAs). Dentre os ncRNAs, merecem destaque as pequenas moléculas de ncRNAs, denominadas de microRNAs, miRNAs ou miRs. Os miRNAs emergem como reguladores fundamentais da estabilidade celular e orquestram processos complexos, principalmente na sua interação com o sistema imune. Compreender sua biologia e seus mecanismos de ação é, portanto, fundamental para explorar seu potencial como alvo na imunoterapia do câncer.

1.5 microRNAs: Papel no câncer, na regulação imune e implicações em linfomas virais

miRNAs são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos de tamanho e que desempenham um papel fundamental na regulação pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos. Desde sua descoberta têm sido amplamente investigados devido ao seu envolvimento em processos fisiológicos e patológicos, notadamente no desenvolvimento tumoral^[49,50]

A biogênese dos miRNAs ocorre por meio de duas vias principais: a canônica e a não canônica. A via canônica é predominante e inicia-se no núcleo com a transcrição de pri-miRNAs por uma RNA polimerase II, que posteriormente são processados pelo complexo Drosha/DGCR8 em pré-miRNAs, exportados ao citoplasma e clivados pela enzima Dicer em um duplex maduro. Esse duplex é incorporado a proteínas da família Argonaute (AGO), formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA Induced Silencing Complex-RISC*), no qual a fita guia é mantida e direciona o reconhecimento de mRNAs-alvo por complementaridade de sequência, levando à inibição da tradução ou à degradação do transcrito. Em contraste, a via não canônica compreende mecanismos alternativos de biogênese independentes de componentes do maquinário clássico, como DROSHA ou Dicer, incluindo, por exemplo, mirtrons e vias Dicer-independentes, que assumem maior relevância em contextos celulares específicos.^[49,51,52]

Contudo, a integridade dessas vias de biogênese é frequentemente subvertida no microambiente tumoral, onde a expressão de miRNAs é habitualmente desregulada e contribui para a progressão da doença. Os miRNAs podem exibir uma dupla funcionalidade na oncogênese. OncomiRs (e.g. miR-21, miR-10b) podem promover a tumorigênese ao silenciar genes supressores de tumor como PTEN e PDCD4, resultando em invasão e metástase. Inversamente, miRNAs supressores de tumor (TS-miRs- *Tumor Suppressor microRNAs*), atuam na repressão de oncogenes, contudo no câncer apresentam-se frequentemente subexpressos, tendo sua capacidade de frear a expressão de oncogenes corrompida, resultando em proliferação desordenada, favorecendo o desenvolvimento e a progressão neoplásica, (e.g. família let-7 e o miR-206).^[53,52,54]. Além disso, os miRNAs também participam ativamente da comunicação intercelular no microambiente tumoral, influenciando a transdiferenciação de fibroblastos associados ao câncer (*Cancer Associated Fibroblasts-CAFs*), estimulando a angiogênese e modulando a resposta imune.^[55]

Fundamentalmente os miRNAs são reguladores não apenas da expressão gênica, mas também reguladores essenciais do sistema imune, desempenhando papéis críticos na

diferenciação, ativação, homeostase e tolerância de células imunológicas. Em múltiplos cânceres, os miRNAs podem controlar a resposta imune antitumoral por meio da regulação direta ou indireta da expressão de moléculas de ICs. [50,56,23]

Dados compilados na revisão de CORTEZ e colaboradores (2019) mostram que a modulação da imunidade inata e adaptativa é finamente orquestrada por miRNAs. Na linhagem mielóide, a diferenciação monocítica e a monocitopoiese são coordenadas pelos miRNAs 17-5p, 20a e 106a (via fator AML1), além da influência dos miRNAs 21, 155, 424 e o cluster 17-92 sobre as vias MAPK e JAK-STAT. A plasticidade de macrófagos também reflete esse controle: enquanto o miR-155 e o miR-125a/b sustentam o fenótipo pró-inflamatório M1 via ativação de NF- κ B, os miRNAs 146a e 21 agem como reguladores negativos, atenuando a sinalização de TLR/NF- κ B. No compartimento das células NK, os miRNAs 150, 181 e 155 estão envolvidos na maturação e regulação, enquanto a secreção de IFN- γ e a citotoxicidade (via perforina e granzima B) são controladas pelos miRNAs 29, 30e, 378 e 27a-5p. Na imunidade adaptativa, o miR-155 destaca-se como um regulador determinante na polarização de linfócitos Th1/Th2, no desenvolvimento de células Treg e na proliferação de células T CD8+, que também é regulada pelos miRNAs 21 e 30b. O cluster miR-17-92 exerce papel abrangente, promovendo citotoxicidade de células T CD8+, diferenciação de células T auxiliares foliculares e resposta de células Th1, por meio da atuação em alvos como TGF β RII e PTEN. Adicionalmente o miR-146a reprime a sinalização de NF- κ B e mantém a homeostase das células Tregs (via STAT1), que tem seu potencial supressor regulado também pelo balanço dos miRNAs 15a e 16. [57]

De forma direta, os miRNAs podem comprometer a atividade de ICs pela interação desses ncRNAs com transcritos de seus genes-alvo, promovendo a degradação do RNAm ou inibindo sua tradução. Por outro lado, de maneira indireta, os miRNAs podem interferir nos ICs pela regulação pós-transcricional de genes que codificam mediadores imunológicos como as citocinas, por exemplo. Digno de nota, a expressão de uma mesma molécula reguladora de IC pode ser modificada por vários miRNAs (e.g. PD-L1 é alvo de miR-200, miRNA-197, miR-152 e miR-570), bem como um mesmo miRNA pode afetar a expressões de diferentes moléculas reguladoras de ICs (e.g. miR-155 regula diretamente as expressões de CTLA-4 e BTLA) [58,59].

Para que a complexa rede de respostas imunitárias seja estabelecida, é fundamental uma regulação precisa da linfopoiese e da hematopoiese. Nesse contexto, os miRNAs atuam como reguladores centrais, coordenando estágios de diferenciação celular, com um papel particularmente crítico na diferenciação de células linfóides. Durante a ontogenia dessas células

destacam-se os miRNAs-150, -146a, -155, -125b, -223 e -142, além da família let-7^[60], enquanto o cluster miR-17-92 desempenha importante papel na regulação das fases iniciais do desenvolvimento linfocitário^[61]

No cenário das neoplasias hematológicas, como os linfomas, os perfis de expressão de miRNAs podem sofrer alterações significativas influenciadas pelo microambiente tumoral, apresentando variações tanto entre os linfonodos quanto na medula óssea, a depender da apresentação clínica da doença, configurando um mecanismo molecular complementar às alterações genéticas clássicas que impulsionam a linfomagenese.^[62,63] A relevância desses marcadores é corroborada pela revisão de Sevcikova e colaboradores que destaca a significância dos miRNAs na patogênese, diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento de neoplasias hematológicas (e.g. miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-199a, miR-497, miR-155) que além de serem associados à distúrbios da hematopoiese possuem expressão aberrante em pacientes com DLBCL^[64] Em HL a desregulação de miRNAs específicos é crucial para a patogênese, afetando processos como o desenvolvimento de células B (e.g. miR-9, miR-150 e miR-155), a hiperativação da via NF-κB (e.g. miR-155 e miR-196a) e mecanismos de evasão imune (e.g. miR-138)^[65] Em BL, o oncogene *MYC* é regulado por diversos miRNAs, dentre os quais pode-se citar miR-23a, miR-26a, miR-29b, miR-30d, miR-146a, miR-146b, miR-155 e miR-221^[66]

A estabilidade regulatória dos miRNAs pode ainda ser desafiada por agentes externos, com destaque para infecções virais. miRNAs exercem importante papel regulando tanto a defesa do hospedeiro quanto nas estratégias de replicação do patógeno. Ao atuarem em diversas etapas do ciclo viral essas moléculas podem silenciar receptores de superfície para impedir a entrada do vírus, orquestrar vias de sinalização imune e modular processos metabólicos essenciais, para alterar o estado metabólico do hospedeiro, como a autofagia e a apoptose.^[67] Adicionalmente, a capacidade viral de manipular os miRNAs do hospedeiro favorece a sobrevivência, persistência e a progressão tumoral, e nesse contexto, o EBV destaca-se por sua habilidade em subverter a maquinaria de miRNAs de seu hospedeiro seja por intermédio de suas proteínas de latência ou pela expressão de seus próprios miRNAs virais (ebv-miRs).^[68-70]

O atual estado do conhecimento sobre a biologia dos cânceres admite que mudanças na expressão de miRNAs têm papel relevante no desenvolvimento e progressão dessas doenças^[52]. Mais recentemente, a documentação de alterações na regulação de moléculas de ICs em cânceres têm subsidiado avanços que propiciaram novas e promissoras estratégias de controle de cânceres, particularmente linfomas^[71-74]. Compreender a interação entre miRNAs e ICs tem se tornado essencial para novas abordagens de gestão da saúde para pacientes com cânceres. Sobretudo nos linfomas associados à infecção viral, essas interações influenciam vias e

processos biológicos cruciais no combate à infecção, o que pode ter impacto direto na progressão da doença. Estudos nessa área podem oferecer contribuição valiosa tanto para uma melhor compreensão da patogênese dos linfomas como também para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas mais eficazes.

Pelo exposto, percebe-se que as atividades de miRNAs têm papel fundamental na modulação das vias imunitárias. Esses achados ressaltam a importância de estudos que busquem elucidar as complexas atividades de miRNAs, incluindo sua relação com os ICs na vigência de infecção pelo EBV. A investigação das repercussões da infecção viral em termos da atividade de ncRNAs pode proporcionar informações importantes sobre mecanismos subjacentes à carcinogênese e a imunomodulação em cânceres, particularmente os linfomas, com potencial de propiciar a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento dessas doenças.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Prospectar, por meio de uma análise exploratória de *datasets* públicos, miRNAs com alto potencial de regulação de moléculas de *checkpoint* imunológico em modelos de linfomas associados à infecção por EBV para identificação de miRNA-candidato para estudos funcionais subsequentes.

2.2 Objetivos específicos

1. Levantar e selecionar conjuntos de dados (*datasets*) públicos de expressão de miRNAs em tecidos linfoides humanos, particularmente em distúrbios linfoproliferativos associados à infecção pelo EBV;
2. Identificar os miRNAs mais abundantes nos *datasets* selecionados;
3. Mapear e documentar interações preditas entre os miRNAs identificados e os genes que codificam moléculas importantes na regulação de *checkpoints* imunológicos;
4. Realizar a curadoria de resultados experimentais publicados sobre os miRNAs identificados, a fim de compilar evidências sobre sua relevância biológica na regulação de respostas imunitárias, infecção pelo EBV e linfomagenese.

3 Material e Métodos

3.1 Preâmbulo

O projeto da pesquisa de mestrado originalmente previa a avaliação de um possível papel do hsa-miR-192-5p como regulador de moléculas de ICs em linhagens de células malignas humanas derivadas de linfomas associados ao EBV e/ou KSHV. Contudo, considerando recomendações de assessoria científica *ad hoc* da FAPESP sobre proposta de financiamento na linha de auxílio regular à pesquisa (Processo. 2024/21426-0, aprovado em Abril/2026,) a proposta foi reformulada para melhor subsidiar a escolha do miRNA-alvo.

Em síntese, em que pese que o hsa-miR-192-5p tenha sido selecionado com base em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa^[75,76], esses trabalhos prévios do ViriCan estavam contextualizados no desenvolvimento do carcinoma de nasofaringe. Assim, as críticas acolhidas sobre a proposta original estavam subsidiadas na perspectiva de que a escolha do miRNA-alvo para as investigações pretendidas deveria estar melhor alinhada com dados sobre o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas – particularmente linfomas associados à infecção pelo EBV. Consequentemente, a pesquisa foi reorientada metodologicamente para incluir uma etapa preliminar de robusta prospecção e seleção de miRNA-alvo – descrita neste trabalho –, fundamental para as análises experimentais subsequentes.

A fim de propiciar uma maior robustez na seleção de miRNAs com maiores chances de apresentarem relevância biológica na regulação de ICs em linfomas humanos associados à infecção por EBV, foi estabelecida uma estratégia baseada em análise exploratória com tratamento estatístico de *datasets* públicos de expressão gênica em nível transcricional. A **Figura 1** apresenta o desenho geral do estudo, detalhado nas seções subsequentes.

Em tempo, além das análises aqui descritas e que resultaram a identificação de miRNAs candidatos para análises experimentais que serão desenvolvidas no decorrer da pesquisa financiada pela FAPESP (Proc. 2024/21426-0; vigência: Maio/2026-Abr/2029), durante o treinamento de mestrado foram realizadas etapas experimentais para padronização das análises de expressão de ICs empregando painel de moléculas estabelecido em trabalho prévio do ViriCan (^[77]). Nesse sentido, os avanços obtidos durante o programa de mestrado são relatados no **Apêndice (Parte B)** desta dissertação.

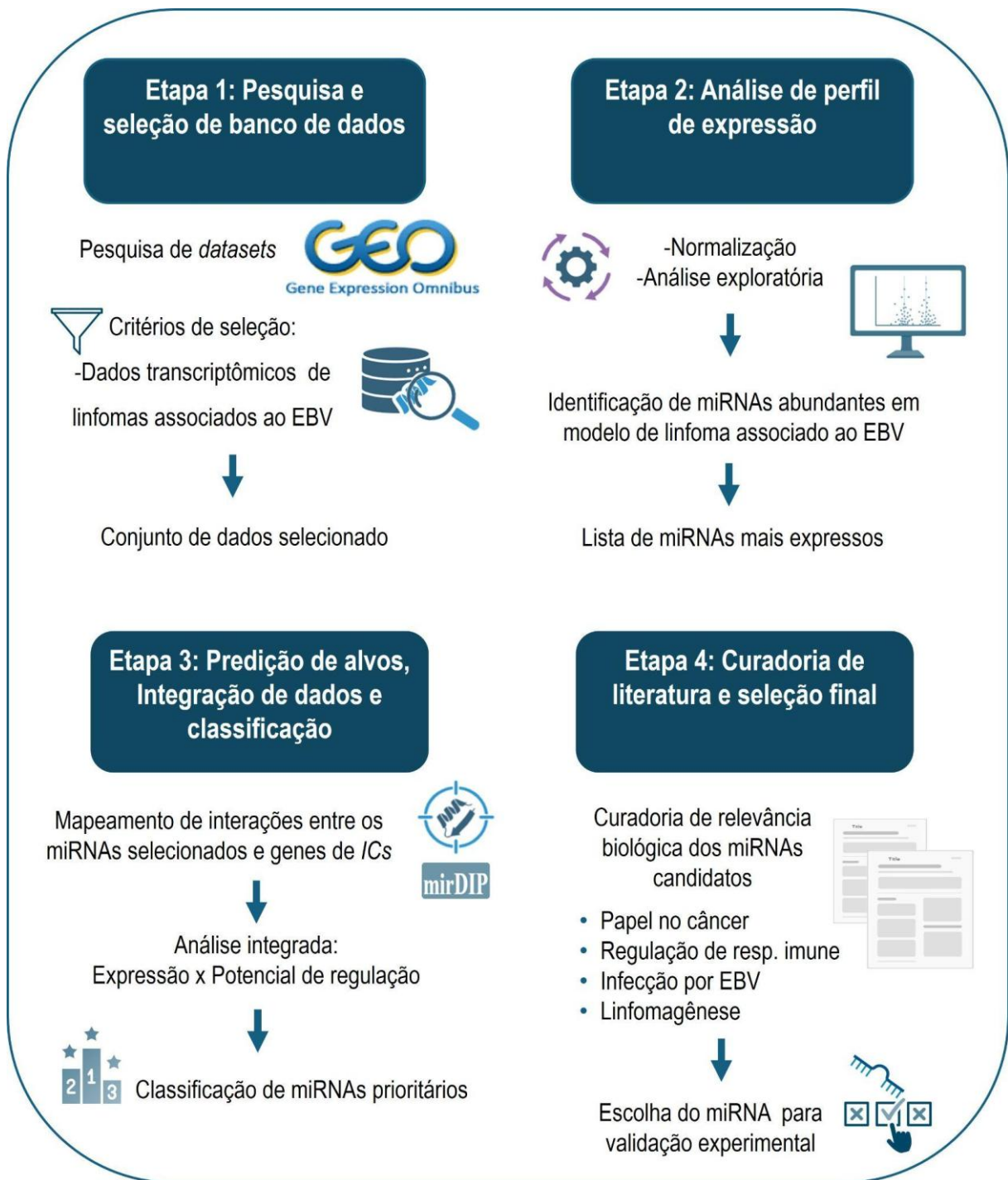


FIGURA 1-Síntese do delineamento geral do estudo

3.2 Seleção de conjunto públicos de dados

A prospecção de miRNAs para avaliação de potencial participação na regulação de ICs em linfomas associados ao EBV baseou-se em *datasets* derivados de análise de expressão gênica em experimentos relatados em trabalhos publicados na literatura. Para tanto, inicialmente foi realizado um levantamento dos conjuntos de dados depositados no repositório público GEO (*Gene Expression Omnibus*), mantido pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) dos EUA.^[78]

Para o levantamento dos *datasets*, foram definidos parâmetros de busca no GEO para incluir apenas estudos com amostras de *Homo sapiens* e dados de transcriptoma gerados pelos métodos de perfilamento de ncRNAs por microarranjos (*non-coding RNA profiling by array*) ou por sequenciamento de alto rendimento (*non-coding RNA profiling by high throughput sequencing*). A busca inicial baseada na sintaxe “miRNA AND lymphoma AND EBV” retornou 32 *datasets* com informações potencialmente relevantes sobre a expressão de miRNAs endógenos e virais em experimentos com células linfoides. Os *datasets* foram então avaliados para priorização de análise empregando uma pontuação baseada em três critérios principais: 1) tipo de amostra avaliada, com especial interesse em linhagens celulares de linfomas EBV-positivos; 2) plataforma experimental; e 3) e objetivos do estudo original, com foco em regulação de miRNAs. A aplicação dessa estratégia resultou na classificação dos 32 *datasets* conforme demonstrado no **Quadro 1**.

QUADRO 1- Classificação de prioridade de análise dos datasets identificados conforme critérios de seleção

Prioridade de análise	Identificadores GEO dos <i>datasets</i>
(A) Análise detalhada	GSE10107; GSE147228
(B) Análise preliminar	GSE15229; GSE22898
(C) Para análise oportunamente	GSE12014; GSE13056; GSE15250; GSE52916
(D) Para análise eventual	GSE9070; GSE10105; GSE116675; GSE18437; GSE22420; GSE116675; GSE206824
(E) Dispensados de análise	GSE9104; GSE18438; GSE18439; GSE22938; GSE30695; GSE31408; GSE32109; GSE32113; GSE36926; GSE43958; GSE46877; GSE53476; GSE53479; GSE59479; GSE59480; GSE65752; GSE139425; GSE206930

Conforme indicado no **Quadro 1**, os *datasets* GSE10107 e GSE147228 foram identificados como os mais relevantes para os propósitos deste trabalho. O estudo associado ao *dataset* GSE10107, publicado por Cameron *et.al*, (2008)^[79], identificou o hsa-miR-146a como

alvo de regulação da oncoproteína LMP1 do EBV em linfócitos B. Por sua vez, o trabalho associado ao dataset GSE147228, publicado por Ungerleider *et al.* (2021)^[80] e do mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que miRNAs do EBV são potentes efetores na remodelação do transcriptoma na linhagem Akata, derivada de BL. Ambos os trabalhos demonstram que o EBV se vale de ncRNAs (virais e endógenos) para modular a expressão gênica da célula infectada – um mecanismo importante na patogênese de cânceres associados à infecção viral.

A análise em detalhes dos dados brutos desses *datasets* culminou com a seleção do GSE147228 como fonte primária de dados neste trabalho. Além do estreito alinhamento da abordagem do estudo original ^[80] (i.e., exploração da expressão de miRNAs virais e endógenos humanos e seu impacto na remodelação do transcriptoma tumoral) com as necessidades do presente trabalho, a disponibilidade de dados de transcriptoma não explorados pelos autores e que são valiosas para os objetivos deste estudo subsidiaram a seleção desse *dataset*. Digno de nota, embora o *dataset* GSE10107 e seu trabalho associado ^[79] tenham suscitado o hsa-miR-146a como um miRNA candidato potencialmente relevante, o GSE147228 apresenta dados mais abrangentes, de modo que sua análise foi priorizada considerando um maior potencial de fomentar descobertas originais.

Sucintamente, o *dataset* GSE147228 contém dados de expressão pequenos RNAs avaliadas por sequenciamento massivo paralelo (*small RNA-seq*) gerados em equipamento *Illumina HiSeq 2500* (*Illumina, Inc.*, San Diego, CA, EUA - plataforma GPL16791), a partir de células Akata. Essa linhagem foi estabelecida em 1991 a partir de um linfonodo cervical comprometido por BL EBV-positivo, proveniente de uma criança japonesa de quatro anos de idade.^[81] Células Akata constituem um modelo clássico de BL EBV-positivo, amplamente empregado em estudos sobre biologia viral e patogênese de doenças associadas ao vírus.

3.3 Normalização, análise exploratória e visualização dos dados

Os arquivos de contagem bruta (*raw counts*) obtidos do *dataset* GSE147228 são derivados de três réplicas biológicas independentes de análise de pequenos RNAs nas células Akata (amostras GSM5285847, GSM5285848 e GSM5285849). Após extração dos dados necessários, os dados foram reorganizados em formato tabular e os valores de expressão de miRNAs foram tratados e processados para a etapa de análise exploratória baseada na expressão dos miRNAs endógenos humanos. Os dados de contagem foram normalizados, expressos em contagem por milhão (CPM) e em seguida foi calculada a média dos valores de CPM para cada miRNA entre as triplicatas. As análises subsequentes foram realizadas na linguagem R versão 4.4.1 (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, AUS), utilizando o ambiente *RStudio*

versão 2024.04.2, Build 764 (*Posit Software*, Boston, MA, USA). A análise exploratória foi executada empregando análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*), que foi aplicada aos valores transformados em $\log_2$ (CPM + 1) de todos os miRNAs. Paralelamente, os miRNAs foram ordenados por abundância com base na média de CPM e o subconjunto dos 20 mais abundantes (*Top 20*) foi selecionado para visualização.

3.4 Predição de Alvos

Foi realizada predição das interações regulatórias entre os miRNAs e os genes de moléculas de ICs empregando a plataforma mirDIP (*MicroRNA Data Integration Portal*) versão 4.1.8 (*Jurisica Lab, University Health Network*, Toronto, ON, CAN), que integra e pontua dados de múltiplas fontes para análises de predição, gerando uma pontuação consolidada de probabilidade de interação (*Integrated Score - IS*).^[82,83] A análise no mirDIP baseou-se nos miRNAs endógenos humanos identificados como os principais contribuintes na PCA e que também apresentavam a maior abundância de expressão no *dataset* GSE147228. Adicionalmente, a análise de predição teve como foco um painel ampliado de genes que codificam as moléculas reguladoras de ICs codificadas pelos seguintes genes: *BTLA* (HGNC:21087), *CD226* (HGNC:16961), *CD27*(HGNC:11922), *CD274*(HGNC:17635), *CD276*(HGNC:19137), *CD28*(HGNC:1653), *CD40* (HGNC:11919), *CD80* (HGNC:1700), *CD85*(HGNC:16309), *HAVCR2* (HGNC:18437), *ICOS* (HGNC:5351), *LAIR1*(HGNC:6477), *PDCDILG2*(HGNC:18731), *SIGLEC10* (HGNC:15620), *SIRPA* (HGNC:9662), *TIGIT* (HGNC:26838), *TNFRSF4* (HGNC:11918), *TNFRSF9* (HGNC:11924), *VSIR* (HGNC:30085), *CTLA4* (HGNC:2505), *VTN1* (HGNC:28873), *LAG3* (HGNC:6476), *PDCD1* (HGNC:8760) e *CD244* (HGNC:18171). A fim de analisar apenas as predições com nível mínimo razoável de evidências experimentais e/ou computacionais, as interações obtidas nos resultados do mirDip foram filtradas de modo para se obter apenas as predições com nível de confiança (baseado no IS) descritas como muito alto (*very high*), alto (*high*) ou médio (*medium*).

A fim de articular as informações da análise de PCA com base no *dataset* GSE147228 com a investigação de predição de alvos, elaboramos uma estratégia estatística para estimar a importância relativa de cada miRNA na regulação de genes codificantes de moléculas de ICs. Para tanto foi estabelecido uma métrica denominada *score* ponderado de regulação (SPR). Estimado com base nos resultados das análises previamente descritas (PCA + predição mirDIP), o SPR foi empregado na ordenação dos miRNAs de acordo com sua relevância para os objetivos do trabalho. Essa pontuação procura capturar a abrangência e força das predições, combinadas

à abundância relativa de cada miRNA no transcriptoma obtido com as células Akata. O SPR é dado pelo produto entre $SR_base * Fp$, definidos a seguir:

- **SR_base (Score de regulação base):** Representa a força da predição, calculado como mediana (IS) * $\log_{10}(N+1)$, onde IS (*Score Integrado*) e N (número de alvos preditos) são obtidos para cada miRNA na plataforma mirDip;
- **Fp (Fator de ponderação):** Um valor entre 1 e 2 derivado da abundância do miRNA (segundo a análise PCA; PCA Dim.1) para modular o valor do SR_Base pela quantidade do miRNA verificada no *dataset* GSE147228.

3.5 Revisão sistematizada da literatura

A fim de contextualizar a relevância biológica de cada um dos 6 miRNAs mais abundantes, foi realizada revisão sistematizada de literatura para levantamento de evidências da participação dos miRNAs em análise nos processos de regulação de respostas imunitárias em geral, imunidade tumoral e linfomagenese. As buscas foram realizadas na base de dados PubMed (NCBI). Foram utilizadas as estratégias de pesquisa indicadas abaixo, sem restrição temporal, com seleção apenas trabalhos publicados em inglês e que apresentavam resultados experimentais (excluindo-se, portanto, os artigos de revisão, estudos de descrição de métodos e estudos *in silico* sem validação experimental).

1. ("miR-X" OR "hsa-miR-X" OR "microRNA-X" OR "miRNA-X") *immune checkpoints* – individualmente, para cada miRNA considerado;
2. ("miR-X" OR "hsa-miR-X" OR "microRNA-X" OR "miRNA-X") AND *lymphomas*;
3. ("miR-X" OR "hsa-miR-X" OR "microRNA-X" OR "miRNA-X") AND *leukemias*;
4. ("miR-X" OR "hsa-miR-X" OR "microRNA-X" OR "miRNA-X") AND EBV;
5. ("miR-X" OR "hsa-miR-X" OR "microRNA-X" OR "miRNA-X") AND *cancer*.

Os dados dos artigos retornados nas buscas foram organizados em planilha de cálculo *Google Sheet* (Google LLC, Mountain View, CA, USA) para as seleções subsequentes, iniciando por categorização qualitativa de acordo com os critérios definidos a seguir:

- **Categoria 1 (C1) – Evidência Direta:** Estudos com validação experimental de interação miRNA-gene alvo, ou associação funcional direta com moléculas de *checkpoint* imunológico;
- **Categoria 2 (C2) – Evidência Funcional/Mecanicista:** Estudos que buscam explorar o papel biológico do miRNA em fenômenos relevantes de biologia dos cânceres (e.g., vias de sinalização, proliferação celular, apoptose etc.) ou respostas imunitárias, ainda que sem foco direto em *checkpoints*;

- **Categoria 3 (C3) – Evidência Funcional/Mecanicista com lncRNAs ou circRNAs:** Estudos que estudam interações entre miRNAs e lncRNAs/circRNAs, geralmente em análises de coexpressão;
- **Categoria 4 (C4) – Evidência Correlacional/Descritiva:** Estudos puramente associativos, para identificação/análise de biomarcadores e assinaturas baseadas na expressão de miRNAs para finalidades clínicas em pacientes com cânceres.

A fim de discriminar os trabalhos em que o miRNA foi central no estudo (destacado no título ou hipótese de trabalho) daqueles em que a molécula foi abordada como um achado secundário, foi aplicado um filtro aos estudos classificados na categoria 2 (C2) baseado na identificação da importância (centralidade) da molécula em relação aos resultados e conclusões apresentadas. Subsequentemente, os trabalhos obtidos nessa categoria foram filtrados também para seleção somente das investigações no contexto de neoplasias hematológicas. Por fim, o conjunto definitivo de estudos obtidos para análise mais detalhada foi dado pela totalidade dos estudos classificados como C1 (i.e., que abordam diretamente a regulação de ICs) e os trabalhos de C2 obtidos após filtragem com base nos critérios de centralidade da molécula de miRNA e contextualizados na investigação de neoplasias hematológicas.

4 Resultados

O desenvolvimento deste trabalho compreende três etapas principais, a saber: 1) Processamento e análise exploratória dos dados do *dataset* GSE147228; 2) Predição de interações entre os miRNAs abundantes com moléculas reguladoras de ICs; e 3) Prospecção e sistematização de evidências da atividade dos miRNAs com base em trabalhos da literatura. Os resultados de cada etapa são detalhados nas seções a seguir.

4.1 Perfil de expressão e abundância de miRNAs em células Akata

A **Figura 2** apresenta o resultado da PCA realizada com base no *dataset* GSE147228. Os componentes principais PC1 e PC2 explicam aproximadamente 98,65% da variância total, sendo que PC1 é responsável por 97,18% da variância. Esse resultado evidencia que a variabilidade global da expressão dos miRNAs identificados nas células Akata é impulsionada por um conjunto específico dessas moléculas. A distribuição dos miRNAs segundo PC1 (**Figura 2** e **Tabela A2**) revelam que 6 miRNAs humanos contribuem mais significativamente para a variação: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p e hsa-miR-142-5p. A posição dos miRNAs na PCA e o elevado índice de qualidade ($\cos^2$) obtido para suas coordenadas na análise sugerem que esses miRNAs são especialmente relevantes no perfil de expressão transcricional obtido das células Akata infectadas pelo EBV.

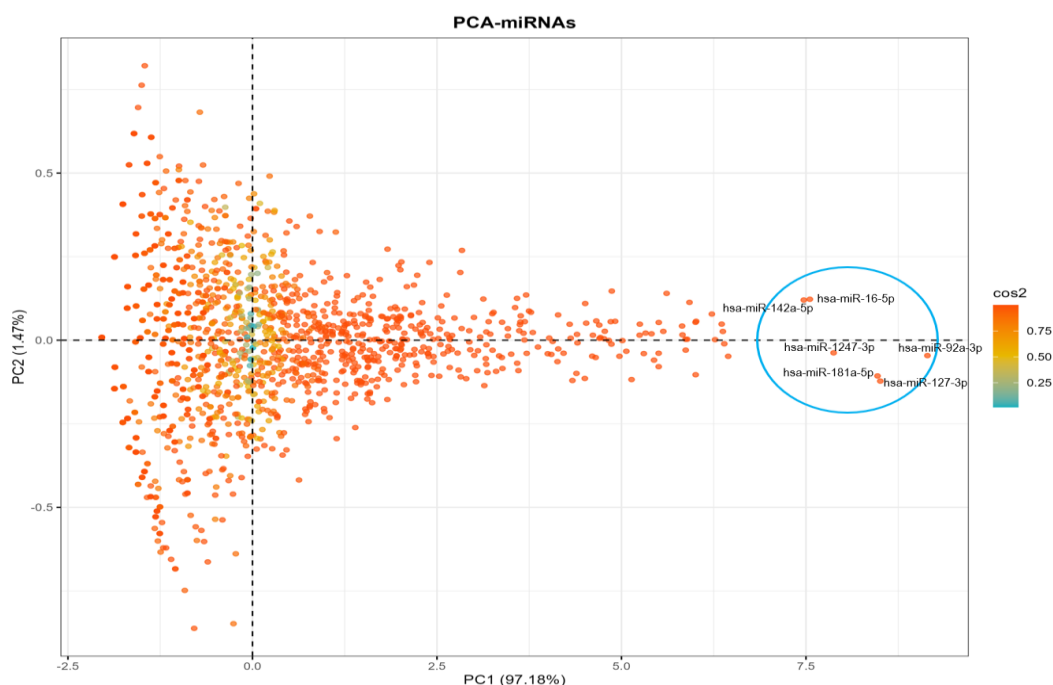


FIGURA 2- Análise de Componentes Principais (PCA) de 2.400 miRNAs a partir de dados do *dataset* GSE147228. Resultado baseado em contagens normalizadas (COM) e log-transformadas. Observa-se que o primeiro componente (PC1) segrega um pequeno grupo de miRNAs (círculo em azul). A cor dos pontos remete à qualidade

da representação na PCA ($\cos^2$). Em ordem decrescente de PC1, os seis miRNAs são: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p e hsa-miR-142-5p. Análise e visualização geradas com R+RStudio.

Conforme notado na **Figura 2**, os dados do *dataset* GSE147228 apresentam ampla variação nos níveis de expressão dos miRNAs detectados nas células Akata infectadas pelo EBV. A **Figura 3** apresenta os 20 miRNAs mais abundantes identificados. Os dados normalizados de CPM são apresentados na **Tabela A1**. Os 6 miRNAs segregados pelo alto valor de PC1 na PCA (**Figura 2**) apresentaram valores médios de CPM superior a 40.000, destacando-se dentre os 20 miRNAs mais abundantes.

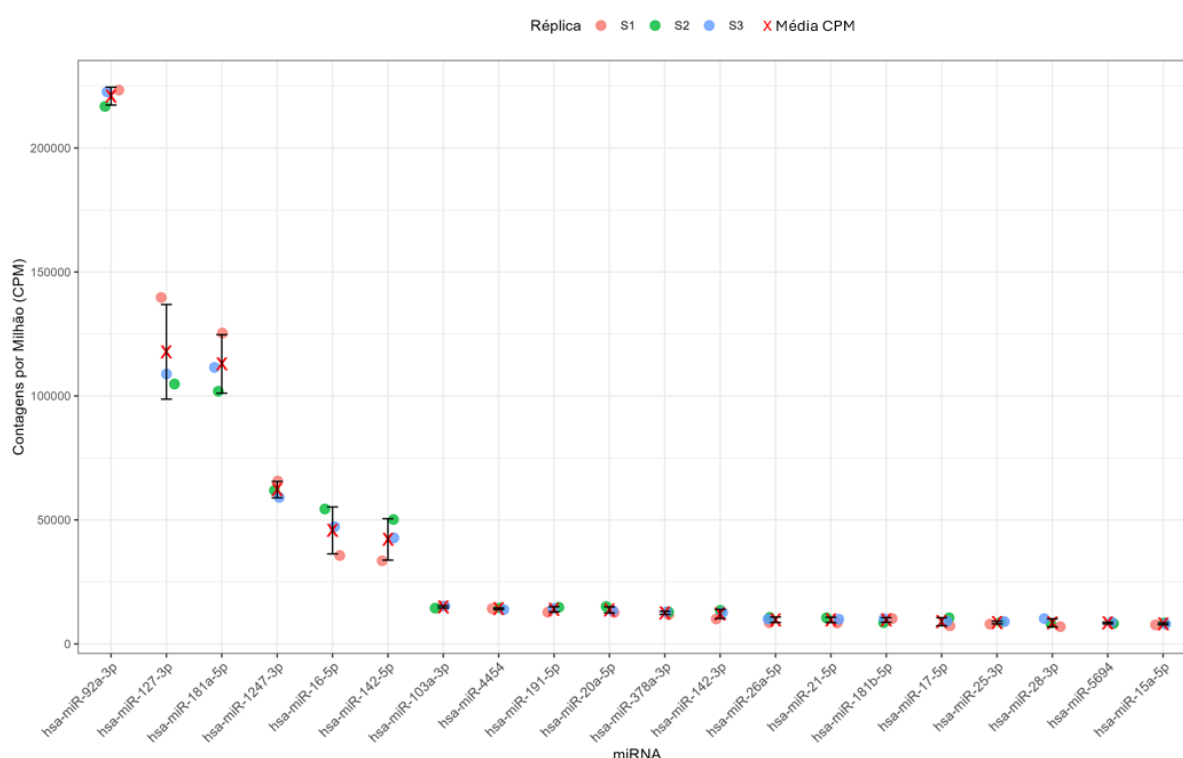


FIGURA 3- Análise da abundância de miRNAs expressos em células Akata EBV-positivas com base no *dataset* GSE147228. Representação dos 20 miRNAs mais abundantes identificados, com base em suas contagens normalizadas (CPM) para cada uma das replicatas biológicas (S1, S2 e S3) e valor médio (marcação com “x”, em vermelho) e desvio padrão. Análise e visualização geradas com R+RStudio.

4.2 Predição de interações entre os miRNAs e genes de moléculas de ICs

A fim de ordenar os miRNAs de modo a se identificar aqueles com maior potencial para regulação de ICs em células linfóides, após a predição de alvos na plataforma mirDIP foi realizado o cálculo SPR conforme descrito previamente (Seção 3.3). Assim, os 6 miRNAs mais abundantes identificados no *dataset* GSE147228 (**Figura 2**) foram ordenados em ordem decrescente do SPR calculado, pontuação que combina os resultados da PCA aos resultados de

força de predição de alvos estimados na plataforma mirDIP. Essa abordagem evidenciou o hsa-miR-92a-3p como miRNA humano com a maior pontuação de SPR, seguido de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-142-5p e hsa-miR-1247-3p.

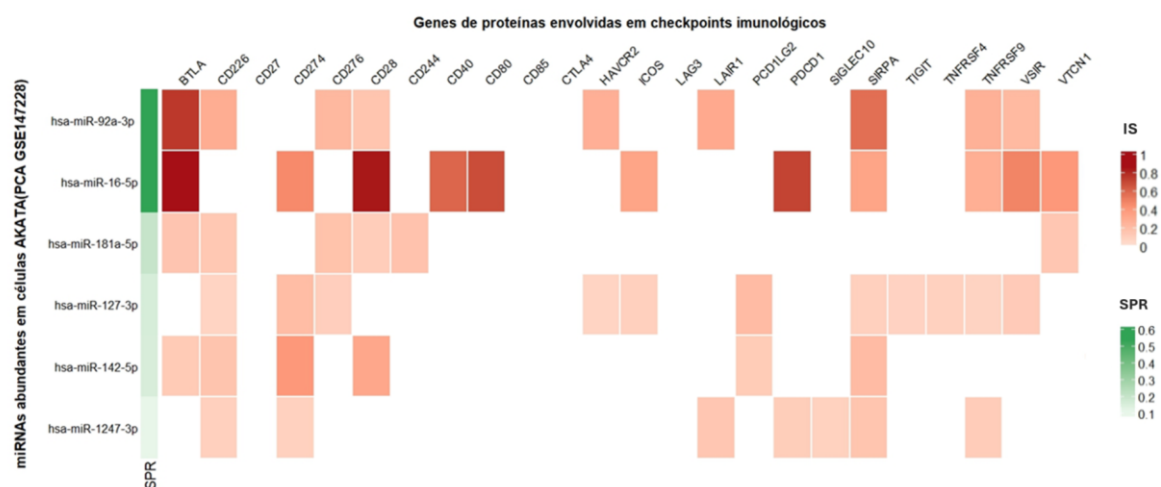


FIGURA 4-Estimativa do potencial regulatório dos 6 miRNAs identificados como mais abundantes em células Akata EBV-positivas (dados do dataset GSE147228) em relação a genes selecionados que codificam moléculas com papel em *checkpoints* imunitários (ICs). A intensidade da cor vermelha na intersecção de cada miRNA (eixo das ordenadas) com uma molécula de IC (eixo das abcissas) correspondem ao valor do score integrado (IS) obtido plataforma mirDip. Os miRNAs estão listados em ordem decrescente de acordo com seu Score Ponderado de Regulação (SPR), calculado com base nos resultados de abundância do miRNA no modelo experimental indicado (análise PCA) e a força de predição em relação a genes participantes de ICs (IS do mirDip). Análise e visualização geradas com R+RStudio.

4.3 Prospecção de evidências biológicas por revisão sistematizada da literatura

A partir de um conjunto inicial de 623 documentos únicos obtidos em busca da literatura sobre os seis miRNAs identificados como mais abundantes nas células Akata EBV-positivas (dataset GSE147228), procedeu-se a classificação e seleção dos trabalhos publicados conforme indicado na **Seção 3.4**. A **Figura 5** sumariza a sistemática do processo de seleção dos trabalhos que subsidiaram a análise de relevância dos miRNAs quanto ao seu potencial como regulador de ICs.

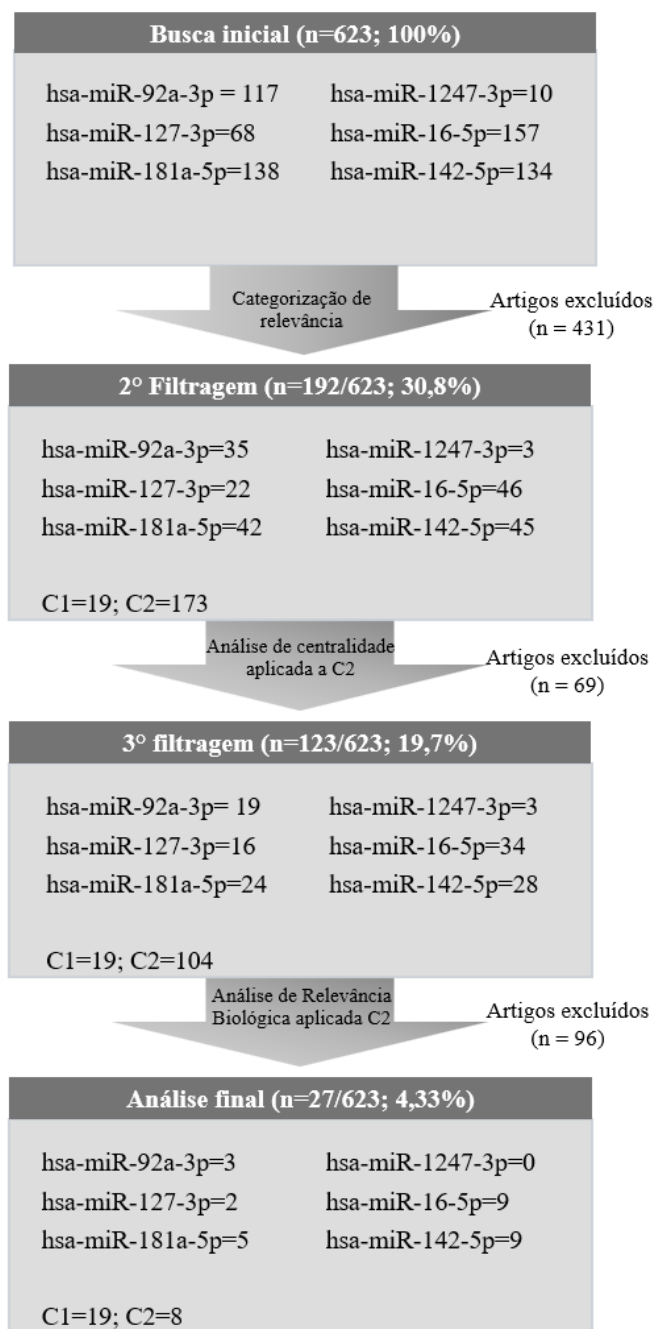


FIGURA 5-Processo de revisão sistematizada da literatura para contextualizar a relevância biológica dos 6 miRNAs identificados como mais abundantes em células Akata EBV-positivas, conforme dados do *dataset* GSE147228. A seleção dos estudos foi efetuada pela filtragem dos estudos de acordo com os critérios definidos para as categorias de relevância C1- Estudos com evidência direta de regulação de ICs; C2- Estudos com evidência funcional/mecanicista do miRNA com fenômenos relevantes na biologia dos cânceres; C3- Estudos com evidência funcional/mecanicista de envolvimento de lncRNAs/circRNAs; e C4- Estudos com informações correlacionais/descriptivas. Os estudos que se enquadravam em múltiplas categorias foram classificados na categoria de maior prioridade; por exemplo, trabalhos focados em lncRNA (C3) com dados de interação com moléculas de ICs (C1) foram classificados na categoria C1, de maior nível de relevância frente aos objetivos deste trabalho.

A triagem inicial e aplicação da categorização para classificação dos miRNAs proporcionou a remoção de todos os estudos classificados em C3 (foco em interações com *lncRNAs/circRNAs*; n=129) e C4 (estudos descritivos ou correlacionais; n=302). Consequentemente, foram obtidos 192 documentos para a seleção subsequente, sendo 19 (3,04%) identificados em C1 (evidência direta com ICs) e 173 em C2 (papel biológico do miR). Aos documentos identificados em C2 (n=173) foi aplicado o critério de centralidade do miRNA em análise, resultando na exclusão de 69 documentos (trabalhos nos quais a molécula era elemento secundário da investigação). Aos 104 documentos remanescentes de C2 foi aplicada o filtro de seleção baseado no contexto biológico, obtendo-se 8 trabalhos que expressamente investigam neoplasias hematológicas. Por fim, a aplicação do algoritmo de seleção descrito na **Figura 5** resultou na seleção de 27 documentos, sendo 19 (3,0%) trabalhos previamente categorizados como C1 e 8 (1,3%) trabalhos categorizados como C2.

O **Quadro 2** sumariza as informações dos 19 estudos classificados como C1, com dados sobre a relação entre algum dos miRNAs abundantes identificados no *dataset* GSE147228 e moléculas de ICs, 1 dos quais investigavam neoplasias hematológicas. Nesse conjunto de 19 trabalhos, 14 (2,2%) apresentam alguma validação experimental da regulação de ICs, 3 (0,5%) apresentaram apenas dados de predição *in silico*, 1 (0,2%) trabalho não encontrou correlação entre o miRNA e a molécula de IC na investigação realizada e 1 (0,2%) descreve o miRNA como biomarcador preditivo de terapia com nivolumabe e a molécula de IC como um biomarcador prognóstico; entretanto, o estudo não investiga uma relação direta entre o miRNA e a molécula de IC. Os 8 artigos classificados como C2 abordam principalmente o papel dos miRNAs em mecanismos moleculares de sinalização de vias, maturação de células eritróides e manutenção, diferenciação e transformação celular na patogênese de doenças hematológicas. Desses 8 trabalhos, 6 (75%) tratam da patogênese de leucemias, 1 (12,5%) investiga o DLBCL e 1 (12,5%) analisa o sarcoma de kaposi, doença causada pela infecção pelo KSHV.

QUADRO 2- Estudos que investigam a relação entre os miRNAs selecionados e moléculas de *checkpoint* imunológico (ICs) identificados após sistematização de evidências da literatura

miRNA / Refs	Checkpoint alvo	Contexto	Principais achados
hsa-miR-92a-3p			
Jieke Cui <i>et.al</i> (2018) ^[84]	TIM3, LAG3, PD-1, CTLA4	Microvesículas leucêmicas	Promove exaustão de células T via proteínas específicas aumentando expressão de moléculas de ICs
Ting Li <i>et. al</i> (2022) ^[85]	PD-1, LAG-3, VISTA, TIM3, IDO1, PD-L1, TIGIT, CTLA-4	Câncer colorretal	Relação predita
Juan Gu <i>et. al</i> (2023) ^[86]	PD-L1	Câncer gástrico	Modula a expressão de PD-L1 indiretamente via PTEN/ERK
hsa-miR-127-3p			
Não foram encontrados estudos			
hsa-miR-181a-5p			
Genova <i>et.al</i> ^[87]	PDL-1	Câncer de pulmão	Sem evidência de regulação direta do miR com a molécula de IC
Ling-Xian Zhang <i>et. al</i> (2022) ^[88]	PD-1	Câncer de pulmão	Relação indireta:miR-181a-5p inibe a expressão de CARM1 → circHMGB2 captura miR-181a-5p → ↑CARM1 e resistência a PD-1
hsa-miR-1247-3p			
Não foram encontrados estudos			
hsa-miR-16-5p			
Chen <i>et. al</i> (2022) ^[89]	PDL-1	Câncer de pulmão	Regula negativamente a expressão de PDL-1
Jun Zhu <i>et.al</i> (2023) ^[90]	CASP6/CASP8 (podem ser relacionados a ICs)	Câncer de pâncreas	Relação predita
Guo-Rong Chen <i>et. al</i> (2023) ^[91]	PDL-1	Glioma	Relação predita
Shekarchi <i>et. al</i> (2024) ^[92]	PD-1, TIM-3	Não tem relação com câncer	miR-16-5p tem uma correlação temporal inversa com <i>checkpoints</i> PD-1 e TIM-3
Layani <i>et. al</i> (2025) ^[93]	CD40 e CD80	Melanoma	Influencia os padrões de expressão das proteínas de <i>checkpoint</i> no melanoma

miRNA / Refs	Checkpoint alvo	Contexto	Principais achados
Zhengtian Li <i>et. al</i> (2020) ^[94]	PDL-1	Câncer gástrico	Exossomos M1 com miR-16-5p → ativam células T via PD-L1 → inibem progressão de GC
Jieke Cui <i>et. al</i> (2018) ^[84]	TIM3, LAG3, PD-1, CTLA4	Microvesículas leucêmicas	Promove exaustão de células T via proteínas específicas aumentando expressão de moléculas de ICs
Palamarchuk <i>et. al</i> (2022) ^[95]	PDL-1	Cultura de células	miR-15/16 → inibe PD-1 e PD-L1 → reduz sinalização inibitória → favorecendo resposta imune
hsa-miR-142-5p			
Long Jia <i>et. al</i> (2017) ^[96]	PD-L1	Câncer de pâncreas	Atua como supressor tumoral → inibindo PD-L1
Dawidowicz <i>et. al</i> (2021) ^[97]	PD-L1	Câncer colorretal	A associação direta não foi validada neste estudo.
Yafei Zhang <i>et. al</i> (2025) ^[98]	PD-L1	Câncer de esôfago	Regula negativamente PDL-1, promovendo efeito antitumoral
Yun Jiang <i>et. al</i> (2021) ^[99]	PD-L1	Câncer de pulmão	OIP5-AS1 atua como esponja → regulando negativamente miR-142-5p → atua em PDL-1
Ling <i>et. al</i> (2022) ^[100]	PDL-1	Câncer cervical	HPV16 E6/E7 → ↓ miR-142-5p (supressor tumoral) → ↑ PD-L1 → escape imune
Wan <i>et. al</i> (2018) ^[101]	PDL-1	Câncer de pulmão	miR-142-5p → regula células CD4+ T via PTEN que modula PDL-1
ChenfeiZhou <i>et. al</i> (2020) ^[102]	IDO	Câncer cervical	miR-142-5p → baixa expressão de promove escape imune ao induzir IDO via ARID2/DNMT1/IFN-γ

5 Discussão

Neste trabalho foi realizada a prospecção de miRNAs com potencial de regulação de moléculas de ICs partindo do *dataset* GSE147228, que apresenta dados sobre a expressão de ncRNAs humanos e virais em células EBV-positivas da linhagem Akata, derivada de BL. Em síntese, os resultados evidenciaram seis miRNAs humanos como abundantemente expressos nas células linfoides malignas: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-142-5p. Subsequentemente foi realizada análise *in silico* para prever e estimar a regulação de genes codificadores de moléculas de ICs pelos miRNAs identificados, seguido de revisão sistematizada da literatura para levantamento de evidências experimentais da participação desses miRNAs em processos de regulação imunitária e linfomagenese. A combinação dessas três abordagens culminou na identificação do hsa-miR-92a-3p como um miRNA de potencial mais promissor para validação experimental quanto ao seu papel na regulação da expressão de moléculas de IC.

A fim de estimar a importância relativa de cada miRNA na regulação de moléculas de ICs, estabelecemos o *Score* Ponderado de Regulação (SPR) – métrica composta pelos dados de abundância da PCA e da análise de predição de alvos dentre moléculas de IC selecionadas. Os miRNAs hsa-miR-92a-3p e hsa-miR-16-5p apresentaram os valores mais elevados de SPR, seguidos dos miRs hsa-miR-127-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-1247-3p e hsa-miR-142-5p. Esse resultado qualifica esses quatro últimos miRNAs como candidatos menos promissores, evidenciando o hsa-miR-92a-3p como candidato principal, seguido do hsa-miR-16-5p – ambos moléculas com evidências relevantes de regulação de ICs.

O levantamento sistematizado de trabalhos da literatura (623 artigos, originalmente) e a análise minuciosa dos estudos selecionados com base em critérios de categorização (C1-4) que refletem os objetivos do presente trabalho revelou que a maioria dos estudos (n=431, 69,2%) abordava os miRNAs de interesse sob a perspectiva de sua utilidade como biomarcadores (C4; 302 estudos, 48,5%) ou como moléculas em eixos regulatórios envolvendo lncRNAs/circRNAs (C3; 129 estudos, 20,7%). Em contraste, foram obtidos 192 estudos (30,8% do total inicial de documentos) nas categorias mais relevantes frente aos objetivos deste trabalho (C1 e C2). A associação do miRNA com moléculas de ICs (Categoria C1) foi identificada em apenas 19 estudos (3,0%); por sua vez, um papel central do microRNA no trabalho (C2), que inicialmente compreendeu 173 dos 623 (27,8%) documentos, foi identificada em apenas 8 estudos (1,3%), quando considerados os critérios de centralidade do miRNA e foco em neoplasias hematológicas. Esses resultados evidenciam uma carência de estudos sobre os miRNAs

humanos identificados, especialmente quanto ao seu papel como potenciais reguladores de ICs no contexto de neoplasias hematológicas, em geral, e nos linfomas, em particular

Em modelo murino *knockout* Pbx1 o miR-127-3p foi o mais diferencialmente expresso e altamente específico em células-tronco hematopoéticas, além de ter sido um miRNA significativamente sub-regulado em células endoteliais infectadas pelo KSHV^[103,104]. O miR-181a e o miR-142-3p já tiveram papéis observados em células de leucemia linfocítica crônica (*Chronic Lymphocytic Leukemia* - CLL), leucemia linfoblástica aguda (*Acute Lymphoblastic Leukemia* - ALL), leucemia mielóide crônica (*Chronic Myeloid Leukemia* - CML), leucemia mielóide aguda (*Acute Myeloid Leukemia*-AML) e DLBCL – seja por meio da inibição direta de genes e proteínas, regulação de vias como Wnt/ β -catenina, indução e inibição de proliferação ou ligações diretas a mutações associadas ao gene/doença ^[105–109]. Similarmente, o miR-16-5p foi associado a processos de proliferação e diferenciação em células leucêmicas.^[110] Em conjunto, esses dados subsidiam a percepção de relevância desses miRNAs em cânceres hematológicos, sinalizando a importância de maior investigação dessas moléculas na patogênese de linfomas e leucemias.

Dentre os 19 trabalhos publicados categorizados como C1, 14 (74%) apresentaram alguma validação experimental da regulação, indicando que, embora existam evidências da relação desses miRNAs com moléculas de ICs, o tema é subexplorado. A análise dos estudos categorizados em C1 (**Quadro 2**) revelou que o hsa-miR-16-5p e o hsa-miR-142-5p são investigados na maioria dos estudos, totalizando 12 artigos com validação experimental. As evidências identificadas na literatura demonstram que o miR-16-5p pode atuar de modo semelhante a um gene supressor tumoral e regular a resposta imunitária ao interagir diretamente com o transcrito de múltiplos genes-alvos codificadores de moléculas de ICs, tais como PD-L1, PD-1, CD40 e CD80^[89,95,94,93]. Por outro lado, Cui et. al (2018) observaram o miR-16-5p sendo exportado por microvesículas de células leucêmicas como mecanismo de exaustão de células T por interferência na ação de diversas moléculas de ICs, como PD-1, CTLA-4, TIM3^[84]. Digno de nota, a função do hsa-miR-16-5p como um regulador da expressão de ICs às células T no TME, pois um houve uma forte correlação inversa entre este miRNA com PD-1 e TIM-3 em contexto de investigação observacional de imunologia da gestação^[92].

A literatura sobre o miR-142-5p mostra que ele já foi identificado como um supressor tumoral que potencializa a resposta imunitária ao mirar diretamente o PDL-1, e como um promotor do escape imune em vasos linfáticos ao induzir exaustão das células T viaIDO através de interações complexas^[96,99,98,100,102,101]. A respeito do hsa-miR-181a-5p foi observada uma

regulação indireta em câncer de pulmão: quando este miRNA é sequestrado por circHMGB2, níveis de CARM1 aumentam, levando à resistência ao tratamento com inibidores de PD-1^[88].

Ao analisar a literatura referente ao candidato de menor pontuação segundo o SPR, o hsa-miR-1247-3p, verificamos ausência de estudos na categoria C1 e uns poucos trabalhos C2 que associam esse miRNA a outras funções biológicas. A luz das evidências atualmente disponíveis, esse resultado sugere que este miR ainda não possui um papel relevante estabelecido na regulação imunitária e de forma mais ampla é pouco explorado em outros contextos, apesar de sua elevada abundância relativa observada nos dados de expressão do *dataset* GSE147228.

O hsa-miR-92a-3p apresentou o valor mais elevado de SPR, sendo posicionado como o candidato mais promissor para a regulação de moléculas de ICs (**Figura 4**). Com base no levantamento de dados da literatura, foram identificados dois estudos relacionando esse miRNA diretamente à regulação imunitária, um dos quais relacionado às neoplasias hematológicas – contexto biológico de interesse nesta pesquisa. Nos estudos de Juan Gu *et al.* (2023)^[86] o miR aparece como um mediador crítico da comunicação tumoral via exossomos, regulando indiretamente a expressão de PD-L1, o que o posiciona como um alvo terapêutico promissor. Jieke Cui *et al.* (2018)^[84] avaliaram o papel de miRNAs exportados por células leucêmicas via exossomos/microvesículas. Em síntese, os autores relataram que o hsa-miR-92a-3p pode atuar como um mensageiro parácrino que induz disfunção de respostas imunitárias por diferentes vias, seja exercendo um papel imunoregulador indireto sobre a expressão de PD-L1 via PTEN/ERK ou induzindo a exaustão de células T pela superexpressão de múltiplos ICs (PD-1, CTLA-4, TIM3) – um processo possivelmente modulado pela via NF-κB. Essas observações sugerem que a exportação ativa desses miRNAs em vesículas é um mecanismo de escape tumoral utilizado por cânceres para desativar o sistema imune à distância e promover um fenótipo imunossupressor^[86,84]. A participação relatada da via NF-κB^[84] é informação particularmente relevante em nossa pesquisa, posto que essa via constitui um eixo central na imunopatogênese da infecção pelo EBV^[111], o que reforça a possibilidade de mecanismos semelhantes ocorrerem em linfomas associados a esse vírus, como o BL, representado neste estudo pela linhagem Akata.

Coletivamente, os resultados baseados na análise exploratória do *dataset* GSE147228, análises *in silico* e a revisão sistematizada de literatura evidenciaram dois miRNAs como candidatos promissores para investigação experimental subsequente, por indícios substanciais de apresentarem elevado potencial para regulação de ICs em células linfóides. Tanto o hsa-miR-92a-3p como o hsa-miR-16-5p apresentaram os resultados mais robustos nas análises

exploratória (PCA) e classificatória (SPR) efetuadas, além de evidências diretas de algum envolvimento na regulação de ICs (**Quadro 2**). Para continuidade desta pesquisa, considerando sua posição como o candidato de maior relevância no modelo celular Akata e seu maior potencial de originalidade científica, considerando que o papel do hsa-miR-16-5p já foi previamente investigado.^[89,92–94,84,95]

6 Considerações finais

Com base no exposto, o hsa-miR-92a-3p confirmou-se como um alvo prioritário para etapas de validação experimental. Essa priorização fundamentou-se na sua elevada abundância no modelo de linfoma infectado pelo EBV (células Akata), no seu forte potencial regulatório sobre moléculas de ICs e na existência de evidências científicas preliminares que corroboram sua relevância, embora este miRNA ainda permaneça pouco investigado, configurando uma importante lacuna de conhecimento.

A identificação deste alvo demonstra que a integração de grandes conjuntos de dados transcriptômicos é uma estratégia custo-efetiva e metodologicamente consistente para a descoberta científica, permitindo a transição segura da análise computacional para a experimentação *in vitro*. Em suma, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre mecanismos de controle pós-transcricional de moléculas de *checkpoints* imunológicos em cânceres associados ao EBV, orientando de maneira fundamentada futuras investigações na área.

Embora o delineamento experimental tenha sido readequado para priorizar o rigor na seleção e na análise do alvo, o presente trabalho cumpriu o objetivo fundamental de identificar e priorizar um alvo molecular de maior relevância. Assim, o plano de continuidade deste estudo, seja no âmbito deste projeto ou como linha de investigação para pesquisadores subsequentes, encontra-se devidamente amparado e subsidiado pelas evidências aqui estabelecidas.

Referências Bibliográficas

- [1] Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020; 10:a034819. DOI:10.1101/cshperspect.a034819 | PMID: 31727680; PMCID: PMC7263093.
- [2] Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma:Diagnosis and Treatment. 2020; 101:
- [3] Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory. n.d. <https://gco.iarc.fr/> (Accessed: 11/Apr/2024)
- [4] Chu Y, Liu Y, Fang X, Jiang Y, Ding M, Ge X, Yuan D, Lu K, Li P, Li Y, Xu H, Fan J, Zhou X, Wang X. The epidemiological patterns of non-Hodgkin lymphoma: global estimates of disease burden, risk factors, and temporal trends. *Front Oncol*. 2023; 13:1059914. DOI:10.3389/fonc.2023.1059914 | PMID: 37333805; PMCID: PMC10272809.
- [5] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71:. DOI:10.3322/CAAC.21660 | PMID: 33538338.
- [6] WHO Classification of Tumours Editorial Board. B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. *Haematolymphoid Tumours*, vol. 11, pt. B. 5th ed., Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2024
- [7] Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2022; 97:1478–88. DOI:10.1002/ajh.26717 | PMID: 36215668.
- [8] Opinto G, Agostinelli C, Ciavarella S, Guarini A, Maiorano E, Ingravallo G. Hodgkin Lymphoma: A Special Microenvironment. *JCM*. 2021; 10:4665. DOI:10.3390/jcm10204665
- [9] Weniger MA, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2021; 35:968–81. DOI:10.1038/s41375-021-01204-6 | PMID: 33686198; PMCID: PMC8024192.
- [10] Connors JM, Cozen W, Steidl C, Carbone A, Hoppe RT, Flechtner H-H, Bartlett NL. Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6:61. DOI:10.1038/s41572-020-0189-6 | PMID: 32703953.
- [11] Singh R, Shaik S, Negi BS, Rajguru JP, Patil PB, Parihar AS, Sharma U. Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *J Family Med Prim Care*. 2020; 9:1834–40. DOI:10.4103/jfmpe.jfmpe_1037_19 | PMID: 32670927; PMCID: PMC7346945.
- [12] Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Padala SA, Barsouk A, Rawla P. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*. 2021; 9:5. DOI:10.3390/medsci9010005 | PMID: 33573146; PMCID: PMC7930980.
- [13] Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JWM, Mhlanga MM, Mulder WJM, Riksen NP, Schlitzer A, Schultze JL, Stabell Benn C, Sun JC, Xavier RJ, Latz E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20:375–88. DOI:10.1038/s41577-020-0285-6 | PMID: 32132681; PMCID: PMC7186935.
- [14] Bahl A, Pandey S, Rakshit R, Kant S, Tripathi D. Infection-induced trained immunity: a twist in paradigm of innate host defense and generation of immunological

- memory. *Infect Immun.* 2025; 93:e0047224. DOI:10.1128/iai.00472-24 | PMID: 39655962; PMCID: PMC11784091.
- [15] Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018; 14:49. DOI:10.1186/s13223-018-0278-1 | PMID: 30263032; PMCID: PMC6156898.
- [16] Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host & Microbe.* 2019; 25:13–26. DOI:10.1016/j.chom.2018.12.006
- [17] Wang R, Lan C, Benlagha K, Camara NOS, Miller H, Kubo M, Heegaard S, Lee P, Yang L, Forsman H, Li X, Zhai Z, Liu C. The interaction of innate immune and adaptive immune system. *MedComm.* 2024; 5:e714. DOI:10.1002/mco2.714
- [18] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018; 32:1267–84. DOI:10.1101/gad.314617.118 | PMID: 30275043.
- [19] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011; 144:646–74. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013 | PMID: 21376230.
- [20] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022; 12:31–46. DOI:10.1158/2159-8290.CD-21-1059 | PMID: 35022204.
- [21] Tufail M, Jiang C-H, Li N. Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Sig Transduct Target Ther.* 2025; 10:227. DOI:10.1038/s41392-025-02280-1
- [22] Xu J, editor. Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy. vol. 1248 Singapore: Springer Singapore, 2020. DOI:10.1007/978-981-15-3266-5
- [23] Alemohammad H, Najafzadeh B, Asadzadeh Z, Baghbanzadeh A, Ghorbaninezhad F, Najafzadeh A, Safarpour H, Bernardini R, Brunetti O, Sonnessa M, Fasano R, Silvestris N, Baradaran B. The importance of immune checkpoints in immune monitoring: A future paradigm shift in the treatment of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022; 146:112516. DOI:10.1016/j.biopha.2021.112516
- [24] Zhang Y, Zheng J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1248:201–26. DOI:10.1007/978-981-15-3266-5_9 | PMID: 32185712.
- [25] García-Domínguez DJ, Hontecillas-Prieto L, Palazón-Carrión N, Jiménez-Cortegana C, Sánchez-Margalet V, de la Cruz-Merino L. Tumor Immune Microenvironment in Lymphoma: Focus on Epigenetics. *Cancers.* 2022; 14:1469. DOI:10.3390/cancers14061469
- [26] Toor SM, Sasidharan Nair V, Decock J, Elkord E. Immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2020; 65:1–12. DOI:10.1016/j.semcancer.2019.06.021 | PMID: 31265893.
- [27] Csizmar CM, Ansell SM. Engaging the Innate and Adaptive Antitumor Immune Response in Lymphoma. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:3302. DOI:10.3390/ijms22073302 | PMID: 33804869; PMCID: PMC8038124.
- [28] Khurana A, Ansell SM. Role of Microenvironment in Non-Hodgkin Lymphoma: Understanding the Composition and Biology. *Cancer J.* 2020; 26:206–16. DOI:10.1097/PPO.0000000000000446 | PMID: 32496454.

- [29] Hu B, Jacobs R, Ghosh N. Checkpoint Inhibitors Hodgkin Lymphoma and Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018; 13:543–54. DOI:10.1007/s11899-018-0484-4
- [30] Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, Angin M, Wakeham A, Greenfield EA, Sobel RA, Okada H, McKinnon PJ, Mak TW, Addo MM, Anderson AC, Kuchroo VK. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med*. 2012; 18:1394–400. DOI:10.1038/nm.2871 | PMID: 22863785; PMCID: PMC3491118.
- [31] Farrell PJ. Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annu Rev Pathol*. 2019; 14:29–53. DOI:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023 | PMID: 30125149.
- [32] Zapatka M, Borozan I, Brewer DS, Iskar M, Grundhoff A, Alawi M, Desai N, Sülthmann H, Moch H, PCAWG Pathogens, Cooper CS, Eils R, Ferretti V, Lichter P, PCAWG Consortium. The landscape of viral associations in human cancers. *Nat Genet*. 2020; 52:320–30. DOI:10.1038/s41588-019-0558-9 | PMID: 32025001; PMCID: PMC8076016.
- [33] Roizman B. Introduction: definition and classification of the human herpesviruses. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Cambridge University Press, 2007
- [34] Weed DJ, Damania B. Pathogenesis of Human Gammaherpesviruses: Recent Advances. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2019; 6:166–74. DOI:10.1007/s40588-019-00127-2 | PMID: 33134035; PMCID: PMC7597832.
- [35] Johnson KE, Tarakanova VL. Gammaherpesviruses and B Cells: A Relationship That Lasts a Lifetime. *Viral Immunol*. 2020; 33:316–26. DOI:10.1089/vim.2019.0126 | PMID: 31913773; PMCID: PMC7247026.
- [36] Münz C. The Role of Lytic Infection for Lymphomagenesis of Human γ -Herpesviruses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:605258. DOI:10.3389/fcimb.2021.605258 | PMID: 33842383; PMCID: PMC8034291.
- [37] Yu H, Robertson ES. Epstein-Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*. 2023; 15:714. DOI:10.3390/v15030714 | PMID: 36992423; PMCID: PMC10056551.
- [38] Damania B, Kenney SC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*. 2022; 185:3652–70. DOI:10.1016/j.cell.2022.08.026
- [39] Shannon-Lowe C, Rickinson A. The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Front Oncol*. 2019; 9:713. DOI:10.3389/fonc.2019.00713 | PMID: 31448229; PMCID: PMC6691157.
- [40] Silva J de M, Alves CE de C, Pontes GS. Epstein-Barr virus: the mastermind of immune chaos. *Front Immunol*. 2024; 15:1297994. DOI:10.3389/fimmu.2024.1297994 | PMID: 38384471; PMCID: PMC10879370.
- [41] Cesarman E, Damania B, Krown SE, Martin J, Bower M, Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5:9. DOI:10.1038/s41572-019-0060-9 | PMID: 30705286; PMCID: PMC6685213.
- [42] Cesarman E, Chadburn A, Rubinstein PG. KSHV/HHV8-mediated hematologic diseases. *Blood*. 2022; 139:1013–25. DOI:10.1182/blood.2020005470 | PMID: 34479367; PMCID: PMC8854683.
- [43] Cai H, Liu G, Zhong J, Zheng K, Xiao H, Li C, Song X, Li Y, Xu C, Wu H, He Z, Zhu Q. Immune Checkpoints in Viral Infections. *Viruses*. 2020; 12:1051. DOI:10.3390/v12091051 | PMID: 32967229; PMCID: PMC7551039.

- [44] Biggi AFB, Elgui de Oliveira D. The Epstein-Barr Virus Hacks Immune Checkpoints: Evidence and Consequences for Lymphoproliferative Disorders and Cancers. *Biomolecules*. 2022; 12:397. DOI:10.3390/biom12030397 | PMID: 35327589; PMCID: PMC8946074.
- [45] Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, Gill D, Marlton P, Seymour J, Khanna R. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood*. 2006; 108:2280–9. DOI:10.1182/blood-2006-04-015164 | PMID: 16757686.
- [46] Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O'Donnell E, Neuberg D, Shipp MA. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:1611–8. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1942 | PMID: 22271878; PMCID: PMC3321508.
- [47] Bauer M, Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Wickenhauser C, Seliger B. Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies and Immune Escape: The Role of the Tumor Microenvironment and Tumor Cell Evasion Strategies. *Cancers (Basel)*. 2021; 13:5189. DOI:10.3390/cancers13205189 | PMID: 34680337; PMCID: PMC8533749.
- [48] Salik B, Smyth MJ, Nakamura K. Targeting immune checkpoints in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2020; 13:111. DOI:10.1186/s13045-020-00947-6 | PMID: 32787882; PMCID: PMC7425174.
- [49] Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*. 2023; 24:816–33. DOI:10.1038/s41576-023-00611-y
- [50] Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*. 2019; 179:1033–55. DOI:10.1016/j.cell.2019.10.017
- [51] Kim H, Lee Y-Y, Kim VN. The biogenesis and regulation of animal microRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2025; 26:276–96. DOI:10.1038/s41580-024-00805-0
- [52] He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, Xie H, Peng X, Yin W, Tao Y, Wang X. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020; 16:2628–47. DOI:10.7150/ijbs.47203 | PMID: 32792861; PMCID: PMC7415433.
- [53] Inoue J, Inazawa J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. *J Hum Genet*. 2021; 66:937–45. DOI:10.1038/s10038-021-00938-6
- [54] Kanwal N, Al Samarraï O, Al-Zaidi HMH, Mirzaei A, Heidari M. Comprehensive analysis of microRNA (miRNA) in cancer cells. *Cell Mol Biomed Rep*. 2023; 3:89–97. DOI:10.55705/cmbr.2022.364591.1070
- [55] Arghiani N, Shah K. Modulating microRNAs in cancer: next-generation therapies. *Cancer Biol Med*. 2021; 19:289–304. DOI:10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0294 | PMID: 34846108; PMCID: PMC8958885.
- [56] Smolle MA, Prinz F, Calin GA, Pichler M. Current concepts of non-coding RNA regulation of immune checkpoints in cancer. *Mol Aspects Med*. 2019; 70:117–26. DOI:10.1016/j.mam.2019.09.007 | PMID: 31582259.
- [57] Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, Welsh J, Calin GA. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2019; 58:244–53. DOI:10.1002/gcc.22725

- [58] Yang Q, Cao W, Wang Z, Zhang B, Liu J. Regulation of cancer immune escape: The roles of miRNAs in immune checkpoint proteins. *Cancer Lett.* 2018; 431:73–84. DOI:10.1016/j.canlet.2018.05.015 | PMID: 29800685.
- [59] García-Giménez JL, Saadi W, Ortega AL, Lahoz A, Suay G, Carretero J, Pereda J, Fatmi A, Pallardó FV, Mena-Molla S. miRNAs Related to Immune Checkpoint Inhibitor Response: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25:1737. DOI:10.3390/ijms25031737
- [60] Souza OF, Popi AF. Role of microRNAs in B-Cell Compartment: Development, Proliferation and Hematological Diseases. *Biomedicines.* 2022; 10:2004. DOI:10.3390/biomedicines10082004
- [61] Lai M, Gonzalez-Martin A, Cooper AB, Oda H, Jin HY, Shepherd J, He L, Zhu J, Nemazee D, Xiao C. Regulation of B-cell development and tolerance by different members of the miR-17~92 family microRNAs. *Nat Commun.* 2016; 7:12207. DOI:10.1038/ncomms12207
- [62] Veryaskina YA, Titov SE, Kovynev IB, Pospelova TI, Fyodorova SS, Shebunyaeva YYu, Sumenkova DV, Zhimulev IF. MicroRNA Expression Profile in Bone Marrow and Lymph Nodes in B-Cell Lymphomas. *Int J Mol Sci.* 2023; 24:15082. DOI:10.3390/ijms242015082 | PMID: 37894763; PMCID: PMC10606460.
- [63] Gao H-X, Li S-J, Wang M-B, Yan S-F, Cui W-L, Ma Z-P, Xue J, Sang W, Zhang W, Li X-X. Screening and identification of differentially expressed microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma based on microRNA microarray. *Oncol Lett.* 2021; 22:753. DOI:10.3892/ol.2021.13014 | PMID: 34539857; PMCID: PMC8436336.
- [64] Sevcikova A, Fridrichova I, Nikolaieva N, Kalinkova L, Omelka R, Martiniakova M, Ciernikova S. Clinical Significance of microRNAs in Hematologic Malignancies and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers.* 2023; 15:2658. DOI:10.3390/cancers15092658
- [65] Paczkowska J, Giefing M. MicroRNA signature in classical Hodgkin lymphoma. *J Appl Genet.* 2021; 62:281–8. DOI:10.1007/s13353-021-00614-7 | PMID: 33544339; PMCID: PMC8032569.
- [66] Drillis G, Goulielmaki M, Spandidos DA, Aggelaki S, Zoumpourlis V. Non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs) and their roles in lymphogenesis in all types of lymphomas and lymphoid malignancies (Review). *Oncology Letters.* 2021; 21:1–17. DOI:10.3892/ol.2021.12654
- [67] Yao J, Zhu Y, Zhang G, Zhou X, Shang H, Li L, Xu T. Action mechanisms and characteristics of miRNAs to regulate virus replication. *Virology.* 2024; 590:109966. DOI:10.1016/j.virol.2023.109966
- [68] Nahand JS, Shojaie L, Akhlagh SA, Ebrahimi MS, Mirzaei HR, Baghi HB, Mahjoubin-Tehran M, Rezaei N, Hamblin MR, Tajiknia V, Rahimian N, Mirzaei H. Cell death pathways and viruses: Role of microRNAs. *Molecular Therapy Nucleic Acids.* 2021; 24:487–511. DOI:10.1016/j.omtn.2021.03.011 | PMID: 33898103.
- [69] Mansour RM, El-Sayyad GS, Hemdan M, Rizk NI, Abdel Mageed SS, Mohammed OA, Mahdy A, Abuelhaded K, Farag SA, Shahin RK, Nassar YA, El-Shora HM, Amin R, Doghish AS. Epstein-Barr virus and human MiRNAs crosstalk: orchestrating latency, lytic cycle, and immune system modulation. *Folia Microbiol (Praha).* 2025. DOI:10.1007/s12223-025-01388-9 | PMID: 41369835.

- [70] Iizasa H, Kim H, Kartika AV, Kanehiro Y, Yoshiyama H. Role of Viral and Host microRNAs in Immune Regulation of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Front Immunol.* 2020; 11:. DOI:10.3389/fimmu.2020.00367
- [71] Kline J, Godfrey J, Ansell SM. The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood.* 2020; 135:523–33. DOI:10.1182/blood.2019000847
- [72] Hatic H, Sampat D, Goyal G. Immune checkpoint inhibitors in lymphoma: challenges and opportunities. *Ann Transl Med.* 2021; 9:1037. DOI:10.21037/atm-20-6833 | PMID: 34277837; PMCID: PMC8267255.
- [73] Marin-Acevedo JA, Soyano AE, Dholaria B, Knutson KL, Lou Y. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol.* 2018; 11:8. DOI:10.1186/s13045-017-0552-6 | PMID: 29329556; PMCID: PMC5767051.
- [74] Armengol M, Santos JC, Fernández-Serrano M, Profitós-Pelejà N, Ribeiro ML, Roué G. Immune-Checkpoint Inhibitors in B-Cell Lymphoma. *Cancers.* 2021; 13:214. DOI:10.3390/cancers13020214
- [75] Müller-Coan BG. Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe. 2022
- [76] Coan BGMü, Oliveira DED. Effects of human microRNAs 100-5p, 192-5p, and 574-3p on proliferation, migration, and gene expression of human immortalized nasopharyngeal cells. 20252025.04.14.648665. DOI:10.1101/2025.04.14.648665
- [77] Biggi AFB. Ação das proteínas LMP1 e RPMS1 do vírus de Epstein- Barr (EBV) na regulação de genes codificadores de proteínas de checkpoint imunológico em células humanas cultivadas in vitro. 2021
- [78] Clough E, Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Lee H, Zhang N, Serova N, Wagner L, Zalunin V, Kochergin A, Soboleva A. NCBI GEO: archive for gene expression and epigenomics data sets: 23-year update. *Nucleic Acids Res.* 2023; 52:D138–44. DOI:10.1093/nar/gkad965 | PMID: 37933855; PMCID: PMC10767856.
- [79] Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol.* 2008; 82:1946–58. DOI:10.1128/JVI.02136-07 | PMID: 18057241; PMCID: PMC2258704.
- [80] Ungerleider N, Bullard W, Kara M, Wang X, Roberts C, Renne R, Tibbetts S, Flemington EK. EBV miRNAs are potent effectors of tumor cell transcriptome remodeling in promoting immune escape. *PLoS Pathog.* 2021; 17:e1009217. DOI:10.1371/journal.ppat.1009217 | PMID: 33956915; PMCID: PMC8130916.
- [81] Takada K, Horinouchi K, Ono Y, Aya T, Osato T, Takahashi M, Hayasaka S. An Epstein-Barr virus-producer line Akata: Establishment of the cell line and analysis of viral DNA. *Virus Genes.* 1991; 5:147–56. DOI:10.1007/BF00571929
- [82] Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild A-C, Tsay M, Lu R, Jurisica I. mirDIP 4.1—integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46:D360–70. DOI:10.1093/nar/gkx1144
- [83] Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the Micronome – Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PLOS ONE.* 2011; 6:e17429. DOI:10.1371/journal.pone.0017429
- [84] Cui J, Li Q, Luo M, Zhong Z, Zhou S, Jiang L, Shen N, Geng Z, Cheng H, Meng L, Yi S, Sun H, Wu F, Zhu Z, Zou P, You Y, Guo A-Y, Zhu X. Leukemia cell-derived

- microvesicles induce T cell exhaustion via miRNA delivery. *OncolImmunology*. 2018; 7:e1448330. DOI:10.1080/2162402X.2018.1448330 | PMID: 29900066.
- [85] Li T, Liu W, Wang C, Wang M, Hui W, Lu J, Gao F. Multidimension Analysis of the Prognostic Value, Immune Regulatory Function, and ceRNA Network of LY6E in Individuals with Colorectal Cancer. *Journal of Immunology Research*. 2022; 2022:5164265. DOI:10.1155/2022/5164265
- [86] Gu J, Chu X, Huo Y, Liu C, Chen Q, Hu S, Pei Y, Ding P, Pang S, Wang M. Gastric cancer-derived exosomes facilitate pulmonary metastasis by activating ERK-mediated immunosuppressive macrophage polarization. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2023; 124:557–72. DOI:10.1002/jcb.30390
- [87] Genova C, Marconi S, Chiorino G, Guana F, Ostano P, Santamaria S, Rossi G, Vanni I, Longo L, Tagliamento M, Zullo L, Dal Bello MG, Dellepiane C, Alama A, Rijavec E, Ludovini V, Barletta G, Passiglia F, Metro G, Baglivo S, Chiari R, Rivoltini L, Biello F, Baraibar I, Gil-Bazo I, Novello S, Grossi F, Coco S. Extracellular vesicles miR-574-5p and miR-181a-5p as prognostic markers in NSCLC patients treated with nivolumab. *Clin Exp Med*. 2024; 24:182. DOI:10.1007/s10238-024-01427-8
- [88] Zhang L-X, Gao J, Long X, Zhang P-F, Yang X, Zhu S-Q, Pei X, Qiu B-Q, Chen S-W, Lu F, Lin K, Xu JJ, Wu Y-B. The circular RNA circHMGB2 drives immunosuppression and anti-PD-1 resistance in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas via the miR-181a-5p/CARM1 axis. *Mol Cancer*. 2022; 21:110. DOI:10.1186/s12943-022-01586-w | PMID: 35525959; PMCID: PMC9077876.
- [89] Chen H-L, Luo Y-P, Lin M-W, Peng X-X, Liu M-L, Wang Y-C, Li S-J, Yang D-H, Yang Z-X. Serum exosomal miR-16-5p functions as a tumor inhibitor and a new biomarker for PD-L1 inhibitor-dependent immunotherapy in lung adenocarcinoma by regulating PD-L1 expression. *Cancer Med*. 2022; 11:2627–43. DOI:10.1002/cam4.4638 | PMID: 35347894; PMCID: PMC9249988.
- [90] Zhu J, Shi Y, Lan S, Wang J, Jiang F, Tang C, Cai Y, Pan Z, Jian H, Fang H, Zhang Y, Zhong F. Dissection of pyroptosis-related prognostic signature and CASP6-mediated regulation in pancreatic adenocarcinoma: new sights to clinical decision-making. *Apoptosis*. 2023; 28:769–82. DOI:10.1007/s10495-023-01823-7 | PMID: 36882663; PMCID: PMC10232623.
- [91] Chen G-R, Zhang Y-B, Zheng S-F, Xu Y-W, Lin P, Shang-Guan H-C, Lin Y-X, Kang D-Z, Yao P-S. Decreased SPTBN2 expression regulated by the ceRNA network is associated with poor prognosis and immune infiltration in low-grade glioma. *Exp Ther Med*. 2023; 25:253. DOI:10.3892/etm.2023.11952
- [92] Shekarchi AA, Hosseini L, Kamrani A, Alipourfard I, Soltani-Zangbar MS, Akbari M, Roshangar L, Aghebati-Maleki L, Chakari-Khiavi F, Chakari-Khiavi A, Motlagh Asghari K, Danaii S, Poulak T, Ahmadian Heris J, Yousefi M. Evaluation of changes in exhausted T lymphocytes and miRNAs expression in the different trimesters of pregnancy in pregnant women. *Mol Biol Rep*. 2024; 51:442. DOI:10.1007/s11033-024-09370-3 | PMID: 38520563.
- [93] Layani A, Meninger T, Sidi Y, Avni D, Leibowitz R. Mir-16 Decreases the Expression of VTI1B and SMPD1, Genes Involved in Membrane-Protein Trafficking in Melanoma. *Cancers*. 2025; 17:2197. DOI:10.3390/cancers17132197
- [94] Li Z, Suo B, Long G, Gao Y, Song J, Zhang M, Feng B, Shang C, Wang D. Exosomal miRNA-16-5p Derived From M1 Macrophages Enhances T Cell-Dependent

- Immune Response by Regulating PD-L1 in Gastric Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:572689. DOI:10.3389/fcell.2020.572689 | PMID: 33330451; PMCID: PMC7734296.
- [95] Palamarchuk A, Tsyba L, Tomasello L, Pekarsky Y, Croce CM. PDCD1 (PD-1) is a direct target of miR-15a-5p and miR-16-5p. *Sig Transduct Target Ther.* 2022; 7:12. DOI:10.1038/s41392-021-00832-9
- [96] Jia L, Xi Q, Wang H, Zhang Z, Liu H, Cheng Y, Guo X, Zhang J, Zhang Q, Zhang L, Xue Z, Li Y, Da Y, Zhao P, Zhang R. miR-142-5p regulates tumor cell PD-L1 expression and enhances anti-tumor immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017; 488:425–31. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.05.074
- [97] Dawidowicz M, Kula A, Mielcarska S, Kiczmer P, Gołąbek K, Ostrowska Z, Waniczek D, Świętochowska E. miREIA - an immunoassay method in assessment of microRNA levels in tumor tissue-pilot study. The impact of miR-93-5p, miR-142-5p and IFN γ on PD-L1 level in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol.* 2021; 68:247–54. DOI:10.18388/abp.2020_5533 | PMID: 33826281.
- [98] Zhang Y, Liu C, Jin S, Xie L, Xiao Q, Yao J. Ultrasound-Targeted Nanobubbles Codelivering NKP-1339 and miR-142-5p for Synergistic Mitochondrial Immunogenic Cell Death and PD-L1 Inhibition in Cancer Therapy. *Biomater Res.* 2025; 29:0232. DOI:10.34133/bmr.0232 | PMID: 40785846; PMCID: PMC12334082.
- [99] Jiang Y, Wang K, Lu X, Wang Y, Chen J. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes promote lung cancer progression by OIP5-AS1/ miR-142-5p/ PD-L1 axis. *Mol Immunol.* 2021; 140:47–58. DOI:10.1016/j.molimm.2021.10.002 | PMID: 34653794.
- [100] Ling J, Sun Q, Tian Q, Shi H, Yang H, Ren J. Human papillomavirus 16 E6/E7 contributes to immune escape and progression of cervical cancer by regulating miR-142–5p/PD-L1 axis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2022; 731:109449. DOI:10.1016/j.abb.2022.109449
- [101] Wan J, Ling X, Peng B, Ding G. miR-142-5p regulates CD4⁺ T cells in human non-small cell lung cancer through PD-L1 expression via the PTEN pathway. *Oncol Rep.* 2018; 40:272–82. DOI:10.3892/or.2018.6439 | PMID: 29767245; PMCID: PMC6059749.
- [102] Zhou C, Zhang Y, Yan R, Huang L, Mellor AL, Yang Y, Chen X, Wei W, Wu X, Yu L, Liang L, Zhang D, Wu S, Wang W. Exosome-derived miR-142-5p remodels lymphatic vessels and induces IDO to promote immune privilege in the tumour microenvironment. *Cell Death Differ.* 2021; 28:715–29. DOI:10.1038/s41418-020-00618-6
- [103] Crisafulli L, Muggeo S, Uva P, Wang Y, Iwasaki M, Locatelli S, Anselmo A, Colombo FS, Carlo-Stella C, Cleary ML, Villa A, Gentner B, Ficara F. MicroRNA-127-3p controls murine hematopoietic stem cell maintenance by limiting differentiation. *Haematologica.* 2019; 104:1744–55. DOI:10.3324/haematol.2018.198499
- [104] Lee SM, Kaye KM, Slack FJ. Cellular microRNA-127-3p suppresses oncogenic herpesvirus-induced transformation and tumorigenesis via down-regulation of SKP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2021; 118:e2105428118. DOI:10.1073/pnas.2105428118
- [105] Zhu D-X, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou Z-J, Wang Y-H, Liu P, Hong M, Miao K-R, Liu P, Xu W, Li J-Y. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis.* 2012; 33:1294–301. DOI:10.1093/carcin/bgs179 | PMID: 22610076.

- [106] Lyu X, Li J, Yun X, Huang R, Deng X, Wang Y, Chen Y, Xiao G. miR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 2017; 37:1469–76. DOI:10.3892/or.2017.5425 | PMID: 28184923.
- [107] Zhang X, Ma W, Xue W, Wang Y, Chen P, Li Q, Li Y-Y, Hu X, Zhao Y, Zhou H. miR-181a plays the tumor-suppressor role in chronic myeloid leukemia CD34 + cells partially via SERPINE1. *Cell Mol Life Sci.* 2023; 81:10. DOI:10.1007/s00018-023-05036-8 | PMID: 38103082; PMCID: PMC10725356.
- [108] Trissal MC, Wong TN, Yao J-C, Ramaswamy R, Kuo I, Baty J, Sun Y, Jih G, Parikh N, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA, Ley TJ, Maillard I, Reddy PR, Link DC. MIR142 Loss-of-Function Mutations Derepress ASH1L to Increase HOXA Gene Expression and Promote Leukemogenesis. *Cancer Res.* 2018; 78:3510–21. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-3592 | PMID: 29724719; PMCID: PMC6030481.
- [109] Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Döll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grässer FA. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Medicine.* 2012; 1:141–55. DOI:10.1002/cam4.29
- [110] Papagiannopoulos CI, Theodoroula NF, Vizirianakis IS. miR-16-5p Promotes Erythroid Maturation of Erythroleukemia Cells by Regulating Ribosome Biogenesis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14:137. DOI:10.3390/ph14020137 | PMID: 33572085; PMCID: PMC7915806.
- [111] Oliveira DE de, Ballon G, Cesarman E. NF-κB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends in Microbiology.* 2010; 18:248–57. DOI:10.1016/j.tim.2010.04.001 | PMID: 20452220.
- [112] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry.* 2009; 55:611–22. DOI:10.1373/clinchem.2008.112797
- [113] Zhou W-T, Jin W-L. B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021; 12:701006. DOI:10.3389/fimmu.2021.701006 | PMID: 34349762; PMCID: PMC8326801.
- [114] Wang J-Y, Wang W-P. B7-H4, a promising target for immunotherapy. *Cell Immunol.* 2020; 347:104008. DOI:10.1016/j.cellimm.2019.104008 | PMID: 31733822.
- [115] Ning Z, Liu K, Xiong H. Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders. *Front Immunol.* 2021; 12:654960. DOI:10.3389/fimmu.2021.654960 | PMID: 33859648; PMCID: PMC8043046.
- [116] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood.* 2018; 131:58–67. DOI:10.1182/blood-2017-06-741033 | PMID: 29118008; PMCID: PMC6317697.
- [117] Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1248:7–32. DOI:10.1007/978-981-15-3266-5_2 | PMID: 32185705.
- [118] Aggarwal V, Workman CJ, Vignali DAA. LAG-3 as the third checkpoint inhibitor. *Nat Immunol.* 2023; 24:1415–22. DOI:10.1038/s41590-023-01569-z | PMID: 37488429; PMCID: PMC11144386.
- [119] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018; 48:434–52. DOI:10.1016/j.immuni.2018.03.014 | PMID: 29562194; PMCID: PMC7116507.

- [120] Wang Y, Du J, Gao Z, Sun H, Mei M, Wang Y, Ren Y, Zhou X. Evolving landscape of PD-L2: bring new light to checkpoint immunotherapy. *Br J Cancer*. 2023; 128:1196–207. DOI:10.1038/s41416-022-02084-y | PMID: 36522474; PMCID: PMC10050415.
- [121] Zhao L, Cheng S, Fan L, Zhang B, Xu S. TIM-3: An update on immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2021; 99:107933. DOI:10.1016/j.intimp.2021.107933 | PMID: 34224993.
- [122] Yuan L, Tatineni J, Mahoney KM, Freeman GJ. VISTA: A Mediator of Quiescence and a Promising Target in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol*. 2021; 42:209–27. DOI:10.1016/j.it.2020.12.008 | PMID: 33495077; PMCID: PMC8088836.

Apêndices

Parte A - Material Suplementar

Informações suplementares relacionadas à análise exploratória de *datasets* de pequenos RNAs não codificantes e predição bioinformática de interações miRNA-alvo.

TABELA A1- Extrato dos dados utilizados no gráfico de dispersão dos 20 miRNAs endógenos mais abundantes em linhagem Akata a partir de dados do *dataset* GSE147228.

Dados normalizados (CPM) dos top 20 miRNAs					
miRNA	S1	S2	S3	média_cpm	sd_cpm
hsa-miR-92a-3p	223,350.21	216,771.16	222,655.59	220,925.65	3,614.62
hsa-miR-127-3p	139,710.63	104,821.33	108,845.69	117,792.55	19,087.97
hsa-miR-181a-5p	125,353.79	101,898.73	111,475.69	112,909.40	11,793.08
hsa-miR-1247-3p	65,652.42	61,905.38	59,088.97	62,215.59	3,292.70
hsa-miR-16-5p	35,649.46	54,414.49	47,273.47	45,779.14	9,471.34
hsa-miR-142-5p	33,501.31	50,161.69	42,747.21	42,136.74	8,346.95
hsa-miR-103a-3p	15,225.84	14,425.40	15,222.80	14,958.02	461.26
hsa-miR-4454	14,249.23	14,474.43	13,842.46	14,188.71	320.31
hsa-miR-191-5p	12,765.02	14,772.88	14,296.46	13,944.78	1,049.11
hsa-miR-20a-5p	12,679.74	15,079.84	13,436.61	13,732.06	1,227.03
hsa-miR-378a-3p	11,808.71	12,854.32	12,941.33	12,534.79	630.31
hsa-miR-142-3p	10,050.39	13,557.79	12,668.47	12,092.22	1,823.32
hsa-miR-26a-5p	8,539.79	10,690.62	9,994.91	9,741.77	1,097.53
hsa-miR-21-5p	8,460.60	10,547.79	9,974.27	9,660.89	1,078.31
hsa-miR-181b-5p	10,229.07	8,565.28	10,185.22	9,659.86	948.48
hsa-miR-17-5p	7,295.16	10,530.4	9,066.27	8,964.06	1,620.21
hsa-miR-25-3p	8,009.86	8,797.64	9,008.95	8,605.48	526.53
hsa-miR-28-3p	6,954.06	8,399.01	10,198.98	8,517.35	1,625.69
hsa-miR-5694	8,186.50	8,256.18	8,827.81	8,423.50	351.87
hsa-miR-15a-5p	7,699.21	8,469.36	8,045.91	8,071.49	385.1

As colunas S1, S2 e S3 referem-se às três réplicas biológicas; média_cpm representa a média dos valores de Contagem por Milhão (CPM) entre as réplicas, e sd_cpm representa o desvio padrão desses valores

TABELA A2- Coordenadas da PCA para os 20 miRNAs mais abundantes do *dataset* GSE147228.

Coordenadas da PCA para os top 20 miRNAs						
miRNA	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.1_cos ¹	Dim.2_cos ²	Dim.2_cos ²
hsa-miR-92a-3p	9.146	-0.046	0.012	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-127-3p	8.507	-0.122	0.103	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-181a-5p	8.469	-0.107	0.050	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-1247-3p	7.874	-0.038	0.057	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-16-5p	7.552	0.123	-0.077	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-142-5p	7.471	1.120	-0.061	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-103a-3p	6.446	-0.048	0.014	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-4454	6.393	-0.011	0.032	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-191-5p	6.374	0.026	-0.021	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-20a-5p	6.358	0.048	0.006	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-378a-3p	6.268	0.002	-0.016	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-142-3p	6.225	0.078	-0.062	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-26a-5p	6.012	0.057	-0.034	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-21-5p	6.005	-0.103	0.007	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-181b-5p	6.004	0.054	-0.037	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-17-5p	5.921	0.113	-0.050	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-25-3p	5.891	0.003	-0.026	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-28-3p	5.870	-0.030	-0.014	1.000	0.000	0.000
hsa-miR-5694	5.870	0.003	-0.136	0.999	0.000	0.001
hsa-miR-15a-5p	5.827	0.016	0.007	1.000	0.000	0.000

As colunas Dim.1, Dim.2 e Dim.3 apresentam as coordenadas de cada miRNA nos três componentes principais. As colunas _cos2 apresentam a qualidade da representação de cada miRNA em cada dimensão.

TABELA A3- Ranqueamento dos 6 miRNAs mais abundantes em células Akata a partir de dados do *dataset* GSE147228 de acordo com o Score Ponderado de Regulação (SPR).

#	SPR ¹	miRNA	PC1 ²	Alvos	Med. IS ³	SR Base ⁴	Fp ⁵
1°	0,539	hsa-miR-92a-3p	9,146	9	0,270	9,146	2,000
2°	0,539	hsa-miR-16-5p	7,552	11	0,476	0,514	1,048
3°	0,198	hsa-miR-181a-5p	8,469	6	0,147	0,124	1,596
4°	0,155	hsa-miR-127-3p	8,507	11	0,089	8,507	1,619
5°	0,152	hsa-miR-142-5p	7,471	6	0,180	0,152	1,000
6°	0,110	hsa-miR-1247-3p	7,874	7	0,098	0,089	1,241

¹ SPR: Score Ponderado de Regulação, calculado pela fórmula $SPR = (SR \text{ Base}) \times (Fp)$ representando o potencial regulatório final do miRNA ao integrar a força da predição com a abundância experimental; ² PC1: Valor do componente principal da primeira dimensão; ³ Med. IS: Mediana dos valores do score integrado (*Integrated Score*) obtida na plataforma mirDIP em relação a genes de ICs preditos como alvos para o respectivo miRNA; ⁴ SR Base: Score de Regulação (SR) base; ⁵ Fp: Fator de ponderação (Fp), um valor normalizado (entre 1 e 2) derivado da abundância (PC.1);

TABELA A4- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-92a-3p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-92a-3p	BTLA (HGNC:21087)	0,755009635
	CD226 (HGNC:16961)	0,282203002
	CD276 (HGNC:19137)	0,220909054
	CD28 (HGNC:1653)	0,152860282
	HAVCR2 (HGNC:18437)	0,269548403
	LAIR1 (HGNC:6477)	0,302263542
	SIRPA (HGNC:9662)	0,560600567
	TNFRSF9 (HGNC:11924)	0,258768195
	VSIR (HGNC:30085)	0,213735757

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

TABELA A5- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-127-3p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-127-3p	CD226 (HGNC:16961)	0,06955241
	CD274 (HGNC:17635)	0,192339096
	CD276 (HGNC:19137)	0,098111495
	HAVCR2 (HGNC:18437)	0,069803429
	ICOS (HGNC:5351)	0,089424873
	PCD1LG2 (HGNC:18731)	0,203417064
	SIRPA (HGNC:9662)	0,088974172
	TIGIT (HGNC:26838)	0,076482421
	TNFRSF4 (HGNC:11918)	0,08637647
	TNFRSF9 (HGNC:11924)	0,072147696
	VSIR (HGNC:30085)	0,115747188

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

TABELA A6- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-181a-5p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-181a-5p	<i>BTLA</i> (HGNC:21087)	0,154415978
	<i>CD226</i> (HGNC:16961)	0,133706316
	<i>CD276</i> (HGNC:19137)	0,169667942
	<i>CD28</i> (HGNC:1653)	0,108223341
	<i>CD244</i> (HGNC:18171)	0,167840665
	<i>VTCN1</i> (HGNC:28873)	0,138601369

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

TABELA A7- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-1247-3p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-1247-3p	<i>CD226</i> (HGNC:16961)	0,087261565
	<i>CD274</i> (HGNC:17635)	0,086331294
	<i>LAIR1</i> (HGNC:6477)	0,145426503
	<i>PDCD1</i> (HGNC:8760)	0,098467226
	<i>SIGLEC10</i> (HGNC:15620)	0,07674103
	<i>SIRPA</i> (HGNC:9662)	0,153028687
	<i>TNFRSF9</i> (HGNC:11924)	0,110019872

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

TABELA A8- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-16-5p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-16-5p	<i>BTLA</i> (HGNC:21087)	0,857779338
	<i>CD274</i> (HGNC:17635)	0,457957478
	<i>CD28</i> (HGNC:1653)	0,842149225
	<i>CD40</i> (HGNC:11919)	0,594204599
	<i>CD80</i> (HGNC:1700)	0,682502201
	<i>ICOS</i> (HGNC:5351)	0,331238423
	<i>PDCD1</i> (HGNC:8760)	0,713913441
	<i>SIRPA</i> (HGNC:9662)	0,33320685
	<i>TNFRSF9</i> (HGNC:11924)	0,272096653
	<i>VSIR</i> (HGNC:30085)	0,476186818
	<i>VTCN1</i> (HGNC:28873)	0,390224069

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

Tabela A9- Dados de predição obtidos na plataforma miRDip para o hsa-miR-142-5p com genes relacionados a checkpoints imunológicos.

miRNA	Alvo	IS ¹
hsa-miR-142-5p	<i>BTLA</i> (HGNC:21087)	0,119440281
	<i>CD226</i> (HGNC:16961)	0,155491812
	<i>CD274</i> (HGNC:17635)	0,39342104
	<i>CD28</i> (HGNC:1653)	0,31527353
	<i>PCD1LG2</i> (HGNC:18731)	0,113229153
	<i>SIRPA</i> (HGNC:9662)	0,204239097

¹ IS: *Integrated score* obtido da plataforma mirDIP. Em negrito, estão os dois maiores valores.

Quadro A1- Características metodológicas, plataformas de análise e impacto das publicações científicas associadas aos *datasets* obtidos no repositório GEO.

Cód.	n ²	Experimento ³	Plataforma ⁴	Pipeline ⁵	Normalização ⁶	Publicação ⁷
GSE10107	9	Perfil de expressão por microarray/ Perfil de ncRNAs por microarray	LC Sciences Human 4k microRNA array/ Agilent-014850 Whole Human/Genome Microarray 4x44K	Agilent Feature Extraction (FES)	Subtração de Background /Log2	J. Virol.(SJR 1.283)
GSE 147228	12	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina HiSeq 2500	Bowtie2/ Hyb Pipeline	Contagens por milhão/Contagens brutas	PLOS Pathogens (SJR 1.987)
GSE15229	31	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina Genome Analyzer	Pipeline personalizado do autor	Mapeamento de Sequências / Verificação de Biogênese	Blood (SJR 5.823) / Nature (SJR18.288)
GSE22898	192	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento/ Perfil de expressão por microarray	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array/ Illumina Genome Analyzer	Pipeline personalizado do autor/ Affymetrix Expression Console™ Software	Mapeamento de Sequências / Verificação de Biogênese / RMA (Robust Multi-Array)	Blood (SJR 5.823) / Nature (SJR18.288)
GSE12014	48	Perfil de ncRNAs por microarray	Sugden Lab Epstein-Barr virus miRNA microarray	GenePix Pro 6.0.	Normalização pela média das intensidades medianas	Elsevier-Virology (SJR 0.741)
GSE13056	8	Perfil de ncRNAs por microarray	EBV regulated microRNAs human 3k array	Regressão baseado em mapeamento de background	Lowess (Regressão ponderada localmente)	Elsevier-Virology (SJR 0.741)
GSE15250	70	Perfil de ncRNAs por microarray	miRCURY LNA microRNA Array	Genespring 7.3.1.	Lowess / mediana (por gene).	Blood (SJR 5.823)
GSE52916	18	Perfil de ncRNAs por microarray	Agilent Human miRNA Microarray 1.0	R (script personalizado)	Normalização de quantis	BMC- Infectious Agents and Cancer (SJR 0.709)
GSE9104	4	Perfil de ncRNAs por microarray	Mouse microRNA 1K array version 1.0	Combimatrix Microarray Imager	mediana normalizada e subtração de Background	Nature portfolio (SJR18.288)
GSE18438	20	Perfil de ncRNAs por microarray	Agilent014850 Whole Human Genome Microarray 4x44KG4112F	AgilentFeature Extraction/ R/ BioConductor.	Normalização de escala (separadamente para os grupos de amostras)	-
GSE18439	45	Perfil de ncRNAs por microarray	Agilent014850 Whole Human/ Genome Microarray 4x44KG4112F	AgilentFeature Extraction/R/ BioConductor	Normalização de escala (separadamente para os grupos de amostras e ao nível de sonda)	-
GSE22938	4	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	454 GS 20 (<i>Mus musculus</i>)	Remoção de adaptadores e Read sorting	Frequência de reads idênticas	J. Virol. (SJR 1.283)

Cód.	n ²	Experimento ³	Plataforma ⁴	Pipeline ⁵	Normalização ⁶	Publicação ⁷
GSE30695	2	Perfil de ncRNAs por microarray	MRA1041_miRHumanViruses_13.0_090 309	Programas desenvolvidos <i>In-house</i> / TIGR MeV (para clustering)	Lowess (Regressão ponderada localmente) com correção de background por regressão.	Plos One (SJR 0.803)
GSE31408	148	Perfil de ncRNAs por microarray	miRCURY LNA microRNA Array, 5th generation	ImaGene 8.0 / Script personalizado	Regressão polinomial ponderada localmente com correção de background por convolução	Blood (SJR 5.823)
GSE32109	6	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina Genome Analyzer II	FASTX-Toolkit (Pré processamento) e Bowtie (Alinhamento)/PARalyzer	miRBase com critérios de contagem de reads/Identificação de clusters por conversão e mapeamento ENSEMBL	Cell press-Host & microbe (SJR 7.067)
GSE32113	20	Perfil de expressão por microarray/ Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Operon Human V3.0.2 printed oligonucleotide array/ Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array/Illumina Genome Analyzer II	Linguagem R (biblioteca 'affy') /rarrayMagic (R package) e GenePattern	RMA (Robust Multi-array Average) /Lowess (dentro do array) e Scale (entre arrays)	Cell press-Host & microbe (SJR 7.067)
GSE36926	9	Perfil de ncRNAs por microarray	miRCURY LNA microRNA Array, v.10.0	Genespring (Agilent Technologies) e SAM (Significance Analysis of Microarrays).	Algoritmo Global Lowess/log2	J. Virol. (SJR 1.283)
GSE43958	5	Perfil de ncRNAs por microarray	3D-Gene Human miRNA V16_1.0.0	Processamento estatístico <i>in house</i>	Subtração de Background e normalização pela média global	American Journal of Hematology (JCR 3.076)
GSE46877	208	Perfil de ncRNAs por microarray	Yale Lu Human/Mouse microRNA v2.0	Baseada em <i>labelling controls</i>	<i>Scaling</i> (pré e pós-marcação), <i>Thresholding</i> / transformação Log2	Nucleic Acids Research (JCR 7.776)
GSE53476	2	Perfil de ncRNAs por microarray	Affymetrix Multispecies miRNA-2 Array	Partek® Genomics Suite.	-	-
GSE53479	36	Perfil de ncRNAs por microarray	NanoString nCounter Human miRNA Expression Assay	nSolver Analysis Software	Normalização por Controles Positivos Internos	The American Journal of Pathology(JCR 1.313)
GSE59479	22	Perfil de ncRNAs por microarray	Agilent-039731 SurePrint G3 Custom Human 8x60K Microarray	GeneSpring GX 12.5	Normalização por quantil (sem transformação de baseline)	The faseb Journal (JCR 1.319)
GSE59480	34	Perfil de expressão por microarray/ Perfil de ncRNAs por microarray	Agilent-039731 SurePrint G3 Custom Human 8x60K Microarray	GeneSpring GX 12.5/	Normalização por quantil (sem transformação de baseline)	The faseb Journal (JCR 1.319)
GSE65752	9	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina Genome Analyzer IIx	Dustmasker, FASTX-Toolkit, Bowtie 0.12.7 e BEDTools 2.16.2	Contagem de Reads Normalizadas	J. Virol. (SJR 1.283)
GSE139425	6	Perfil de ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina HiSeq 2500	New Tuxedo (HISAT2, StringTie, Ballgown) +	Estimativa de abundância via <i>Ballgown</i> e filtragem por variância	Elsevier- Non-coding RNA Research (JCR 1.120)

Cód.	n ²	Experimento ³	Plataforma ⁴	Pipeline ⁵	Normalização ⁶	Publicação ⁷
GSE206930	24	Perfil ncRNAs por sequenciamento de alto rendimento	Illumina HiSeq 2500/ Arraystar Human CircRNA microarray V2	ACGT101-miR (LC Sciences). Illumina Casava/bcl2fastq/ HiSeq Control (HCS)/HiSeq Control (HCS), RTA (Real-Time Analysis) e bcl2fastq.	Basecalling/ Desmultiplexação	PNAS (SJR 1.198)

Perfil metodológico e rigor científico dos *datasets* analisados neste estudo. ¹ Código identificador do *dataset* no repositório NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>); ² Número de amostras avaliadas; ³ Estratégia metodológica utilizada para gerar dados transcriptômicos; ⁴ Sistema técnico de equipamentos para gerar dados; ⁵ Fluxo computacional e programas de análise de dados; ⁶ Ajuste estatístico de dados brutos; ⁷ Veículo de comunicação científica onde o estudo foi submetido à publicação.

Parte B - Relatório Experimental

Durante o treinamento de mestrado foram realizados experimentos para a aplicação de um painel de RT-qPCR de moléculas reguladoras de ICs previamente estabelecido no ViriCan (**QUADRO B1**)^[77]. Esses experimentos foram conduzidos com vistas à análise oportuna da expressão das moléculas em nível transcricional nas células infectadas pelo EBV e submetidas a alteração na expressão do hsa-miR-92-3p, definido conforme descrito no corpo principal desta dissertação.

Sucintamente, foram realizados experimentos para familiarização com o painel previamente estabelecido e sua revalidação por meio de nova avaliação dos parâmetros de eficiência e especificidade analítica da amplificação por RT-qPCR para os alvos de ICs selecionados. Para tanto, foram geradas curvas de diluição seriada de amostras de referência para a determinação da eficiência de amplificação (E) e do coeficiente de correlação (R^2) dos experimentos de qPCR, essenciais para estimativa da linearidade e da sensibilidade da detecção dos transcritos de interesse ^[112]

Quadro B1- Panel de alvos moleculares proposto por BIGGI, 2021^[77] para análise da expressão de moléculas com papel em *checkpoints* imunológicos potencialmente relevantes para a linfomagenese.

Proteína (Gene, HGNC ¹)	Propriedades	Sequência (5' -3')
B7-H3 (CD276; HGNC:19137)	Proteína transmembrana, expressa em múltiplos tecidos. Associada a pior prognóstico em vários cânceres humanos ^[113]	S: GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA AS: GGTCTCATGGTCAGGCTATT
B7-H4 (VTCN1 - 79679)	Expresso em diversos tecidos, inibidor da resposta imune das células T e promove o escape imunológico. Associada à progressão e pior prognóstico em diversos cânceres ^[114]	S: CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA AS: GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG
BTLA (CD272 – 151888)	Expressa em linfócitos T e B, células dendríticas e outras células linfoides. Liga-se ao receptor HVEM. Associado a cânceres e doenças autoimunes ^[115]	S: TCTGGACATCTGGAACATC AS: AAAGGGATCTCCTGCTAAG
CTLA-4 (CD152 – 1493)	Localizado predominantemente em vesículas intracelulares de células T reguladoras. Atua na sinalização inibitória contribuindo com autoimunidade e progressão tumoral ^[116,117]	S: TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC AS: TCACACACAAAGCTGGCGAT
LAG-3 (CD223 – 3902)	Proteína transmembrana, expressa em células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B e células NK. Regula negativamente a ativação e função das células T. Atua na resposta imune antitumoral ^[118]	S: GCGGGGACTTCTCGCTATG AS: TCAAAATGACCCAGTCGGAGG
PD-L1 (CD274 – 29126)	Expressa em diversas células hematopoiéticas/endoteliais. Hiperexpressa no microambiente tumoral. Associada a pior prognóstico para diversos cânceres. Múltiplos cânceres expressam elevados níveis de PD-L1 ^[119]	S: GCCCATACAACAAAATCAACC AS: GCTTGTCCAGATGACTTCGG
PD-L2 (PDCD1LG2 – 80380)	Proteína transmembrana tipo I. Inibe secreção de citocinas e a proliferação de células T, atua na tumorigênese, provendo escape imunitário ^[120]	S: ACCCAGGACCCATCCAACCTT AS: ACCACAGTTTCAGATAGCACT
TIM-3 (HAVCR2 – 84868)	Expressa na superfície de Th1, macrófagos, células dendríticas e monócitos. Possui importante papel em doenças autoimunes, infecções virais crônicas e tumores ^[121]	S: CTTTCCAAGGATGCTTACCAC AS: CAGATCCCTGCTCCGATGTA
VISTA (VSIR – 64115)	Proteína transmembrana tipo I, expressa em tecidos linfoides. Mantém a quiescência das células T, inibindo sua ativação na ausência de estimulação antígeno externa. Atua na progressão tumoral. ^[122]	S: TCATCCTGCTCCTGGTCTACA AS: TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA

¹ Código no Comitê de Nomenclatura de Genes Humanos (HUGO; <https://www.genenames.org/>). Modificado de BIGGI, 2021^[77]

Análise de funcionalidade dos iniciadores por PCR convencional

A fim de verificar qualitativamente a capacidade de amplificação para cada par de iniciadores do painel de ICs, foram realizadas reações de PCR convencional (endpoint) utilizando alíquotas de cDNA em *pools* de amostras utilizadas em trabalhos anteriores do grupo, proveniente de linhagens celulares de cânceres humanos com e sem infecção pelo EBV, a saber: a) BC1 ([RRID:CVCL_1079](#)) para os alvos 18S (169 pb), RPS13 (87pb), HSPCB 90(80pb) e CTLA4 (93 pb); b) RAEL ([RRID:CVCL_7208](#)) para BTLA (97 pb); c) NP69 ([RRID:CVCL_F755](#)) para PDL1(114 pb);d) THP 1 ([RRID:CVCL_0006](#)) para os alvos PDL2 (190 pb), VISTA (90 pb) e TIM3 (189 pb); e) MCF7([RRID:CVCL_0031](#)) para B7H4(100 pb) e B7H3 (164 pb).Essas amostras foram utilizadas como referência conhecida de expressão de uma ou mais moléculas reguladoras de ICs, conforme descrito no trabalho prévio que estabeleceu o painel de RT-qPCR (¹⁷⁷) . Os experimentos da PCR convencional para essa avaliação foram realizados em um volume final de 20 µL de reação, compostas por tampão de PCR 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,3 mM de cada iniciador, 1,25 U de Taq DNA polimerase convencional *Class Five* (NEOBIO, Botucatu, SP, Brasil) e 1µL amostra (*pool* de cDNA). O programa de termociclagem foi dado por desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 40s, 60°C por 30s e 72°C por 30s, encerrando com extensão final a 72°C por 10min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *Brilliant Green NeoTaq* (NEOBIO, Botucatu, SP, Brasil), sob tensão constante de 80v por 40 min (**Figura B1**).

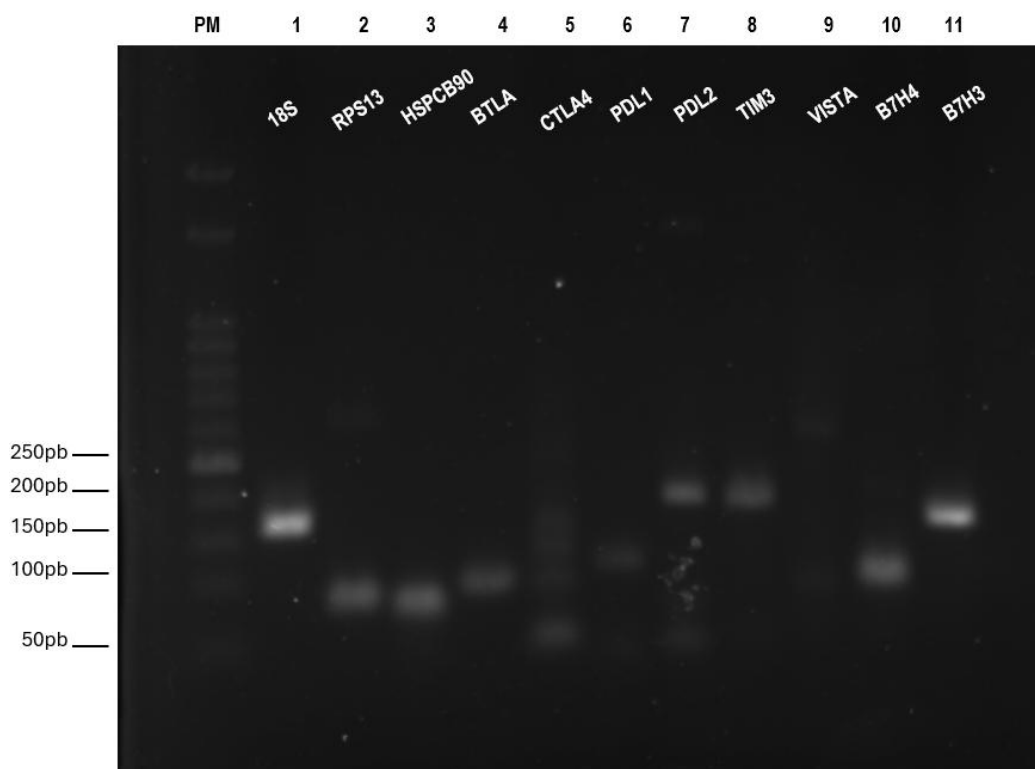


FIGURA B1- Eletroforese de produto de PCR convencional para validação de iniciadores para amplificação de cDNA proveniente de transcritos de moléculas selecionadas de *checkpoints* imunitários. Foram utilizados *pools* de cDNA das seguintes linhagens celulares: a) BC1 para os alvos 18S (169 pb), RPS13 (87pb), HSPCB 90(80pb) e CTLA4 (93 pb); b) RAEL para BTLA (97 pb); c) NP69 para PDL1(114 pb); d) THP 1 para os alvos PDL2 (190 pb), VISTA (90 pb) e TIM3 (189 pb); e) MCF7 para B7H4(100 pb) e B7H3 (164 pb). Análise Produtos de PCR avaliados em gel de agarose 2% corado com corante intercalante *Brilliant Green*. PM: Marcador de peso molecular (50 pb).

Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a validação técnica dos iniciadores, foram selecionadas as linhagens celulares THP-1, MCF-7, representando modelos de histogênese monocítica e epitelial, respectivamente, além das linhagens derivadas de linfomas Akata ([RRID:CVCL_0148](#)), BC1, Jiyoye ([RRID:CVCL_1317](#)) e IBL1 ([RRID:CVCL_9638](#)) . A linhagem THP-1, foi cultivada em suspensão com o meio de cultivo RPMI 1640, enquanto a linhagem MCF-7 foi mantida em meio DMEM, ambas suplementadas com 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* - FBS), sem adição de antibióticos e cultivadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO². Periodicamente as células foram submetidas a análise morfológica, monitoramento da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do corante azul de *trypan* e subcultivo quando necessário. Para o subcultivo da linhagem MCF-7 (aderente), ao atingir aproximadamente 80%

de confluência, a monocamada foi lavada com dPBS e submetida à dissociação enzimática com tripsina 0,05% pré-aquecida a 37°C por 5 minutos. Após o descolamento celular, a enzima foi inativada, a suspensão celular centrifugada e ressuspendida em novo meio de cultivo para nova semeadura ou lisada para extração de material genético subsequente.

Todas as linhagens mantidas em cultivo foram submetidas a monitoramento de contaminação microbiológica pela pesquisa molecular de *Mycoplasma spp.* As análises foram conduzidas pelo suporte técnico do laboratório conforme instruções do fabricante seguindo protocolos de extração de material genético com o kit *EasyPure®* Viral DNA/RNA (TransGen Biotech, Beijing, China). A detecção foi realizada por qPCR, e as culturas que eventualmente se revelaram positivas foram descartadas.

Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

As linhagens cultivadas foram submetidas à extração de RNA total com o reagente TRIzol™ (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria UV em equipamento NanoDrop™ 1000 (ThermoFisher) e armazenado a -80°C.

As linhagens BC1, Jiyoye e IBL-1 apresentaram instabilidade de crescimento *in vitro* e baixa viabilidade celular após sucessivos subcultivos, impossibilitando sua utilização. No caso específico da linhagem BC1, embora tenha-se obtido densidade celular satisfatória em uma das tentativas de cultivo, o rendimento e a integridade do RNA total isolado não atingiu rendimento e parâmetros de pureza (estimado pela razão 260/280 nm na análise por espectrometria UV) preconizado para os experimentos subsequentes necessários para a síntese de cDNA e subsequente RT-qPCR.

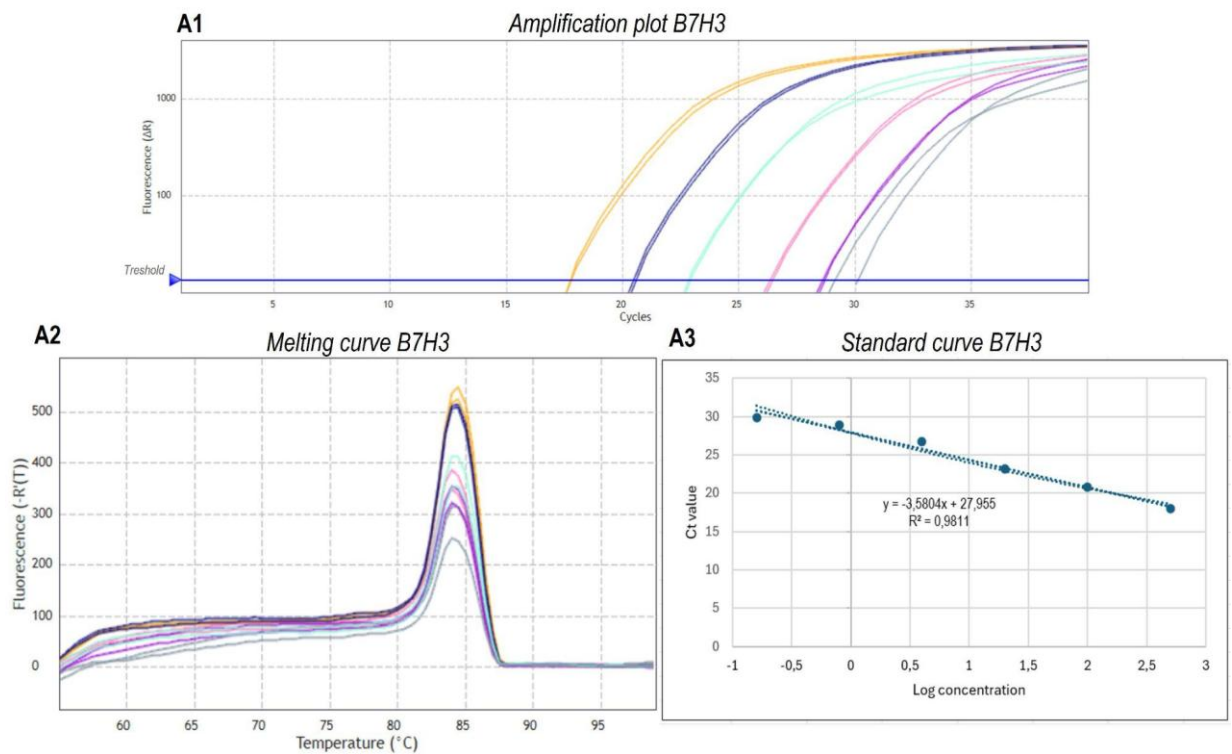
As amostras de RNA total das linhagens celulares que se mostraram apropriadas para os experimentos subsequentes (com pureza e integridade verificadas) foram submetidas à eliminação de DNA genômico contaminante por incubação com DNase I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) por 10 min a 37°C, seguida de inativação enzimática a 75°C por 10 min. A síntese de cDNA foi efetuada com o sistema comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher) em reações de 40µL, contendo ~3µg de RNA total, tampão RT 1X, 4 mM de dNTP Mix, iniciadores arbitrários 1X, 2,5UI/µL de transcriptase reversa MultiScribe™ e 2,0 UI/µL de inibidor de RNase. O protocolo térmico consistiu em incubação inicial a 25°C por 10 min, seguida de 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

Ensaio de qPCR e curvas de eficiência de amplificação

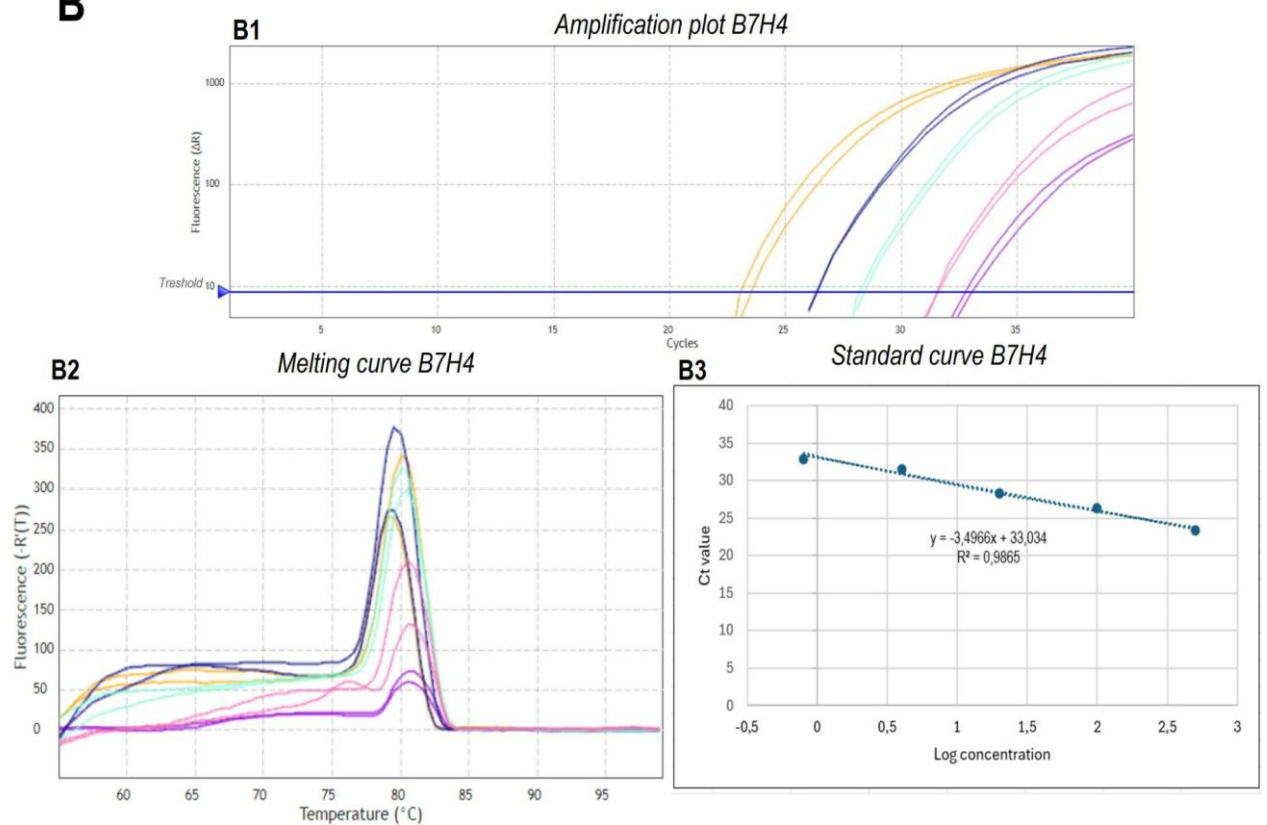
As amostras obtidas de cDNA das linhagens celulares MCF7 e THP1 foram submetidas a diluições seriadas em solução TE (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH8.0), visando a construção das curvas para análise de eficiência de amplificação. As reações de qPCR foram realizadas em volume final de 10µL, compostas por 5,0 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 0,30µM de cada iniciador e 1µL de cDNA. As amostras correspondentes aos pontos da diluição seriada partiram de amostra a 500ng/µL, a partir da qual foram realizadas as diluições subsequentes em razão 1:10 (Amostra de THP1) ou 1:5 (amostra de MCF7). O programa de termociclagem consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 60s. Ao final do programa de amplificação foi realizada curva de dissociação (*melting curve*) com rampa de temperatura de 55°C a 99°C, em incrementos de 0,5°C a cada 5s (tempo). Os ensaios foram executados em duplicatas técnicas, utilizando o equipamento *AriaMX Real-Time PCR System* (Agilent Technologies, Boeblingen, Germany).

A eficiência de amplificação (E) foi calculada a partir da inclinação (*slope*) da curva de amplificação obtida pelas diluições seriadas de cDNA. A linearidade do ensaio foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e a especificidade de cada reação foi confirmada pela análise da curva de dissociação. A **Figura B2** apresenta resultados obtidos para validação para três alvos realizados de forma conclusiva (*B7H3*, *B7H4*, *VISTA*). Para cada alvo, observa-se o perfil exponencial de amplificação, a curva de dissociação obtida e os resultados da regressão linear da curva de diluição seriada, evidenciando que os ensaios ocorreram nos níveis esperados dos parâmetros analíticos de eficiência ($E \geq 90\%$) e linearidade ($R^2 \geq 0,98$) da qPCR.

A



B



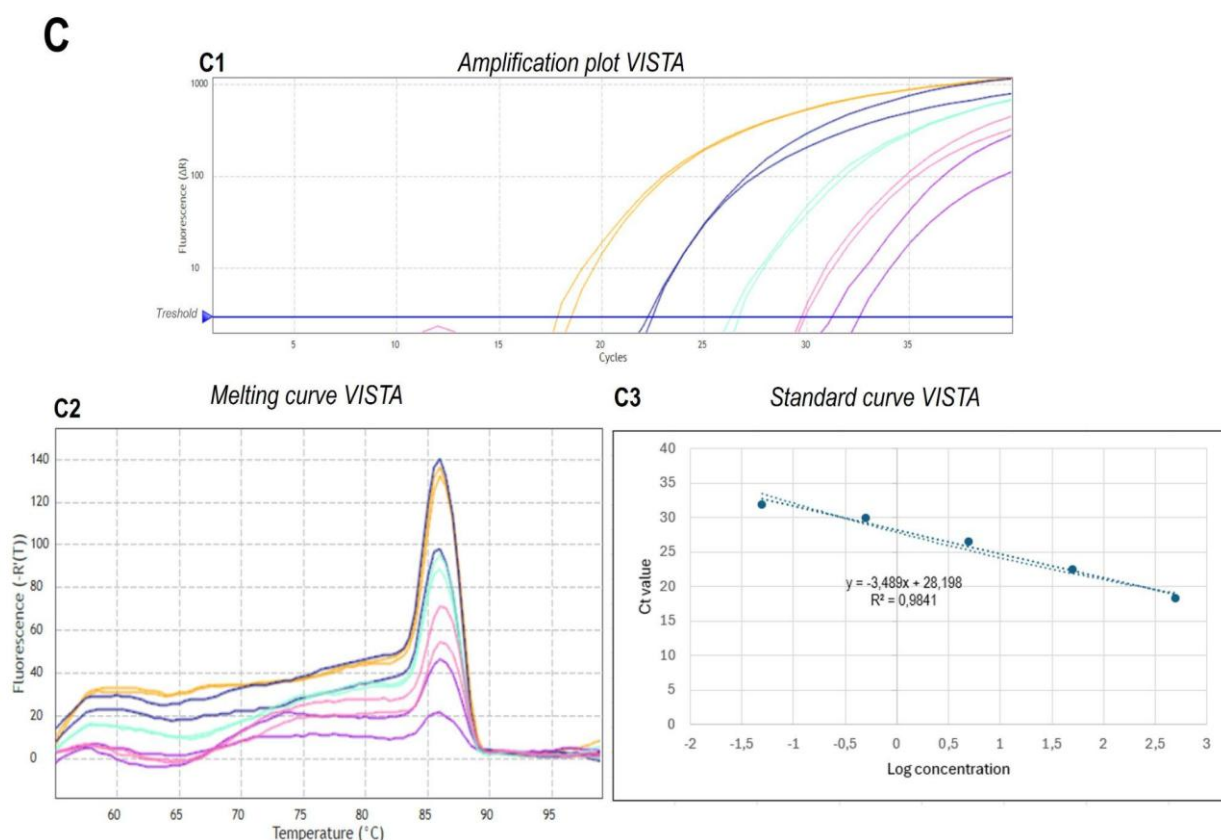


FIGURA B2 - Curvas de amplificação, dissociação e curvas padrão dos iniciadores para os alvos *B7H3*, *B7H4* e *VISTA* por qPCR para análise de eficiência. Em cada painel observam-se: (A1, B1, C1) Curvas de amplificação por fluorescência; (A2, B2, C2) Curvas de dissociação (*Melting Curves*) e (A3, B3, C3) Curvas padrão calculadas a partir de diluições seriadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas técnicas e as linhagens utilizadas para os alvos foram MCF7 (1:5) para *B7H3* e *B7H4*; THP1 (1:10) para *VISTA*.

Tabela B1. Parâmetros de linearidade e eficiência de amplificação por RT-qPCR para os alvos *B7H3*, *B7H4* e *VISTA*

Alvo	Concentração (ng/μL)	Log10 (concentração)	Ct1 ¹	Ct2 ¹	Média Ct	Slope ²	Eficiência ³
<i>B7H3</i>	500	2,69	17,93	17,99	17,96	-3,5804	90,23
	100	2	20,7	20,8	20,75		
	20	1,30	23,19	23,06	23,12		
	4	0,60	26,74	26,63	26,68		
	0,8	-0,09	28,86	28,91	28,88		
	0,16	-0,79	30,35	29,42	29,88		
<i>B7H4</i>	500	2,69	23,57	23,05	23,31	-3,4966	93,19
	100	2	26,34	26,36	26,35		
	20	1,30	28,17	28,39	28,28		
	4	0,60	31,54	31,58	31,56		
	0,8	-0,09	33,05	32,80	32,92		
<i>VISTA</i>	500	2,69	17,84	18,52	18,18	-3,489	93,47
	50	1,69	22,51	22,25	22,38		
	5	0,69	26,30	26,71	26,50		
	0,5	-0,30	29,76	29,9	29,83		
	0,05	-1,30	31,22	32,58	31,9		

Parâmetros de desempenho e valores de Ct para validação da eficiência de amplificação e robustez do ensaio. Valores médios e individuais de Ct obtidos em duplicatas técnicas e diluições seriadas (razão 1:5 para os alvos *B7H3* e *B7H4* e razão 1:10 para o alvo *VISTA*). ¹ Cts das replicatas técnicas #1 e #2, respectivamente. ² Slope calculado com base nos CTs alcançados em diferentes concentrações; ³ Eficiência de amplificação foi calculada pela fórmula ($E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$). Para os alvos *B7H4* e *VISTA* um ponto de diluição foi retirado a fim de obter melhores resultados de eficiência.