

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 21/02/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Bárbara Grasielle Müller Coan**

**“Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira  
Coorientador(a): Prof. Dr. Danillo Pinhal

**Botucatu**

**2022**

Bárbara Grasielle Müller Coan

“Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira  
Coorientador: Prof. Dr. Danillo Pinhal

Botucatu  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Coan, Barbara Grasielle Muller.

Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe / Barbara Grasielle Muller Coan. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: Danillo Pinhal

Capes: 40105008

1. Câncer. 2. Neoplasias nasofaríngeas. 3. MicroRNAs.  
4.

Palavras-chave: Câncer; Carcinoma de nasofaringe; miRNAs.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a UNESP, a Faculdade de Medicina e o programa de pós-graduação em Patologia da UNESP de Botucatu.

Agradeço às agências financiadoras CAPES e FAPESP (Proc. DR 2017/22312-5) pelo suporte financeiro.

Agradeço ao IBTEC pela estrutura oferecida mesmo nestes tempos difíceis.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira e coorientador Prof. Dr. Danilo Pinhal pelo suporte e apoio durante todo o projeto.

Agradeço ao meu marido Rafael pelo companheirismo, amparo e auxílio neste processo. Agradeço também minha filha Helena por me dar forças nestes últimos 2 anos.

Agradeço a minha família, em especial à minha irmã Cristiane.

Agradeço a todos os amigos que fiz aqui em Botucatu que tornaram esta experiência ainda mais gratificante.

---

“Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe”

## Sumário

<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
Câncer: generalidades.....	15
Progressão dos cânceres .....	18
Carcinoma de nasofaringe.....	20
microRNAs.....	22
MicroRNAs no carcinoma de nasofaringe.....	27
<b>CAPÍTULO 2 - MANUSCRITO .....</b>	<b>29</b>
Preâmbulo .....	30
Abstract.....	31
Introduction.....	33
Material and Methods .....	35
<i>Cell culture</i> .....	35
<i>miRNA Target Prediction and Pathway Enrichment Analysis</i> .....	35
<i>Cellular transfection of miRNA mimetics and assessment of miRNA expression</i> .....	35
<i>Estimation of cell proliferation and migration rates in vitro</i> .....	36
Results.....	38
<i>In silico analysis of miR-100-5p, miR-192-5p and miR-574-3p showed unique deregulated pathways and target genes.</i> .....	38
<i>Effects if treatment of NP69 cells with mimetics for miRs 100-5p, 192-5p, and 574-3p in selected gene targets</i> .....	40
<i>MiR-192-5p mimic treatment decreases cell migration but did not induce alteration in cell proliferation or viability in vitro</i> .....	42

---

---

Discussion .....	45
Supplementary Material .....	48
References .....	63
<b>CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>71</b>
<i>Análise da eficiência dos primers utilizados para a amplificação dos respectivos transcritos alvos para o miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p .....</i>	<i>74</i>
<i>Construção de vetores lentivirais para transdução em células imortalizadas de nasofaringe.</i>	
<i>75</i>	
<i>Vetores psiCHECK2 .....</i>	<i>92</i>
<i>Ensaio da Luciferase após transfecção com miR-100-5p em células imortalizadas de nasofaringe (NP69).....</i>	<i>104</i>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>

---

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Coan, Barbara Grasielle Muller.

Efeitos dos miRNAs humanos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na expressão gênica e migração em célula imortalizada de nasofaringe / Barbara Grasielle Muller Coan. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: Danillo Pinhal

Capes: 40105008

1. Câncer. 2. Neoplasias nasofaríngeas. 3. MicroRNAs.  
4.

Palavras-chave: Câncer; Carcinoma de nasofaringe; miRNAs.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abaixo estão listadas abreviaturas e siglas utilizadas ao longo do texto. Os de ocorrência única foram descritos conforme se apresentam no texto.

Sigla ou Abreviatura	Definição por extenso	Correspondência em inglês
<b>CSCs</b>	Células tronco cancerígenas	<i>Cancer Stem Cells</i>
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr virus</i>
<b>EGF</b>	Fatores de Crescimento Epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EGFR</b>	Genes Codificadores dos Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>EMT</b>	Transição epitelial mesenquimal	Epithelial mesenchymal transition
<b>FGFR3</b>	Receptor Tipo 3 de Fator de Crescimento de Fibroblastos	<i>Receptor, Fibroblast Growth Factor, Type 3</i>
<b>FZD8</b>	Receptor Frizzled 8	<i>Frizzled Receptor 8</i>
<b>HIF-1</b>	Fator 1 Induzível por Hipóxia	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
<b>IGF1</b>	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I	<i>Insulin-Like Growth Factor I</i>
<b>LMP1</b>	Proteína latente de membrana 1	<i>Latent Membrane Protein 1</i>
<b>MAPK</b>	Fosfatases da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Phosphatase</i>
<b>MET</b>	Transição mesenquimal epitelial	Mesenquimal-epithelial transition
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Proteína Estimuladora de Ligação de kappa B	<i>kappa B Enhancer Binding Protein</i>
<b>NPC</b>	Carcinoma de nasofaringe	<i>Nasopharyngeal Carcinoma</i>
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-Quinases	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinases</i>
<b>RAB2A</b>	Proteína rab2 de Ligação ao GTP	<i>rab2 GTP-Binding Protein</i>
<b>STC1</b>	Stanniocalcina 1	<i>Stanniocalcin 1</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento Transformador beta	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
<b>TKR</b>	Receptor de tirosina quinase	<i>Tyrosine kinase receptor</i>
<b>UTR</b>	Regiões não Traduzidas	<i>Untranslated regions</i>
<b>VEGF</b>	Receptores de Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular vascular	<i>Receptors, Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>WNT</b>	Proteína Wingless	<i>Wingless Type Protein</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de carcinogênese epitelial, com discriminação de eventos das etapas de iniciação, promoção e progressão de carcinomas. Na iniciação ocorrem as primeiras alterações no genoma celular, acrescidas de novas alterações moleculares durante a promoção. O acúmulo progressivo de alterações culmina na transformação celular, o que geralmente delimita a transição entre as etapas de promoção e progressão tumoral. Alterações moleculares genéticas e epigenéticas ocorrem durante toda a carcinogênese, ocasionalmente propiciando novas propriedades biológicas associadas ao fenótipo maligno, tais como capacidade de invasão e de disseminação neoplásica (e.g., por metástase). Admite-se que a formação de metástases de carcinomas pode ser favorecida pela ocorrência de transição epitelial-mesenquimal (EMT), fenômeno no qual as células malignas apresentam redução de propriedades de fenótipo epitelial e passam a expressar propriedades mesenquimais, mais favoráveis à ocorrência de invasão tecidual, remodelamento vascular, migração e sobrevivência celular. Na metástase, as células malignas disseminadas por via vascular (sanguínea ou linfática) alcançam tecidos à distância do tumor primário e efetuam extravasamento para o interstício tecidual. A colonização dos tecidos alcançados e o desenvolvimento de colônias secundárias de células malignas são favorecidos pela EMT reversa, também conhecida como transição mesenquimal-epitelial (MET), favorecendo o desenvolvimento de macrometástases (HUGO et al., 2007; RYAN; FAUPEL-BADGER, 2016)..... 16

Figura 2 - Síntese de microRNAs e sua ação sobre o mRNA alvo. Inicialmente há ação da RNA polimerase II no núcleo celular para síntese de uma molécula poliadenilada precursora, o pri-miRNA. Clivada pelo complexo Drosha, o pri-miRNA origina o pre-miRNA, que é exportado para o citoplasma pela exportina 5. Após nova clivagem (complexo Dicer) ocorre separação das fitas do pre-miRNA e a ligação dos miRNAs formados com proteínas argonautas do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que medeia o silenciamento RNA mensageiro alvo. Essa inibição da tradução ocorre principalmente de quatro modos: (A) repressão do reconhecimento do sítio de iniciação da tradução; (B) indução da deadenilação do mRNA, impedindo sua circularização;

---

---

(C) indução da saída prematura ribossomal do mRNA; ou (D) promovendo a degradação do mRNA. Figura original baseada em trabalhos da literatura (CHEN et al., 2012; DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010; HAMMOND, 2015). ..... 23

Figura 3 – Modelo das atividades do miR-192-5p por sua interação com moléculas e vias preditas nas análises *in silico*. Células NP69 tratadas com o mimético de miR-192-5p demonstraram uma redução na taxa de migração e uma redução no transcrito *RAB2A*. Essa relação já está descrita em células de câncer de cólon, onde a redução de *RAB2A* levou a redução nas taxas de migração, invasão e proliferação celular. Adicionalmente, *RAB2A* foi relacionado à ativação da via ERK que sofre a influência de outros alvos de miR-192-5p. Esse miRNA foi encontrado aumentado em amostras de soro de pacientes com NPC, tendo sido visto como potencial biomarcador para essa doença. MiR-192-5p já foi descrito como inibidor da via TGF- $\beta$ , que por sua vez induz a EMT e inibe o transcrito de *KHSRP*, um inibidor de EMT que induz a maturação do miR-192-5p. Linhas destacadas em azul escuro remetem a achados *in vitro* desse trabalho; vias e genes em negrito foram preditos como relacionados a miR-192-5p. Imagem baseada nos trabalhos (PUPPO et al., 2016; YUAN et al., 2014, p. 3; ZHENG et al., 2019). ..... 67

Figura 4 - Modelo das atividades do miR-100-5p e sua interação com moléculas e vias preditas nas análises *in silico*. Células NP69 tratadas com o mimético de miR-100-5p demonstraram uma redução no transcrito *FZD8*. TGF- $\beta$  foi descrito como indutor do aumento dos níveis de *FZD8*, que por sua vez ativa a via Wnt, levando a um aumento da proliferação e metástase em carcinoma de células renais. Adicionalmente, miR-100-5p foi encontrado com níveis reduzidos em amostras de NPC, levando ao aumento da migração, invasão e proliferação dessas células por meio de IGF1R, além de ser descrito como um inibidor de *mTOR*. Linhas destacadas em azul escuro remetem a achados *in vitro* desse trabalho; vias e genes em negrito foram preditos como relacionados a miR-100-5p. Imagem baseada nos trabalhos (SPANJER et al., 2016; YANG et al., 2017). ..... 68

Figura 5 - Modelo das atividades do miR-574-3p e sua interação com moléculas e vias preditas na análise *in silico*. Células NP69 tratadas com o mimético de miR-574-3p demonstraram uma redução no transcrito *STC1* que já foi descrito como biomarcador para sobrevida de pacientes com câncer de bexiga. Quando

aumentado, *STC1* induziu a proliferação e quimioresistência em células de câncer gástrico, além de ser descrito como ativador da via TGF- $\beta$ , que por sua vez leva ao aumento da expressão de miR-574-3p. Esse miRNA quando na presença de hipóxia (linhagem celular de linfoma histiocítico), é sequestrado pela ribonucleoproteína hnRNP L, levando ao aumento de VEGFA e *EP300* (alvo do miR-574-3p, com ativação de HIF1 $\alpha$  e via NF- $\kappa$ B. .... 69

---

## Resumo

Os cânceres são doenças neoplásicas malignas com etiopatogenia complexa. As células transformadas adquirem diversas propriedades que propiciam alterações em taxas de migração, invasão e sobrevivência celular, facilitando a formação de metástases. Esse processo sofre a influência de diversos fatores, inclusive de pequenos RNAs não codificantes, como os miRNAs. Os miRNAs são moléculas que canonicamente impedem a tradução de um mRNA, podendo agir em diversos processos celulares, incluindo na carcinogênese e progressão do câncer, como o carcinoma de nasofaringe (NPC). O NPC é um câncer agressivo com alta taxa de invasão em tecidos adjacentes, como base do crânio, seios nasais e órbitas, além de alta taxa de metástase para linfonodos regionais. Sua forma não queratinizante compreende mais de 95% dos casos e quando indiferenciado, é fortemente associado ao vírus de Epstein-Barr (EBV). Em um estudo recente de nosso grupo de pesquisa, observamos que células imortalizadas de nasofaringe (NP69) apresentavam um aumento na expressão do miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p quando transfectadas com a proteína latente de membrana 1 (*Latent Membrane Protein 1 – LMP1*) do EBV proveniente da variante viral M81, em comparação com a LMP1 proveniente da variante viral B95-8A. Portanto, este estudo visa elucidar os efeitos do miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na viabilidade, proliferação e migração de células imortalizadas de nasofaringe (NP69) cultivadas *in vitro*. Para tanto, foi realizada a predição dos alvos dos respectivos miRNAs e o enriquecimento de vias para inferir quais vias de sinalização intracelular poderiam ser moduladas por cada miRNA, seguida pela análise dos transcritos dos genes alvos selecionados. Adicionalmente, células NP69 foram transfectadas com os miméticos do miR-100-5p, miR-192-5p ou miR-574-3p para a análise de comportamento celular. Quando essas foram transfectadas com o mimético do miR-192-5p, foi observada a redução de 40% no transcrito do gene *RAB2A* e redução de 43% na sua migração celular. No enriquecimento de vias, o miR-192-5p teve sua ação predita em vias como MAPK, GPCRs, TKR e TGF- $\beta$ . Células NP69 transfectadas com os miméticos do miR-100-5p e miR-574-3p reduziram significativamente os transcritos dos genes *FZD8* e *STC1*, respectivamente. Entretanto, nos ensaios funcionais realizados, não foram observadas alterações significativas no comportamento celular. Com esses resultados pode-se observar que o miR-192-5p possui uma função de supressor tumoral, elucidando parte de sua função em células de nasofaringe. Portanto, isso demonstra sua importância no contexto do NPC e a necessidade de seu estudo adicional.

---

## Abstract

Cancers are malignant neoplastic diseases with complex etiopathogenesis. Transformed cells acquire diverse biological properties that induce alteration in the migration, invasion, and cell survival rates, favoring metastasis formation. This process is under the influence of many factors, including miRNAs. MiRNAs are molecules that canonically prevent mRNA translation, influencing many cellular processes, carcinogenesis and progression of cancers, like nasopharyngeal carcinoma (NPC). NPC is an aggressive cancer with high invasion rates to adjacent tissues, such as the base of the cranium, face sinuses, and orbits, in addition to a high metastatic rate to local lymph nodes. The nonkeratinizing NPC subtype comprehends over 95% of total cases and, when undifferentiated, is highly related to Epstein-Barr virus (EBV) infection. In a recent study of our group, we observed that immortalized nasopharyngeal cells NP69<sup>SV40T</sup> transfected with the EBV oncoprotein, Latent membrane protein 1 (LMP1), from M81 strain showed increased expression of human miR-100-5p, miR-192-5p, and miR-574-3p compared to NP69<sup>SV40T</sup> cells transfected with LMP1 from EBV strain B95.8A. Thus, this study aimed to assess the putative effects of each of the identified microRNAs on the viability, migration, and proliferation of human immortalized nasopharyngeal cells (NP69<sup>SV40T</sup>) cultivated in vitro. Therefore, target prediction and pathway enrichment analysis were performed to infer which pathways could be modulated by each miRNA followed by expression analysis of selected predicted target genes. Additionally, NP69<sup>SV40T</sup> cells were transfected with miR-100-5p, miR-192-5p, or miR-574-3p mimic to analyze cell behavior. After their transfection with miR-192-5p mimic, we observed a 40% decrease in *RAB2A* transcript level and a 43% reduction in cell migration. During the pathway enrichment analysis, miR-192-5p showed predicted involvement in pathways such as MAPK, GPCRs, TKR, and TGF- $\beta$ . NP69<sup>SV40T</sup> cells transfected with miR-100-5p or miR-574-3p reduced transcriptional levels of its targets *FZD8* and *STC1*, respectively. However, in the performed cellular assays, they did not alter cell behavior. The results demonstrate that miR-192-5p acts as a tumor suppressor, answering part of its function in nasopharyngeal cells. This shows its importance in the NPC context and the necessity of further studies of this miRNA.

---

## Capítulo 1 - Introdução



## **Câncer: generalidades**

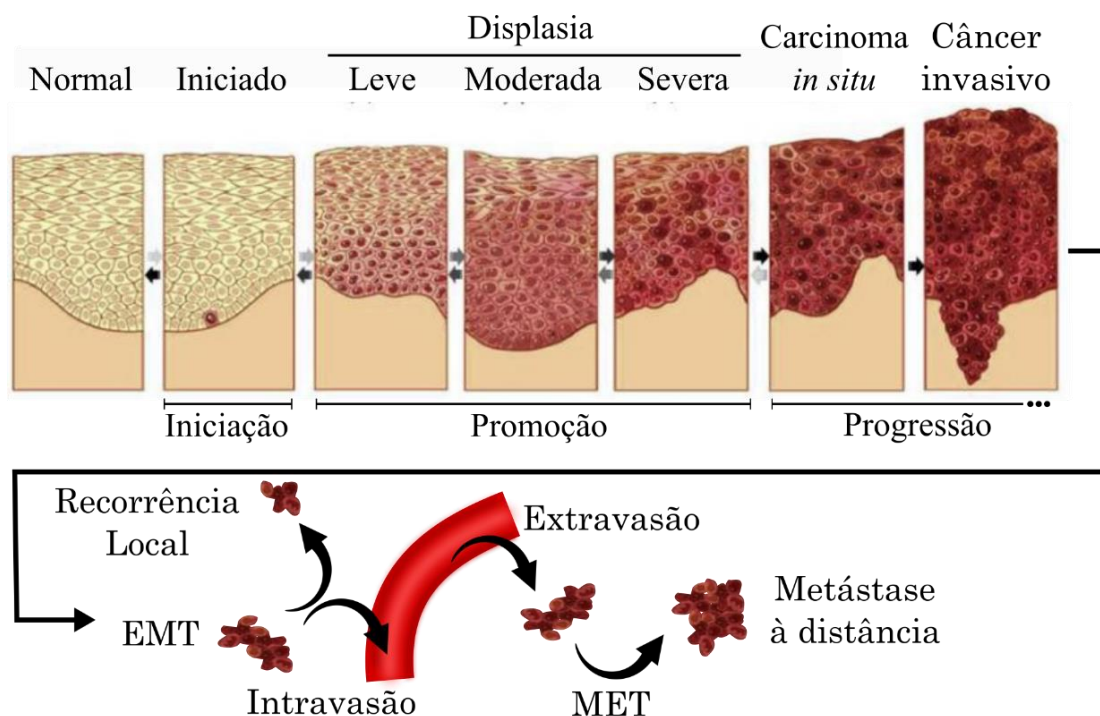
Segundo dados do programa Globocan (*Global Cancer Observatory*) da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*), mais de 19 milhões de novos casos de cânceres foram diagnosticados em 2020 em todo mundo e essas doenças foram responsáveis por cerca de 9,9 milhões de óbitos naquele ano (SUNG et al., 2021). Em geral, a incidência de cânceres vem aumentando anualmente como consequência, por exemplo, do envelhecimento populacional e do aumento da exposição a riscos cancerígenos, tais como sobrepeso, obesidade e o consumo de álcool (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015; THUN et al., 2010).

Os cânceres são doenças de etiologia complexa, na qual contribuem fatores constitutivos (e.g., patrimônio genéticos do indivíduo), fatores ambientais e fatores relacionados aos hábitos e estilo de vida. Estima-se que até 50% dos casos de cânceres poderia ser prevenida, incluindo doenças relacionadas à exposição solar, tabagismo, dieta e doenças infecciosas (MATTIUZZI; LIPPI, 2019; MÜLLER-COAN et al., 2018). Essas doenças ocorrem mais comumente em adultos mais velhos e em grande medida são carcinomas – cânceres que se desenvolvem a partir de células epiteliais ou de células de outras histogêneses em tecidos de revestimento.

Os carcinomas estão entre os cânceres mais comuns em todo o mundo, respondendo pela maior fração de desfechos letais em decorrência de neoplasias malignas. Estima-se que 45,6% dos quase 10 milhões de óbitos por cânceres em ambos os sexos em 2020 tenham sido majoritariamente em decorrência de carcinomas ocorrendo em mama, próstata, cólon e reto, traqueia, brônquio e pulmão e estômago (SUNG et al., 2021).

O processo de desenvolvimento do câncer (i.e., *carcinogênese*) é tradicionalmente dividido nas etapas de iniciação, promoção e progressão (Figura 1). Na iniciação ocorrem as primeiras alterações moleculares no patrimônio genético da célula – tipicamente mutações associadas à exposição a carcinógenos ambientais, quer sejam químicos, físicos ou infecciosos. As células iniciadas proliferam e adquirem novas alterações durante a etapa subsequente, a promoção, na qual se observa a instalação progressiva de instabilidade genômica. Ao longo do tempo, esse comprometimento ocorrendo durante a promoção nas células iniciadas propicia o desenvolvimento do fenótipo maligno, que culmina com a transformação celular (BEN-DAVID; AMON, 2020; BRABLETZ et al., 2021). O surgimento de células malignas (transformadas) tende a ocorrer na transição entre a fase de promoção e a fase subsequente da carcinogênese, a progressão tumoral.

---



**Figura 1** – Modelo de carcinogênese epitelial, com discriminação de eventos das etapas de iniciação, promoção e progressão de carcinomas. Na iniciação ocorrem as primeiras alterações no genoma celular, acrescidas de novas alterações moleculares durante a promoção. O acúmulo progressivo de alterações culmina na transformação celular, o que geralmente delimita a transição entre as etapas de promoção e progressão tumoral. Alterações moleculares genéticas e epigenéticas ocorrem durante toda a carcinogênese, ocasionalmente propiciando novas propriedades biológicas associadas ao fenótipo maligno, tais como capacidade de invasão e de disseminação neoplásica (e.g., por metástase). Admite-se que a formação de metástases de carcinomas pode ser favorecida pela ocorrência de transição epitelial-mesenquimal (EMT), fenômeno no qual as células malignas apresentam redução de propriedades de fenótipo epitelial e passam a expressar propriedades mesenquimais, mais favoráveis à ocorrência de invasão tecidual, remodelamento vascular, migração e sobrevivência celular. Na metástase, as células malignas disseminadas por via vascular (sanguínea ou linfática) alcançam tecidos à distância do tumor primário e efetuam extravasamento para o interstício tecidual. A colonização dos tecidos alcançados e o desenvolvimento de colônias secundárias de células malignas são favorecidos pela EMT reversa, também conhecida como transição mesenquimal-epitelial (MET), favorecendo o desenvolvimento de macrometástases (HUGO et al., 2007; RYAN; FAUPEL-BADGER, 2016).

A colonização do tecido pelas células transformadas ocorre simultaneamente à consolidação de propriedades biológicas comumente compartilhadas por cânceres. Conforme modelo proposto por Hanahan e Weinberg (2011), essas propriedades incluem a autonomia relativa na geração de estímulos pró-proliferativos, evasão de sinais

inibidores de crescimento e proliferação, evasão da resposta imunitária, subversão da senescência celular (i.e., imortalização), inflamação câncer-induzida, invasão tecidual, remodelamento vascular, instabilidade genética, comprometimento de mecanismos de morte celular (apoptose, notadamente) e desregulação metabólica. Todos estes fatores contribuem para a agressividade biológica dos cânceres, oferecendo condições favoráveis à disseminação de células neoplásicas para outros tecidos no organismo hospedeiro (HANAHAN; WEINBERG, 2011, 2011).

É na progressão da carcinogênese em que tipicamente se observam as manifestações do desenvolvimento de um câncer no organismo hospedeiro, o que pode propiciar o diagnóstico da doença. Nessa etapa a instabilidade genômica das células malignas tende a estar estabelecida tanto em nível gênico como cromossômico, com mutações e rearranjos citogenéticos variados e frequente aneuploidia (BEN-DAVID; AMON, 2020). A instabilidade genômica suscita heterogeneidade fenotípica das células malignas, propiciando a emergência de subpopulações celulares que podem apresentar propriedades particulares que lhes oferecem vantagens em relação às suas congêneres, incluindo melhores condições de sobrevivência no ambiente intratumoral, maior potencial proliferativo, imunoevasão, maior capacidade de invasão e para disseminação neoplásica. Outros fatores importantes estão relacionados com a progressão dos cânceres, e estes serão detalhados a seguir.

---

## Progressão dos cânceres

A manifestação clínica de neoplasias malignas tipicamente ocorre na etapa de progressão dos cânceres, etapa em que ocorrem diversas alterações que habilitam as células transformadas efetuarem a se expandirem, invadir e colonizar tecidos no sítio original de desenvolvimento da doença ou à distância do tumor primário (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O entendimento da patogênese da progressão dos cânceres é fundamental para a gestão do cuidado da doença, notadamente porque a existência de doença disseminada (por metástases, por exemplo) compromete o prognóstico do paciente, respondendo por altos índices de morbidade e mortalidade (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; TANG et al., 2020).

O processo de metástase segue uma sequência sucessiva de eventos que compõem a *cascata metastática*, que culmina na formação de pequenas colônias de células neoplásicas malignas disseminadas à distância do tumor primário, denominadas *micrometástases*, que eventualmente se desenvolvem em tumores secundários manifestos, as *macrometástases* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O sucesso na disseminação metastática requer que células malignas estejam habilitadas a colonizar tecidos distintos do sítio do tumor primário. No caso de carcinomas, admite-se que a ocorrência de metástases seja influenciada pelo fenômeno de transição epitelial-mesenquimal (*Epithelial Mesenchymal Transition - EMT*), no qual se observa mudanças de expressão gênica que levam a célula epitelial a manifestar algumas propriedades relacionadas ao fenótipo mesenquimal, incluindo maior motilidade e capacidade de invasão. Células em EMT também podem sofrer o processo inverso, fenômeno denominado EMT-reversa ou ainda transição mesenquimal-epitelial (*Mesenquimal-Epithelial Transition – MET*), o que tende a ocorrer quando células do carcinoma alcançam novos sítios para colonização metastática (Figura 1). A ocorrência de EMT-reversa/MET no sítio de metástase aparentemente favorece o desenvolvimento tumoral pela maior capacidade proliferativa observada em células expressando propriedades epiteliais, por exemplo (BRABLETZ et al., 2021; GEORGAKOPOULOS-SOARES et al., 2020).

Convém destacar que o estabelecimento de metástases requer modificações do microambiente tecidual no sítio a ser colonizado para propiciar sobrevivência e proliferação das células malignas recém-chegadas. Para tanto, ocorrem interações com células locais (neoplásicas ou não) e células recrutadas, culminando em modificação do

---

microambiente tecidual que favorece sua colonização pelas células malignas (NEOPHYTOU et al., 2021). Um microambiente tecidual suscetível à colonização neoplásica decorre de modificações em múltiplos tipos celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células T, osteoclastos e osteoblastos. Esta comunicação se faz em grande parte por meio de vesículas extracelulares contendo miRNAs, tanto provenientes de células cancerígenas sendo receptados por células normais, como o caminho reverso (SOLÉ; LAWRIE, 2021).

Alguns cânceres, como o carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma – NPC*), possuem capacidade invasiva e uma alta frequência no estabelecimento de metástases em linfonodos regionais, apesar da menor taxa de disseminação à distância para outros órgãos. Devido à sua localização anatômica, possui elevada agressividade biológica, com remoção cirúrgica é difícil e responsividade à quimioterapia é pouco eficiente. Motivo pelo qual o estudo detalhado dos mecanismos celulares e moleculares do NPC se tornam essenciais para melhorar seu diagnóstico e tratamento. Estas características do NPC, desde seu surgimento, até sua progressão, podem ser influenciadas por diversos fatores que serão detalhados a seguir.

---

## **Carcinoma de nasofaringe**

O carcinoma de nasofaringe é um câncer agressivo e de prognóstico tipicamente desfavorável. Sua etiologia é multifatorial, incluindo fatores genéticos, como por exemplo a composição em genes do sistema de antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen - HLA*) do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex – MHC*), exposição a nitrosamidas e, particularmente, infecção pelo vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus – EBV*) (CAETANO et al., 2020). A doença possui elevada capacidade de invasão, que tende a ocorrer principalmente na base do crânio, seios nasais e órbitas. Em aproximadamente 50% dos casos há invasão de nódulos linfáticos e em cadeias linfáticas de cabeça e pescoço. Também pode ocorrer metástase a distância por disseminação hematogênica, notadamente para ossos, pulmões e fígado, habitualmente em até 3 anos após o diagnóstico. A sobrevivência média dos pacientes é de 5 anos, variando de 40% em regiões endêmicas, até 80% quando tumores esporádicos (CHEN et al., 2019).

A incidência do NPC varia substancialmente de acordo com a localização geográfica. Esse câncer é relacionado a pouco mais de 133 mil casos e 80 mil mortes no ano de 2020 em nível mundial, sendo endêmico no sudeste da Ásia, notadamente na China (SUNG et al., 2021). Independentemente da região, o NPC ocorre cerca de 2,5 vezes mais em homens do que em mulheres; seu desenvolvimento é inicialmente assintomático, mas pode desenvolver sinais como epistaxe, otite média ou obstrução nasal, dependendo do tamanho do tumor e comprometimentos dos tecidos após a invasão local (CHEN et al., 2019).

Em termos histopatológicos o NPC é classificado em queratinizante, não-queratinizante ou basaloide. O NPC não-queratinizante é responsável por mais de 95% dos casos em áreas endêmicas e é subdividido nas formas diferenciadas e indiferenciadas, esta última fortemente associada à infecção pelo EBV. A forma queratinizante do NPC compreende menos de 20% dos casos, sendo rara em regiões endêmicas. (CHEN et al., 2019).

Atualmente, o perfil molecular do carcinoma de nasofaringe auxiliou na identificação de alterações genômicas que estimulam o desenvolvimento e a progressão da doença. Dentre essas estão alterações que proporcionam perdas de função de reguladores negativos de NF- $\kappa$ B, lesões genéticas recorrentes (e.g. perda do *locus* CDKN2A/CDKN2B), amplificação do gene *CCND1* (codifica a ciclina D1), mutação em

---

*TP53* e em componentes da via de sinalização PI3K/MAPK, modificações de cromatina e na maquinaria de reparo do DNA (TSANG et al., 2020). Adicionalmente, a expressão da proteína latente de membrana 1 (LMP1) do EBV proporciona ativação constitutiva da via NF- $\kappa$ B, um importante fenômeno da patogênese do NPC que é também observado em diversos outros cânceres associados ao EBV, notadamente linfomas (CHEN et al., 2019; LI et al., 2017).

A regulação da expressão gênica no NPC, assim como em outros cânceres, se faz por diversos mecanismos, incluindo mecanismos epigenéticos, tais como remodelamento da cromatina, modificação de histonas, metilação de DNA e expressão de RNAs não-traduzidos, como os microRNAs (miRNAs) (CHOI; LEE, 2013). Nesse contexto, a ação de miRNAs pode ser particularmente relevante na regulação do padrão de expressão gênica de células malignas, na regulação do microambiente tumoral, invasão local e na disseminação neoplásica, inclusive por metástases (HUSSEN et al., 2021). Isso mostra que os miRNAs possuem ação importante não só em uma etapa da carcinogênese, mas sim em diversas etapas, regulando a tradução de genes com função de supressores tumorais ou oncogenes. O detalhamento da função de um determinado miRNA em uma etapa da carcinogênese, assim como em um determinado tecido, será elucidado em mais detalhes no tópico a seguir.

---

## microRNAs

RNAs que não codificam proteínas – mais comumente referidos como RNAs não-codificantes (*Non-coding RNAs* – ncRNA) – podem atuar na regulação epigenética da expressão gênica com efeitos duradouros, como no caso de alguns ncRNAs longos (lncRNA), ou de forma transitória e dinâmica, como no caso dos miRNAs (MORRIS, 2011). Estima-se que apenas 2% do genoma humano seja de genes codificadores de proteínas (~20 mil genes), sendo o restante representado por cerca de 11 mil pseudogenes, e 9 mil miRNAs e 10-32 mil lncRNAs (RYAN; FAUPEL-BADGER, 2016; SAW et al., 2021).

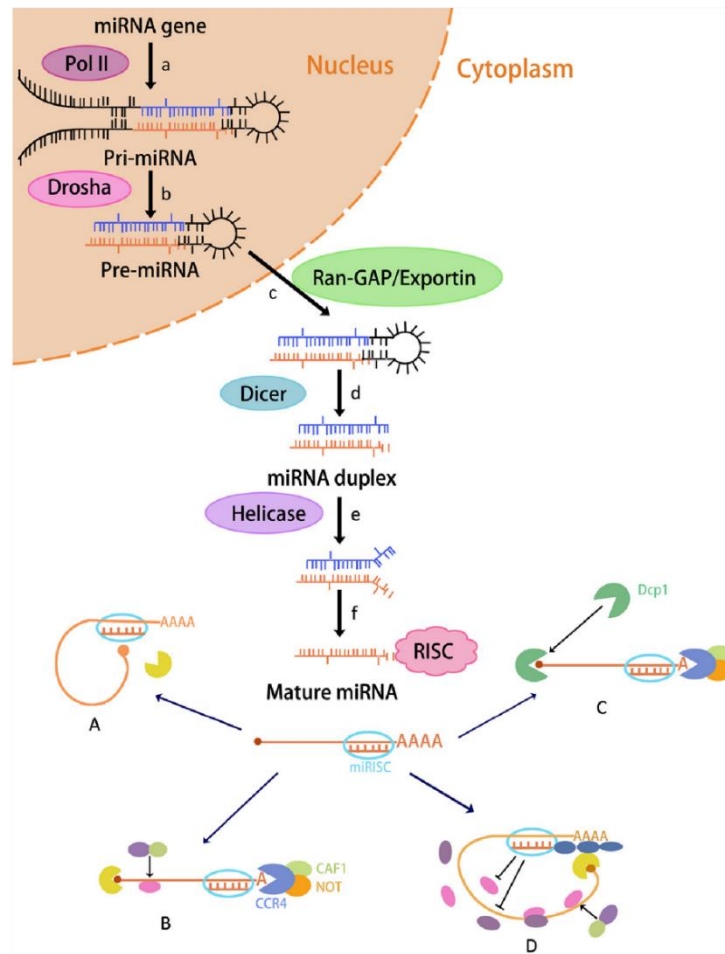
MiRNAs em geral (i.e., modo de ação canônico) exercem uma função inibitória na tradução de RNAs mensageiros (mRNA). A ação dessas moléculas foi originalmente descrita por Ambros e Ruvkun no desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde um pequeno RNA não-traduzido possuía ação inibitória na expressão de determinados genes. Atualmente sabe-se que miRNAs têm papel regulatório em diversas vias fisiológicas e patológicas, incluindo no desenvolvimento de cânceres (CHEN; YAN, 2021).

Os miRNAs são codificados por sequências distribuídas por todo o genoma. Algumas estão presentes em genes não-codificantes, cujos produtos são exclusivamente miRNAs, outras estão localizadas em introns ou na região UTR não-traduzida (*Untranslated Region* - UTR) de um gene codificador de proteína (HAMMOND, 2015). A maioria dos miRNAs é gerada a partir de transcritos primários longos que são clivados sequencialmente pelas enzimas Drosha e Dicer (biogênese pela via canônica). Alguns miRNAs, entretanto, podem ser gerados sem a clivagem por Drosha, sendo geralmente formados a partir de um pequeno RNA não codificante transcrito pela RNA polimerase II (STRIBLING et al., 2021).

A via canônica de biogênese de miRNAs requer ação da RNA polimerase II, que forma inicialmente uma grande molécula de RNA, o pri-miRNA que passa por processamento pela RNase III, chamada *Drosha*, originando uma molécula de RNA com aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada pre-miRNA. O pre-miRNA, agora no citoplasma, sofre ação da endoribonuclease *Dicer*, de modo a originar dois miRNA maduros, com comprimento de 17-25 nucleotídeos (Figura 2) (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). Estes miRNAs maduros se associam às proteínas argonautas (AGO) e GW182, um complexo indutor de silenciamento (*RNA-induced Silencing complex* –

---

*RISC*), permitindo a ligação do miRNA à um mRNA por meio de pareamento em sua região 3' UTR preferencialmente. Embora rara, a ligação do miRISC a éxons e à região 5'UTR já foi previamente reportada (ALI SYEDA et al., 2020).



**Figura 2** - Síntese de microRNAs e sua ação sobre o mRNA alvo. Inicialmente há ação da RNA polimerase II no núcleo celular para síntese de uma molécula poliadenilada precursora, o pri-miRNA. Clivada pelo complexo Droscha, o pri-miRNA origina o pre-miRNA, que é exportado para o citoplasma pela exportina 5. Após nova clivagem (complexo Dicer) ocorre separação das fitas do pre-miRNA e a ligação dos miRNAs formados com proteínas argonautas do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que medeia o silenciamento RNA mensageiro alvo. Essa inibição da tradução ocorre principalmente de quatro modos: (A) repressão do reconhecimento do sítio de iniciação da tradução; (B) indução da deadenilação do mRNA, impedindo sua circularização; (C) indução da saída prematura ribossomal do mRNA; ou (D) promovendo a degradação do mRNA. Figura original baseada em trabalhos da literatura (CHEN et al., 2012; DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010; HAMMOND, 2015).

Apesar de pequenos, os miRNAs possuem certa especificidade conferida por sua região *seed*, que consiste nos nucleotídeos de sua região 5' entre as posições dois e oito.

Essa ligação leva à degradação (alta complementariedade) ou repressão da tradução (baixa complementariedade) do mRNA pelo miRNA maduro, podendo ocorrer por quatro processos principais: repressão do reconhecimento do sítio de iniciação da tradução; indução da saída prematura ribossomal do mRNA; indução da deadenilação do mRNA impedindo a circularização do mesmo; ou promovendo a degradação do mRNA. Quando múltiplos miRNAs compartilham da mesma região *seed*, eles são descritos como membros de uma mesma família e comumente podem ter ação sinérgica sobre um mesmo mRNA. (LEITÃO; ENGUITA, 2022).

Alterações na expressão de miRNAs tem sido amplamente documentadas em cânceres (HILL; TRAN, 2021), podendo resultar em estímulo ou inibição da doença, dependendo da sua função como *oncomiRs* ou supressores tumorais (função à ser explicada a diante). Digno de nota, sequências codificadoras de miRNAs estão localizadas em diversas regiões cromossômicas comumente afetadas por deleções e ampliações identificadas nos cânceres (CROCE, 2012).

Os miRNAs participam de diversos processos celulares, invariavelmente causando inibição pós-transcricional de seus genes-alvo. Por exemplo, podem agir na tradução e expressão de reguladores da progressão do ciclo celular, da diferenciação celular, de rotas metabólicas, da morte celular programada (e.g. apoptose), da manutenção da homeostasia tecidual e em respostas imunitárias. Aproximadamente 60% das proteínas humanas têm sua tradução regulada por miRNAs, quer seja em processos fisiológicos ou patológicos, incluindo a carcinogênese e a progressão tumoral (HILL; TRAN, 2021).

Alguns miRNAs agem diretamente na progressão de cânceres, com protagonismo em fenômenos como a cascata metastática, EMT e remodelamento do microambiente (e.g., pela expressão de metaloproteinases (DONG et al., 2021)). De modo geral, admite-se que miRNAs podem agir de modo semelhante aos genes supressores tumorais, quando inibem a tradução de oncogenes, ou como *oncomiRs*, quando inibem a tradução de genes supressores tumorais. Entretanto, não são incomuns situações em que miRNAs maduros que se originaram do mesmo pre-miRNA (formas 5p e 3p) apresentam dualidade de ações. Ambos podem ter uma ação sinérgica (e.g., supressora tumoral, como no caso do miR-100 (CHEN et al., 2015; MAIA et al., 2013)) ou antagônica (*oncomiRs* ou supressor tumoral). Essa dualidade de um miRNA se aplica também à um mesmo miRNA maduro, pois esses habitualmente são contexto-dependente, como por exemplo o miR-574-5p (CUI et al., 2014; JI et al., 2013).

---

A expressão de miRNAs pode ser impactada por alterações genéticas e genômicas (e.g. translocações, deleções, amplificações, mutações) que comprometem suas sequências codificadoras ou regulatórias, além da regulação de seus fatores de transcrição e alterações na expressão ou função de enzimas envolvidas em sua biogênese, dentre outros mecanismos (HILL; TRAN, 2021). A primeira evidência de envolvimento de miRNAs na patogênese de cânceres foi apresentada em 2002 por Croce e Calin, que relataram ação supressora tumoral do miR-15 e miR-16-1 na leucemia mieloide crônica (CALIN et al., 2002). Atualmente há evidências de alterações envolvendo miRNAs em diferentes aspectos da carcinogênese, incluindo regulação de propriedades de CSCs, tais como, autorenovação, tumorigenicidade e resistência a drogas (ASADZADEH et al., 2019).

O miR-100 (3p e 5p) é um importante miRNA que aparenta ter ação predominante de supressão tumoral. Em ensaios *in vitro* com células de carcinoma mamário, adenocarcinoma pulmonar e de carcinoma de nasofaringe, a redução de miR-100 foi relacionada ao aumento da proliferação celular e resistência à apoptose (FENG; WANG; CHEN, 2012, p. 1; JIANG et al., 2015, p. 8; SHI et al., 2010, p. 1). Ensaios *in vivo* com células de cânceres colorretal e de nasofaringe demonstraram que a redução na expressão de miR-100 proporcionou maior crescimento tumoral em animais de experimentação (CHEN et al., 2014; SHI et al., 2010, p. 1). Adicionalmente, miR-100 foi encontrado regulado negativamente em diversos tipos de cânceres e sua menor expressão foi relacionada a resistência tumoral à múltiplas drogas, metástase em linfonodos, metástase pulmonar e menor sobrevida média (CHEN et al., 2014; DAI et al., 2011; FENG; WANG; CHEN, 2012; JIANG et al., 2015; WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2014), além de possuir potencial como biomarcador para diversos tipos de cânceres (DOU et al., 2017).

Outro miRNA relevante nesse contexto é o miR-574, cuja forma 3p possui função supressora tumoral frequentemente reportada. A expressão aumentada desse miRNA foi associada à inibição da migração, da invasão e da proliferação de células de câncer gástrico (SU et al., 2012), enquanto sua redução propiciou resistência ao tamoxifeno no câncer de mama (UJIHIRA et al., 2015). Recentemente o miR-574-3p foi apontado como um potencial biomarcador para diagnóstico de câncer de próstata em amostras de urina (PAIVA et al., 2020). Por outro lado, sua forma 5p tem sido referida como oncomir: por exemplo, a expressão de miR-574-5p foi associada a estímulo de migração e invasão celular em cânceres de pulmão (células pequenas e não-pequenas) e colorretal (JI et al., 2013; ZHOU et al., 2015, 2016) e quantidades elevadas de miR-574-5p foram detectadas em vesículas extracelulares no câncer de pulmão de células pequenas, colorretal e próstata

---

(BRYANT et al., 2012; JI et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Apesar das formas 3p e 5p do miR-574 humano terem sido associadas à ação de supressão tumoral e oncomir, respectivamente, ambas parecem exibir atividade dual dependendo do tipo tumoral e contexto biológico. Por exemplo, a forma 3p também foi associada ao crescimento celular no osteosarcoma (XU et al., 2016, p. 4), enquanto miR-574-5p já foi cogitada como supressora de metástases para o câncer colorretal (CUI et al., 2014, p. 1).

Também o miR-192-5p tem sido frequentemente apresentado como biomarcador tumoral em potencial, com expressão aumentada identificada em células neoplásicas ou em exossomos de cânceres de esôfago, colorretal (DELLA VITTORIA SCARPATI et al., 2014; HUANG et al., 2017; WARNECKE-EBERZ et al., 2015) e no carcinoma hepatocelular relacionado à infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) (WEN et al., 2015). Esse miRNA parece atuar como oncomir, pois a elevação de sua expressão foi associada a aumento das taxas de proliferação, migração e invasão em células de carcinoma hepatocelular *in vitro* (YAN-CHUN et al., 2015). Adicionalmente, foi associada a resistência ao tamoxifeno em carcinoma mamário e a recorrência e metástase para carcinomas hepatocelular e mamário *in vivo* (KIM et al., 2016; YAN-CHUN et al., 2015). Ainda assim, a expressão do miR-192 também já foi associada a redução do potencial metastático de células de carcinoma mamário (PUPPO et al., 2016) e esse microRNA tem sido estudado como potencial biomarcador e alvo terapêutico para o carcinoma hepatocelular (MISHAN et al., 2020).

---

## MicroRNAs no carcinoma de nasofaringe

Em um estudo publicado de nosso grupo de pesquisa, ViriCan, observamos que células imortalizadas de nasofaringe NP69<sup>SV40T</sup> (RRID #CVCL\_F755) apresentavam diferenças na expressão de miRNAs endógenos humanos quando transfectadas com variantes da proteína latente de membrana 1 (*Latent Membrane Protein 1 – LMP1*) do EBV dos genótipos virais B95-8A e M81 (MÜLLER COAN et al., 2022, p. 8). Comparado ao EBV genótipo B95-8A, o genótipo M81 possui maior eficiência para infectar células epiteliais, além de levar a uma maior indução de ciclo lítico viral. Pacientes infectados com EBV M81 possuem alta titulação de anticorpos contra proteínas virais que induzem a replicação celular, sendo que esse fator foi relatado como preditivo para o desenvolvimento de NPC, combinado à outros estímulos (TSAI et al., 2013). Assim, há indícios de que o genótipo M81 do EBV possa ter uma ação única nas células neoplásicas infectadas pelo vírus, podendo ocasionar alterações no comportamento tumoral.

Nesse estudo prévio, buscamos investigar se a LMP1 dos genótipos B95-8A e M81 do EBV se equivalem na regulação de expressão de miRNAs humanos selecionados e nas taxas de migração de células de nasofaringe transfectadas de modo transiente para expressão da oncoproteína viral. Observamos a expressão ectópica de LMP1 variante M81 induziu aumento de miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p, em comparação com células transfectadas com LMP1 variante B95-8A. Com base de predição *in silico* dos alvos desses miRNAs, identificamos que as alterações nesses miRNAs potencialmente propiciam mudanças na regulação da sobrevivência e proliferação celular, apoptose e angiogênese por meio mudanças em diversas vias intracelulares como PI3K/AKT, MAPK, NF-κB e JAK/STAT (MÜLLER COAN et al., 2022, p. 8).

Baseado nesses dados, é plausível supor que células com expressão aumentada do miRNA-100-5p, -192-5p e -574-3p tenham diferenças de comportamento *in vitro* e *in vivo* relacionadas ao desenvolvimento tumoral e progressão de cânceres. Para a elucidação de sua importância na patogênese de cânceres humanos, como o NPC, as inferências com base nos dados obtidos demandam validação dos efeitos dos miRNAs indicados por análises funcionais. Isso é particularmente relevante no que se refere aos fenômenos da progressão tumoral, os quais condicionam a agressividade biológica das doenças neoplásicas malignas.

---

Os resultados previamente indicados podem contribuir para melhor entendimento da patogênese do NPC, câncer fortemente associado à infecção pelo EBV e de elevada agressividade, com rápida disseminação loco-regional (CHEN et al., 2019). Assim, o presente estudo buscou investigar possíveis efeitos dos miRNAs miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p na viabilidade, proliferação, migração de células humanas imortalizadas de epitélio nasofaríngeo.

## Referências

- ALI SYEDA, Z. et al. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1723, mar. 2020. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijms21051723>
- ASADZADEH, Z. et al. microRNAs in cancer stem cells: Biology, pathways, and therapeutic opportunities. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 7, p. 10002–10017, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1002/jcp.27885>
- BEN-DAVID, U.; AMON, A. Context is everything: aneuploidy in cancer. **Nature Reviews. Genetics**, v. 21, n. 1, p. 44–62, jan. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41576-019-0171-x>
- BRABLETZ, S. et al. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. **The EMBO journal**, v. 40, n. 18, p. e108647, set. 2021. DOI: <http://doi.org/10.15252/embj.2021108647>
- BRYANT, R. J. et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 4, p. 768–774, fev. 2012. DOI: <http://doi.org/10.1038/bjc.2011.595>
- CAETANO, B. F. R. et al. Epstein-Barr virus microRNAs in the pathogenesis of human cancers. **Cancer Letters**, nov. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.019>
- CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, nov. 2002. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- CHEN, B. et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, p. 228, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1186/1479-5876-10-228>
- CHEN, J. F.; YAN, Q. The roles of epigenetics in cancer progression and metastasis. **The Biochemical Journal**, v. 478, n. 17, p. 3373–3393, set. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1042/BCJ20210084>
- CHEN, P. et al. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. **Medical Oncology**, v. 31, n. 10, p. 235, out. 2014. DOI: <http://doi.org/10.1007/s12032-014-0235-x>
- CHEN, Y.-P. et al. Nasopharyngeal carcinoma. **The Lancet**, v. 394, n. 10192, p. 64–80, jul. 2019. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30956-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0)
- CHEN, Z. et al. Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 1, p. 329–336, jul. 2015. DOI: <http://doi.org/10.3892/ol.2015.3179>
- CHOI, J. D.; LEE, J.-S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 4, p. 164, 2013. DOI: <http://doi.org/10.5808/GI.2013.11.4.164>
- CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **National Institutes of Health**, v. 10, n. 10, p. 704–14, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrg2634.Causes>
- CUI, Z. et al. Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. **Cancer Cell International**, v. 14, p. 47, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1186/1475-2867-14-47>
- DAI, Y. et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance. **Head & Neck**, v. 33, n. 6, p. 786–791, jun. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1002/hed.21540>
-

- DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **Journal of Biochemistry**, v. 148, n. 4, p. 381–392, out. 2010. DOI: <http://doi.org/10.1093/jb/mvq096>
- DELLA VITTORIA SCARPATI, G. et al. Analysis of Differential miRNA Expression in Primary Tumor and Stroma of Colorectal Cancer Patients. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1155/2014/840921>
- DONG, B. et al. MiRNA-mediated EMT and CSCs in cancer chemoresistance. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 10, fev. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1186/s40164-021-00206-5>
- DOU, Z. et al. Pooling-analysis for diagnostic and prognostic value of MiRNA-100 in various cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 62703–62715, jun. 2017. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.18697>
- ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–69, abr. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrc1840>
- FENG, B.; WANG, R.; CHEN, L.-B. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. **Cancer Letters**, v. 317, n. 2, p. 184–191, abr. 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.024>
- GEORGAKOPOULOS-SOARES, I. et al. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, abr. 2020. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. The global burden of cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505–527, jul. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0735>
- GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, nov. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 87, p. 3–14, jun. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HILL, M.; TRAN, N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. **Disease Models & Mechanisms**, v. 14, n. 4, p. dmm047662, abr. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- HUANG, Q. et al. MicroRNA-192 promotes the development of nasopharyngeal carcinoma through targeting RB1 and activating PI3K/AKT pathway. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 29, fev. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12957-020-1798-y>
- HUANG, Z. et al. A novel serum microRNA signature to screen esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 1, p. 109–119, jan. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1002/cam4.973>
- HUGO, H. et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 374–383, nov. 2007. DOI: <http://doi.org/10.1002/jcp.21223>
- HUSSEN, B. M. et al. The Impact of Non-coding RNAs in the Epithelial to Mesenchymal Transition. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, mar. 2021. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmolb.2021.665199>
- JI, H. et al. Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Cell Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, out. 2014. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0110314>
-

- Ji, S. et al. miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact  $\beta$ -catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer. **Gut**, v. 62, n. 5, p. 716–726, maio 2013. DOI: <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301083>
- Ji, Z. et al. MicroRNA-574-3p Regulates HIF- $\alpha$  Isoforms Promoting Gastric Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition via Targeting CUL2. **Digestive Diseases and Sciences**, out. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10620-021-07263-0>
- JIANG, Q. et al. MicroRNA-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, nov. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13277-015-4342-x>
- KIM, Y. S. et al. miRNAs involved in LY6K and estrogen receptor alpha contribute to tamoxifen-susceptibility in breast cancer. v. 5, n. 7, p. 42261–42273, 2016.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, jan. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. **Non-coding RNA**, v. 8, n. 1, p. 10, jan. 2022. DOI: <http://doi.org/10.3390/ncrna8010010>
- LI, Y. Y. et al. Exome and genome sequencing of nasopharynx cancer identifies NF- $\kappa$ B pathway activating mutations. **Nature Communications**, v. 8, p. 14121, jan. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1038/ncomms14121>
- MAIA, B. DE M. et al. microRNA Portraits in Human Vulvar Carcinoma. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 11, p. 1231–1241, nov. 2013. DOI: <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0121>
- MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current Cancer Epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217–222, dez. 2019. DOI: <http://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
- MISHAN, M. A. et al. Functional mechanisms of miR-192 family in cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 59, n. 12, p. 722–735, 2020. DOI: <http://doi.org/https://doi.org/10.1002/gcc.22889>
- MORRIS, K. V. The emerging role of RNA in the regulation of gene transcription in human cells. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 22, n. 4, p. 351–358, jun. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.02.017>
- MÜLLER COAN, B. G. et al. Latent Membrane Protein 1 (LMP1) from Epstein–Barr Virus (EBV) Strains M81 and B95.8 Modulate miRNA Expression When Expressed in Immortalized Human Nasopharyngeal Cells. **Genes**, v. 13, n. 2, p. 353, fev. 2022. DOI: <http://doi.org/10.3390/genes13020353>
- MÜLLER-COAN, B. G. et al. Cancer Progression Goes Viral: The Role of Oncoviruses in Aggressiveness of Malignancies. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 7, p. 485–498, jul. 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.04.006>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)**. . . , abr. 2021. . Acesso em: 20 abr. 2021
- NEOPHYTOU, C. M. et al. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2053, jan. 2021. DOI: <http://doi.org/10.3390/cancers13092053>
-

- PAIVA, R. M. et al. Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2061–2073, nov. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1007/s12094-020-02349-z>
- PUPPO, M. et al. miRNA-Mediated KHSRP Silencing Rewires Distinct Post-transcriptional Programs during TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. n. 16, p. 967–978, 2016.
- RYAN, B. M.; FAUPEL-BADGER, J. M. The hallmarks of premalignant conditions: a molecular basis for cancer prevention. **Seminars in oncology**, v. 43, n. 1, p. 22–35, fev. 2016. DOI: <http://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.007>
- SAW, P. E. et al. Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology. **Science China Life Sciences**, v. 64, n. 1, p. 22–50, jan. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11427-020-1700-9>
- SCHAGAT, T.; VIDUGIRIENE, J. MicroRNA Biosensors: Application for the psiCHECK™-2 Vector. **Promega corporation**, 2008.
- Sequence Scramble (GenScript)**, 2002. Disponível em: <https://www.genscript.com/tools/create-scrambled-sequence>. Acesso em: 25 ago. 2021
- SHAW, P. et al. A Clinical Update on the Prognostic Effect of microRNA Biomarkers for Survival Outcome in Nasopharyngeal Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4369, ago. 2021. DOI: <http://doi.org/10.3390/cancers13174369>
- SHI, W. et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 126, n. 9, p. 2036–2048, maio 2010. DOI: <http://doi.org/10.1002/ijc.24880>
- SOLÉ, C.; LAWRIE, C. H. MicroRNAs in Metastasis and the Tumour Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4859, jan. 2021. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijms22094859>
- SPANJER, A. I. R. et al. TGF- $\beta$ -induced profibrotic signaling is regulated in part by the WNT receptor Frizzled-8. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 5, p. 1823–1835, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1096/fj.201500129>
- STRIBLING, D. et al. A noncanonical microRNA derived from the snaR-A noncoding RNA targets a metastasis inhibitor. **RNA**, v. 27, n. 6, p. 694–709, jan. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1261/ma.078694.121>
- SU, Y. et al. Aberrant expression of microRNAs in gastric cancer and biological significance of miR-574-3p. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 468–475, ago. 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.05.016>
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: <http://doi.org/10.3322/caac.21660>
- TANG, Q. et al. Mutant p53 on the path to metastasis. **Trends in cancer**, v. 6, n. 1, p. 62–73, jan. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.11.004>
- THUN, M. J. et al. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 100–110, jan. 2010. DOI: <http://doi.org/10.1093/carcin/bgp263>
- TSAI, M.-H. et al. Spontaneous Lytic Replication and Epitheliotropism Define an Epstein-Barr Virus Strain Found in Carcinomas. **Cell reports**, out. 2013. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.012>
-

- TSANG, C. M. et al. Translational genomics of nasopharyngeal cancer. **Seminars in Cancer Biology**, Translational Genomics for Rare Cancers: Challenges and Opportunity. v. 61, p. 84–100, abr. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.09.006>
- UJIHIRA, T. et al. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 5, jan. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep07641>
- WACLAWICZEK, A. et al. Mesenchymal niche remodeling impairs hematopoiesis via stanniocalcin 1 in acute myeloid leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 6, p. 3038–3050, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1172/JCI133187>
- WANG, J. et al. Prognostic significance of microRNA-100 in solid tumors: an updated meta-analysis. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 493–502, jan. 2017. DOI: <http://doi.org/10.2147/OTT.S122774>
- WARNECKE-EBERZ, U. et al. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. **Tumor Biology**, v. 36, n. 6, p. 4643–4653, jun. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3112-0>
- WEN, Y. et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma: Plasma miRNAs and hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1679–1690, out. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1002/ijc.29544>
- XU, H. et al. miR-574-3p acts as a tumor promoter in osteosarcoma by targeting SMAD4 signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 5247–5253, dez. 2016. DOI: <http://doi.org/10.3892/ol.2016.5355>
- YAN-CHUN, L. et al. MicroRNA-192-5p Promote the Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cell by Targeting SEMA3A. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry**, nov. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000296>
- YANG, Q. et al. Frizzled 8 promotes the cell proliferation and metastasis of renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 78989–79002, set. 2017. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.20742>
- YAO, P. et al. Interplay between miR-574-3p and hnRNP L regulates VEGFA mRNA translation and tumorigenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 13, p. 7950–7964, jul. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/gkx440>
- YUAN, L. et al. Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, n. 12, p. 1613–1621, dez. 2014. DOI: <http://doi.org/10.4161/15384047.2014.961874>
- ZHENG, X.-F. et al. MicroRNA-192 acts as a tumor suppressor in colon cancer and simvastatin activates miR-192 to inhibit cancer cell growth. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 3, p. 1753–1760, mar. 2019. DOI: <http://doi.org/10.3892/mmr.2019.9808>
- ZHOU, H.-C. et al. Downregulation of microRNA-100 enhances the ICMT-Rac1 signaling and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12177–12188, out. 2014.
- ZHOU, R. et al. Tumor invasion and metastasis regulated by microRNA-184 and microRNA-574-5p in small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44609–44622, nov. 2015.
- ZHOU, R. et al. MicroRNA-574-5p promotes metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTPRU. **Scientific Reports**, v. 6, out. 2016. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep35714>
-

