



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



“Efeitos da Oncoproteína LMP1 do Vírus de Epstein-Barr no Potencial de Invasão e na Expressão de microRNAs Endógenos em Células Humanas *in vitro*”

BÁRBARA GRASIELE MÜLLER COAN

Mestranda

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de mestre junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

**Botucatu, SP
novembro de 2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

**Efeitos da Oncoproteína LMP1 do Vírus de Epstein-Barr
no Potencial de Invasão e na Expressão de microRNAs
Endógenos em Células Humanas *In Vitro***

BÁRBARA GRASIELE MÜLLER COAN

Mestranda

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Orientador

**Botucatu, SP
novembro de 2016**

Coan, Barbara Grasielle Muller.

Efeitos da oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr no potencial de invasão e na expressão de microRNAs endógenos em células humanas in vitro / Barbara Grasielle Muller Coan. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 20100000

1. Proteínas oncogênicas. 2. Neoplasias. 3. MicroRNAs. 4. Progressão da doença. 5. Técnicas In vitro. 6. Herpesvírus humano 4.

Palavras-chave: Carcinogênese viral; EBV; Ensaios in vitro; MicroRNAs; Progressão tumoral.

Agradecimentos

Agradeço a UNESP, o Instituto de Biociências e o programa de pós-graduação de Biologia Geral e Aplicada de Botucatu.

Agradeço às agências financiadoras CNPq (163512/2014-0) e FAPESP (2014/15678-5).

Agradeço ao IBTEC pela estrutura oferecida.

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

Agradeço ao Dr. Marcio Luis Acencio pelo auxílio na análise da função dos alvos dos microRNAs.

Agradeço ao meu marido Rafael pelo companheirismo, amparo e auxílio neste processo.

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 da oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr no potencial de invasão e na expressão de microRNAs endógenos em células humanas *in vitro*”

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Cânceres.....	14
1.1.1	Generalidades	14
1.1.2	Biologia dos cânceres.....	15
1.1.3	Carcinoma de nasofaringe	16
1.2	Vírus de Epstein-Barr	17
1.2.1	Proteína LMP1 do EBV	21
1.3	Modificações epigenéticas, microRNAs e cânceres.....	23
1.4	EBV LMP1, microRNAs e progressão tumoral.....	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Células e condições de cultura	29
3.2	Transfecção celular.....	30
3.3	Obtenção da sequência codificadora de LMP1 do EBV.....	30
3.4	Produção de construtos para expressão de EBV LMP1	34
3.5	Validação dos construtos gerados de EBV LMP1.....	37
3.5.1	Análise transcricional da ORF de LMP1.....	37
3.5.2	Análise estrutural da ORF de LMP1.....	38

3.5.3	<i>Análise funcional da LMP1 expressa pelo ensaio da luciferase</i>	38
3.6	Migração e invasão celular	39
3.7	Análise de expressão de miRNAs endógenos	40
4	RESULTADOS	44
4.1	Validação dos construtos para expressão de LMP1 de EBV B95.8 e M81	44
4.2	Análise de Migração Celular	45
4.3	Análise de Invasão Celular	45
4.4	Análise da Expressão de microRNAs	46
4.4.1	<i>Genes potencialmente regulados por miRs diferentemente expressos pela LMP1 variante M81</i>	48
4.4.2	<i>Vias intracelulares potencialmente modificadas por miRs diferencialmente expressos por LMP1 de EBV M81</i>	50
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8	ANEXOS	74

Lista de Figuras

- FIGURA 1** - Após a infecção primária de células B (presentes principalmente nas tonsilas), há replicação lítica inicial e infecção de outras células suscetíveis da mucosa oral. Algumas células B se tornam latentemente infectadas pelo EBV, havendo reativação do ciclo lítico viral na dependência do estado da resposta imunitária do organismo. A produção de novas partículas propicia infecção de novas células e veiculação do EBV pela saliva do hospedeiro infectado¹¹. 18
- FIGURA 2** - Comparação entre a entrada do EBV em células B e células epiteliais. As interações moleculares envolvidas são distintas; adicionalmente, em células B há formação de endossomo, enquanto que nas células epiteliais ocorre fusão da membrana celular com o envelope viral, propiciando liberação no citoplasma do capsídeo do EBV (Produção original). 20
- FIGURA 3** - Síntese de microRNAs. Inicialmente há ação da RNA polimerase II para síntese de molécula pri-miRNA poliadenilado, a qual é clivada pelo complexo Drosha, originando o pre-miRNA. Este é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5. Após nova clivagem (complexo Dicer), há a 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, com ou sem sua degradação. Baseada nas refs. ^{48,49} 25
- FIGURA 4** - Gel de agarose para verificação da presença do amplicons correspondentes ao RNAm de LMP1. Da esquerda para a direita: vetor B95-8-DLC, M81-DLC, plasmídeo pBabe com LMP1 B95-8, DNA de linhagem IBL1, constitutivamente infectada com EBV (controle positivo) e amostra sem DNA (controle negativo)..... 34
- FIGURA 5** – Representação esquemática da ORF que codifica a proteína LMP1 (gene BNLF1) do EBV. São indicados sítios de enzimas de restrição (EcoRI, em amarelo, e BamHI, em azul) utilizadas para subclonagem do inserto (vide texto). Em verde e vermelho são indicados o códon de iniciação e terminação do gene BNLF1, respectivamente. Regiões destacadas em lilás pertencentes ao vetor da subclonagem pGEM-T Easy. 35
- FIGURA 6** - Gel de eletroforese após PCR para verificação da ligação do inserto ao vetor-base pEF1alpha-IRES-ZsGreen. Colunas da esquerda para a direita: vetor-base sem inserto, vetor com inserto B95-8 em proporção molares 1:3 e 1:6, vetor com inserto M81 nas proporções molares 1:3 e 1:6, vetor-base não-digerido e controle negativo da reação. Na 1ª e 2ª linha, observa-se uma banda discreta na região esperada para o inserto (1750pb) e uma banda mais forte na região do vetor-base vazio (165 pb). As proporções molares 1:3 aparecem com banda mais nítida. Na 3ª e 4ª linha (20h de

ligação), observa-se maior rendimento da reação, demonstrada por aumento na intensidade das bandas..... 36

FIGURA 7 - Gel de eletroforese após *PCR colony* de bactérias transformadas com construtos contendo sequência codificante de LMP1 do EBV isolados B95-8 e M81. Na linha superior (1750pb) observa-se amplificação da sequência da LMP1 em todas as amostras, com exceção do controle negativo sem DNA (NTC) e da amostra em que há vetor-base pZsGreen não digerido (Zs). Na linha inferior (165pb) está apresentada a região onde seriam identificadas bandas representando amplificação do vetor recircularizado sem o inserto. Para seguimento dos experimentos, foram selecionadas preferencialmente amostras que apresentam melhor relação entre banda de LMP1 (1750pb) comparada à banda de vetor vazio recircularizado (165pb). 37

FIGURA 8 – Mapa dos construtos gerados para expressão de LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV..... 37

FIGURA 9 - Desenho esquemático do procedimento adotado para o ensaio de reparo de ferida (*Wound healing assay*). Após a lesão (cinza claro) na monocamada celular (cinza escuro), procedeu-se lavagem da placa e registro das áreas de intersecção das lesões. O registro foi repetido nos dois momentos indicados para cálculo da redução da área de lesão em decorrência da migração celular (área pontilhada em vermelho). 39

FIGURA 10 - Desenho esquemático dos procedimentos realizados para obtenção e análise dos microRNAs..... 43

FIGURA 11 - Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença da deleção de 30pb na sequência viral codificadora de LMP1 (gene BNLF1). 44

FIGURA 12 – Ensaio de atividade da luciferase de modo NF-kB-dependente. Os níveis de luminescência obtidos correspondem ao nível de ativação de NF-kB nas células transfectadas com os construtos gerados para expressão de LMP1 do EBV (vetores pZsGLMP1_B95.8 e M81) em relação ao nível basal de ativação da via nas células transfectadas com o vetor-base vazio (controle). Nota-se que quando há presença de LMP1 o nível de ativação é maior. 44

FIGURA 13 - Redução da área de lesão de monocamada após 16h de incubação das células NP69 transfectadas (vetor-base vazio, pZsGLMP1B95-8 ou pZsGLMP1M81). 45

FIGURA 14 – Taxa de células invasoras Ensaio de invasão com células NP69 transfectadas com os construtos para expressão de LMP1 dos isolados B95.8 e M81. 46

FIGURA 15 – Resultados da análise dos microRNAs expressos em células HEK293 transfectadas com os construtos codificando LMP1 de EBV B95.8 e M81 em comparação com células transfectadas com o vetor-base vazio (*volcano plot*). Verifica-se que 3 microRNAs se revelaram significativamente hiperexpressos (pontos com preenchimento vermelho) e nenhum hipoexpresso (pontos verdes)... 47

FIGURA 16 - Diagrama de Venn indicando as relações entre os conjuntos compostos pelo total de genes-alvo preditos para o miR-34a-5p ou miR-497-5p (verde), genes reconhecidamente expressos em tecido renal humano (vermelho) e genes com dados de validação publicados sobre interação com os miRs endógenos humanos miR-34a-5p e miR-497-5p (conjuntos em azul). 50

FIGURA 17 - Número de genes (*hits*) atuantes nas vias intracelulares indicadas, em relação ao número total de genes-alvos analisados empregando o banco de dados *Kegg Pathways*..... 52

FIGURA 18 – Proporção de genes estimulando (percentual positivo) ou inibindo (percentual negativo) os processos biológicos indicados, considerando o total de genes-alvos preditos como inibidos pelos miRs hiperexpresso em células HEK293 expressando a variante M81 em relação à variante B95.8 da LMP1 do EBV. Resultados obtidos com análise empregando a ferramenta *Kegg Pathways*²⁶². 52

Lista de Quadros

QUADRO 1 - Programas de latência do EBV e principais produtos virais expressos.....	19
QUADRO 2 - Sequências relacionadas à LMP1 das variantes B95.8 e M81 do EBV obtidas junto ao NCBI.	31
QUADRO 3 - Iniciadores, componentes de reação e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação e análise de vetores recombinantes para expressão de LMP1 de EBV B95.8 e M81	33
QUADRO 4 - Discriminação das condições experimentais para preparação dos vetores de expressão da oncoproteína LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV.	35
QUADRO 5 - MicroRNAs selecionados com base na literatura para realização do qPCR array separados didaticamente em três grupos: supressores tumorais, oncomirs e com dupla função ..	42
QUADRO 6 - Genes alvo dos miRs selecionados com validação na literatura da interação miR-RNAm.	48
QUADRO 7 - Genes analisados com o <i>Kegg Pathways</i> , suas funções e principais vias intracelulares em que participam, quando disponível.	50

Lista de Abreviaturas

AKT - Proteína quinase Serina/Treonina específica (*Serine/Threonine specific protein kinase*)
ATM - Proteína mutada na Ataxia-Telangectasia (*Ataxia telangiectasia mutated protein*)
CTAR - Região ativadora C-terminal (*C-terminal activator region*)
CSCs - Células iniciadoras de tumor (*Cancer Stem Cells*)
DDR - Resposta ao dano de DNA (*DNA Damage Response*)
EBER - Pequenos RNAs codificados pelo Vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus-encoded small RNAs*)
EBNA - Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*)
EBV - Vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)
EGF - Fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
ERK - Quinase Extracelular regulada por Sinais (*Extracellular signal-regulated kinase*)
G-CSF - Fator estimulante de colônia de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*)
GSK3 - Glicogênio sintase quinase (*Glycogen Synthase Kinase*)
HBV - Vírus da hepatite B (*Hepatitis B Virus*)
HCV - Vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus*)
Hh - Hedgehog (*Hedgehog*)
HIF-1 (α) - Fator induzido por hipóxia 1 (alfa) (*Hypoxia-inducible factor-1 (alpha)*)
HLA II - Antígenos leucocitários humanos de classe II (*Human Leukocyte Antigens Class II*)
HTLV - Vírus linfotrópico da célula T humana (*Human T lymphotropic virus*)
IGF1 - Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*)
IGFR1 - Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor Receptor 1*)
KSHV - Vírus do sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma Virus*)
LMP - Proteína latente de membrana (*Latent Membrane Protein*)
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos (*Mitogen activated protein kinases*)
NF- κ B - Fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor Kappa B*)
NPC - Carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma*)
NRP1 - Neuropilina 1 (*Neuropilin 1*)
PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)
ROS - Espécie reativa de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
TGF- β (1/3) - Fator de crescimento tumoral beta (1/3) (*Tumor Growth Factor Beta (1/3)*)
TNF - Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor*)
TRADD - Proteínas do domínio de morte associadas ao receptor do TNF (*TNF Receptor Associated Death Domain Proteins*)
TRAF - Fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (*Tumoral Necrosis Factor Receptor Associated Factors*)
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)
Wnt - *Wingless-related integration site*

Resumo

O vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* - EBV) é um herpesvírus ubíquo que participa na patogênese de diferentes neoplasias malignas humanas, notadamente o linfoma de Burkitt endêmico e o carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Tem tropismo principalmente por células epiteliais e linfócitos B e seu ciclo biológico é dividido em fases de infecção lítica e latente. Isolados distintos do EBV podem apresentar propriedades biológicas peculiares: por exemplo, em relação ao isolado viral B95-8, o M81 tem predileção por células epiteliais e é mais suscetível a induzir reativação lítica espontânea. As células neoplásicas latentemente infectadas pelo EBV expressam número limitado de produtos virais, alguns com papel cancerígeno bem documentado. Nesse sentido merece destaque a proteína latente de membrana 1 (*Latent Membrane Protein 1* - LMP1), uma proteína transmembrana com propriedades transformantes *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, a expressão de LMP1 em células epiteliais estimula motilidade e invasão celular, o que reflete na agressividade biológica de carcinomas associados ao EBV. Para esse efeito, LMP1 pode regular a expressão de determinados microRNAs, que por sua vez podem atuar em diversos processos celulares, como progressão do ciclo celular, proliferação celular, metabolismo celular e apoptose. Alguns microRNAs estão envolvidos em condições adversas à saúde, incluindo a carcinogênese, a progressão tumoral e o surgimento do fenótipo de resistência à drogas em cânceres. A expressão de EBV LMP1 contribui no potencial metastático do carcinoma de nasofaringe; entretanto, é desconhecido se a LMP1 de diferentes isolados virais exibem efeitos distintos no que se refere aos fenômenos da progressão de carcinomas. Por essa razão, o presente estudo verificou se as diferentes variantes de LMP1 (e.g., isolados B95-8 e M81) induziram níveis distintos de migração e invasão celular e de expressão de diversos microRNAs. Para tanto, células expressando a proteína LMP1 dos isolados virais B95-8 e M81, foram submetidas a experimento de migração e invasão celular *in vitro* e análise da expressão dos miRNAs. Quanto à indução de migração e invasão celular, as variantes não promoveram diferenças significativas, porém, a expressão de microRNAs demonstrou indício *in silico* da variante M81 de induzir a regulação negativa de genes envolvidos em estímulos da adesão focal, angiogênese, anti-apoptóticos, modulação da expressão gênica celular, motilidade e proliferação celular.

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpesvirus that participates in many human cancers pathogenesis, such as endemic Burkitt lymphoma and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. EBV cycle is divided into the lytic and latent infection and distinct viral strains may present peculiar biological properties; compared to the viral isolate B95-8, M81 has propensity to epithelial cell infection and can more likely induce spontaneous lytic activation. In latently-infected neoplastic cells, EBV expresses a limited set of viral products, some of them with well documented oncogenic properties, like latent membrane protein 1 (LMP1). LMP1 is a transmembrane protein with transforming properties both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, epithelial cells expressing LMP1 show increased cell mobility and invasion, with impact on the biological behavior of EBV-associated carcinomas. Cellular microRNAs are involved in many cellular processes like cell cycle progression, cell proliferation, cell metabolism and apoptosis. Some of those microRNAs are related to carcinogenesis, cancer progression and even resistance to chemotherapy drugs. Though EBV LMP1 expression can contribute to metastatic potential of nasopharyngeal carcinomas, it is unknown whether different viral LMP1 forms may have distinct effects on the progression of carcinomas. We verified if LMP1 from B95-8 or M81 EBV isolates behaves distinctly regarding cell migration, invasion and microRNA expression. For this intent, we used human cells expressing the LMP1 protein from EBV B95-8 and M81 strains, and performed *in vitro* cell invasion and migration assays as well as miRNAs expression analysis using rt-PCR. Regarding migration and invasion, both isolates showed similar results. However, microRNA expression pointed *in silico* evidence that M81, when compared to B95-8, can downregulate genes involved in focal adhesion, apoptosis escape, gene expression, cell motility and proliferation.

1 Introdução

1.1 Cânceres

1.1.1 Generalidades

Doenças neoplásicas malignas – os cânceres – foram a segunda maior causa de óbitos em 2013 em todo o mundo, secundando doenças cardiovasculares. Observa-se aumento progressivo da incidência dessas doenças ano após ano, em virtude do envelhecimento populacional e aumento da prevalência de determinados fatores de risco, tais como sobrepeso, obesidade e consumo de álcool¹.

Os cânceres são doenças multifatoriais, cuja etiologia participam tanto fatores genéticos quanto ambientais e de estilo de vida. Estima-se que aproximadamente 50% de todos os cânceres sejam preveníveis, incluindo doenças relacionadas à exposição solar, tabagismo, dieta e doenças infecciosas².

Ao infectarem células do hospedeiro ou com elas interagirem, certos microrganismos ocasionam alterações teciduais crônicas, quer seja por ação direta ou indireta, como na indução da inflamação. Isso é particularmente relevante com alguns vírus, os quais podem interferir em um ou mais fenômenos simultaneamente, como o controle do ciclo celular, apoptose, adesão celular, regulação dos telômeros e manutenção da integridade genômica levando a alterações em processos críticos celulares e podendo favorecer o desenvolvimento de cânceres³.

Em 2008, aproximadamente 16,1% dos cânceres em todo mundo foram relacionados a agentes infecciosos. A frequência de cânceres associadas a infecções é menor em países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento (7,4% versus 22,8%, respectivamente). Dentre os agentes infecciosos implicados estão vírus, bactérias e até mesmo helmintos⁴. A força de associação entre um dado agente infeccioso e cânceres humanos oscila, sendo de 2,3% para o *Schistosoma haematobium* e o câncer de bexiga, até 100% entre o vírus do papiloma humano (*Human Papillomavirus* - HPV) e o desenvolvimento do carcinoma de colo uterino⁵.

Entre os agentes infecciosos comumente relacionados a cânceres humanos merecem destaque os vírus, em ordem decrescente, os papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite

B e C (*Hepatitis B virus* - HBV e *Hepatitis C virus* - HCV), e o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* – EBV) que será abordado em maiores detalhes oportunamente neste trabalho ⁵.

1.1.2 *Biologia dos cânceres*

O processo de desenvolvimento de uma neoplasia maligna (e.g., a carcinogênese), é convencionalmente dividido em 3 etapas: iniciação, promoção e progressão. Na etapa de iniciação ocorrem as primeiras alterações permanentes no genoma celular (e.g., mutações), comumente associada à exposição aos agentes classificados como cancerígenos. Na promoção ocorre a expansão do repertório de células iniciadas no tecido, com acúmulo de novas alterações durante a proliferação celular e, eventualmente, a ocorrência da transformação celular. Admite-se que as alterações fenotípicas na carcinogênese ocorrem de maneira lenta e progressiva, na medida em que a instabilidade genética se torna cada vez mais severa ⁶.

A transformação celular tipicamente delimita a transição entre a promoção e a progressão, sendo caracterizada pela aquisição de propriedades que definem o fenótipo maligno de uma célula neoplásica maligna. A partir desse momento algumas características compartilhadas pelos cânceres se tornam explícitas, tais como: autonomia na geração de estímulos proliferativos, evasão de sinais inibidores de crescimento, evasão da resposta imunitária, imortalização (i.e., duplicação celular ilimitada), indução de inflamação, invasão tecidual e propensão para disseminação (e.g., metástase), indução de angiogênese, instabilidade genética, comprometimento dos mecanismos de morte celular por apoptose e desregulação do metabolismo energético celular ⁷.

A etapa de progressão da carcinogênese merece destaque em virtude das manifestações do desenvolvimento do câncer no organismo hospedeiro. Nessa etapa há consolidação da instabilidade genética nas células neoplásicas, observada tanto em nível gênico como cromossômico (i.e., ocorrência de aneuploidia). Essa instabilidade genética tem papel crucial na progressão tumoral, posto que propicia heterogeneidade genética e fenotípica entre as células malignas, ocasionando emergência de clones com maior capacidade de sobrevivência, evasão imunitária e proliferação.

Cânceres que desenvolvem metástases sofrem diversas alterações que habilitam suas células a efetuarem invasão e colonização de outros tecidos. O processo é complexo e segue uma cronologia de eventos que suscita a formação de micrometástases e o desenvolvimento

destas em tumores secundários macroscopicamente discerníveis ⁷. O entendimento da patogênese da progressão do câncer é fundamental para o manejo clínico da doença, posto que a existência de metástases compromete o prognóstico do paciente, respondendo por altos índices de morbidade e mortalidade. Alguns cânceres apesar de produzirem metástases em tecidos distantes com baixa frequência, possuem alta tendência invasiva nos tecidos adjacentes. Dependendo da localização anatômica, essa invasão pode levar a alta morbidade do paciente, como pode ocorrer no carcinoma de nasofaringe.

1.1.3 Carcinoma de nasofaringe

O carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma* – NPC) é um câncer com elevada agressividade biológica e prognóstico ruim. A etiologia desta doença tem sido associada à exposição a nitrosamidas e infecção pelo EBV ⁸.

A incidência do NPC varia substancialmente de acordo com a localização geográfica, sendo mais comumente encontrado no sudeste da Ásia e sudoeste da China. É um câncer de cabeça e pescoço responsável por cerca de 65.000 novos casos e 38.000 mortes anualmente. Ocorre cerca de três vezes mais em homens do que em mulheres, independentemente da região, sendo a maioria dos pacientes com idade entre 40 e 60 anos. A maioria dos pacientes é assintomática no início, podendo desenvolver sinais devido ao aumento do volume tumoral, como epistaxis, otite média ou obstrução nasal ⁹.

Os tumores podem ser desde bem diferenciados até indiferenciados, sendo que, maior agressividade, invasibilidade e taxa de metástases é observada nos cânceres de maior grau histológico ¹⁰ Em 2005, a *World Health Organization* (WHO) classificou o NPC em três grandes categorias: carcinoma de células escamosas ceratinizante, carcinoma de células escamosas não ceratinizantes (podendo ser diferenciado ou indiferenciado) e o carcinoma basalóide de células escamosas. O carcinoma não ceratinizante é a forma clássica de NPC, e geralmente a forma indiferenciada é associada à infecção pelo EBV, sendo histologicamente caracterizado por conter um infiltrado inflamatório que favorece o crescimento das células tumorais ¹¹.

Devido a sua localização anatômica e alta tendência de invadir os tecidos adjacentes, pode ocorrer invasão na base do crânio, sinus nasais e órbita. A invasão dos linfonodos adjacentes ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes devido a existência de um plexo

linfático no local. Adicionalmente, há a disseminação via hematológica levando à uma doença disseminada. Os locais mais frequentes de disseminação a distância são as metástases ósseas, pulmonares e hepáticas, geralmente surgindo em até 3 anos após o diagnóstico. A sobrevida média dos pacientes é de 5 anos, variando de 40% em regiões endêmicas, até 80% em regiões com tumores esporádicos ⁹.

Quando células da nasofaringe latentemente infectadas pelo EBV possuem algumas alterações genéticas iniciais, como uma displasia celular leve, algumas proteínas virais de latência induzem o agravamento desta displasia, podendo levar a formação do carcinoma indiferenciado *in situ* ou até mesmo um carcinoma invasivo ¹². Seu estadiamento pode ser associado à alta titulação viral, principalmente quando nos estádios clínicos avançados ¹³.

1.2 Vírus de Epstein-Barr

O EBV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *gammaherpesvirinae*. É um agente infeccioso humano ubíquo, pois mais de 90% dos indivíduos adultos apresentam evidências sorológicas de exposição prévia ao EBV, e a infecção viral permanece latente por toda a vida. O vírus tem afinidade principalmente por células epiteliais e linfócitos B, que eventualmente sofrem transformação maligna favorecida pela infecção viral ¹⁴.

O EBV contribui no desenvolvimento de diversos cânceres humanos, notadamente alguns tipos de carcinoma gástrico (principalmente o carcinoma linfoepitelial), linfoma de Burkitt (*Burkit Lymphoma- BL*) e carcinoma de nasofaringe, como descrito anteriormente ¹⁵.

A infecção primária pelo EBV é geralmente assintomática, mas pode ser acompanhada do quadro de mononucleose infecciosa, principalmente se ocorrer a partir da puberdade. Nesses casos observa-se elevada carga viral na orofaringe, onde são liberadas partículas do EBV originadas de células epiteliais, principalmente, ou linfócitos B locais. Em termos gerais, a infecção do hospedeiro pelo EBV compreende uma etapa de replicação inicial em células permissivas (e.g., células epiteliais e linfócitos B na orofaringe), uma etapa de infecção latente no organismo (linfócitos B em tecidos linfoides), recirculação de linfócitos B de memória latentemente infectados e uma fase de reativação viral com replicação e liberação de novas partículas virais ¹⁶.

Trata-se de um vírus envelopado contendo DNA dupla fita com 172kb de comprimento, codificando mais de 80 genes ¹⁷. Seu envelope lipídico possui diversas

glicoproteínas (gp) com papel importante na ligação inicial e entrada do EBV na célula do hospedeiro.

Após a infecção primária por meio da saliva, o EBV infecta células epiteliais e células B. Algumas células B se mantêm cronicamente infectadas e sua proliferação é controlada por um grupo específico de células T citotóxicas. Em um certo momento, as células B se tornam permissivas ao ciclo viral produtivo, propiciando liberação de partículas virais para infecção de mais células epiteliais e células B, além de veiculação do vírus na saliva para infecção de novos hospedeiros (Figura 1)¹¹.

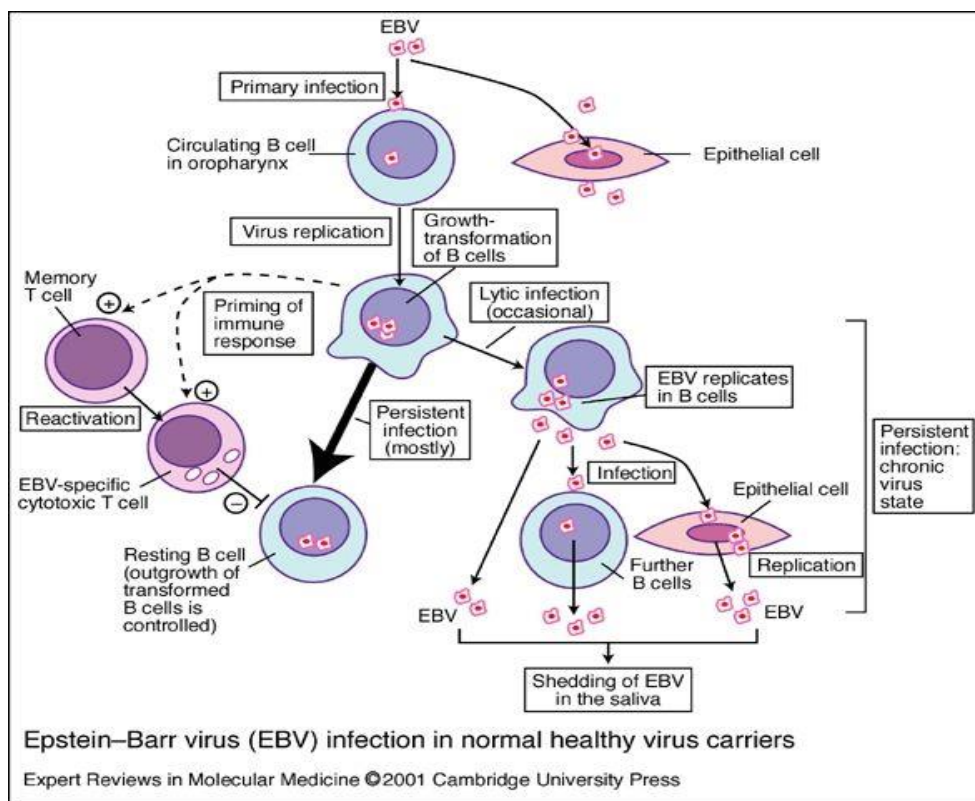


FIGURA 1 - Após a infecção primária de células B (presentes principalmente nas tonsilas), há replicação lítica inicial e infecção de outras células suscetíveis da mucosa oral. Algumas células B se tornam latentemente infectadas pelo EBV, havendo reativação do ciclo lítico viral na dependência do estado da resposta imunitária do organismo. A produção de novas partículas propicia infecção de novas células e veiculação do EBV pela saliva do hospedeiro infectado¹¹.

O ciclo biológico do EBV nas células infectadas é classicamente dividido em duas fases: fase de latência e fase lítica (ou produtiva). Na infecção latente o genoma do EBV é replicado em sintonia com o genoma do hospedeiro, sendo segregado para as células-filhas sem efeitos citopáticos virais significativos. Nesta fase a redução na expressão de produtos virais favorece o escape da vigilância imunológica pela menor exposição de epítomos virais

na superfície celular, propiciando infecção por tempo indeterminado ¹⁸. No ciclo lítico, por outro lado, há expressão de grande número de genes do EBV e replicação ativa do genoma viral com a formação de novas de partículas virais, cuja liberação pela célula infectada frequentemente culmina em morte celular. A transição da fase latente para a lítica do ciclo biológico do EBV é denominada reativação viral ¹⁹.

Durante a infecção latente pelo EBV, o DNA viral se mantém como episssoma no núcleo da célula infectada e a expressão de produtos virais é restrita, determinando alguns perfis conhecidos de expressão gênica denominados programas de latência (Quadro 1). Esses perfis são definidos pela expressão de diferentes produtos virais, incluindo pequenos RNAs codificados pelo EBV (*Epstein-Barr virus-encoded small RNAs – EBERs*), antígeno nuclear do EBV (*Epstein-Barr Nuclear Antigen – EBNA*) e proteína latente de membrana (*Latent Membrane Protein – LMP*). As transições entre as fases de infecção latente e lítica do ciclo biológico do EBV geralmente decorre de regulação epigenética de genes virais e celulares. Digno de nota, em diversos cânceres associados ao EBV, como o NPC e Linfoma de Hodgkin, é possível identificar padrão geralmente caracterizado por hipermetilação de regiões codificadoras de supressores tumorais²⁰.

QUADRO 1 - Programas de latência do EBV e principais produtos virais expressos²¹.

Programa de Latência	Principais produtos virais expressos	Contextos da infecção pelo EBV
Tipo I	EBERs, BARF0, EBNA1, (LMP2A)	• Células B de memória em proliferação e linfoma de Burkitt <i>in vivo</i> • Carcinoma gástrico associado ao EBV¹
Tipo II	EBERs, BARFs, EBNA1, LMPs (1, 2A e 2B)	• Células B do centro germinativo • Células neoplásicas de NPC e linfoma de Hodgkin clássico EBV positivo
Tipo III	EBERs, BARFs, EBNA1 (1, 2, 3) e LP e LMPs (1, 2A e 2B)	• Células B naïve e linhages celulares linfoblastóides • Células provenientes de doenças linfoproliferativas em hospedeiros imunossuprimidos (e.g., PTLD² e linfoma não Hodgkin do Sistema nervosa central)

¹Alguns casos de carcinoma gástrico associado ao EBV podem expressar LMP2A.

²Doença linfoproliferativa pós-transplante (*Posttransplant Lymphoproliferative Disease – PTLD*)

A entrada do EBV nas células suscetíveis à infecção viral ocorre de maneiras distintas entre células B e epiteliais (Figura 2). Na célula B, após endocitose viral, há ligação de gp42 com HLA-II, levando à um remodelamento de algumas glicoproteínas virais e tendo como consequência a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, culminando na

liberação do capsídeo com DNA viral no citoplasma. Em contraste, nas células epiteliais não há endocitose e sim a ligação de glicoproteínas virais com integrinas da membrana celular e NRP1, levando à formação de um poro de fusão entre envelope viral e membrana celular, com consequente liberação do capsídeo no citoplasma celular ²².

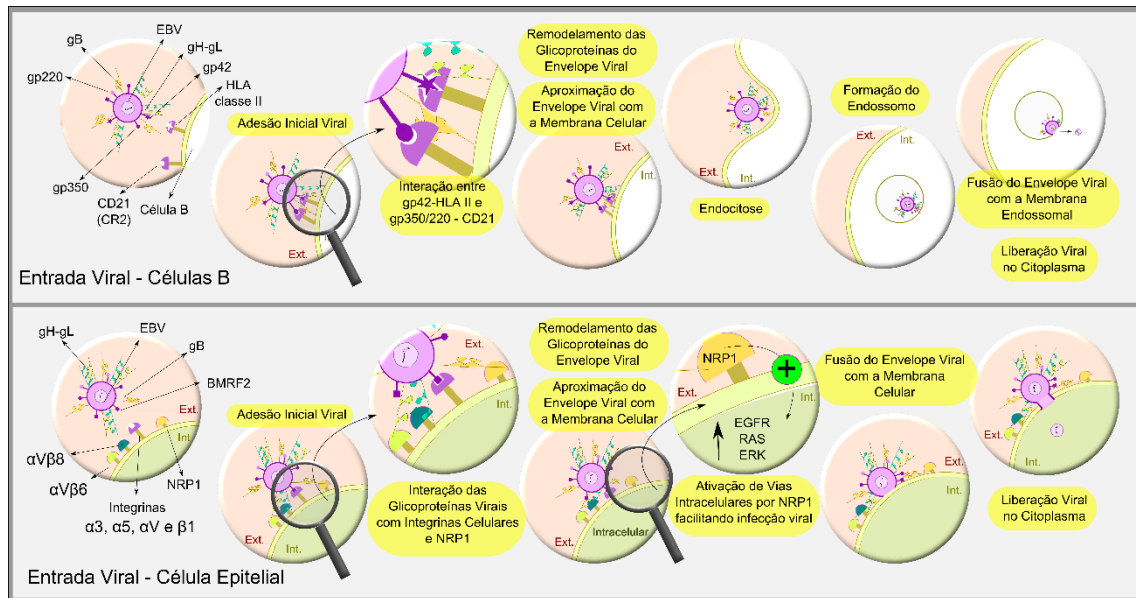


FIGURA 2 - Comparação entre a entrada do EBV em células B e células epiteliais. As interações moleculares envolvidas são distintas; adicionalmente, em células B há formação de endossomo, enquanto que nas células epiteliais ocorre fusão da membrana celular com o envelope viral, propiciando liberação no citoplasma do capsídeo do EBV (Produção original).

Em 2013, Tsai e colaboradores relataram que os isolados B95-8 e M81 do EBV se comportam de maneiras distintas, sendo que M81 possui maior predileção por células epiteliais ao invés de células linfóides, além de possuir maior capacidade de induzir o ciclo lítico quando comparado a B95-8²³. Por outro lado, ainda não há dados suficientes que permitam concluir se proteínas relevantes do EBV derivadas desses isolados virais apresentam propriedades biológicas distintas, particularmente no que diz respeito aos seus efeitos na progressão tumoral. Dentre os produtos virais particularmente relevantes em virtude de propriedades que favorecem o desenvolvimento de neoplasias malignas em pacientes portadores do EBV, destaca-se a proteína LMP1, que será abordada em maiores detalhes a seguir.

1.2.1 Proteína LMP1 do EBV

A LMP1, codificada pelo gene BNLF-1 do EBV, é uma proteína formada por seis estruturas transmembranares e uma região C-terminal citoplasmática. LMP1 age como um receptor de superfície constitutivamente ativo nas células em que é expressa, mimetizando a sinalização deflagrada pela molécula CD40, da superfamília do receptor para o fator de necrose tumoral (*Tumoral Necrosis Factor Receptor – TNFR*). Diferentemente dos TNFR, entretanto, LMP1 não requer interação de ligantes com sua porção extracelular para ativação de transdução de sinal intracelular ²⁴.

Dois domínios C-terminais de LMP1, denominados de região ativadora C-terminal (*C-terminal activator region – CTAR*) 1 e 2, são fundamentais para a deflagração de sinalização intracelular. CTAR-1 contribui na ativação da via NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B – NF-κB*) por meio da interação com os fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (*Tumoral Necrosis Factor Receptor Associated Factors – TRAFs*). Adicionalmente, mediado pelo estímulo de NF-κB, LMP1 induz EGFR a nível proteico, o que subsequentemente leva a indução de sinais proliferativos e de sobrevivência ininterruptos para as células infectadas pelo EBV ²⁵. CTAR-2, por sua vez, ativa NF-κB por meio da interação com TRADD (*Tumoral Necrosis Factor Receptor Associated Death Domain Proteins – TRADD*) ²⁶. Mais recentemente um terceiro domínio localizado entre CTAR-1 e CTAR-2 foi descrito, o CTAR-3, cuja atividade foi associada à expressão do VEGF ²⁷.

Além de suas propriedades transformantes, dados acumulados nas últimas décadas têm suscitado um importante papel da LMP1 no comportamento biológico das neoplasias malignas associadas ao EBV, notadamente na progressão de carcinomas. É relatado que LMP1 pode favorecer redução da adesão intercelular, degradação da membrana basal e do estroma intersticial, aumento da motilidade celular e estímulo da angiogênese, de modo a aumentar a agressividade e o potencial metastático de carcinomas; em contrapartida, a supressão de LMP1 pode inibir todos esses fenômenos ²⁸.

O EBV, destacando-se a LMP1, tem alta capacidade de interferir com diversas vias de sinalização celular com grande importância no câncer, como: NF-κB, MAP quinases,

PI3K-AKT, JAK-STAT e Hedgehog. Com isso, há um aumento da proliferação celular, resistência a apoptose e estímulo de invasão ²⁹.

NF-κB é uma das vias de maior importância e intensamente estimulada pela LMP1. Sua ativação é mediada pela CTAR-2, quando pela via clássica e CTAR-1, no caso da via alternativa. No caso da via clássica ou canônica, seus alvos influenciam positivamente proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, inibição da apoptose, imunomodulação, migração celular, citocinas e receptores de citocinas, além de suprimir supressores tumorais (como TGFβ e Smad) ³⁰, agir sobre o metabolismo celular e a importação de glicose ³¹.

A proteína LMP1 ativa o supressor tumoral p53 pela via das MAP quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases – MAPK*), auxiliando a manutenção do ciclo latente, além de aumentar a transcrição de alguns genes antiapoptóticos (como A20 e Bcl-2) ³². Adicionalmente, dentro da família das MAP quinases, destacam-se ERK (*Extracellular signal-regulated kinase – ERK*), que auxilia a progressão do ciclo celular ³³, e p38. A quinase p38 em si induz a apoptose, porém, quando expressa em células infectadas pelo EBV induz o aumento da expressão de LMP1, que ao contrário de p38 em si, leva ao escape da apoptose, modificando um mecanismo de defesa celular em favor da manutenção viral ³⁴.

Outras vias que merecem destaque são PI3K-AKT, JAK-STAT, Hedgehog e Wnt. Um ponto importante resultante da ativação de PI3K-AKT (*Phosphatidylinositol 3-kinase - Serine/Threonine specific protein kinase – PI3K-AKT*) e ERK é o aumento da síntese protéica de HIF-1α (*Hypoxia-inducible factor-1 – HIF-1α*), com papel chave no efeito de Warburg (produção de energia por meio de glicólise aeróbica) auxiliando a adaptação das células tumorais em ambientes com baixa oxigenação. Além disso, possui papel na angiogênese (pelo aumento da transcrição de VEGF), promoção da progressão tumoral e metástase além da degradação de P53 ^{35,36}. Adicionalmente, LMP1 oferece um estímulo contínuo às vias de sinalização JAK-STAT³⁷ e Hedgehog, levando a uma modulação da resposta imunitária ³⁸ e manutenção das CSCs (*Cancer Stem Cells – CSCs*) ou CSC-like, respectivamente ³⁹. Este estímulo da LMP1 em diversas vias celulares demonstra sua alta capacidade de modulação de mecanismos celulares importantes no câncer e como sua presença pode modificar em grande escala o comportamento celular.

1.3 Modificações epigenéticas, microRNAs e cânceres

Recentemente, o reconhecimento de que alterações epigenéticas, dentre elas destacando-se as moléculas de RNA não-traduzidas têm papel na regulação de fenômenos relacionados à progressão do câncer gerou novas perspectivas para o entendimento da biologia dos cânceres, possibilitando o aperfeiçoamento de intervenções para controle mais efetivo dessas doenças.

Modificações epigenéticas são mudanças na expressão ou fenótipo que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA. Essas modificações cooperaram com as alterações genéticas para a aquisição de características malignas por células neoplásicas, contribuindo para a carcinogênese. Agindo por diversos mecanismos, podem interferir na tradução de RNAs mensageiros, como no caso dos microRNAs, ou até mesmo servir de barreiras para os fatores de transcrição impedindo sua ligação, como no caso da metilação do DNA em regiões promotoras gênicas. Por outro lado, enquanto que a quantidade de mutações envolvidas na perda ou ganho de função das células neoplásicas está na casa das dezenas, a quantidade de alterações epigenéticas está na ordem de centenas, milhares, ou acima disso ⁴⁰. Diversos mecanismos epigenéticos são descritos, tais como as modificações covalentes de histonas, metilação do DNA, e ainda os RNAs não codificantes, com destaque para microRNAs ⁴¹.

MicroRNAs foram originalmente descritos por Ambros e Ruvkun, que descobriram que o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* demandava um pequeno RNA não-traduzido com ação inibitória na expressão de determinados genes. Esse veio a ser o primeiro representante de uma classe de pequenos RNAs não-traduzidos vieram a ser denominados microRNAs (miRNAs, ou miRs), abundantemente identificados nos genomas de microrganismos, plantas e animais. Muitos miRNAs possuem ação regulatória no desenvolvimento e destino celular; outros auxiliam na regulação pós-transcricional da expressão gênica ⁴². Diferentes processos celulares são regulados por miRNAs, que modulam a expressão de reguladores da progressão do ciclo celular, da proliferação celular, genes relacionados ao metabolismo, apoptose, desenvolvimento dos tecidos, imunidade, etc. Estima-se que 60% das proteínas humanas têm suas mensagens reguladas por miRNAs.

A biogênese de miRNAs requer ação da RNA polimerase II, que forma pri-miRNAs – grandes moléculas de RNA precursoras que são processadas no núcleo pela RNase III

(Drosha). O pri-miRNA é processado a uma molécula com aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada pré-miRNA. No citoplasma, a pré-miRNA sofre ação da RNase III (*Endoribonuclease Dicer*), de modo a originar miRNA maduros, com comprimento de 21-23 nucleotídeos (Figura 3) ⁴³. Os miRNAs maduros irão se associar às proteínas AGO (*argonautas*), que os guiam para ligação a RNA mensageiros (RNAm) específicos, pareando-os pela região 3' não traduzida (*Untranslated Region* - UTR). A degradação ou repressão da tradução do RNAm pelo miRNA maduro se torna possível após sua ligação com o complexo indutor de silenciamento de RNA (*RNA-induced Silencing complex* – *RISC*), formado pelas proteínas Argonautas e GW182⁴⁴. As proteínas AGO possuem sítios que podem levar a inibição da transcrição, deadenilação ou até mesmo degradação dos RNAm⁴⁵.

Categorizadas em oito diferentes tipos, as proteínas argonautas contém um domínio PA2 (*Piwi-AGO-2wille*) que reconhece e se liga à região 3' UTR dos pequenos RNAs, e o domínio PIWI, responsável pela clivagem do RNAm. Em humanos, apenas a proteína AGO2 possui a capacidade de clivagem, apesar da AGO3 também possuir o domínio de clivagem, conhecido como tríade catalítica (*aspartato-aspartato-histidina*)⁴⁶. Adicionalmente, estas proteínas possuem algumas funções não-canônicas nucleares, podendo agir em metilação e demetilação de histonas, splicing alternativo do RNAm a até mesmo auxílio no reparo de dano ao DNA ⁴⁷.

Sequências codificadoras de miRNAs estão distribuídas por todo o genoma. Algumas são genes não-codificantes, cujos produtos exclusivos são miRNAs, outras estão localizadas em introns ou na região UTR de um gene codificador de proteína ⁴⁸.

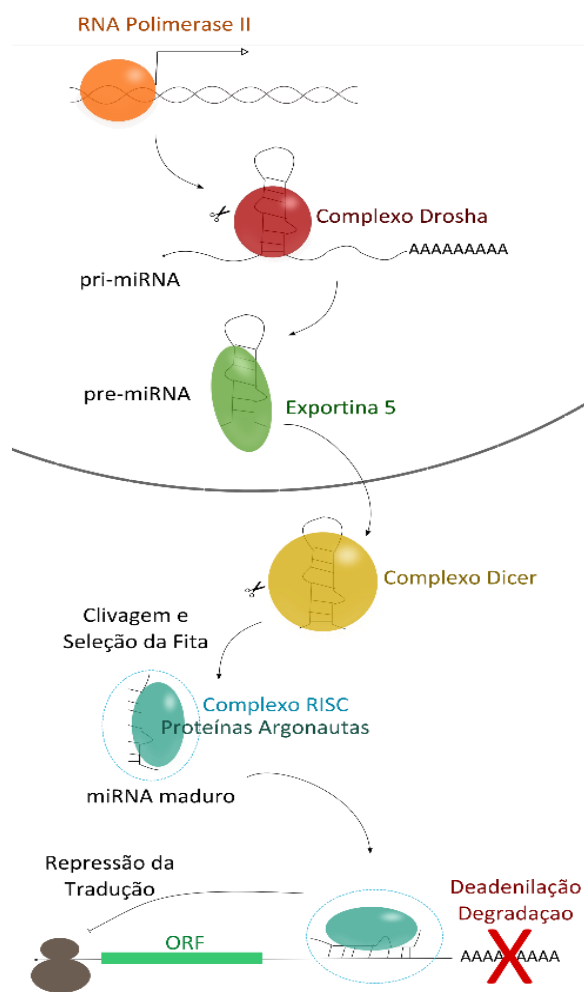


FIGURA 3 - Síntese de microRNAs. Inicialmente há ação da RNA polimerase II para síntese de molécula pri-miRNA poliadenilado, a qual é clivada pelo complexo Drosha, originando o pre-miRNA. Este é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5. Após nova clivagem (complexo Dicer), há a separação 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, com ou sem sua degradação. Baseada nas refs. 48,49

Embora pequenos, os miRNAs são em boa parte específicos, neste ponto destacando-se os nucleotídeos entre as posições dois e oito de sua região 5' (região *seed*). A complementariedade parcial com um dado RNAm usualmente causa sua inibição, enquanto complementariedade elevada geralmente ocasiona sua degradação ⁴². Quando diversos miRNAs possuem a mesma região *seed*, eles são descritos como membros de uma mesma família e comumente podem controlar simultaneamente o mesmo RNAm. ⁵⁰.

Assim como os miRNAs modulam a sinalização intracelular pela regulação da tradução de RNAm das proteínas envolvidas, algumas vias intracelulares induzem a transcrição de miRNAs, como a via das MAP quinases, que propicia transcrição de miR-21, microRNA que propicia diversas alterações celulares que favorecem o desenvolvimento de cânceres humanos ⁵¹.

Alterações em microRNAs tem sido documentadas em situações relacionadas à carcinogênese, progressão tumoral e ao fenótipo de resistência à drogas em cânceres ⁵². Digno de nota, diversas sequências codificadoras de microRNAs estão localizadas em regiões cromossômicas afetadas por deleções e amplificações identificadas nos cânceres ⁵³, levando a alteração na expressão destes miRNAs, que podem agir de modo semelhante aos genes supressores tumorais ou oncogenes ⁵⁴.

Diversos miRNAs foram implicados em fenômenos importantes da carcinogênese, incluindo angiogênese, inibição da apoptose, proliferação celular, transição epitelial-mesenquimal e metástase ⁵⁵⁻⁵⁷. Assim, torna-se premente o esclarecimento da função de miRNAs específicos, quer seja pelos efeitos deflagrados na célula onde foi sintetizado, mas também pela possível influência no microambiente tumoral (e.g., por meio de exossomos) ⁵⁵⁻⁵⁷. Os miRNAs agem também sobre diversas moléculas chave, alterando o metabolismo celular e influenciando o comportamento da célula cancerígena. Levando em consideração em torno de 60 miRNAs chave envolvidos no metabolismo da célula neoplásica, pôde-se observar que 39% deles estavam envolvidos no metabolismo da glicose, 29% influenciavam vias celulares oncogênicas, 15% envolvidos no metabolismo lipídico, 7% na biogênese de aminoácidos e o restante em outras etapas ⁵⁸.

A alteração da expressão de alguns miRNAs da célula do hospedeiro tem papel fundamental tanto na carcinogênese como na progressão do NPC. Adicionalmente a proteína viral LMP1 por si só leva a alteração da expressão destes microRNAs, assim como pode ter sua expressão alterada por eles, levando a alterações do comportamento da célula cancerígena ^{12,58}.

1.4 EBV LMP1, microRNAs e progressão tumoral

O EBV interfere em vias intracelulares de sinalização por meio da expressão de suas proteínas virais e de alterações epigenéticas, incluindo as mediadas por miRNAs. Em células linfoblastóides, há formação massiva de eucromatina por demetilação, levando ao aumento da expressão de diversos genes além do aumento da instabilidade gênica. Em contraste, nas células do carcinoma de nasofaringe, a LMP1 do EBV regula positivamente diversas DNA metiltransferases (*DNA methyltransferase* – *DNMTs*), levando a hipermetilação e

contribuindo para o silenciamento gênico de diversos genes supressores tumorais e do genoma viral da célula do hospedeiro ²⁰.

Adicionalmente, LMP1 modula miRNAs expressos tanto em células B como em células epiteliais infectadas, induzindo múltiplos efeitos *in vitro*, incluindo proliferação celular, resistência à apoptose e aumento da motilidade celular. Existe uma correlação positiva entre a presença de LMP1 e o potencial metastático do NPC, devido aos fatores anteriormente descritos ¹². Além de favorecer a progressão do câncer, LMP1 também pode induzir resistência das células neoplásicas a quimioterápicos em virtude de sua ação na expressão de miR-21 ⁵⁹.

Conforme previamente mencionado, embora ambos os isolados B95-8 e M81 do EBV possam infectar células epiteliais, M81 é mais eficiente nesta infecção e na indução de ciclo lítico viral ²³. Pacientes com esse isolado viral possuem elevada titulação de anticorpos contra proteínas virais que estimulam a replicação celular, um fator preditivo para o desenvolvimento de NPC, principalmente se combinado a outros estímulos cancerígenos ²³. Isso sugere que o isolado M81 possa ter uma ação peculiar nas células neoplásicas infectadas pelo EBV, com reflexos no comportamento tumoral.

Até o momento não é sabido se as proteínas LMP1 dos isolados B95-8 e M81 se equivalem no tocante aos efeitos relacionados a fenômenos da progressão tumoral, os quais podem ser regulados pela expressão de determinados miRNAs celulares. Por essa razão, o presente estudo visa investigar se a LMP1 dos isolados virais M81 e B95-8 se equivalem em termos da regulação de expressão de miRNAs endógenos selecionados e nas taxas de invasão verificadas para células de carcinoma humano *in vitro* que expressam essa oncoproteína viral.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente estudo visou verificar a hipótese de que diferentes formas da proteína LMP1 do EBV apresentam propriedades distintas na indução de migração, invasão e regulação da expressão de miRNAs que regulam fenômenos importantes da progressão de cânceres.

2.2 Objetivos específicos

1. Gerar modelo de células humanas expressando as variantes da proteína LMP1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV *in vitro*;
2. Comparar os potenciais de migração e invasão *in vitro* de células humanas expressando a proteína LMP1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV;
3. Avaliar e comparar os perfis de expressão de miRNAs selecionados em células humanas expressando as variantes de LMP1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV.

3 Materiais e Métodos

3.1 Células e condições de cultura

Para os ensaios celulares foram utilizadas células das linhagens HEK293 (células humanas embrionárias renais) e NP69 (células humanas pré-malignas de epitélio de nasofaringe). HEK293 foi selecionada por se tratar de uma linhagem amplamente utilizada devido à sua elevada susceptibilidade a transfecções gênicas efetuadas com carreadores lipídicos. NP69, por sua vez, foi selecionada por ser histologicamente relacionada ao carcinoma de nasofaringe e negativa para infecção pelo EBV.

Ambas as linhagens foram devidamente validadas quanto à autenticidade genética por meio de análise de repetições curtas em tandem (*Short tandem Repeats* – STRs) com sistema comercial GenePrint 10 (Promega, Madison, WI, USA), conforme instruções do fabricante.

O perfil obtido de HEK293 para os loci de STRs analisados (TH01: 7, 9.3; D21S11: 28, 30.2; D5S818: 8; D13S317: 12, 14; D7S820: 11, 12; D16S539: 9, 13; CSF1PO: 11, 12; AMEL: X; vWA: 16, 19; TPOX: 11) revelou-se equivalente ao perfil de referência disponibilizado pelo biorrepositório ATCC para essa linhagem (Cód. CRL-11268). Para as células NP69, o perfil obtido (TH01: 7; D21S11: 31; D5S818: 11; D13S317: 10, 12; D7S820: 11; D16S539: 11, 12; CSF1PO: 12, 13; AMEL: X, Y; vWA: 16, 19; TPOX: 11) foi compatível com o previamente descrito na literatura ⁶⁰. Adicionalmente, as células utilizadas nos experimentos foram certificadas como livres de contaminação por micoplasma.

Após descongelamento, as células HEK293 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dubecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* - FBS) e 0,4% de gentamicina. A cultura de células NP69 foi efetuada utilizando meio para queratinócitos (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 5% de FBS, 25 µg/mL de extrato de pituitária bovina (*Bovine Pituitary Extract* – BPE), 0,2 ng/mL de fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor* – EGF) e 1% de gentamicina. As células em cultivo foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e os experimentos foram efetuados pelo menos 5 dias após o descongelamento, a fim de propiciar readaptação das células às condições de cultura.

Sempre que as células em cultivo atingiam de 80 a 90% de confluência era realizado um repique celular para que elas se mantivessem na faixa de crescimento exponencial. Neste momento, sempre era realizada a contagem celular e calculado sua viabilidade para detectar se houve alteração na taxa de crescimento esperado ou morte celular aumentada durante aquele período.

3.2 Transfecção celular

As transfecções celulares foram realizadas utilizando os carreadores lipídicos Effectene (Qiagen, Valencia, CA, USA) ou Lipofectamine (Life Technologies), ambos conforme protocolos indicados pelo fabricante, dependendo da eficiência de transfecção do tipo celular utilizado. As células foram semeadas no dia anterior ao da transfecção, de modo a alcançarem confluência aproximada de 60%. Para tanto, foram inicialmente semeadas, 1×10^5 e $0,75 \times 10^5$ células para HEK293 e NP69, respectivamente.

A análise das taxas de transfecção foram feitas verificando o percentual de células que expressavam o GFP, que indicaria a presença do vetor na célula.

3.3 Obtenção da sequência codificadora de LMP1 do EBV

As sequências abertas para leitura (*Open Reading Frame* – ORF) do gene BNLF1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV (Quadro 2) foram obtidas de vetores contendo o genoma completo dessas variantes virais, gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Heri-Jacques Delecluse (*German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*). Os vetores originais XXX (doravante denominados B95.8-DLC e M81-DLC) foram recebidos em células *E. coli* DH5 α acondicionadas em tubo de 1,5mL com agar *Luria-Bertani* (LB).

QUADRO 2 - Sequências relacionadas à LMP1 das variantes B95.8 e M81 do EBV obtidas junto ao NCBI.

EBV LMP1 variante M81 (GenBank Acc# [AGZ95236.1](#)):

ORF para síntese:

```
gcgcgcA1AGCTTatggaacgcgaccttgagagggggccaccgggcccgcacggccccctctaggaacccccctctcctcttcca  
taggccttgctctccttctcctgctcttgccgctactgttctggctgtatcgttatgagtaactggactggaggagcgctcctt  
gtcctctattcctttgctctcatgcttattattatcattctcatctcttattcttcagaagagaccttctctgtccacttggagg  
ccttggtctactcctactgatgggtcaccctcctactcatcgctctctggaatttgacggacagggcattgtaccttgaattgtgc  
tgttcatctttggctgcttacttgtcttaggtctctggatctacttcttggagattctctggcggttgggtgccaccatctggcag  
cttttggccttcactagccttcttctagccatcatcctgcttattattgtctctctatctacaacaaaactgggtggactctatt  
ggttgatctcctttggctcctcctgtttatggccattttaactggatgtattatcatggaccacgacacactgatgaacaccacc  
acgatgactcctcccgacccctcaacaagctaccgacgattctagccatgaatctgactctaactccaacgagggcgacaccac  
ctgctcgtgagtgggcgccgacggacccccactctgctctcaaacctaggcgacactggaggtggtcctgacaatggcccaca  
ggacctgacaacactgatgacaatggcccacaggacctgacaacactgatgacaatggcccacatgaccgctgcctcaggacc  
ctgacaacactgatgacaatggcccacaggacctgacaacactgatgacaatggcccacatgaccgctgcctcaggacc  
gactctgctggaatgatggaggccctccaaatttgacggaagaggttgaaaacaaaggaggtgaccgggacccgcttcgatgac  
agacggtggcggtgatccacaccttctacgctgcttgggtactctggttcgggtgagatgatgacgacccccacggcc  
cagttcagctaagctactatgactaaGATCCgcgcgc
```

Proteína:

```
MERDLERGPPGPPRPLGPPLSSSIGLALLLLLALLFWLYIVMSNWTGGALLVLYSFALMLIIIIILIIIFRFRDLCLPLGLGLLLLMVTLILLIALW  
NLHGQALYLGIVLFIFGCLLVGLWIYFLEILWRLGATIWQLLAFFLAIFLLIIIALYLQNNWTLVLDLLWLLFLAILIWMYYHGPRHTDEHH  
HDDSLPHPQQATDSSSHESDSNSNEGRHLLVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLQDPDNTDDNGPQDP  
DNTDDNGPHDPLPHNPSDSAGNDGGPPNLTEEVENKGGDRDPMSMTDGGGGDPLPTLLLGTSGGSGDDDDPHGPVQLSYDD
```

EBV LMP1 variante B95-8 (GenBank Acc# [CAD53472.1](#))

ORF para síntese:

```
gcgcgcA1AGCTTatggaacacgaccttgagagggggccaccgggcccgcgacggccccctcgaggacccccctctcctcttccc  
taggccttgctctccttctcctcctcttgccgctactgttttggctgtacatcgttatgagtgactggactggaggagccctcctt  
gtcctctattcctttgctctcatgcttataattataattttgatcatcttattcttcagaagagaccttctctgtccacttggagc  
cctttgtatactcctactgatgatcacctcctgctcatcgctctctggaatttgacggacagggcattgttccttgaattgtgc  
tgttcatcttcgggtgcttacttgtcttaggtatctggatctacttattggagatgctctggcgacttgggtgccaccatctggcag  
cttttggcctcttcttagccttcttcttagacctcatcctgctcattattgtctctctatctacaacaaaactgggtggactctatt  
ggttgatctcctttggctcctcctgtttctggcgattttaactggatgtattaccatggacaacgacacagtgatgaacaccacc  
acgatgactcctcccgacccctcaacaagctaccgatgattctggccatgaatctgactctaactccaacgagggcgacaccac  
ctgctcgtgagtgaggccggcgacggacccccactctgctctcaaacctaggcgacactggaggtggtcctgacaatggcccaca  
ggacctgacaacactgatgacaatggcccacaggacctgacaacactgatgacaatggcccacatgaccgctgcctcaggacc  
ctgacaacactgatgacaatggcccacaggacctgacaacactgatgacaatggcccacatgaccgctgcctcatgacctagc  
gactctgctggaatgatggaggccctccacaattgacggaagaggttgaaaacaaaggaggtgaccagggcccgctttgatgac  
agacggaggcggtcatagtcattcggccatggcggtgattccacaccttctacgctgcttgggttcttctggtt  
ccggtggagatgatgacgacccccacggcccagttcagctaagctactatgactaaGATCCgcgcgc
```

Proteína:

```
MEHDLERGPPGPPRPPRGPPLSSSLGLALLLLLALLFWLYIVMSDWTGGALLVLYSFALMLIIIIILIIIFRFRDLCLPLGALCILLMITLLILLALW  
NLHGQALFLGIVLFIFGCLLVGLWIYLLLEMLWRLGATIWQLLAFFLAFFLDLILLIIIALYLQNNWTLVLDLLWLLFLAILIWMYYHGRHSDEHH  
HDDSLPHPQQATDSSSHESDSNSNEGRHLLVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLQDPDNTDDNGPQDP  
DNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLMTDGGGGHSHDSHGGGDPHPLPTLLLGSSSGGDDDDPHGPVQLSYDD
```

A recuperação dos plasmídeos foi iniciada com crescimento bacteriano em meio SOC (*Super Optimal Broth* - SOC) por 1h a 37°C com agitação a 225rpm, seguido de inoculação em placas de petri com LB-agar acrescido do antibiótico cloranfenicol 25µg/mL para seleção microbiana. Após 72h, colônias foram isoladas e submetidas a purificação dos plasmídeos utilizando *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. A validação dos vetores e confirmação da presença de LMP1 foi realizada por meio de amplificação por PCR de sequência de aproximadamente 290pb do gene BNLF1 flanqueada pelos iniciadores que possibilitam a diferenciação entre DNA do gene ou cDNA gerado a

partir do transcrito devido a diferença de 78pb entre os amplicons dessas duas espécies moleculares. As condições experimentais são indicadas no Quadro 3.

Para confirmação e análise das sequências amplificadas do gene codificador da LMP1 do EBV, os produtos de PCR gerados (290pb) foram submetidos a sequenciamento Sanger em serviço especializado do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP. Após confirmação, as bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em meio LB para posterior extração e purificação plasmidial utilizando *QIAGEN® Plasmid Midi kit* (Qiagen), empregando instruções do fabricante.

A fim de se confirmar a expressão em nível transcricional de EBV LMP1 a partir dos plasmídeos purificados, efetuou-se sua transfecção transiente em células HEK293 com os vetores B95-8-DLC ou M81-DLC. Para tanto, as células foram inicialmente semeadas a $0,75 \times 10^5$ células por poço em placa de 24 poços e transfectadas com o carreador lipídico FuGene® (Promega, Madison, WI, USA), conforme o protocolo do fabricante. Foram efetuados dois experimentos independentes empregando amostras em triplicata e os resultados foram monitorados em 24, 48 e 72h pós-transfecção.

Após transfecção, as células em cultivo foram submetidas a dissociação enzimática com tripsina, ressuspendidas, peletizadas e congeladas (1×10^6 células) rapidamente em nitrogênio líquido (método “*Snap Frozen*”). Procedeu-se então a extração de RNA utilizando o sistema comercial *RNeasy Plus Mini* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria UV em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Boston, MA) e tratado com enzima DNase I. Após o tratamento, foi efetuada eletroforese de amostra do RNA em gel de agarose a 1% para identificação das bandas de RNA ribossômico e confirmação de ausência de bandas sugestivas de contaminação por DNA genômico. Subsequentemente foi efetuada transcrição reversa do RNA total utilizando-se a enzima *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Life Technologies), conforme recomendações do fabricante.

A Figura 4 demonstra a identificação do transcrito de LMP1 do EBV nas células transfectadas com os vetores B95.8-DLC ou M81-DLC, confirmando que ambos estavam adequados para geração dos construtos para expressão das variantes de interesse de LMP1. Como controles positivos foram empregados DNA correspondente a vetor pBabe contendo

sequência do gene BNLF-1 do isolado B95.8 do EBV e DNA extraído da linhagem IBL-1, gerada a partir de linfoma não-Hodgkin com infecção constitutiva pelo EBV.

QUADRO 3 - Iniciadores, componentes de reação e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação e análise de vetores recombinantes para expressão de LMP1 de EBV B95.8 e M81

Alvos e iniciadores	Componentes da reação	Termociclagem
Diferenciação entre LMP1 DNA ou cDNA Sense: CGT TAT GAG TGA CTG GAC TGG A Antisense: TGA ACA GCA CAA TTC CAA GG	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ¹	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 57°C - 40s, 72°C-40s (30x); 72°C- 10min; 4°C - ∞
Amplificação de LMP1 sequência completa Sense: ATG GAA CRC GAC CTT Antisense: TTA GTC ATA GTA GCT TAG CT	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ¹	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 55°C - 40s, 72°C-2min (37x); 72°C- 10min; 4°C - ∞
Amplificação de LMP1 sequência completa (para clonagem) EBVLMP1_EcoRI.S: GCG CGC G↓AA TTC CGT ACT GCC TCC GGC AGA EBVLMP1_BamHI.A: GCG CGC G↓GA TCC AAT GTG GCT TTT CAG CCT A	Tampão de PCR 1x (Tris-SO ₄ 60mM pH 8,9/sulfato de amônio 18mM), 2,5mM MgSO ₄ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA polimerase (TaqDNA Polimerase de alta fidelidade ²).	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 55°C - 40s, 72°C-2min (37x); 72°C- 10min; 4°C - ∞
Verificação da presença de inserto no vetor ZsGreen EF1a.S: TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC IRES.A: ACG CAC ACC GGC CTT AT	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ¹	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 55°C - 40s, 72°C-2min (37x); 72°C- 10min; 4°C - ∞
Verificação da presença de Inserto no vetor pGEM TEasy com inserto pGEM TF: GTT TTC CCA GTC ACG AC PGEM TR: GTC ATA GCT GTT TCC TG	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ¹	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 55°C - 40s, 72°C-2min (37x); 72°C- 10min; 4°C - ∞
Verificação de deleção de 30pb em LMP1 LMP1.A (S): CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA LMP1.S (A): GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC	Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl ₂ , 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional ¹	96°C- 5min (1x); 94°C-30s, 57°C - 40s, 72°C-40s (30x); 72°C- 10min; 4°C - ∞

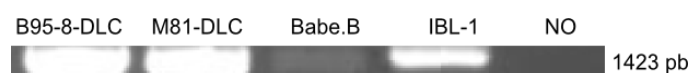


FIGURA 4 - Gel de agarose para verificação da presença do amplicons correspondentes ao RNAm de LMP1. Da esquerda para a direita: vetor B95-8-DLC, M81-DLC, plasmídeo pBabe com LMP1 B95-8, DNA de linhagem IBL1, constitutivamente infectada com EBV (controle positivo) e amostra sem DNA (controle negativo).

3.4 Produção de construtos para expressão de EBV LMP1

As sequências correspondentes às ORFs codificadoras de LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV (Quadro 3) foram amplificadas por PCR utilizando enzima de alta fidelidade *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies); as condições foram apresentadas no Quadro 3. Os iniciadores utilizados continham sítios para *EcoRI* e *BamHI*, propiciando digestão com as respectivas enzimas de restrição para clonagem unidirecional. O amplicon resultante (1.578 pb) foi subclonado no vetor pGEM TEasy® (Promega), de modo a propiciar condições para adequada clivagem enzimática do DNA para geração dos insertos de interesse.

A subclonagem do amplicon no vetor de subclonagem foi verificada por PCR convencional (condições no Quadro 3). Confirmada a ligação, foi realizada transformação de células competentes *E. coli* DH5α *Sub Cloning Efficiency* (Life technologies), crescimento bacteriano em LB-Agar acrescido de ampicilina (100µg/mL), X-Gal e IPTG, a fim de se selecionar colônias contendo o inserto inserido no vetor. A confirmação da presença do inserto em colônias selecionadas foi realizada por PCR de colônia única (*PCR-colony*) com os iniciadores direcionados a segmentos do vetor pGEM (Quadro 3). Colônias validadas foram cultivadas para amplificação do vetor de subclonagem e submetidas a purificação do plasmídeo com sistema *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante.

Para geração dos construtos de expressão de LMP1 nas células eucariotas, os vetores de subclonagem validados (pGEM-LMP1B95-8 e pGEM-LMP1M81) e o vetor-base (*backbone*) comercial pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech, Mountain View, CA, USA), doravante denominado pZsGreen, foram submetidos a digestão com as *BamHI* e *EcoRI*, nessa ordem (condições no Quadro 4). A ordem de digestão foi definida considerando a presença de dois sítios para *EcoRI* no cassete de clonagem (*multiple cloning site - MCS*) do vetor pGEM-TEasy (Figura 5), o que prejudicaria a digestão de *BamHI* subsequente a *EcoRI*.

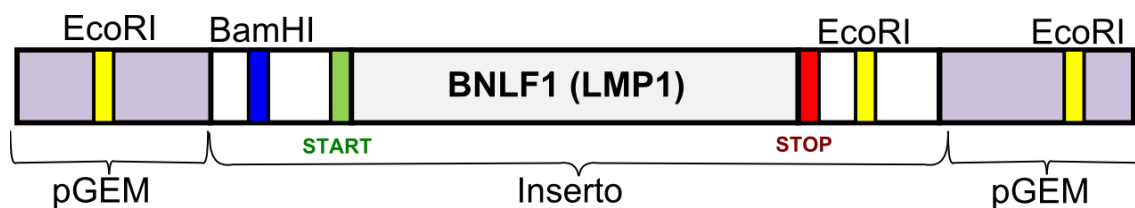


FIGURA 5 – Representação esquemática da ORF que codifica a proteína LMP1 (gene BNLF1) do EBV. São indicados sítios de enzimas de restrição (EcoRI, em amarelo, e BamHI, em azul) utilizadas para subclonagem do inserto (vide texto). Em verde e vermelho são indicados o códon de iniciação e terminação do gene BNLF1, respectivamente. Regiões destacadas em lilás pertencentes ao vetor da subclonagem pGEM-T Easy.

QUADRO 4 - Discriminação das condições experimentais para preparação dos vetores de expressão da oncoproteína LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV.

Propósito experimental	Componentes da reação	Condições da reação
Digestão com <i>Bam</i> HI	Tampão NEB2 ¹¹ x (5mM de NaCl; 1mM de Tris; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ditiotretitol pH 7,9), 3,5 µg BSA ² , 20U de enzima e 2,5 µg de DNA do vetor ou inserto.	Incubação 37°C-1:30h.
Digestão com <i>Eco</i> RI	Tampão NEB2 ¹¹ x (5mM de NaCl; 1mM de Tris; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ditiotretitol pH 7,9), 3,5 µg BSA ² , 20U de enzima e 2,5 µg de DNA do vetor ou inserto.	Incubação 37°C-1:30h Inativação 65°C-20min
Desfosforilação do vetor com enzima fosfatase antártica.	Tampão da enzima 1x (50 mM Bis-Tris-propano-HCl; 1mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ZnCl ₂ ; pH 6,0), 5U da enzima e 1,20µg de DNA do vetor.	Incubação 37°C - 15min; inativação 65°C - 5 min
Ligação entre vetor e inserto com enzima T4 DNA ligase	Tampão 1x (50mM de Tris-HCl; 10mM MgCl ₂ ; 1mM de ATP, 10 mM ditiotretitol pH 7,5), 1000U da enzima, vetor com concentração fixa de 50ng e inserto em proporções crescentes em relação ao vetor (razões vetor: inserto 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3).	Incubação 16°C - 20h

O produto de digestão dos vetores pGEM-LMP1_B95-8 e _M81 foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% para isolamento e purificação do inserto. Para tanto, foi empregado sistema *QIAEX[®] II Gel Extraction Kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. O vetor-base pZsGreen foi purificado diretamente após digestão empregando sistema *Qiaquick[®] PCR Purification Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Subsequentemente, o vetor-base foi submetido a defosforilação com fosfatase antártica (New England Biolabs, Ipswich, MA), a fim de evitar recircularização.

A ligação do vetor-base pZsGreen com os insertos purificados foi realizada utilizando a T4 DNA ligase (New England Biolabs) na proporção molar 1:3 e incubações a 16°C por 5:30h e 20h. O sucesso da ligação foi verificado por meio de amplificação por PCR de segmento contendo o inserto e delimitado por iniciadores dirigidos ao vetor-base (Quadro 3). Um maior rendimento foi obtido após 20h de ligação, ainda que às custas de maior quantidade também de vetores recircularizados sem o inserto. Assim, optou-se pela transformação bacteriana com os construtos gerados empregando o produto da reação de ligação em 20h (Figura 6).

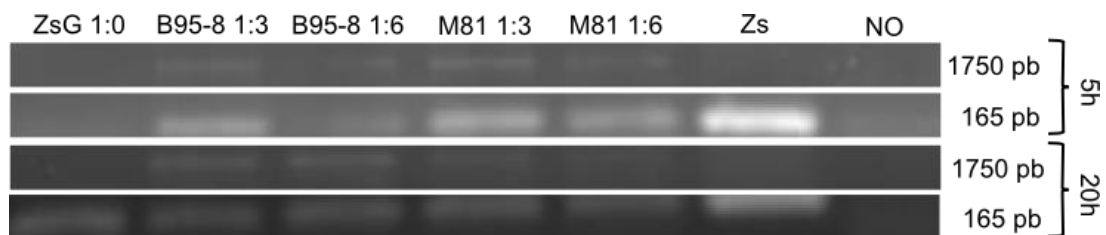


FIGURA 6 - Gel de eletroforese após PCR para verificação da ligação do inserto ao vetor-base pEF1alpha-IRES-ZsGreen. Colunas da esquerda para a direita: vetor-base sem inserto, vetor com inserto B95-8 em proporção molares 1:3 e 1:6, vetor com inserto M81 nas proporções molares 1:3 e 1:6, vetor-base não-digerido e controle negativo da reação. Na 1ª e 2ª linha, observa-se uma banda discreta na região esperada para o inserto (1750pb) e uma banda mais forte na região do vetor-base *vazio* (165 pb). As proporções molares 1:3 aparecem com banda mais nítida. Na 3ª e 4ª linha (20h de ligação), observa-se maior rendimento da reação, demonstrada por aumento na intensidade das bandas.

Células competentes *E. coli DH5α Sub Cloning Efficiency* (Life technologies) foram submetidas à transformação com os construtos gerados para expressão da LMP1 dos isolados virais B95.8 e M81 (pZsGLMP1_B95-8 e pZsGLMP1_M81, respectivamente). As bactérias foram crescidas por 24h em meio LB-Agar contendo canamicina (50µg/mL) como o antibiótico de seleção. Foram selecionadas 24 colônias de cada grupo para confirmação da presença de LMP1 por *PCR-colony* empregando iniciadores dirigidos a segmentos do vetor-base (Quadro 2). Todas as colônias foram positivas, de modo que 5 de cada grupo foram selecionadas com base na melhor proporção de intensidade das bandas do construto contendo o inserto em relação à do vetor recircularizado sem inserto (Figura 7).

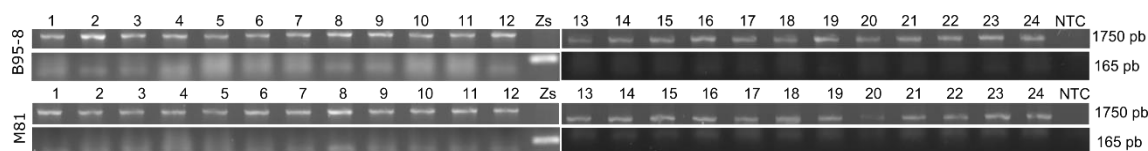


FIGURA 7 - Gel de eletroforese após *PCR colony* de bactérias transformadas com construtos contendo sequência codificante de LMP1 do EBV isolados B95-8 e M81. Na linha superior (1750pb) observa-se amplificação da sequência da LMP1 em todas as amostras, com exceção do controle negativo sem DNA (NTC) e da amostra em que há vetor-base pZsGreen não digerido (Zs). Na linha inferior (165pb) está apresentada a região onde seriam identificadas bandas representando amplificação do vetor recircularizado sem o inserto. Para seguimento dos experimentos, foram selecionadas preferencialmente amostras que apresentam melhor relação entre banda de LMP1 (1750pb) comparada à banda de vetor vazio recircularizado (165pb).

As colônias bacterianas selecionadas foram submetidas a purificação de plasmídeo com *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen) e subsequentemente recertificação da presença de LMP1 nos construtos. A fim de se obter os vetores de expressão em quantidade e grau de pureza adequados para os experimentos de transfecção celular, seguiu-se novo crescimento bacteriano e purificação dos construtos empregando *QIAGEN® Plasmid Midi kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante.

3.5 Validação dos construtos gerados de EBV LMP1

3.5.1 Análise transcricional da ORF de LMP1

Os construtos pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 gerados, cujo mapa é apresentado na Figura 8, foram avaliados quanto à capacidade de expressão constitutiva de LMP1 em células eucariotas empregando os procedimentos relatados previamente (vetores B95.8-DLC e M81-DLC, que contém o genoma completo do EBV). Para tanto foram empregadas tanto células HEK293 como também NP69.

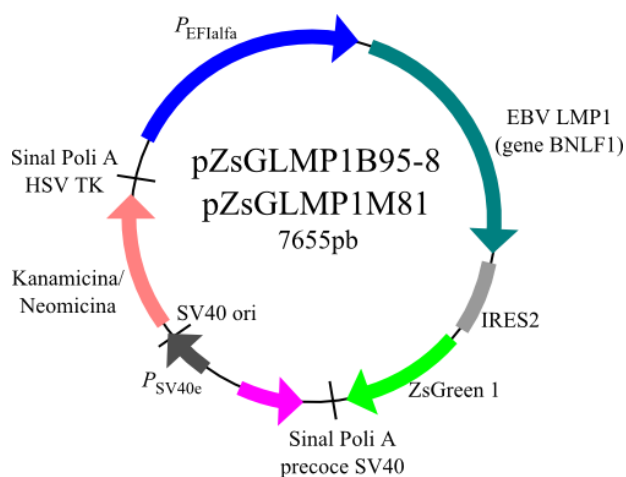


FIGURA 8 – Mapa dos construtos gerados para expressão de LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV.

No caso da NP69, a validação foi realizada com investigação de dez clones selecionados (5 de pZsGLMP1B95-8 e 5 de pZsGLMP1M81) em triplicada, tendo como controle o vetor-base (pZsGreen) sem inserto. As replicatas foram submetidas a extração de

RNA, tratamento com DNase I, quantificação em NanoVue, avaliação em gel de agarose e RT-PCR para LMP1 conforme previamente relatado neste trabalho. Por fim, foi efetuada PCR convencional para detecção dos transcritos de LMP1 utilizando iniciadores para amplificação completa de sua ORF e iniciadores que se encontram em exons distintos, a fim de discriminar a amplificação de sequências provenientes de DNA ou cDNA (Quadro 3). Os resultados obtidos indicaram adequada expressão de LMP1 em células eucariotas transfectadas com esses construtos.

3.5.2 *Análise estrutural da ORF de LMP1*

Os construtos gerados foram submetidos a investigação da deleção de 30pb descrita para o gene BNLF1 de alguns isolados do EBV ⁶¹. Essa deleção discrimina as variantes de LMP1 estudadas no presente estudo, posto que está presente no gene BNLF1 do isolado viral M81, mas não em B95.8. A detecção da deleção foi realizada por PCR convencional com os iniciadores indicados no Quadro 3. A análise foi realizada com amostras de DNA plasmidial provenientes de três clones de pZsG-LMP1_B95-8 (#2, 3 e 12) e três de pZsG-LMP1_M81 (#6, 7 e 9), cujos produtos de PCR foram submetidos para serviços especializados de sequenciamento Sanger. As sequências obtidas para pZsG-LMP1_B95-8 e pZsG-LMP1_M81 foram comparadas com sequências de BNLF1 dos isolados virais B95-8 e M81 depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (Acc# AJ507799.2 e KF373730.1, respectivamente).

3.5.3 *Análise funcional da LMP1 expressa pelo ensaio da luciferase*

A funcionalidade da LMP1 transcrita por meio dos construtos gerados foi analisada por meio de ensaio da luciferase empregando o vetor repórter pcDNA3.1-NF-kBLuc, que proporciona a expressão da luciferase do vaga-lume na dependência de ativação de elemento NF-kB-responsivo em seu promotor⁶². Para tanto, células HEK293 foram cotransfectadas transientemente com três vetores: o vetor repórter pcDNA3.1-NF-kBLuc, o vetor pGL4.74 (Promega), que proporciona expressão constitutiva da luciferase do cnidário *Renilla reniformis*, um dos construtos gerados (pZsG-LMP1B95-8 ou pZsG-LMP1M81), como amostra-teste, ou o vetor-base (pZsGreen), como controle negativo. O ensaio foi realizado em placa branca de 96 poços utilizando o kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), conforme orientações do fabricante, empregando quatro replicatas técnicas para

cada uma das três replicatas biológicas. A leitura da luminescência foi efetuada em equipamento GloMax Explorer (Promega) e, para fins de análise dos resultados, os níveis de luminescência da luciferase do vaga-lume (indicadora da ligação e ativação do elemento NF- κ B-responsivo no vetor repórter) foi normalizado pela luminescência da luciferase *Renilla*, expressa constitutivamente nas células transfectadas.

3.6 Migração e invasão celular

Para análise de migração e invasão celular foram empregadas células transientemente transfectadas com os construtos gerados, conforme previamente descrito.

A análise das taxas de migração celular foi efetuada empregando o ensaio de reparo de ferida (*Wound healing assay*). Entre 48 e 72h após a transfecção, as células foram submetidas a privação de nutrientes (meio de cultura sem suplementação com FBS) por 24h para sincronização do ciclo celular. Subsequentemente a suplementação foi reestabelecida e efetuou-se lesão na monocamada de células em formato de “H” utilizando uma ponteira de 10 μ l em placa de 24 poços. Procedeu-se documentação fotográfica da placa no momento de lesão da monocamada (“zero”) e em 16h, gerando-se duas imagens por campo (uma em cada intersecção da lesão) empregando magnificação de 100x. Para determinação da porcentagem de fechamento da lesão da monocamada, as imagens (área aproximada de 1,5 mm²; Figura 9) foram analisadas com o software TScratch⁶³.

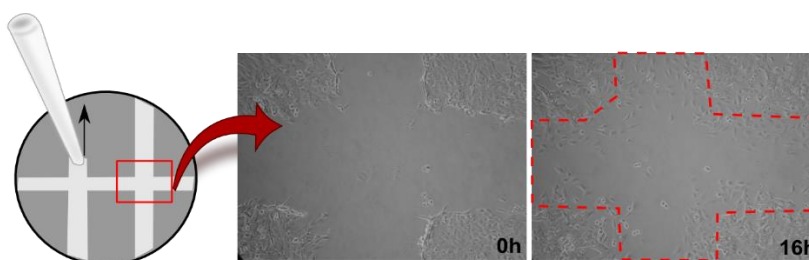


FIGURA 9 - Desenho esquemático do procedimento adotado para o ensaio de reparo de ferida (*Wound healing assay*). Após a lesão (cinza claro) na monocamada celular (cinza escuro), procedeu-se lavagem da placa e registro das áreas de intersecção das lesões. O registro foi repetido nos dois momentos indicados para cálculo da redução da área de lesão em decorrência da migração celular (área pontilhada em vermelho).

As taxas de invasão celular foram estimadas com experimento em câmara de Boyden⁶⁴. Para tanto foi empregado mimético de matriz extracelular Geltrex™ *Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix* (Life Technologies), o qual foi depositado

internamente sobre a membrana semipermeável (poros de 8µm) de insertos *ThinCert*TM (Greiner Bio-One, Nürtingen, Germany), de modo a se formar camada com espessura aproximada de 175µL por cm². Após 30min para consolidação da matriz, 1x10⁵ células foram semeadas com meio sem aditivos no inserto, que foi disposto em placa de 24 poços contendo meio enriquecido com 20% de FBS. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 18h, seguindo-se retirada da matriz do inserto, fixação das células com metanol, coloração com azul de toluidina e subsequente contagem das células invasoras que alcançarem a face externa da membrana do inserto.

3.7 Análise de expressão de miRNAs endógenos

A análise de expressão de miRNAs celulares regulados diferencialmente pelas variantes B95.8 e M81 do EBV foi realizada com painel de alvos analisados por qPCR empregando a plataforma *miScript miRNA PCR Arrays* (Qiagen). O painel de miRNAs constituído foi composto por 91 microRNAs (Quadro 5), selecionados com base na análise de dados de artigos científicos obtidos após busca na literatura com as palavras-chave “microRNAs”, “carcinoma de nasofaringe”, “invasão”, “inflamação” e “câncer”. A seleção dos trabalhos teve como meta estudos com resultados sobre expressão de miRNAs em carcinomas de nasofaringe, carcinomas em geral e em células infectadas pelo EBV, notadamente sob influência de LMP1 do EBV. Ainda, ao painel foram acrescentados 3 controles endógenos, 1 microRNA controle de transcrição reversa e 1 controle para a reação de qPCR.

Células HEK293 foram transfectadas com os construtos pZsGLMP1_B95-8, pZsGLMP1M81, ou o vetor-base (pZsGreen, controle) utilizando o carreador Effectene[®] (Qiagen), conforme descrito anteriormente. Após 72h, as células foram dissociadas com tripsina, lavadas com DPBS e sedimentadas para a formação de *pellet* celular, o qual foi submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido e posteriormente utilizado para extração de RNA com o sistema comercial *miRNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. Em seguida foi realizada transcrição reversa em duas condições: uma convencional (como descrita anteriormente para a detecção da presença ou não da expressão de LMP1 nas amostras transfectadas), e outra específica para microRNAs utilizando o sistema *miScript II RT Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

A qualidade do cDNA dos microRNAs foi verificada empregando qPCR com alvos-controle *miScript[®] QC PCR Array* (Qiagen), composto de dois controles positivos para a

reação de qPCR, dois controles para a qualidade da transcrição reversa, três pequenos RNAs não-codificantes nucleares (SNORDs), três miRs expressos amplamente por todos os tecidos humanos e dois miRs controle negativo (expressos somente em *C. elegans*). Constatada a qualidade da biblioteca de cDNA, foi realizada a qPCR utilizando o painel de alvos selecionados (Quadro 6) empregando o sistema *miScript miRNA PCR Array* (Qiagen). Foram analisados um total de 3 grupos (controle vetor-base vazio, pZsG-LMP1B95-8 e pZsG-LMP1M81) em triplicata, perfazendo total de 9 placas. Os C_s foram analisados utilizando um valor limiar de fluorescência para análise das curvas (*threshold*) igual a 0,03 para todas as placas.

A Figura 10 sumariza os procedimentos adotados para avaliação dos resultados obtidos de expressão diferencial de miRs nas condições experimentais efetuadas. Em síntese, os resultados obtidos foram normalizados e analisados no software online fornecido pela empresa fabricante do qPCR Array (Qiagen). Foram selecionados os miRs com diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas variantes analisadas de EBV LMP1. Os miRs selecionados passaram por predição de alvos utilizando o software de análise mirDIP²⁵⁹, que compara simultaneamente diferentes algoritmos para esse mesmo propósito. Preliminarmente foram selecionados apenas alvos simultaneamente preditos pelos 3 diferentes softwares com suas respectivas filtragens padrão. Dentre os alvos obtidos nesse conjunto preliminar, foram selecionados aqueles classificados na fração dos 1% mais relevantes nos três algoritmos. Adicionalmente, o software TarBase²⁶⁰ foi utilizado para verificar interações miR-RNAm com dados de validação prévia na literatura, além da verificação de quais genes são tipicamente expressos no tecido correspondente às células empregadas no estudo (e.g., genes expressos no rim, para células HEK293) empregando o software IID²⁶¹. Por fim, empregando exclusivamente genes-alvos preditos cuja interação com os microRNAs foi validada na literatura, efetuou-se a identificação de processos celulares potencialmente modulados pelos miRs induzidos pelas variantes de LMP1 do EBV e as respectivas vias intracelulares possivelmente moduladas com auxílio da ferramenta online Kegg Pathways²⁶².

QUADRO 5 - MicroRNAs selecionados com base na literatura para realização do qPCR array separados didaticamente em três grupos: supressores tumorais, oncomirs e com dupla função .

Nº	Gene	Código NCBI	Ref.	Nº	Gene	Código NCBI	Ref.
MicroRNAs com suposta ação supressora tumoral				49	hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	167,168
1	hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	65,66,66	50	hsa-miR-20 ^a	MIMAT0000075	80,164
2	hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	67-69	51	hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	169
3	hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	67,70,71,71	52	hsa-miR-18b-5p	MIMAT0001412	170-172
4	hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	72-75	53	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	173
5	hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	76-78	54	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	174,175
6	hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	76,79,80	55	hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	176,177
7	hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	81-83	56	hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	178-180
8	hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	84-86	57	hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	181
9	hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	76	58	hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	182
10	hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	76,87	59	hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	95,183,184
11	hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	76,88-90	60	hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	185
12	hsa-miR-124-1-5p	MIMAT0004591	91	61	hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	186-188
13	hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	76,92,92,93	62	hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	189
14	hsa-miR-135b-5p	MIMAT0000758	94,95	63	hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	190,191
15	hsa-miR-138-5p	MIMAT0000430	94,96,97	64	hsa-miR-155-5p ^a	MIMAT0000646	192-194
16	hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	76,98	65	hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	195-197
17	hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	99-102	66	hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	94,95,198,199
18	hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	76,103	67	hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	200,201
19	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	76,104,105	68	hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	76,202
20	hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	106	69	hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	203,204
21	hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	107,108	70	hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	95,114,205
22	hsa-miR-188	MIMAT0000457	109-111	71	hsa-miR-210-3p	MIMAT0000267	206,207
23	hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	76,112,113	72	hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	208-211
24	hsa-miR-200a-3p	MIMAT0004613	114-121	73	hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	212,213
25	hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	118,120-123	74	hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	212-214
26	hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	124-126	75	hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	215,216
27	hsa-miR-141-3p	MIMAT0000432	127-129	76	hsa-miR-373-3p	MIMAT0000726	217
28	hsa-miR-429	MIMAT0001536	68,130,131	77	hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	218-221
29	hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	132-134	78	hsa-miR-421	MIMAT0003339	76,222
30	hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	80,80,135	79	hsa-miR-663b	MIMAT0005867	223
31	hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	136	80	hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	224-226
32	hsa-miR-320 ^a	MIMAT0000510	137	81	hsa-miR-4792	MIMAT0019964	227
33	hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	138	82	hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	228,229
34	hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	76,139-141	MicroRNAs reportados com funções mistas			
35	hsa-miR-451a	MIMAT0001631	76,142-144	83	hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	230,231
36	hsa-miR-494-3p	MIMAT0002816	145-147	84	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	76,232-234
37	hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	148	85	hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	235-237
38	hsa-miR-506-5p	MIMAT0022701	149	86	hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436	238-240
39	hsa-miR-539-3p	MIMAT0022705	150-152	87	hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	241-244
40	hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	153,154	88	hsa-miR-184	MIMAT0000454	245-248
41	hsa-miR-634	MIMAT0003304	155	89	hsa-miR-203a-3p	MIMAT0000264	76,249,250
42	hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	156-158	90	hsa-miR-372	MIMAT0000724	251-253
43	hsa-let-7d-5p	MIMAT0000064	76,159,160	91	hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	254-256
44	hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	161	92	Controle positivo da reação de PCR (PPC)		
MicroRNAs com suposta ação oncogênica (oncoMirs)				93	microRNA Controle da transcrição reversa (miRTC)		
45	hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	162	miRs controles de expressão (normalizadores)			
46	hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	80,163,164	94	U6	26827	257
47	hsa-miR-17-3p	MIMAT0000071	163	95	RNU-44	26806	257
48	hsa-miR-18a-5p	MIMAT0000072	165,166	96	RNU-48	26801	258

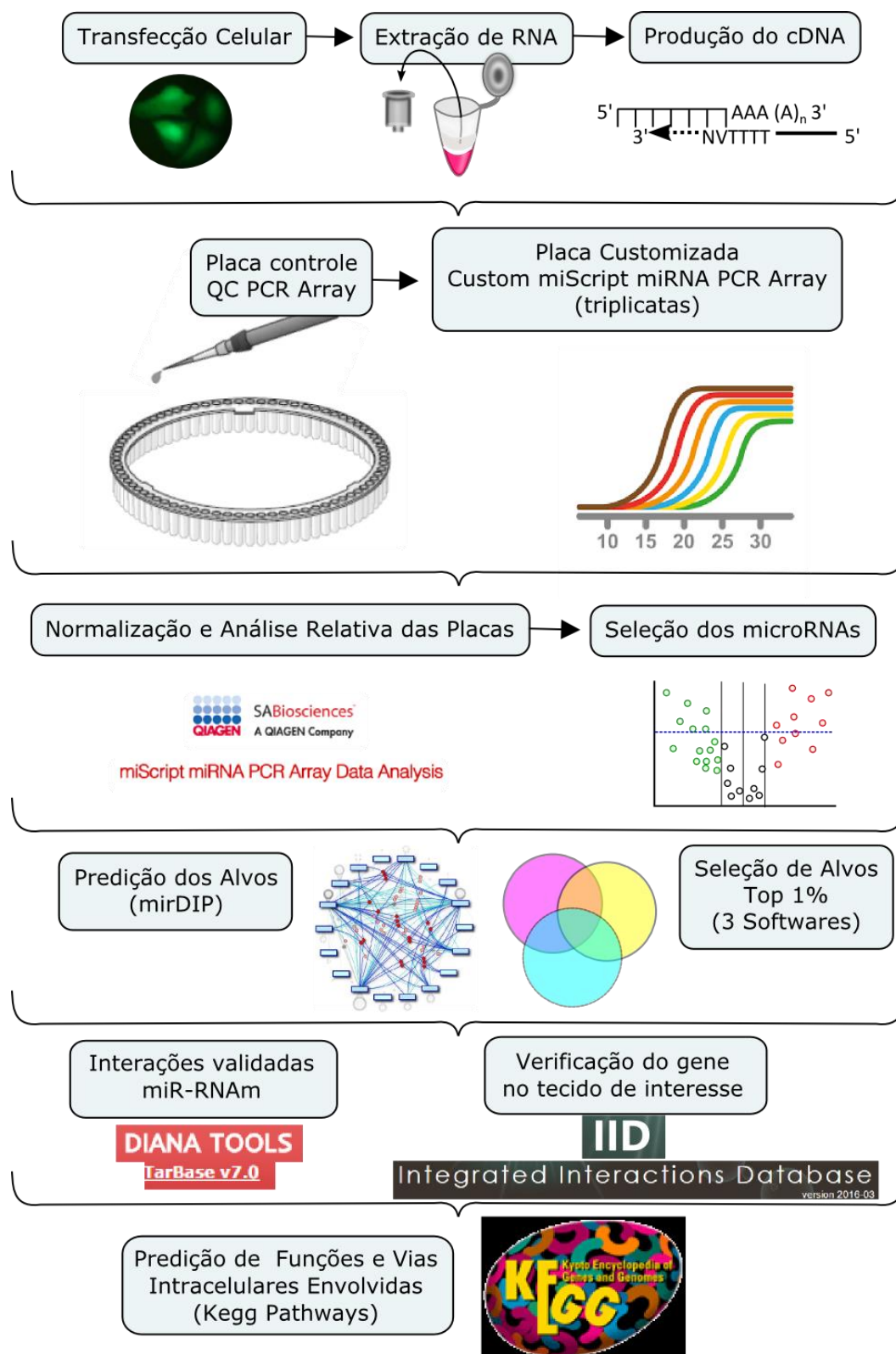


FIGURA 10 - Desenho esquemático dos procedimentos realizados para obtenção e análise dos microRNAs

4 Resultados

4.1 Validação dos construtos para expressão de LMP1 de EBV B95.8 e M81

A amplificação de sequência do gene BNLF1 confirmou a presença da deleção de 30bp descrita na variante M81 da LMP1 do EBV, ausente em B95.8 (Figura 11). Adicionalmente, os resultados de sequenciamento demonstraram que os construtos gerados eram estruturalmente íntegros, com sequências compatíveis com as referências depositadas para os respectivos isolados virais (identidade de 94% com as referências).

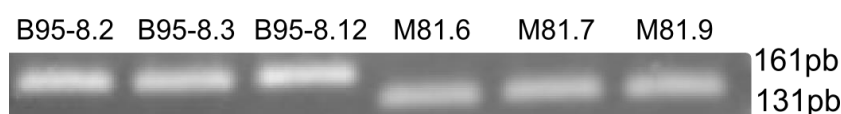


FIGURA 11 - Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença da deleção de 30pb na sequência viral codificadora de LMP1 (gene BNLF1).

Em termos funcionais, a LMP1 codificada em ambos os construtos se mostrou capaz de induzir ativação da via NF- κ B nas células transfectadas. Conforme demonstrado na Figura 12, as células transfectadas com o vetor-base pZsGreen apresentaram nível basal de ativação de NF- κ B, que aumentou em aproximadamente 9 vezes nas células transfectadas com os construtos de LMP1. Não houve diferenças nos níveis de ativação de NF- κ B entre as duas variantes avaliadas de LMP1, expressas nas células transfectadas com os construtos pZsG-LMP1_B95.8 e pZsG-LMP1_M81.

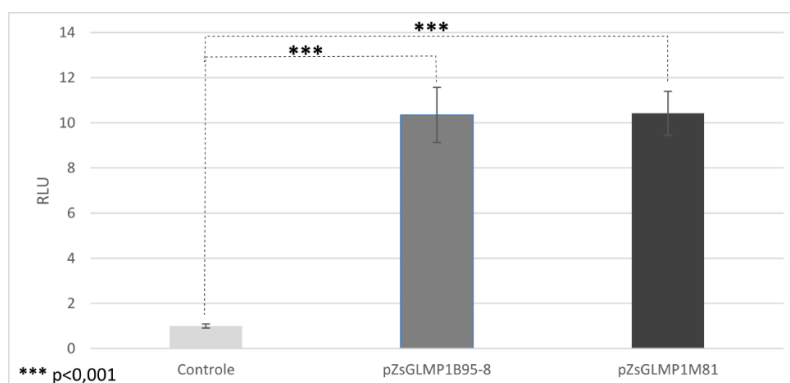


FIGURA 12 – Ensaio de atividade da luciferase de modo NF- κ B-dependente. Os níveis de luminescência obtidos correspondem ao nível de ativação de NF- κ B nas células transfectadas com os construtos gerados para expressão de LMP1 do EBV (vetores pZsGLMP1_B95.8 e M81) em relação ao nível basal de ativação da via nas células transfectadas com o vetor-base vazio (controle). Nota-se que quando há presença de LMP1 o nível de ativação é maior.

4.2 Análise de Migração Celular

A análise de migração celular foi efetuada com células NP69 transfectadas transientemente com o vetor-base e os construtos pZsG-LMP1B95-8 e pZsG-LMP1M81 e efetuada com base na diferença entre as áreas da lesão de monocamada no tempo 0 e em 16h. A Figura 13 revela que houve redução importante na área de lesão em células expressando LMP1. Por outro lado, a diferença entre as reduções obtidas para as variantes M81 e B95.8 de LMP1 do EBV não se revelou estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

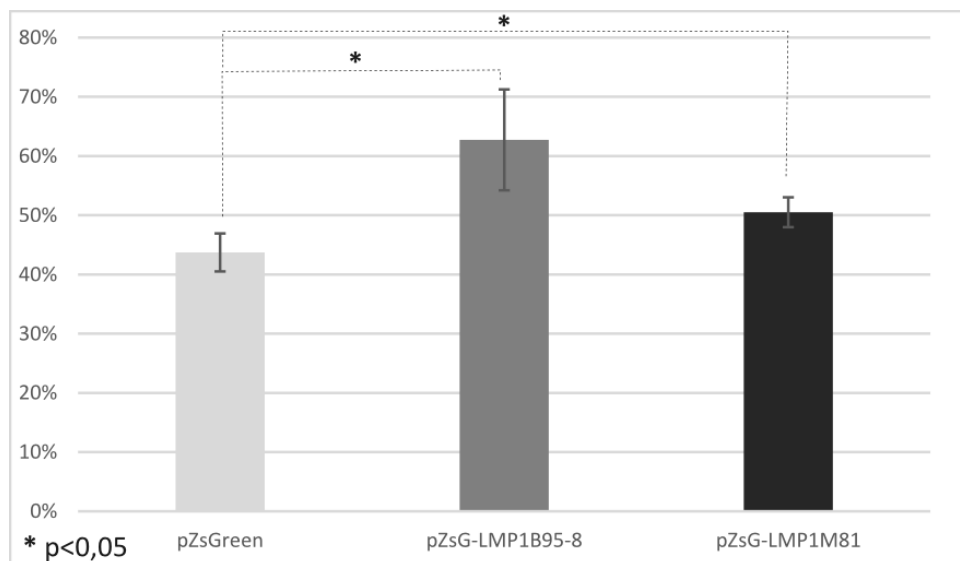


FIGURA 13 - Redução da área de lesão de monocamada após 16h de incubação das células NP69 transfectadas (vetor-base vazio, pZsGLMP1B95-8 ou pZsGLMP1M81).

4.3 Análise de Invasão Celular

A contagem das células invasoras foi feita 18h após a semeadura das células nos insertos. Em relação às células transfectadas com o vetor-base vazio, células NP69 invasoras apresentaram-se em número 25% superior quando foram transfectadas com os construtos para expressão de LMP1 de EBV B95-8 ou M81, sem diferença significativa entre essas variantes da proteína viral (Figura 14).

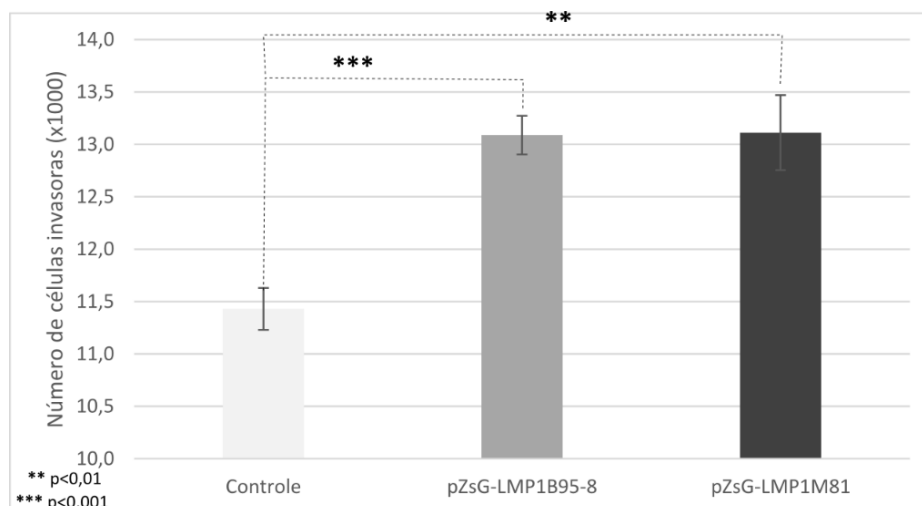


FIGURA 14 – Taxa de células invasoras Ensaio de invasão com células NP69 transfectadas com os construtos para expressão de LMP1 dos isolados B95.8 e M81.

4.4 Análise da Expressão de microRNAs

A análise de expressão foi realizada com as células HEK293 transfectadas transientemente com os construtos. A linhagem foi utilizada devido à alta eficiência de transfecção verificada, alcançando 80% das células, baseado na contabilização das células GFP-positivas. Embora experimentos com células NP69 tenham sido efetuados, essas células tipicamente apresentam taxas de transfecção significativamente inferiores (aproximadamente 40%) e efeitos citopáticos (supostamente pela expressão da LMP1 do EBV) que comprometeram múltiplas tentativas (por meio de tratamento com antibiótico de seleção G418) para geração de células NP69 estavelmente transfectadas para os experimentos de análise de expressão de microRNAs.

Baseado nas relações A_{260}/A_{280} obtidas, o RNA total extraído foi considerado de grau adequado de pureza. Subsequentemente, o cDNA produzido a partir das amostras foi testado por qPCR com a placa controle *miScript[®] miRNA QC PCR Array* (Anexo 8.2), revelando qualidade apropriada baseada nos parâmetros referidos pelo fabricante do sistema. Controles internos positivo e negativo apresentaram o comportamento esperado e os pequenos RNAs nucleares (SNORDs), utilizados como normalizadores, amplificaram sem variação significativa entre as amostras. Considerando que os resultados dos controles de qualidade obtidos foram adequados, procedeu-se os experimentos com as placas customizadas.

Obtidos os resultados experimentais de qPCR Array (Anexo S1), os dados foram normalizados e efetuou-se análise da regulação dos microRNAs de cada grupo (*fold regulation*; Anexo S2), sendo consideradas relevantes as evidências de regulação em nível superior a 1,2 e com valor $p < 0,05$. Células transfectadas com o construto para expressão da variante B95-8 de LMP1 não exibiram resultados significativamente distintos do controle sem expressão dessa oncoproteína do EBV (vetor-base vazio). Por outro lado, células expressando a LMP1 variante M81 apresentaram três miRs hiperexpressos em comparação à LMP1 B95-8: hsa-miR-17-3p, hsa-miR-34a-5p e hsa-miR-497-5p (Figura 15). Esse resultado suscitou a análise de predição *in silico* de genes-alvos cuja expressão pode estar modificada pelos miRs identificados.

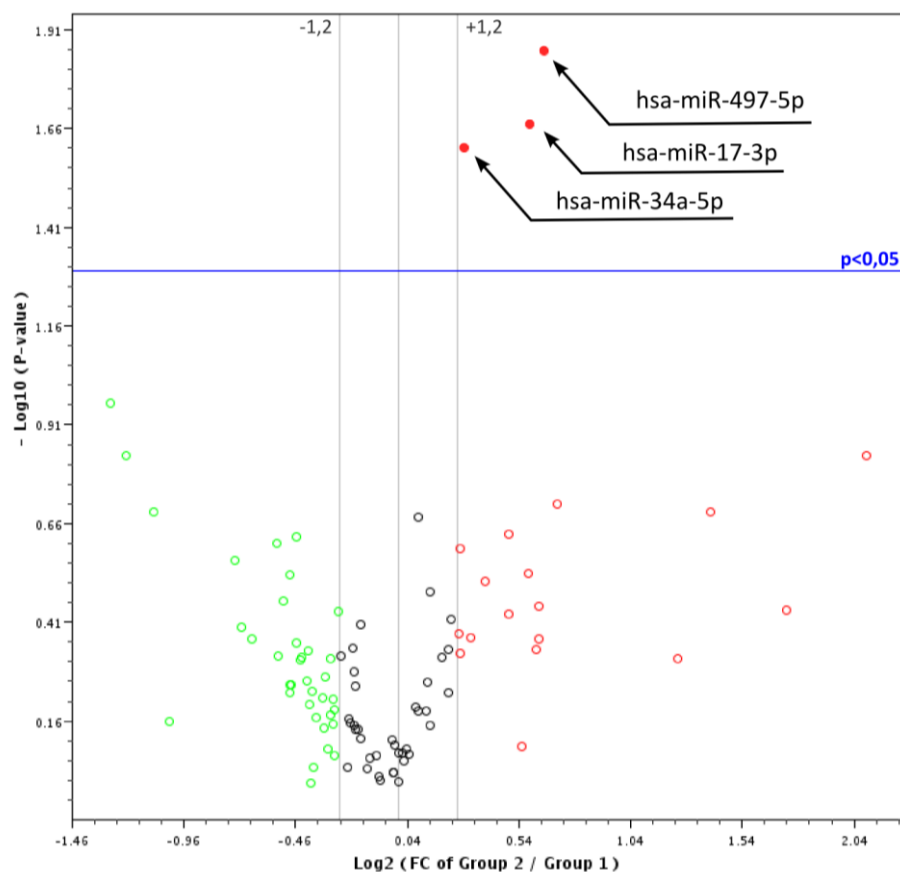


FIGURA 15 – Resultados da análise dos microRNAs expressos em células HEK293 transfectadas com os construtos codificando LMP1 de EBV B95.8 e M81 em comparação com células transfectadas com o vetor-base vazio (*volcano plot*). Verifica-se que 3 microRNAs se revelaram significativamente hiperexpressos (pontos com preenchimento vermelho) e nenhum hipoexpresso (pontos verdes).

4.4.1 Genes potencialmente regulados por miRs diferentemente expressos pela LMP1 variante M81

Após predição *in silico* dos alvos dos miRs hiperexpressos, foi efetuada a identificação daqueles cuja expressão em tecido renal (histogeneticamente relacionado às células HEK293) é documentada, bem como os que possuem interação com o respectivo miR já validada (Quadro S4). Com base nesses critérios foi obtida listagem de genes empregada na busca por funções e vias celulares potencialmente modificados pelos miRs diferencialmente expressos em células expressando a LMP1 de EBV M81 (Quadro 6).

QUADRO 6 - Genes alvo dos miRs selecionados com validação na literatura da interação miR-RNA.

Nº	Gene	Uniprot	Ref	Nº	Gene	Uniprot	Ref	Nº	Gene	Uniprot	Ref
hsa-miR-17-3p				24	FANCA	O15360	279	50	NRIP3	Q9NQ35	279
1	COCH	O43405	263	25	FES	P07332	279	51	NUMBL	Q9Y6R0	279,289
2	SMEK1	Q6IN85	263,264	26	FGD3	Q5JSP0	279	52	PDGFRA	P16234	267,290
hsa-miR-34a-5p				27	FGD6	Q6ZV73	279	53	PKP4	Q99569	279
1	ABCD1	P33897	265	28	FLOT2	Q14254	276,282-284	54	PPFIA1	Q13136	279
2	ACSL4	O60488	266	29	FOSL1	P15407	279	55	PSD4	Q8NDX1	279
3	ALG13	Q9NP73	265	30	FSTL3	O95633	279	56	PVRL1	Q15223	279,291,292
4	ARHGDI	P52566	265	31	FUT8	Q9BYC5	279	57	RNF216	Q9NWF9	279
5	ATPAF1	Q5TC12	265	32	GATAD2B	Q8WXI9	279	58	RRAS	P10301	279
6	AXL	P30530	267,268	33	GIN3	Q9BRX5	285	59	RUFY2	Q8WXA3	279
7	B3GALNT1	O75752	265	34	GK5	Q6ZS86	279	60	SGSM2	O43147	279
8	B3GALNT2	Q8NCR0	265	35	GLRX5	Q86SX6	279	61	SIRT1	Q96EB6	279,293,294
9	BCL2	P10415	269-272	36	GLTP	Q9NZD2	286	62	SLC25A44	Q96H78	279
10	BMP8B	P34820	265	37	GOLPH3L	Q9H4A5	286	63	SMAD7	O15105	279
11	C16orf58	Q96GQ5	265	38	HCN3	Q9P1Z3	279,286	64	SSX5	O60225	279
12	CCNE2	O96020	273	39	HK1	P19367	279	65	SYT1	P21579	279
13	CDON	Q4KMG0	274-276	40	HS2ST1	Q7LGA3	279	66	TAF5	Q15542	279
14	CORO6	Q6QEF8	265	41	KLRK1	P26718		67	TMEM55A	Q8N4L2	279
15	CRTAP	O75718	265,277	42	LMBR1L	Q6UX01	279	68	TMTC3	Q6ZXV5	269,279
16	CUEDC1	Q9NWM3	265	43	LRRC40	Q9H9A6	279,284,287	69	TTC19	Q6DKK2	279
17	DGCR2	P98153	265	44	LRRFIP1	Q32MZ4	287	70	UHRF2	Q96PU4	279
18	DLL1	O00548	265	45	MAP7D3	Q8IWC1	267	71	VCL	P18206	279
19	DNM1L	O00429	265	46	MAPK13	O15264	279	72	ZCCHC17	Q9NP64	279
20	EPS15L1	Q9UBC2	265	47	MOAP1	Q96BY2	279,288	73	ZNF207	O43670	295
21	FAM167A	Q96KS9	265	48	MPV17L2	Q567V2	279	74	ZNF281	Q9Y2X9	267
22	FAM76A	Q8TAV0	278-281	49	MSL2	Q9HCI7	269,273	75	ZNRF1	Q8ND25	279
23	FAM83A	Q86UY5	279								

N°	Gene	Uniprot	Ref	N°	Gene	Uniprot	Ref	N°	Gene	Uniprot	Ref
76	ZSCAN22	P10073	279	10	IGF1R	P08069	296,297,303	22	PVRL1	Q15223	304
hsa-miR-497-5p				11	IP6K1	Q92551	296,297	23	RECK	O95980	281,296,297,305
1	ARL2	P36404	267,296	12	KIF1B	O60333	304	24	SGK1	O00141	306
2	ASB1	Q9Y576	297	13	KIF21A	Q7Z4S6	281,305	25	SIK1	P57059	296,297
3	ASH1L	Q9NR48	281,298,299	14	KIF23	Q02241	281	26	SLC20A2	Q08357	296
4	BTRC	Q9Y297	300	15	LUZP1	Q86V48	296	27	SMAD7	O15105	305
5	CDC44	Q9BXL8	267,296,298	16	MACF1	Q9UPN3	296	28	TMCC1	O94876	296
6	FBXW7	Q969H0	281,296,301,302	17	MTMR3	Q13615	304	29	UBE2V1	Q13404	296
7	FGF2	P09038	267,281	18	N4BP1	O75113	281,296,305	30	WEE1	P30291	296,304,306
8	FOXK1	P85037	267	19	PHF20	Q9BVI0	304	31	YRDC	Q86U90	296,306
9	GPR157	Q5UAW9	296	20	PLAG1	Q6DJT9	281	32	ZBTB34	Q8NCN2	296
				21	PTCH1	Q13635	296	33	ZC3H12C	Q9C0D7	296

Dentre os três miRs identificados como diferencialmente expressos em células HEK293 transfectadas com construto para LMP1 de EBV M81, miR-17-3p apresentou 2 alvos, enquanto miR-34a-5p e miR-497-5p apresentaram mais de 110 alvos cada. Um dos alvos preditos para miR-17-3p é reconhecidamente expresso em tecido renal, situação compartilhada por 83% dos alvos de miR-34a-5p e miR-497-5p. Em termos gerais, constatou-se que 50,7% (n=73) dos alvos preditos para o miR-34a-5p e 22,8% (n=26) para o miR-497-5p eram genes reconhecidamente expressos em tecido renal e possuem interação com o miR regulador já validada na literatura (Figura 16).

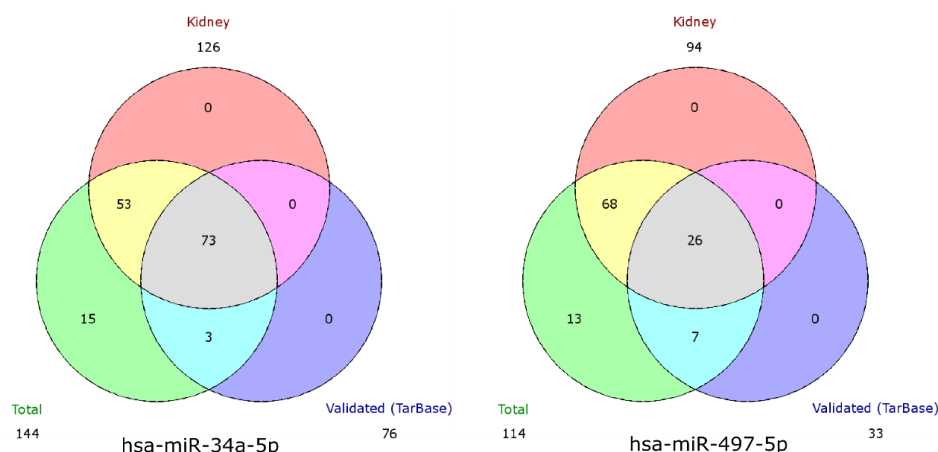


FIGURA 16 - Diagrama de Venn indicando as relações entre os conjuntos compostos pelo total de genes-alvo preditos para o miR-34a-5p ou miR-497-5p (verde), genes reconhecidamente expressos em tecido renal humano (vermelho) e genes com dados de validação publicados sobre interação com os miRs endógenos humanos miR-34a-5p e miR-497-5p (conjuntos em azul).

4.4.2 Vias intracelulares potencialmente modificadas por miRs diferencialmente expressos por LMP1 de EBV M81

Considerando que um miR inibe a tradução dos RNAs mensageiros de seus genes-alvo, admite-se que as funções desses genes estarão comprometidas e, possivelmente, os processos biológicos dos quais participam. A predição de vias intracelulares e função dos genes-alvo preditos e selecionados (conforme previamente indicado) foi efetuada utilizando o banco de dados *Kegg Pathways*, que analisa os genes já inseridos em seu banco de dados, tipicamente os mais amplamente anotados/estudados. Foram verificadas as funções conhecidas e principais vias intracelulares em que os 21 genes obtidos atuam, estes estão indicados no Quadro 7.

QUADRO 7 - Genes analisados com o *Kegg Pathways*, suas funções e principais vias intracelulares em que participam, quando disponível.

Gene	Função	Vias intracelulares envolvidas
AXL	Indução da angiogênese e transição epitelial-mesenquimal, estímulos proliferativos, de diferenciação, crescimento, sobrevivência e motilidade celular	ERK e PI3K/AKT
BCL2	Estímulos proliferativos, de sobrevivência e antiapoptóticos	PI3K/AKT, MAPK, Hedgehog e NF-kB
CDON	Estímulos proliferativos	MAPK e Hedgehog
DNM1L	Indução da necroptose (necrose celular programada induzida por inflamação)	NF-kB
FBXW7	Indução da proteólise	Via da ubiquitina

Gene	Função	Vias intracelulares envolvidas
<i>FGD3</i>	Aumento da motilidade celular e adesão focal	Regulação do citoesqueleto de actina
<i>FGF2</i>	Indução da angiogênese, estímulos proliferativos, migratórios, de regulação do citoesqueleto e antiapoptóticos, além da modulação da transcrição gênica	MAPK, VEGF e PI3K/AKT
<i>FOSL1</i>	Estímulos proliferativos e de transformação celular	Wnt
<i>IGF1R</i>	Indução da angiogênese, estímulos proliferativos, da adesão focal, da dissociação da ligação intercelular, além da modulação da transcrição gênica	MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT, FOXO
<i>KLRK1</i>	Presente em células NK. Reconhece proteínas <i>self</i> anormais em células cancerígenas ou infectadas, levando-as a apoptose	MAPK
<i>NUMBL</i>	Evita degradação de P53 e reduz proliferação celular.	Notch e NF-kB
<i>PDGFRA</i>	Indução da angiogênese, estímulos proliferativos, estímulo da adesão focal além da modulação da endocitose celular e transcrição gênica	MAPK e PI3K/AKT
<i>PTCH1</i>	Estímulos anti-proliferativos	Hedgehog
<i>PVRL1</i>	Presente nas junções intercelulares. Estimula a polimerização da actina e media a entrada viral do Herpes simplex	-
<i>RRAS</i>	Indução da adesão focal, remodelamento do citoesqueleto, proliferação e migração celular, fuga da apoptose, sobrevivência celular, além da modulação da transcrição gênica	PI3K/AKT e MAPK
<i>SGK1</i>	Induz sinais pró-inflamatórios, de sobrevivência, anti-apoptóticos crescimento e proliferação celular	PI3K/AKT, mTOR e regula FOXO
<i>SIRT1</i>	Regulação do ciclo celular e resposta imune. Envolvido na biogênese mitocondrial, glicólise, apoptose, autofagia e silenciamento gênico	AMPK e FOXO
<i>SMAD7</i>	Indução da angiogênese, estímulos proliferativos, estímulo da adesão focal além da modulação da endocitose celular e transcrição gênica Sinais anti-angiogênicos, anti-apoptóticos e de degradação da matriz extracelular.	TGF- β e HIPPO
<i>TAF5</i>	Necessário para o funcionamento de RNAPolIII com papel na expressão gênica do <i>Herpes simplex</i>	-
<i>VCL</i>	Estimula o remodelamento da actina, aumenta a adesão focal e modula a adesão intercelular	-
<i>WEE</i>	Regula o ciclo celular inibindo a progressão em diversos checkpoints da mitose celular.	-

Conforme pode ser observado na Figura 17, os resultados obtidos com o *Kegg Pathways* indicaram que as vias FOXO, Hedgehog, MAPK, NF-kB e PI3K-AKT apresentaram maior número de genes envolvidos (*hits*) dentre os genes-alvo preditos para os mIRs hiper-regulados para LMP1 de EBV M81.

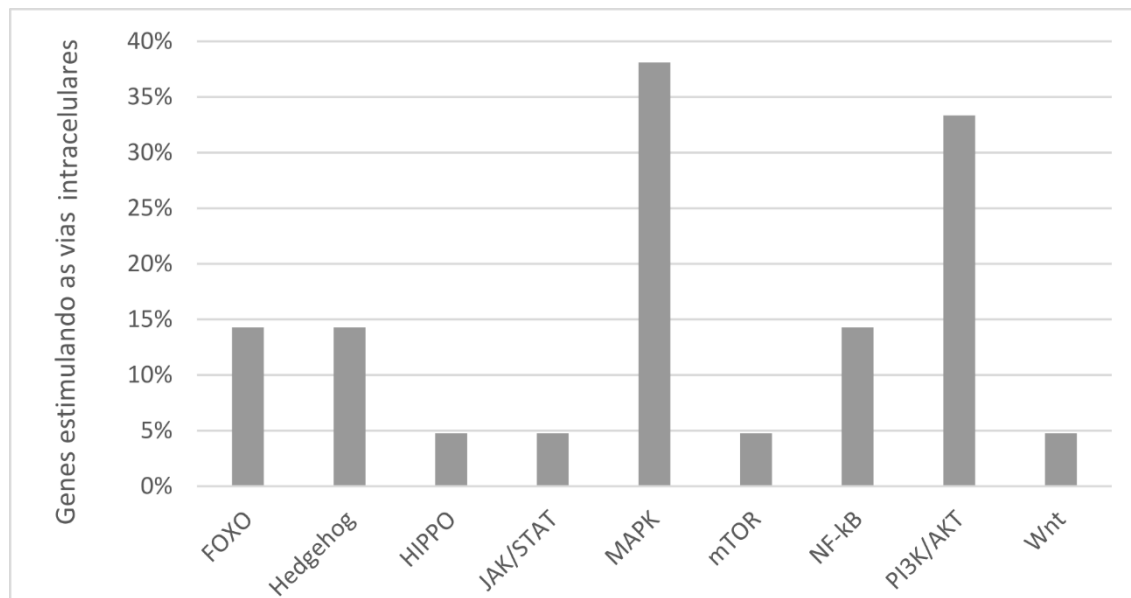


FIGURA 17 - Número de genes (*hits*) atuantes nas vias intracelulares indicadas, em relação ao número total de genes-alvos analisados empregando o banco de dados *Kegg Pathways*.

Por outro lado, ao analisarmos as funções celulares potencialmente alteradas pelos miRs diferentemente expressos em decorrência da LMP1 de EBV M81 – considerando os genes-alvo preditos e selecionados conforme previamente indicados – destacaram-se processos biológicos relacionados à adesão focal, angiogênese, inibição da apoptose, modulação da expressão gênica celular, motilidade e proliferação celular (Figura 18).

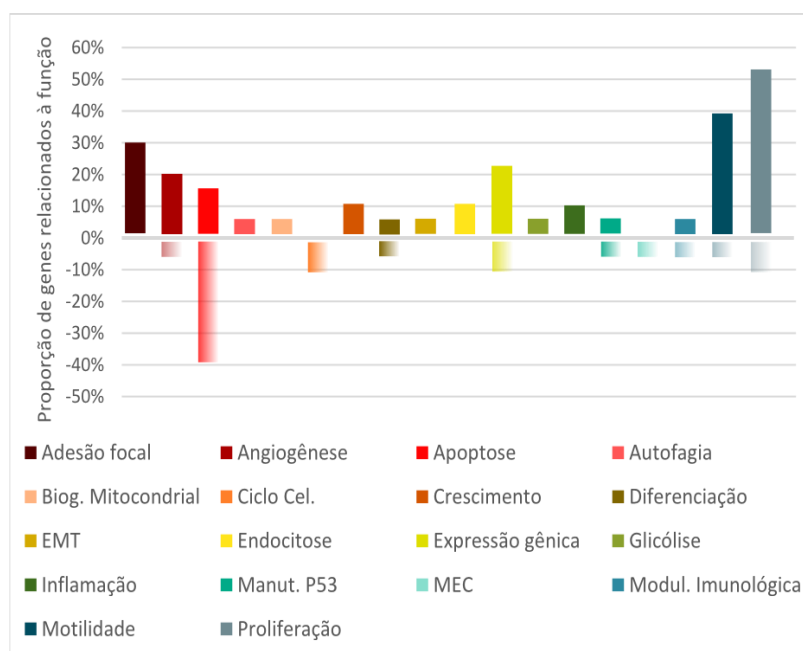


FIGURA 18 – Proporção de genes estimulando (percentual positivo) ou inibindo (percentual negativo) os processos biológicos indicados, considerando o total de genes-alvos preditos como inibidos pelos miRs hiperexpresso em células HEK293 expressando a variante M81 em relação à variante B95.8 da LMP1 do EBV. Resultados obtidos com análise empregando a ferramenta *Kegg Pathways*²⁶².

5 Discussão

Há evidências experimentais acumuladas de que a proteína LMP1 do EBV ocasiona aumento na capacidade de migração e invasão de células epiteliais por diversos mecanismos. Por exemplo, a adesão e motilidade celulares podem ser modificadas por LMP1 por meio de alterações na expressão de caderina N e integrina- $\alpha 5$, o que estimula fenômenos tanto de migração celular individual quanto coletiva ³⁰⁷. A invasão celular também pode ser estimulada pela repressão da expressão do inibidor de metaloproteinase 3 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3* - TIMP-3) pela LMP1, propiciando degradação da matriz extracelular ³⁰⁸, pela ativação de JAK-STAT³⁰⁹. Adicionalmente, a motilidade celular pode ser estimulada por LMP1 via NF- κ B por intermédio de TNFAIP2, proteína associada à formação das protrusões de membrana celular baseadas em actina ³¹⁰. Por outro lado, a placoglobina, uma proteína das junções intercelulares que atua reduzindo o potencial de motilidade da células epiteliais, tem sua expressão substancialmente reduzida pela LMP1 via a ativação de PI3K/AKT e NF- κ B³¹¹.

Neste estudo, a presença da LMP1 aumentou significativamente a capacidade de migração e invasão *in vitro* das células, corroborando com dados previamente publicados. Por outro lado, embora tenham sido relatadas diferenças no comportamento de células epiteliais transfectadas com o genoma viral completo das variantes B95-8 e M81, não foram notadas diferenças significativas no comportamento de migração e invasão *in vitro* de células transfectadas de modo a expressarem apenas a LMP1 destas variantes virais. Igualmente, ambas as variantes de LMP1 apresentaram capacidade semelhante de indução da ativação de ativação de NF- κ B, o que foi demonstrado também para outras variantes dessa oncoproteína viral ³¹².

Embora tenha sido descrito que a variante M81 do EBV seja mais capaz de induzir ciclo lítico viral nas células infectadas²³, essa indução parece se estabilizar alguns meses após a infecção em virtude de modulação da expressão de LMP1 por microRNAs virais (miRBARTs), com consequente redução da apoptose celular ³¹³. A expressão de LMP1 pode ter efeitos antagônicos em relação a apoptose: enquanto a sua região transmembrana estimula a apoptose, sua região carboxi terminal a inibe ³¹⁴. Durante o desenvolvimento desse trabalho, o estabelecimento de linhagem estavelmente transfectadas para expressão constitutiva de LMP1 se mostrou particularmente desafiador, o que pode ser decorrente dos

altos níveis de expressão constitutiva da proteína viral, cujos efeitos citopáticos pela indução de apoptose se tornam mais evidentes em decorrência da ausência da modulação exercida por outras proteínas virais e miRs BARTs do EBV.

Os microRNAs destacam-se não só pela regulação de cânceres humanos, mas também pela sua ação causal na doença. Dependendo quais seus alvos, podem agir podendo agir como supressores tumorais ou oncogenes, além de sua ação desde as etapas iniciais da carcinogênese (e.g. transformação celular) até fenômenos de progressão tumoral (e.g. transição epitelial-mesenquimal). Vale destacar que a regulação pós-transcricional realizada pelos miRs é complexa, sendo que eles modulam e são modulados por diversas proteínas distintas, alterando a regulação de vias intracelulares de maneira direta ou indireta.

No presente estudo, os microRNAs miR-17-3p, miR34a-5p e miR-497-5p apresentaram expressão significativamente maior nas células transfectadas com a LMP1 da variante viral M81 quando comparada com a B95-8. Quando hiperexpresso, admite-se que miR-17-3p atua como oncogene, inibindo supressores tumorais como TIMP3 e PTEN. Essa propriedade foi implicada no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em camundongos¹⁶³, bem como crescimento celular e invasão no câncer de próstata³¹⁵. Adicionalmente, foi proposto que esse miR pode ser utilizado como um biomarcador não-invasivo para detecção de carcinomas de nasofaringe⁸⁰ e de cólon³¹⁶.

Evidências sugerem que os miRNAs podem participar da carcinogênese pela regulação de propriedades de CSCs, tais como auto-renovação, tumorigenicidade e resistência à drogas⁴⁴. Por exemplo, quando hiperexpresso o miR-34a reduz a proporção de CSCs em células de câncer de mama, induzindo apoptose p53-dependente por meio da inibição de Sirt1³¹⁷, cujo gene é um dos alvos preditos neste trabalho. É relatado que esse miR apresenta propriedades de supressão tumoral pela inibição da expressão de diversas proteínas com atividade oncogênicas, culminando em inibindo da formação de metástases e da glicólise aeróbica (efeito de Warburg)²⁸⁷. Outro microRNA diferencialmente expresso encontrado neste estudo foi miR-497, também relatado como supressor tumoral, com funções antiangiogênicas, antiproliferativas e pró-apoptóticas em diversos cânceres como gliomas, câncer de ovário, carcinoma de células escamosas, câncer de mama e câncer de bexiga, principalmente pela inibição de IGF1R e SMAD7³¹⁸⁻³²³, ambos alvos encontrados nas predições deste trabalho.

Como a expressão dos miRs ocorre simultaneamente nas células transfectadas, sua ação com supressão da expressão pós-transcricional de seus genes-alvo foi considerada de forma conjunta, visando elucidar o que globalmente poderia estar ocorrendo nas células transfectadas com as variantes estudadas de EBV LMP1. As análises *in silico* indicaram inibição de genes envolvidos na adesão focal e motilidade celular, resultados em sintonia com os obtidos nos ensaios de migração celular: células transfectadas com a LMP1 variante M81 apresentaram menor migração em comparação a B95-8, ainda que esse estímulo não tenha sido suficiente para diferença estatisticamente significativa entre elas. Por outro lado, a ausência de diferenças quanto ao comportamento invasivo das células também encontra amparo nos resultados de predição *in silico*, posto que não foi observada modificação na expressão de genes codificadores de metaloproteinases ou relacionados. Convém destacar que esses resultados têm a limitação de serem gerados a partir de células transientemente transfectadas, sendo que não é possível antecipar equivalência em modelos baseados em transfecção estável.

Diversos genes antiapoptóticos e pró-proliferativos foram preditos como alvos dos miRs identificados. Assim, é plausível supor que a LMP1 da variante M81 tenha papel induzindo aumento de apoptose e sinais antiproliferativos nas células transfectadas, compatível com o comportamento *in vitro* notado para as células transfectadas com construto para expressão constitutiva dessa versão da oncoproteína viral (dado não mostrado). Os genes alvo preditos nas células contendo a LMP1 da variante M81 também estão envolvidos com uma maior modulação da expressão gênica e do metabolismo energético, corroborando com a literatura, posto que dados publicados indicam que LMP1 pode propiciar alterações no padrão de metilação do DNA das células²⁰ e inibição da glicólise pelo miR-34a³²⁴, respectivamente.

É importante salientar que grande parte das prováveis alterações causadas pelos miR-17-3p, miR34a-5p e miR-497-5p estão envolvidas com a regulação do microambiente tumoral, o que não é passível de investigação com o modelo gerado no presente estudo. É plausível antecipar que essas mesmas células expressando a LMP1 M81 propiciem menor indução de angiogênese e inflamação, concomitantemente a maior modulação da resposta imunitária local. Com base nessas premissas, é possível sugerir que esta variante viral induziria um crescimento tumoral mais lento.

As análises efetuadas possibilitam exame minucioso da expressão de diversos microRNAs celulares modulados pela LMP1 do EBV; entretanto, não propiciam dados sobre os níveis de expressão dos genes-alvo regulados. Assim, necessariamente os resultados apresentados suscitam experimentos adicionais a fim de verificar se as alterações e diferenças preditas entre as variantes preditas, com relação a proliferação celular, apoptose, angiogênese, inflamação e modulação da resposta imune, se confirmam.

6 Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

1. Com relação à indução da migração e invasão celular *in vitro* estas variantes apresentaram comportamento semelhante, no entanto, com relação a expressão dos microRNAs elas se mostraram diferentes.
2. Quando comparada a B95-8 a LMP1 M81 induziu a hiperexpressão de 3 microRNAs (miR-17, miR34a e miR-497) que consequentemente levariam a alterações no comportamento celular como indução da apoptose, redução da angiogênese, proliferação celular e expressão gênica global, além da modulação da resposta imune.

Em síntese, apesar de não apresentarem diferenças em migração e invasão celular, foram obtidos indícios experimentais de que as variantes B95.8 e M81 da LMP1 do EBV podem se comportar de modo distinto com relação a proliferação celular, apoptose, angiogênese, inflamação e modulação da resposta imune. Essas informações suscitam a investigação das predições geradas *in silico*, de modo verificar a existência das alterações biológicas sugeridas, propiciando melhor entendimento sobre as propriedades biológicas e cancerígenas dos genótipos estudados do EBV.

7 Referências Bibliográficas

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol.* **1**, 505–527 (2015).
2. Colditz, G. A., Wolin, K. Y. & Gehlert, S. Applying What We Know to Accelerate Cancer Prevention. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127rv4–127rv4 (2012).
3. Elgui de Oliveira, D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* **247**, 182–96 (2007).
4. De Martel, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* **13**, 607–615 (2012).
5. Oh, J.-K. & Weiderpass, E. Infection and Cancer: Global Distribution and Burden of Diseases. *Ann. Glob. Health* **80**, 384–392 (2014).
6. Duesberg, P. & Li, R. Multistep Carcinogenesis - a chain reaction of aneuploidization. **2**, 202–10 (2003).
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
8. Poon, R. Y. C. DNA damage checkpoints in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol.* **50**, 339–44 (2014).
9. Thompson, L. D. R. Update on Nasopharyngeal Carcinoma. *Head Neck Pathol.* **1**, 81–86 (2007).
10. Yoshizaki, T. *et al.* Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris. Nasus. Larynx* **39**, 137–44 (2012).
11. Murray, P. G. & Young, L. S. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **3**, 1–20 (2001).
12. Yoshizaki, T. *et al.* Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* **337**, 1–7 (2013).
13. Alibek, K., Kakpenova, A. & Baiken, Y. Role of infectious agents in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. *Infect. Agent. Cancer* **8**, 7–7 (2013).
14. Young, L. S. & Rickinson, A. B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 757–768 (2004).
15. Vedham, V., Divi, R. L., Starks, V. L. & Verma, M. Multiple infections and cancer: implications in epidemiology. *Technol. Cancer Res. Treat.* **13**, 177–194 (2014).
16. Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Münz, C. & Hislop, A. D. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* **35**, 159–169 (2014).
17. Longnecker, R. & Neipel, F. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis* **1**, (2007).
18. Thorley-Lawson, D. a. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 251–61; quiz 262 (2005).
19. Murata, T. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol. Immunol.* **58**, 307–17 (2014).
20. Niller, H. H., Szenthe, K. & Minarovits, J. Epstein–Barr virus–host cell interactions: an epigenetic dialog? *Front. Genet.* **5**, (2014).
21. Oliveira, D. E. de, Müller-Coan, B. G. & Pagano, J. S. Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. *Trends Microbiol.* **0**, (2016).
22. Schäfer, G., Blumenthal, M. & Katz, A. Interaction of Human Tumor Viruses with Host Cell Surface Receptors and Cell Entry. *Viruses* **7**, 2592–2617 (2015).
23. Tsai, M.-H. *et al.* Spontaneous Lytic Replication and Epitheliotropism Define an Epstein-Barr Virus Strain Found in Carcinomas. *Cell Rep.* (2013). doi:10.1016/j.celrep.2013.09.012
24. Kieser, A. Pursuing different ‘TRADDes’: TRADD signaling induced by TNF-receptor 1 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1. *Biol. Chem.* **389**, 1261–1271 (2008).

25. Tao, Y.-G. *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 modulates epidermal growth factor receptor promoter activity in a nuclear factor kappa B-dependent manner. *Cell. Signal.* **16**, 781–90 (2004).
26. Zhang, L., Hong, K., Zhang, J. & Pagano, J. S. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* **323**, 141–52 (2004).
27. Zheng, H., Li, L. L., Hu, D. S., Deng, X. Y. & Cao, Y. Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 185–96 (2007).
28. Li, X.-P., Li, G., Peng, Y., Kung, H. & Lin, M. C. Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 212–8 (2004).
29. Tsao, S.-W., Tsang, C. M., To, K.-F. & Lo, K.-W. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies: Role of EBV in epithelial malignancies. *J. Pathol.* **235**, 323–333 (2015).
30. Brinkmann, M. M. Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J. Gen. Virol.* **87**, 1047–1074 (2006).
31. Ersing, I., Bernhardt, C. & Gewurz, B. E. NF- κ B and IRF7 Pathway Activation by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses* **5**, 1587–1606 (2013).
32. Li, L. *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases. *Cancer Lett.* **255**, 219–231 (2007).
33. Lin, X. *et al.* Epstein-Barr virus-encoded LMP1 triggers regulation of the ERK-mediated Op18/stathmin signaling pathway in association with cell cycle. *Cancer Sci.* **103**, 993–999 (2012).
34. Johansson, P., Jansson, A., Ruetschi, U. & Rymo, L. The p38 Signaling Pathway Upregulates Expression of the Epstein-Barr Virus LMP1 Oncogene. *J. Virol.* **84**, 2787–2797 (2010).
35. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **5**, 378–389 (2015).
36. Wakisaka, N. *et al.* Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Synthesis of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5223–5234 (2004).
37. Chen, H. *et al.* Linkage between STAT Regulation and Epstein-Barr Virus Gene Expression in Tumors. *J. Virol.* **75**, 2929–2937 (2001).
38. Pfeifer, A. C., Timmer, J. & Klingmüller, U. Systems biology of JAK/STAT signalling. *Essays Biochem.* **45**, 109–120 (2008).
39. Port, R. J. *et al.* Epstein-Barr virus induction of the Hedgehog signalling pathway imposes a stem cell phenotype on human epithelial cells: Dysregulation of the Hedgehog signalling pathway in NPC. *J. Pathol.* **231**, 367–377 (2013).
40. Choi, J. D. & Lee, J.-S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform.* **11**, 164 (2013).
41. Shen, H. & Laird, P. W. Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. *Cell* **153**, 38–55 (2013).
42. Pasquinelli, A. E., Hunter, S. & Bracht, J. MicroRNAs: a developing story. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 200–5 (2005).
43. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–69 (2006).
44. Takahashi, R.-U., Miyazaki, H. & Ochiya, T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front. Genet.* **4**, 295–295 (2014).
45. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
46. Gagnon, K. T. & Corey, D. R. Argonaute and the Nuclear RNAs: New Pathways for RNA-Mediated Control of Gene Expression. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 3–16 (2012).

47. Huang, V. & Li, L.-C. Demystifying the nuclear function of Argonaute proteins. *RNA Biol.* **11**, 18–24 (2014).
48. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 3–14 (2015).
49. Davis-Dusenbery, B. N. & Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* **148**, 381–392 (2010).
50. Forte, E. & Luftig, M. a. The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **13**, 1156–1167 (2011).
51. Saj, A. & Lai, E. C. Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 504–510 (2011).
52. Raza, U., Zhang, J. D. & Sahin, O. MicroRNAs: master regulators of drug resistance, stemness, and metastasis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **92**, 321–36 (2014).
53. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Natl. Inst. Health* **10**, 704–14 (2012).
54. Cong, N. *et al.* Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/ β -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* **29**, 1579–87 (2013).
55. Guo, L. *et al.* MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4374-2
56. Verma, M., Lam, T. K., Hebert, E. & Divi, R. L. Extracellular vesicles: potential applications in cancer diagnosis, prognosis, and epidemiology. *BMC Clin. Pathol.* **15**, (2015).
57. Abba, M. L., Patil, N., Leupold, J. H. & Allgayer, H. MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *J. Clin. Med.* **5**, (2016).
58. Chen, B. *et al.* Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J. Transl. Med.* **10**, 228 (2012).
59. Yang, G.-D. *et al.* Epstein-Barr Virus_Encoded LMP1 upregulates microRNA-21 to promote the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin-induced Apoptosis by suppressing PDCD4 and Fas-L. *PLoS One* **8**, e78355–e78355 (2013).
60. Chan, S. Y.-Y. *et al.* Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines. *Int. J. Cancer* **122**, 2169–2171 (2008).
61. Giron, L. B., Ramos, S. & Barbosa, A. N. Impact of Epstein – Barr Virus Load , Virus Genotype , and Frequency of the 30 bp Deletion in the Viral BNLF-1 Gene in Patients Harboring the Human Immunodeficiency Virus. *J. Med. Virol.* **85**, 2110–2118 (2013).
62. Keller, S. A. *et al.* NF- κ B is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood* **107**, 3295–3302 (2006).
63. Gebäck, T., Shultz, M. M. P., Koumoutsakos, P. & Detmar, M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* **46**, 265–274 (2009).
64. Shaw, L. in *Cell Migration* (ed. Guan, J.-L.) 97–105 (Humana Press, 2005).
65. Gao, F. *et al.* miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 610–616 (2013).
66. Lu, J. *et al.* Predictive value of miR-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Br. J. Cancer* **110**, 392–398 (2014).
67. Bandi, N. *et al.* miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **69**, 5553–5559 (2009).
68. Zhu, P. *et al.* MiR-429 Induces Gastric Carcinoma Cell Apoptosis Through Bcl-2. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **37**, 1572–1580 (2015).

69. Zhang, C. *et al.* Influence of recombinant lentiviral vector encoding miR-15a/16-1 in biological features of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells. *Cancer Biother. Radiopharm.* **29**, 422–427 (2014).
70. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13944–13949 (2005).
71. He, Q. *et al.* miR-16 targets fibroblast growth factor 2 to inhibit NPC cell proliferation and invasion via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Oncotarget* (2015). doi:10.18632/oncotarget.6504
72. Li, Y.-Q. *et al.* MiR-24 functions as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma through targeting FSCN1. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **34**, 130 (2015).
73. Wang, S., Zhang, R., Claret, F. X. & Yang, H. Involvement of microRNA-24 and DNA methylation in resistance of nasopharyngeal carcinoma to ionizing radiation. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 3163–3174 (2014).
74. Wu, J.-B. *et al.* Reversal effect of GnT-V on the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma cells by alteration β 1, 6-GlcNAc branched N-glycans. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 9901–9911 (2015).
75. Xu, L. *et al.* MicroRNA-24 inhibits growth, induces apoptosis, and reverses radioresistance in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Cancer Cell Int.* **15**, 61 (2015).
76. Chen, J., Yang, R., Zhang, W. & Wang, Y. Candidate pathways and genes for nasopharyngeal carcinoma based on bioinformatics study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 2026 (2015).
77. Li, J. *et al.* MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell Int.* **13**, 7 (2013).
78. Li, J. *et al.* Correction: MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell Int.* **13**, 17 (2013).
79. Liu, N. *et al.* MiR-29c suppresses invasion and metastasis by targeting TIAM1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* **329**, 181–188 (2013).
80. Zeng, X. *et al.* Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma. *PloS One* **7**, e46367 (2012).
81. Baraniskin, A. *et al.* MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis* **33**, 732–739 (2012).
82. Wang, H.-Y. *et al.* MicroRNA-30a promotes invasiveness and metastasis in vitro and in vivo through epithelial-mesenchymal transition and results in poor survival of nasopharyngeal carcinoma patients. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **239**, 891–898 (2014).
83. Zhu, H. *et al.* Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **5**, 816–823 (2009).
84. Adams, B. D., Parsons, C. & Slack, F. J. The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert Opin. Ther. Targets* 1–17 (2015). doi:10.1517/14728222.2016.1114102
85. Long, Z., Wang, B., Tao, D., Huang, Y. & Tao, Z. Hypofractionated radiotherapy induces miR-34a expression and enhances apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 1388–1394 (2014).
86. Wang, L. *et al.* The analysis of microRNA-34 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with corresponding pericarcinous tissues. *Gene* **554**, 1–8 (2015).
87. Li, Y.-Q. *et al.* MiR-34c suppresses tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by targeting MET. *Cell Death Dis.* **6**, e1618 (2015).
88. Feng, B., Wang, R. & Chen, L.-B. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. *Cancer Lett.* **317**, 184–191 (2012).

89. Jiang, Q. *et al.* MicroRNA-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4342-x
90. Shi, W. *et al.* Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **126**, 2036–2048 (2010).
91. Peng, X. H. *et al.* MiR-124 suppresses tumor growth and metastasis by targeting Foxq1 in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* **13**, 186 (2014).
92. Chen, J. J., Liu, S. X., Chen, M. Z. & Zhao, Z. Y. Has-miR-125a and 125b are induced by treatment with cisplatin in nasopharyngeal carcinoma and inhibit apoptosis in a p53-dependent manner by targeting p53 mRNA. *Mol. Med. Rep.* **12**, 3569–3574 (2015).
93. Zhang, J. *et al.* MicroRNA-125b suppresses the epithelial-mesenchymal transition and cell invasion by targeting ITGA9 in melanoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4409-8
94. Golubovskaya, V. M., Sumbler, B., Ho, B., Yemma, M. & Cance, W. G. MiR-138 and MiR-135 directly target focal adhesion kinase, inhibit cell invasion, and increase sensitivity to chemotherapy in cancer cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* **14**, 18–28 (2014).
95. Tang, J.-F. *et al.* Five miRNAs as Novel Diagnostic Biomarker Candidates for Primary Nasopharyngeal Carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 7575–7581 (2014).
96. Li, J. *et al.* MiR-138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2793–2805 (2015).
97. Liu, X. *et al.* MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 2495–2506 (2012).
98. Dong, W. *et al.* MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-3452-9
99. Lan, H., Chen, W., He, G. & Yang, S. miR-140-5p inhibits ovarian cancer growth partially by repression of PDGFRA. *Biomed. Pharmacother. Biomédecine Pharmacothérapie* **75**, 117–122 (2015).
100. Yang, H., Fang, F., Chang, R. & Yang, L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor β receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **58**, 205–217 (2013).
101. Zhai, H., Fesler, A., Ba, Y., Wu, S. & Ju, J. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget* **6**, 19735–19746 (2015).
102. Zhang, W. *et al.* MicroRNA-140-5p inhibits the progression of colorectal cancer by targeting VEGFA. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **37**, 1123–1133 (2015).
103. Liu, L. *et al.* miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Mol. Med. Rep.* **5**, 753–760 (2012).
104. Huang, H. *et al.* miR-145 inhibits invasion and metastasis by directly targeting Smad3 in nasopharyngeal cancer. *Tumor Biol.* **36**, 4123–4131 (2015).
105. Li, Y.-Q. *et al.* MiR-145 Inhibits Metastasis by Targeting Fascin Actin-Bundling Protein 1 in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLOS ONE* **10**, e0122228 (2015).
106. Li, H.-P. *et al.* Silencing of miRNA-148a by hypermethylation activates the integrin-mediated signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **5**, 7610–7624 (2014).
107. Guan, Z. *et al.* TGF- β induces HLA-G expression through inhibiting miR-152 in gastric cancer cells. *J. Biomed. Sci.* **22**, 107 (2015).

108. Huang, H., Hu, M., Li, P., Lu, C. & Li, M. Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133(+) liver cancer stem cells by targeting KIT. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 921–928 (2015).
109. Fang, F. *et al.* MicroRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **63**, 874–885 (2015).
110. Wang, L. & Liu, H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4246-9
111. Wu, J. *et al.* MicroRNA-188 suppresses G1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 66 (2014).
112. Kinose, Y. *et al.* The hypoxia-related microRNA miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in ovarian carcinoma. *Oncotarget* **6**, 11342–11356 (2015).
113. Shatseva, T., Lee, D. Y., Deng, Z. & Yang, B. B. MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. *J. Cell Sci.* **124**, 2826–2836 (2011).
114. Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
115. Korpai, M., Lee, E. S., Hu, G. & Kang, Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* **283**, 14910–4 (2008).
116. Mongroo, P. S. & Rustgi, A. K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. 219–222 (2010). doi:10.4161/cbt.10.6312548
117. Pecot, C. V. *et al.* Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat. Commun.* **4**, 2427–2427 (2013).
118. Uhlmann, S. *et al.* miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene* **29**, 4297–4306 (2010).
119. Xia, H. *et al.* miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 535–41 (2010).
120. Zuberi, M. *et al.* Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **17**, 779–787 (2015).
121. Zuberi, M. *et al.* Erratum to: Expression of serum miR-200a, miR-200b and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **17**, 840 (2015).
122. Wu, H. *et al.* A negative feedback loop between miR-200b and the NF- κ B pathway via IKBKB/IKK- β in breast cancer cells. *FEBS J.* (2015). doi:10.1111/febs.13543
123. Zhang, H.-F. *et al.* Loss of miR-200b promotes invasion via activating the Kindlin-2/integrin β 1/AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma: An E-cadherin-independent mechanism. *Oncotarget* **6**, 28949–28960 (2015).
124. Liu, X.-G. *et al.* High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **29**, 618–626 (2012).
125. Lo, W.-L. *et al.* MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J. Pathol.* **223**, 482–495 (2011).
126. Song, C. *et al.* miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget* **6**, 34968–34978 (2015).
127. Du, Y. *et al.* Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. *J. Gastroenterol.* **44**, 556–561 (2009).

128. Miao, Y. hsa-miR-141 downregulates TM4SF1 to inhibit pancreatic cancer cell invasion and migration. *Int. J. Oncol.* (2013). doi:10.3892/ijo.2013.2189
129. Vrba, L. *et al.* Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PloS One* **5**, e8697 (2010).
130. Chen, J., Wang, L., Matyunina, L. V., Hill, C. G. & McDonald, J. F. Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **121**, 200–205 (2011).
131. Sun, T., Wang, C., Xing, J. & Wu, D. miR-429 modulates the expression of c-myc in human gastric carcinoma cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **47**, 2552–2559 (2011).
132. Ma, L., Deng, X., Wu, M., Zhang, G. & Huang, J. Down-regulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells. *FEBS Lett.* **588**, 1562–1570 (2014).
133. Wang, X. *et al.* MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/BCI-2/survivin pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 5017–5025 (2015).
134. Wu, Z. Y. *et al.* MiR-204 regulates HMGA2 expression and inhibits cell proliferation in human thyroid cancer. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **15**, 535–542 (2015).
135. Yang, W., Lan, X., Li, D., Li, T. & Lu, S. MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer* **15**, (2015).
136. Alajez, N. M. *et al.* MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res.* **71**, 2381–2391 (2011).
137. Qi, X., Li, J., Zhou, C., Lv, C. & Tian, M. MicroRNA-320a inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting BMI-1 in nasopharyngeal carcinoma. *FEBS Lett.* **588**, 3732–3738 (2014).
138. Shan, Y. *et al.* MicroRNA-338 inhibits migration and proliferation by targeting hypoxia-induced factor 1 α in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol. Rep.* **34**, 1943–1952 (2015).
139. Chapman, B. V. *et al.* MicroRNA-363 targets myosin 1B to reduce cellular migration in head and neck cancer. *BMC Cancer* **15**, 861 (2015).
140. Ou, Y., Zhai, D., Wu, N. & Li, X. Downregulation of miR-363 increases drug resistance in cisplatin-treated HepG2 by dysregulating Mcl-1. *Gene* **572**, 116–122 (2015).
141. Zhang, R., Li, Y., Dong, X., Peng, L. & Nie, X. MiR-363 sensitizes cisplatin-induced apoptosis targeting in Mcl-1 in breast cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 347 (2014).
142. Gu, X., Li, J.-Y., Guo, J., Li, P.-S. & Zhang, W.-H. Influence of MiR-451 on Drug Resistances of Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cell Line. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 3291–3297 (2015).
143. Liu, N. *et al.* MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma. *Mol. Cancer* **12**, 123 (2013).
144. Zhang, T. *et al.* MiR-451 increases radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 12593–12599 (2014).
145. Dadpay, M. *et al.* Upregulation of miR-21 and downregulation of miR-494 may serve as emerging molecular biomarkers for prediagnostic samples of subjects who developed nasopharyngeal carcinoma associates with lymph node metastasis and poor prognosis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-3905-1
146. Duan, H.-F. *et al.* Functional elucidation of miR-494 in the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 6679–6689 (2015).
147. Nie, G.-H. *et al.* GALNT7, a target of miR-494, participates in the oncogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4281-6

148. Wang, S. *et al.* The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L. *Oncotarget* **6**, 35893–35907 (2015).
149. Zhang, Z. *et al.* MiR-506 Suppresses Tumor Proliferation and Invasion by Targeting FOXQ1 in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLOS ONE* **10**, e0122851 (2015).
150. Jin, H. & Wang, W. MicroRNA-539 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro and targeting Matrix metalloproteinase-8. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 8075–8082 (2015).
151. Lv, L.-Y., Wang, Y.-Z., Zhang, Q., Zang, H.-R. & Wang, X.-J. miR-539 induces cell cycle arrest in nasopharyngeal carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 4. *Cell Biochem. Funct.* **33**, 534–540 (2015).
152. Mirghasemi, A. *et al.* Down-regulation of miR-133a and miR-539 are associated with unfavorable prognosis in patients suffering from osteosarcoma. *Cancer Cell Int.* **15**, (2015).
153. Cui, Z., Tang, J., Chen, J. & Wang, Z. Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Cell Int.* **14**, 47 (2014).
154. Su, Y. *et al.* Aberrant expression of microRNAs in gastric cancer and biological significance of miR-574-3p. *Int. Immunopharmacol.* **13**, 468–475 (2012).
155. Peng, X. *et al.* MiR-634 sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to paclitaxel and inhibits cell growth both in vitro and in vivo. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 6784–6791 (2014).
156. Liu, Z. *et al.* Knocking down CDK4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 274 (2014).
157. Nadiminty, N. *et al.* MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. *PloS One* **7**, e32832 (2012).
158. Zhao, B. *et al.* MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. *Cancer Lett.* **342**, 43–51 (2014).
159. Kolenda, T., Przybyła, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A. & Lamperska, K. M. The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp. Oncol. Poznań Pol.* **18**, 293–301 (2014).
160. Su, B. *et al.* Let-7d suppresses growth, metastasis, and tumor macrophage infiltration in renal cell carcinoma by targeting COL3A1 and CCL7. *Mol. Cancer* **13**, 206 (2014).
161. Wu, K., Yang, Y., Zhao, J. & Zhao, S. BAG3-mediated miRNA let-7g and let-7i inhibit proliferation and enhance apoptosis of human esophageal carcinoma cells by targeting the drug transporter ABCB10. *Cancer Lett.* **371**, 125–133 (2016).
162. Allaya, N. *et al.* Over-expression of miR-10b in NPC patients: correlation with LMP1 and Twist1. *Tumor Biol.* **36**, 3807–3814 (2015).
163. Shan, S. W. *et al.* Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways. *J. Cell Sci.* **126**, 1517–1530 (2013).
164. Wang, M. *et al.* Circulating miR-17-5p and miR-20a: molecular markers for gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* **5**, 1514–1520 (2012).
165. Chen, X., Wang, J., Cheng, L. & Lu, M.-P. miR-18a downregulates DICER1 and promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7**, 847 (2014).
166. Luo, Z. *et al.* miR-18a promotes malignant progression by impairing microRNA biogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis* **34**, 415–425 (2013).
167. Huang, L. *et al.* Hsa-miR-19a is associated with lymph metastasis and mediates the TNF- α induced epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Sci. Rep.* **5**, 13350 (2015).
168. Xiao, W., Gao, Z., Duan, Y., Yuan, W. & Ke, Y. Downregulation of miR-19a exhibits inhibitory effects on metastatic renal cell carcinoma by targeting PIK3CA and inactivating Notch signaling in vitro. *Oncol. Rep.* **34**, 739–746 (2015).
169. Tsuchida, A. *et al.* miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.* **102**, 2264–2271 (2011).

170. Fonseca-Sánchez, M. A. *et al.* microRNA-18b is upregulated in breast cancer and modulates genes involved in cell migration. *Oncol. Rep.* **30**, 2399–2410 (2013).
171. Murakami, Y. *et al.* The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. *BMC Cancer* **13**, 99 (2013).
172. Yu, X. *et al.* Loss of connective tissue growth factor as an unfavorable prognosis factor activates miR-18b by PI3K/AKT/C-Jun and C-Myc and promotes cell growth in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis.* **4**, e634 (2013).
173. Ou, H., Li, Y. & Kang, M. Activation of miR-21 by STAT3 Induces Proliferation and Suppresses Apoptosis in Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting PTEN Gene. *PLoS ONE* **9**, e109929 (2014).
174. Jin, A.-H. & Wei, Z.-L. Molecular mechanism of increased sensitivity of cisplatin to ovarian cancer by inhibition of microRNA-23a expression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 13329–13334 (2015).
175. Tian, K., Di, R. & Wang, L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* **22**, 351–359 (2015).
176. Huang, T.-T. *et al.* The reciprocal regulation loop of Notch2 pathway and miR-23b in controlling gastric carcinogenesis. *Oncotarget* **6**, 18012–18026 (2015).
177. Ma, G., Dai, W., Sang, A., Yang, X. & Gao, C. Upregulation of microRNA-23a/b promotes tumor progression and confers poor prognosis in patients with gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 8833–8840 (2014).
178. Peng, H. *et al.* miR-27a promotes cell proliferation and metastasis in renal cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 2259–2266 (2015).
179. Wu, X.-Z. *et al.* MiR-27a-3p promotes esophageal cancer cell proliferation via F-box and WD repeat domain-containing 7 (FBXW7) suppression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 15556–15562 (2015).
180. Zhao, Q. *et al.* HIF-1 α Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27a. *PloS One* **10**, e0132746 (2015).
181. Qiu, F. *et al.* miR-29a/b enhances cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma progression by regulating SPARC and COL3A1 gene expression. *PloS One* **10**, e0120969 (2015).
182. Cheung, C. C. *et al.* miR-31 is consistently inactivated in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma and contributes to its tumorigenesis. *Mol. Cancer* **13**, 184–184 (2014).
183. Lyu, X. *et al.* TGF β R2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Mol. Cancer* **13**, 51 (2014).
184. Xu, Y.-F. *et al.* MicroRNA-93 promotes cell growth and invasion in nasopharyngeal carcinoma by targeting disabled homolog-2. *Cancer Lett.* **363**, 146–155 (2015).
185. Qi, X., Li, J., Zhou, C., Lv, C. & Tian, M. MiR-142-3p Suppresses SOCS6 Expression and Promotes Cell Proliferation in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 1743–1752 (2015).
186. Cameron, J. E. *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J. Virol.* **82**, 1946–1958 (2008).
187. Hung, P.-S. *et al.* miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PloS One* **8**, e79926 (2013).
188. Rosato, P. *et al.* Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein – Barr. *Leukemia* **26**, 2343–2352 (2012).
189. Luo, Z. *et al.* miR-149 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **36**, 604–609 (2011).
190. Ding, J. *et al.* Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI α . *Nat. Cell Biol.* **12**, 390–399 (2010).

191. Liu, Y. *et al.* A miR-151 binding site polymorphism in the 3'-untranslated region of the cyclin E1 gene associated with nasopharyngeal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 660–665 (2013).
192. Chen, H.-C. *et al.* MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer* **100**, 1002–1011 (2009).
193. Czocho, J. R., Sulkowski, P. & Glazer, P. M. miR-155 Over-expression Promotes Genomic Instability by Reducing High-fidelity Polymerase Delta Expression and Activating Error-prone DSB Repair. *Mol. Cancer Res. MCR* (2016). doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0399
194. Kim, S. *et al.* Loss of oncogenic miR-155 in tumor cells promotes tumor growth by enhancing C/EBP- β -mediated MDSC infiltration. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7150
195. Li, D. *et al.* Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 7672–7680 (2014).
196. Xu, R.-X. *et al.* DNA damage-induced NF- κ B activation in human glioblastoma cells promotes miR-181b expression and cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **35**, 913–925 (2015).
197. Zheng, Y. *et al.* miR-181b promotes chemoresistance in breast cancer by regulating Bim expression. *Oncol. Rep.* **35**, 683–690 (2016).
198. Li, J. *et al.* miR-183 inhibits TGF- β 1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* **10**, 354 (2010).
199. Sarver, A. L., Li, L. & Subramanian, S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res.* **70**, 9570–9580 (2010).
200. Li, G. *et al.* miR-185-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by targeting WNT2B in vitro. *Cancer Sci.* **105**, 1560–1568 (2014).
201. Xu, J., Ai, Q., Cao, H. & Liu, Q. MiR-185-3p and miR-324-3p Predict Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma and Modulate Cancer Cell Growth and Apoptosis by Targeting SMAD7. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 2828–2836 (2015).
202. Nagpal, N. *et al.* HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF β -signaling in hypoxic microenvironment. *Sci. Rep.* **5**, 9650 (2015).
203. Li, S. *et al.* Mir-192 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal squamous cell carcinoma by targeting Bim. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 8048–8056 (2015).
204. Yan-Chun, L. *et al.* MicroRNA-192-5p Promote the Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cell by Targeting SEMA3A. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* (2015). doi:10.1097/PAI.0000000000000296
205. Yeh, D.-W. *et al.* Downregulation of COMMD1 by miR-205 promotes a positive feedback loop for amplifying inflammatory- and stemness-associated properties of cancer cells. *Cell Death Differ.* (2015). doi:10.1038/cdd.2015.147
206. Tang, X. *et al.* Overexpression of miR-210 is Associated with Poor Prognosis of Acute Myeloid Leukemia. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 3427–3433 (2015).
207. Zhang, C., Tian, W., Meng, L., Qu, L. & Shou, C. PRL-3 promotes gastric cancer migration and invasion through a NF- κ B-HIF-1 α -miR-210 axis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* (2015). doi:10.1007/s00109-015-1350-7
208. Deng, M. *et al.* miR-214 promotes tumorigenesis by targeting lactotransferrin in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 1793–1800 (2013).
209. Phatak, P. *et al.* Overexpression of miR-214-3p in esophageal squamous cancer cells enhances sensitivity to cisplatin by targeting survivin directly and indirectly through CUG-BP1. *Oncogene* (2015). doi:10.1038/onc.2015.271
210. Wang, F., Lv, P., Liu, X., Zhu, M. & Qiu, X. microRNA-214 enhances the invasion ability of breast cancer cells by targeting p53. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 1395–1402 (2015).

211. Zhang, Z.-C. *et al.* Knockdown of miR-214 promotes apoptosis and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* **9**, e86149 (2014).
212. Liu, W. *et al.* miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 2718–2725 (2015).
213. Le Sage, C. *et al.* Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J.* **26**, 3699–3708 (2007).
214. Zhong, C., Ding, S., Xu, Y. & Huang, H. MicroRNA-222 promotes human non-small cell lung cancer H460 growth by targeting p27. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 5534–5540 (2015).
215. Cui, R. *et al.* MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. *Oncotarget* **6**, 21802–21815 (2015).
216. Cui, R. *et al.* MicroRNA-224 promotes tumor progression in nonsmall cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4288–4297 (2015).
217. Ding, W. *et al.* Epigenetic silencing of ITGA2 by MiR-373 promotes cell migration in breast cancer. *PLoS One* **10**, e0135128 (2015).
218. Cai, J. *et al.* MicroRNA-374a activates Wnt/ β -catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* **123**, 566–579 (2013).
219. He, W., Feng, L., Xia, D. & Han, N. MiR-374a promotes the proliferation of human osteosarcoma by downregulating FOXO1 expression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 3482–3489 (2015).
220. Wang, Y. *et al.* MicroRNA-374a promotes esophageal cancer cell proliferation via Axin2 suppression. *Oncol. Rep.* **34**, 1988–1994 (2015).
221. Xu, X. *et al.* miR-374a promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting SRCIN1 in gastric cancer. *FEBS Lett.* **589**, 407–413 (2015).
222. Chen, L., Tang, Y., Wang, J., Yan, Z. & Xu, R. miR-421 induces cell proliferation and apoptosis resistance in human nasopharyngeal carcinoma via downregulation of FOXO4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **435**, 745–750 (2013).
223. Yi, C. *et al.* MiR-663, a microRNA targeting p21(WAF1/CIP1), promotes the proliferation and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* **31**, 4421–4433 (2012).
224. Fang, Y. *et al.* MiR-744 functions as a proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma progression and metastasis via transcriptional control of ARHGAP5. *Oncotarget* **6**, 13164–13175 (2015).
225. Yu, Q., Zhang, F., Du, Z. & Xiang, Y. Up-regulation of serum miR-744 predicts poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 13296–13302 (2015).
226. Zhou, W. *et al.* MiR-744 increases tumorigenicity of pancreatic cancer by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* **6**, 37557–37569 (2015).
227. Li, Y. & Chen, X. miR-4792 inhibits epithelial-mesenchymal transition and invasion in nasopharyngeal carcinoma by targeting FOXC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 863–869 (2015).
228. Cai, J. *et al.* Deregulation of let-7e in epithelial ovarian cancer promotes the development of resistance to cisplatin. *Oncogenesis* **2**, e75 (2013).
229. Mitra, D., Das, P. M., Huynh, F. C. & Jones, F. E. Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e. *J. Biol. Chem.* **286**, 40531–40535 (2011).
230. Jia, H. *et al.* MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS One* **9**, e88057 (2014).
231. Zeng, T. & Li, G. MicroRNA-10a enhances the metastatic potential of cervical cancer cells by targeting phosphatase and tensin homologue. *Mol. Med. Rep.* **10**, 1377–1382 (2014).
232. Liu, B. *et al.* MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1692–1704 (2012).

233. Lu, J. *et al.* MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res.* **71**, 225–233 (2011).
234. Yu, L. *et al.* miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2. *Oncol. Lett.* **5**, 1223–1228 (2013).
235. Lei, C.-J. *et al.* Hsa-miR-132 inhibits proliferation of hepatic carcinoma cells by targeting YAP. *Cell Biochem. Funct.* **33**, 326–333 (2015).
236. Li, W. *et al.* miR-132 upregulation promotes gastric cancer cell growth through suppression of FoxO1 translation. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-3924-y
237. Li, Y. *et al.* miR-132 inhibits lung cancer cell migration and invasion by targeting SOX4. *J. Thorac. Dis.* **7**, 1563–1569 (2015).
238. Liu, F. *et al.* VEGF-activated miR-144 regulates autophagic survival of prostate cancer cells against Cisplatin. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-4383-1
239. Sun, L. *et al.* MiR-144 Inhibits Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating c-Met Expression. *PLoS One* **10**, e0124428 (2015).
240. Zhang, L.-Y. *et al.* MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. *Carcinogenesis* **34**, 454–463 (2013).
241. Li, Y. *et al.* miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14. *Cancer Res.* **75**, 2674–2685 (2015).
242. Ma, Z. *et al.* MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 630–638 (2015).
243. Sun, X., Charbonneau, C., Wei, L., Chen, Q. & Terek, R. M. miR-181a Targets RGS16 to Promote Chondrosarcoma Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Mol. Cancer Res. MCR* **13**, 1347–1357 (2015).
244. Zhao, J., Nie, Y., Wang, H. & Lin, Y. miR-181a suppresses autophagy and sensitizes gastric cancer cells to cisplatin. *Gene* **576**, 828–833 (2016).
245. Qin, C.-Z. *et al.* MicroRNA-184 acts as a potential diagnostic and prognostic marker in epithelial ovarian cancer and regulates cell proliferation, apoptosis and inflammation. *Pharm.* **70**, 668–673 (2015).
246. Su, Z. *et al.* microRNA-184 functions as tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Exp. Ther. Med.* **9**, 961–966 (2015).
247. Yuan, Q., Gao, W., Liu, B. & Ye, W. Upregulation of miR-184 enhances the malignant biological behavior of human glioma cell line A172 by targeting FIH-1. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **34**, 1125–1136 (2014).
248. Zhen, Y. *et al.* Tumor suppressor PDCD4 modulates miR-184-mediated direct suppression of C-MYC and BCL2 blocking cell growth and survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis.* **4**, e872 (2013).
249. Qu, J.-Q. *et al.* MiRNA-203 Reduces Nasopharyngeal Carcinoma Radioresistance by Targeting IL8/AKT Signaling. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 2653–2664 (2015).
250. Yu, H. *et al.* Epstein-Barr virus downregulates microRNA 203 through the oncoprotein latent membrane protein 1: a contribution to increased tumor incidence in epithelial cells. *J. Virol.* **86**, 3088–3099 (2012).
251. Huang, X., Huang, M., Kong, L. & Li, Y. miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in renal cell carcinoma. *Cell Prolif.* **48**, 593–599 (2015).
252. Tan, J.-K., Tan, E.-L. & Gan, S.-Y. Elucidating the roles of miR-372 in cell proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma TW01 cells. *Exp. Oncol.* **36**, 170–173 (2014).
253. Tu, H.-F., Chang, K.-W., Cheng, H.-W. & Liu, C.-J. Upregulation of miR-372 and -373 associates with lymph node metastasis and poor prognosis of oral carcinomas. *The Laryngoscope* **125**, E365–370 (2015).

254. Li, H. *et al.* Clinical and biological significance of miR-378a-3p and miR-378a-5p in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **50**, 1207–1221 (2014).
255. Skrzypek, K. *et al.* Interplay between heme oxygenase-1 and miR-378 affects non-small cell lung carcinoma growth, vascularization, and metastasis. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 644–660 (2013).
256. Yu, B.-L. *et al.* MicroRNA-378 functions as an onco-miR in nasopharyngeal carcinoma by repressing TOB2 expression. *Int. J. Oncol.* **44**, 1215–1222 (2014).
257. Popov, A., Szabo, A. & Mandys, V. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* **15**, 774 (2015).
258. Peltier, H. J. & Latham, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA N. Y. N* **14**, 844–852 (2008).
259. Shirdel, E. A., Xie, W., Mak, T. W. & Jurisica, I. NAViGaTing the Micronome – Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PLOS ONE* **6**, e17429 (2011).
260. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **43**, D153–D159 (2015).
261. Kotlyar, M., Pastrello, C., Sheahan, N. & Jurisica, I. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes. *Nucleic Acids Res.* gkv1115 (2015). doi:10.1093/nar/gkv1115
262. Kanehisa, M. *et al.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **42**, D199–D205 (2014).
263. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
264. Xue, Y. *et al.* Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated microRNA Circuits. *Cell* **152**, 82–96 (2013).
265. Lal, A. *et al.* Capture of MicroRNA–Bound mRNAs Identifies the Tumor Suppressor miR-34a as a Regulator of Growth Factor Signaling. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
266. Kaller, M. *et al.* Genome-wide Characterization of miR-34a Induced Changes in Protein and mRNA Expression by a Combined Pulsed SILAC and Microarray Analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, (2011).
267. Balakrishnan, I. *et al.* Genome-Wide Analysis of miRNA-mRNA Interactions in Marrow Stromal Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 662–673 (2014).
268. Kaller, M. *et al.* Genome-wide Characterization of miR-34a Induced Changes in Protein and mRNA Expression by a Combined Pulsed SILAC and Microarray Analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, (2011).
269. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
270. Rao, D. S. *et al.* MicroRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the Forkhead Box Transcription Factor Foxp1. *Immunity* **33**, 48–59 (2010).
271. Wang, X. *et al.* miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res. Bull.* **80**, 268–273 (2009).
272. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
273. Pillai, M. M. *et al.* HITS-CLIP reveals key regulators of Nuclear Receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 85–97 (2014).
274. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
275. Pillai, M. M. *et al.* HITS-CLIP reveals key regulators of Nuclear Receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 85–97 (2014).

276. Karginov, F. V. & Hannon, G. J. Remodeling of Ago2–mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes Dev.* **27**, 1624–1632 (2013).
277. Haecker, I. *et al.* Ago HITS-CLIP Expands Understanding of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus miRNA Function in Primary Effusion Lymphomas. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
278. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
279. Lal, A. *et al.* Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet.* **7**, e1002363 (2011).
280. Skalsky, R. L. *et al.* The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
281. Gottwein, E. *et al.* Viral microRNA Targetome of KSHV-infected Primary Effusion Lymphoma Cell lines. *Cell Host Microbe* **10**, 515–526 (2011).
282. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
283. Pillai, M. M. *et al.* HITS-CLIP reveals key regulators of Nuclear Receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 85–97 (2014).
284. Skalsky, R. L. *et al.* The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
285. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
286. Kishore, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **8**, 559–564 (2011).
287. Kaller, M. *et al.* Genome-wide Characterization of miR-34a Induced Changes in Protein and mRNA Expression by a Combined Pulsed SILAC and Microarray Analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, (2011).
288. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
289. Xue, Y. *et al.* Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated microRNA Circuits. *Cell* **152**, 82–96 (2013).
290. Peng, Y., Guo, J.-J., Liu, Y.-M. & Wu, X.-L. MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression. *Biosci. Rep.* **34**, (2014).
291. Kameswaran, V. *et al.* Epigenetic regulation of the MEG3-DLK1 microRNA cluster in human Type 2 diabetic islets. *Cell Metab.* **19**, 135–145 (2014).
292. Lipchina, I. *et al.* Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Genes Dev.* **25**, 2173–2186 (2011).
293. Lee, J. *et al.* A Pathway Involving Farnesoid X Receptor and Small Heterodimer Partner Positively Regulates Hepatic Sirtuin 1 Levels via MicroRNA-34a Inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 12604–12611 (2010).
294. Ito, T., Yagi, S. & Yamakuchi, M. MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 735–740 (2010).
295. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
296. Karginov, F. V. & Hannon, G. J. Remodeling of Ago2–mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes Dev.* **27**, 1624–1632 (2013).
297. Xue, Y. *et al.* Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated microRNA Circuits. *Cell* **152**, 82–96 (2013).
298. Skalsky, R. L. *et al.* The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).

299. Xue, Y. *et al.* Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated microRNA Circuits. *Cell* **152**, 82–96 (2013).
300. Furuta, M. *et al.* The Tumor-Suppressive miR-497-195 Cluster Targets Multiple Cell-Cycle Regulators in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* **8**, (2013).
301. Skalsky, R. L. *et al.* The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
302. Kameswaran, V. *et al.* Epigenetic regulation of the MEG3-DLK1 microRNA cluster in human Type 2 diabetic islets. *Cell Metab.* **19**, 135–145 (2014).
303. Luo, M., Shen, D., Zhou, X., Chen, X. & Wang, W. MicroRNA-497 is a potential prognostic marker in human cervical cancer and functions as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Surgery* **153**, 836–847 (2013).
304. Kameswaran, V. *et al.* Epigenetic regulation of the MEG3-DLK1 microRNA cluster in human Type 2 diabetic islets. *Cell Metab.* **19**, 135–145 (2014).
305. Skalsky, R. L. *et al.* The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
306. Balakrishnan, I. *et al.* Genome-Wide Analysis of miRNA-mRNA Interactions in Marrow Stromal Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 662–673 (2014).
307. Wasil, L. R. & Shair, K. H. Y. Epstein–Barr virus LMP1 induces focal adhesions and epithelial cell migration through effects on integrin- $\alpha 5$ and N-cadherin. *Oncogenesis* **4**, e171 (2015).
308. Chang, S.-H., Chang, H.-C. & Hung, W.-C. Transcriptional repression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 enhances invasiveness of nasopharyngeal carcinoma cells. *Oral Oncol.* **44**, 891–897 (2008).
309. Kondo, S. *et al.* MUC1 Induced by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Causes Dissociation of the Cell-Matrix Interaction and Cellular Invasiveness via STAT Signaling. *J. Virol.* **81**, 1554–1562 (2007).
310. Chen, C.-C. *et al.* NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of TNFAIP2 by the Epstein-Barr virus oncoprotein, LMP1, promotes cell motility in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 3648–3659 (2013). doi:10.1038/onc.2013.345
311. Shair, K. H. Y., Schnegg, C. I. & Raab-Traub, N. EBV Latent Membrane Protein 1 Effects on Plakoglobin, Cell Growth, and Migration. *Cancer Res.* **68**, 6997–7005 (2008).
312. Kung, C.-P. & Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 modulates distinctive NF- κ B pathways through C-terminus-activating region 1 to regulate epidermal growth factor receptor expression. *J. Virol.* **84**, 6605–6614 (2010).
313. Lin, X. *et al.* The Epstein-Barr Virus BART miRNA Cluster of the M81 Strain Modulates Multiple Functions in Primary B Cells. *PLoS Pathog.* **11**, (2015).
314. Pratt, Z. L., Zhang, J. & Sugden, B. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Oncogene of Epstein-Barr Virus Can Simultaneously Induce and Inhibit Apoptosis in B Cells. *J. Virol.* **86**, 4380–4393 (2012).
315. Yang, X. *et al.* Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9688–9704 (2013).
316. ZHU, J., DONG, H., ZHANG, Q. & ZHANG, S. Combined assays for serum carcinoembryonic antigen and microRNA-17-3p offer improved diagnostic potential for stage I/II colon cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **3**, 1315–1318 (2015).
317. Ma, W. *et al.* Dysregulation of the miR-34a-SIRT1 axis inhibits breast cancer stemness. *Oncotarget* **6**, 10432–10444 (2015).
318. Feng, F. *et al.* Reduced expression of microRNA-497 is associated with greater angiogenesis and poor prognosis in human gliomas. *Hum. Pathol.* **0**, (2016).
319. Lin, Z., Zhao, J., Wang, X., Zhu, X. & Gong, L. Overexpression of microRNA-497 suppresses cell proliferation and induces apoptosis through targeting paired box 2 in human ovarian cancer. *Oncol. Rep.* (2016). doi:10.3892/or.2016.5012

320. Hu, J., Xu, J.-F. & Ge, W.-L. MiR-497 enhances metastasis of oral squamous cell carcinoma through SMAD7 suppression. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 3023–3031 (2016).
321. Liu, J. *et al.* microRNA-497 Modulates Breast Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Survival by Targeting SMAD7. *DNA Cell Biol.* (2016). doi:10.1089/dna.2016.3282
322. Han, L., Liu, B., Jiang, L., Liu, J. & Han, S. MicroRNA-497 downregulation contributes to cell proliferation, migration, and invasion of estrogen receptor alpha negative breast cancer by targeting estrogen-related receptor alpha. *Tumor Biol.* 1–10 (2016). doi:10.1007/s13277-016-5200-1
323. Zhang, Y. *et al.* MicroRNA-497 inhibits the proliferation, migration and invasion of human bladder transitional cell carcinoma cells by targeting E2F3. *Oncol. Rep.* **36**, 1293–1300 (2016).
324. Zhang, R. *et al.* HPV E6/p53 mediated down-regulation of miR-34a inhibits Warburg effect through targeting LDHA in cervical cancer. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 312–320 (2016).

8 Anexos

QUADRO S 1 - Placa QC para verificação da qualidade de RT e da reação de qPCR.

Alvo	pZsGreen		pZsGLMP1B95-8			pZsGLMP1M81		
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
C. elegans 1	35,84*	0*	0*	35,77*	0*	0*	0*	0*
C. elegans 1	0*	33,44*	0*	0*	0*	38,38*	34,35*	0*
miR-16	21,34	20,19	22,36	22,7	22,51	22,76	23,77	22,74
miR-21	22,37	21,53	22,98	22,7	22,47	23	22,84	22,37
miR-191	23,5	22,82	23,74	24,2	24,05	23,75	24,07	23,89
SNORD61	23,08	21,97	23,84	24,01	23,96	23,97	24,86	24
SNORD95	22,59	21,28	22,99	23,34	23,21	23,12	23,64	23,32
SNORD96A	24,3	22,06	25,67	25,67	25,51	26,04	26,38	25,81
miRTC	24,63	23,66	26,01	25,05	25,58	25,59	26,72	25,59
miRTC	24,44	23,78	26,06	25,02	25,25	25,66	26,86	25,71
PPC	18,54	18,61	18,94	18,56	18,61	18,48	18,32	18,6
PPC	18,48	18,69	18,23	18,46	18,34	18,49	18,48	18,45
média miRTC	24,535	23,72	26,035	25,035	25,415	25,625	26,79	25,65
média PPC	18,51	18,65	18,585	18,51	18,475	18,485	18,4	18,525
Análise RT	4,525	3,57	5,95	5,025	5,44	5,64	6,89	5,625

*Amostras consideradas não amplificadas

QUADRO S 2 - Resultado obtido após miScript miRNA PCR Array QIAGEN.

#	miR	pZsGreen			pZsGLMP1B95-8			pZsGLMP1M81		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1	hsa-miR-9-5p	24,19	24,52	25,02	24,77	25,35	25,36	24,46	24,91	25,46
2	hsa-miR-15a-5p	23,37	26,89	26,84	25,48	27,09	28,12	23,30	27,21	27,46
3	hsa-miR-16-5p	18,86	21,16	21,21	20,14	21,18	22,61	19,03	21,26	21,48
4	hsa-miR-24-3p	21,98	23,92	24,10	22,92	23,81	24,89	21,69	23,69	24,28
5	hsa-miR-26b-5p	22,27	22,67	22,88	22,95	23,13	23,36	22,93	23,28	23,97
6	hsa-miR-29c-3p	22,86	25,89	26,02	24,23	25,58	27,34	22,64	26,11	26,04
7	hsa-miR-30a-3p	24,58	25,36	25,30	25,18	25,49	25,94	24,75	25,32	25,74
8	hsa-miR-34a-5p	22,81	25,00	25,07	23,95	25,28	26,14	22,35	25,30	25,16
9	hsa-miR-34b-5p	36,06*	0,00*	37,64*	0,00*	0,00*	0,00*	33,69*	0,00*	0,00*
10	hsa-miR-34c-5p	30,72	32,66	32,47	33,81	33,92	34,62	30,97	33,01	34,23
11	hsa-miR-100-5p	19,89	20,49	20,59	20,62	21,06	21,11	20,37	21,26	21,19
12	hsa-miR-124-5p	32,81	35,46*	34,79*	38,73*	36,48*	37,49*	33,94*	34,77*	35,22*
13	hsa-miR-125b-5p	23,64	25,06	25,12	24,51	25,26	26,46	23,93	25,23	25,63
14	hsa-miR-135b-5p	30,67	32,87	33,40*	32,64	33,52*	33,41*	31,60	33,17*	33,96*
15	hsa-miR-138-5p	25,71	28,63	28,96	27,48	28,89	30,70	25,95	29,33	29,21
16	hsa-miR-140-3p	24,97	26,97	27,49	26,07	26,99	27,98	24,72	27,30	27,29
17	hsa-miR-140-5p	25,28	27,61	27,70	26,42	27,40	28,37	25,39	27,23	27,72
18	hsa-miR-143-3p	31,99	35,47*	0,00*	39,50*	35,18*	0,00*	32,28	34,58*	0,00*
19	hsa-miR-145-5p	31,03	32,51	33,24	31,65	33,63	33,04	31,04	33,66	32,57
20	hsa-miR-148a-3p	22,36	23,46	23,95	23,25	23,65	24,49	22,50	23,86	24,09
21	hsa-miR-152-3p	25,97	27,49	28,22	26,77	27,47	28,44	26,00	28,05	28,33
22	hsa-miR-188-5p	25,72	27,20	27,78	26,71	27,61	28,20	25,57	27,91	27,93
23	hsa-miR-199a-3p	30,51	31,95	31,76	30,56	31,62	31,70	30,80	32,36	32,22
24	hsa-miR-188-3p	24,86	27,04	27,39	26,55	27,78	27,39	24,51	27,65	27,90
25	hsa-miR-200b-3p	30,22	31,05	31,35	30,73	31,04	31,52	29,99	30,49	31,20
26	hsa-miR-200c-3p	29,24	30,66	30,38	30,02	30,54	31,28	29,29	30,80	30,46
27	hsa-miR-141-3p	31,12	0,00*	0,00*	32,90	35,10*	36,97*	30,37	34,30*	0,00*
28	hsa-miR-429	32,83	33,58*	34,27*	34,41*	35,07*	37,61*	32,11	35,19*	35,60*
29	hsa-miR-204-5p	26,75	27,70	28,20	27,74	28,14	29,24	27,44	28,54	28,80
30	hsa-miR-223-3p	35,98*	37,20*	35,36*	34,00*	35,03*	0,00*	33,63*	38,02*	37,75*
31	hsa-miR-218-5p	22,18	22,44	22,71	22,93	23,10	22,98	22,67	23,35	23,04
32	hsa-miR-320a	22,52	23,49	23,86	23,17	23,63	23,69	22,13	24,03	23,82
33	hsa-miR-338-3p	25,02	28,86	29,56	26,99	29,70	30,70	25,02	28,72	29,78
34	hsa-miR-363-3p	26,75	29,47	29,89	28,18	29,87	31,53	26,80	30,16	30,80

35	hsa-miR-451a	30,62	33,26*	32,50	33,96*	33,78*	32,91	30,30	34,48*	33,69*
36	hsa-miR-494-3p	26,21	28,00	29,13	27,03	28,19	29,06	25,09	28,24	28,94
37	hsa-miR-497-5p	27,20	29,83	30,54	29,04	30,52	31,29	26,80	29,79	30,25
38	hsa-miR-506-5p	0,00*	0,00*	0,00*	36,43*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	36,60*
39	hsa-miR-539-3p	34,11*	38,44*	0,00*	0,00*	34,67*	0,00*	35,89*	0,00*	36,55*
40	hsa-miR-574-3p	26,27	26,97	27,61	26,19	27,04	27,66	25,35	27,06	27,28
41	hsa-miR-634	33,35*	34,92*	36,07*	36,77*	0,00*	34,78*	35,67*	35,33*	35,76*
42	hsa-let-7c-5p	25,32	26,52	26,89	26,13	27,00	27,05	25,40	27,14	27,61
43	hsa-let-7c-5p	25,29	26,36	27,03	26,00	26,82	27,13	25,41	27,00	27,13
44	hsa-let-7i-5p	26,08	27,96	28,39	26,69	28,55	28,87	26,12	28,43	28,60
45	hsa-miR-10b-5p	22,22	22,27	22,79	23,06	23,13	23,30	22,99	23,50	23,58
46	hsa-miR-17-5p	20,06	22,32	22,67	21,28	22,73	23,87	20,20	22,76	23,04
47	hsa-miR-17-3p	25,83	28,90	29,64	27,96	29,48	30,32	25,68	29,21	29,14
48	hsa-miR-18a-5p	21,34	23,86	24,02	22,61	23,91	25,25	21,46	23,77	24,07
49	hsa-miR-19a-3p	19,44	21,99	22,20	20,87	22,27	24,12	19,14	21,84	22,54
50	hsa-miR-20a-5p	19,21	21,62	21,79	20,49	21,64	23,18	19,27	21,67	22,06
51	hsa-miR-92a-3p	20,03	21,53	21,63	21,02	21,82	22,34	20,04	21,98	21,67
52	hsa-miR-18b-5p	25,25	26,69	27,13	26,36	27,37	27,64	25,73	27,63	27,84
53	hsa-miR-21-5p	20,75	21,21	21,86	20,84	21,05	21,59	19,94	21,03	20,96
54	hsa-miR-23a-3p	22,15	22,94	23,32	22,29	22,70	23,22	21,56	22,90	22,91
55	hsa-miR-23b-3p	22,53	23,31	23,71	23,10	23,67	23,90	22,72	23,99	23,90
56	hsa-miR-27a-3p	23,00	25,51	25,75	23,66	24,83	26,69	22,11	24,50	25,33
57	hsa-miR-29a-3p	23,90	26,16	26,51	25,17	26,48	27,89	23,96	26,26	26,96
58	hsa-miR-31-3p	26,32	30,09	30,15	28,57	30,41	31,86	26,62	30,10	30,93
59	hsa-miR-93-5p	20,74	22,96	23,18	22,03	23,17	24,08	20,82	23,38	23,31
60	hsa-miR-142-3p	29,97	32,89	32,21	31,54	33,98*	0,00*	30,05	33,22*	33,34*
61	hsa-miR-146a-5p	31,96	32,81	33,49	30,65	29,79	31,42	30,09	29,92	31,01
62	hsa-miR-149-3p	24,72	26,80	27,61	26,27	27,10	27,10	24,44	27,14	27,34
63	hsa-miR-151a-5p	23,36	24,70	25,09	24,28	24,90	25,78	23,61	25,31	25,08
64	hsa-miR-155-5p	34,40*	35,24*	35,28*	33,85*	0,00*	35,18*	31,22	35,74*	33,11*
65	hsa-miR-181b-5p	23,72	24,82	25,05	24,91	25,13	25,04	23,88	25,37	25,18
66	hsa-miR-183-5p	24,84	25,87	26,35	25,63	26,11	26,15	24,98	26,26	26,21
67	hsa-miR-185-5p	24,23	25,99	26,32	25,27	26,28	26,86	24,38	26,59	26,37
68	hsa-miR-191-5p	21,24	22,11	22,55	21,85	22,57	23,04	21,27	22,64	22,66
69	hsa-miR-192-5p	25,11	27,00	26,87	26,27	27,12	27,26	25,54	27,57	26,90
70	hsa-miR-205-5p	31,65	31,81	32,14	32,05	31,77	33,26	31,45	34,01*	33,51*
71	hsa-miR-210-3p	24,48	26,78	27,52	26,14	27,16	28,26	24,23	27,53	28,00

72	hsa-miR-214-3p	33,61	34,06	0,00	32,50	35,45	33,90	33,65	33,26	35,96
73	hsa-miR-221-3p	19,90	20,62	21,17	20,45	20,56	21,05	19,34	20,73	20,73
74	hsa-miR-222-3p	20,06	20,89	21,12	20,61	20,67	21,52	19,44	20,72	20,81
75	hsa-miR-224-5p	22,39	23,42	23,61	23,02	23,37	23,77	22,37	23,73	23,46
76	hsa-miR-373-3p	0,00*	36,19*	36,71*	0,00*	38,43*	0,00*	37,19*	0,00*	0,00*
77	hsa-miR-374a-5p	21,88	22,67	22,87	22,65	22,99	23,61	22,22	23,16	23,32
78	hsa-miR-421	24,72	25,39	25,55	25,48	25,90	26,00	24,97	26,11	25,78
79	hsa-miR-663b	30,09	31,52	31,92	30,04	30,59	31,60	29,03	31,65	31,34
80	hsa-miR-744-5p	22,73	23,29	23,57	23,43	23,82	23,98	22,89	23,85	23,87
81	hsa-miR-4792	21,70	24,11	25,08	22,33	23,90	25,10	20,78	24,25	25,14
82	hsa-let-7e-5p	23,03	24,35	24,24	23,93	24,60	24,69	23,55	24,63	24,75
83	hsa-miR-10a-5p	20,97	21,52	21,83	21,62	21,95	22,23	21,60	22,30	22,17
84	hsa-miR-26a-5p	20,93	21,67	22,26	21,53	22,10	22,75	21,05	22,29	22,30
85	hsa-miR-132-3p	25,06	26,24	26,46	25,84	26,19	26,57	24,62	26,43	26,17
86	hsa-miR-144-3p	35,49*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	38,08*	34,46*	0,00*	0,00*
87	hsa-miR-181a-5p	23,70	26,26	27,85	25,51	26,61	27,70	23,80	26,89	27,02
88	hsa-miR-184	0,00*	0,00*	0,00*	34,08*	34,89*	0,00*	34,12*	0,00*	34,66*
89	hsa-miR-203a-3p	25,15	26,54	26,56	25,66	26,65	26,79	24,83	26,59	26,36
90	hsa-miR-372-3p	0,00*	33,11*	0,00*	0,00*	36,85*	38,17*	35,48*	0,00*	0,00*
91	hsa-miR-378a-3p	23,50	25,32	25,31	24,59	25,41	25,98	23,53	25,66	25,84
92	RNU6-6P	18,23	19,84	19,95	19,24	20,29	21,05	18,35	20,50	20,47
93	SNORD68	18,93	19,92	20,61	19,85	20,20	20,77	19,17	20,54	20,63
94	SNORD72	22,14	26,94	26,66	24,44	26,41	27,08	22,67	26,38	26,38
95	miRTC	22,28	24,42	24,18	23,25	23,47	25,58	22,28	24,14	24,41
96	PPC	18,65	18,51	18,52	18,61	18,80	18,45	18,47	18,70	18,59

*Amostras consideradas não amplificadas

QUADRO S 3 - Análise comparativa do nível de expressão relativo dos genes alvo.

#	miR	B95-8xControle		M81xControle		M81xB95-8	
		<i>Fold Reg</i>	<i>p value</i>	<i>Fold Reg</i>	<i>p value</i>	<i>Fold Reg</i>	<i>p value</i>
1	hsa-miR-9-5p	1,17	0,96	-1,06	0,87	-1,25	0,81
2	hsa-miR-15a-5p	-1,23	0,27	1,02	0,84	1,25	0,43
3	hsa-miR-16-5p	-1,17	0,39	1,00	0,97	1,17	0,38
4	hsa-miR-24-3p	1,16	0,44	1,27	0,29	1,09	0,55
5	hsa-miR-26b-5p	1,14	0,97	-1,43	0,50	-1,63	0,40
6	hsa-miR-29c-3p	1,03	0,75	1,21	0,32	1,17	0,58
7	hsa-miR-30a-3p	1,29	0,76	1,06	0,93	-1,22	0,84
8	hsa-miR-34a-5p	-1,01	0,88	1,22	0,21	1,23	0,02
9	hsa-miR-34b-5p	-1,35	0,30	1,05	0,84	1,41	0,37
10	hsa-miR-34c-5p	-1,90	0,25	-1,24	0,63	1,53	0,45
11	hsa-miR-100-5p	1,03	0,87	-1,32	0,49	-1,36	0,48
12	hsa-miR-124-5p	-2,37	0,22	1,11	0,63	2,64	0,20
13	hsa-miR-125b-5p	1,03	0,87	-1,03	0,91	-1,06	0,98
14	hsa-miR-135b-5p	1,19	0,61	-1,11	0,97	-1,32	0,63
15	hsa-miR-138-5p	-1,20	0,36	-1,03	0,68	1,17	0,45
16	hsa-miR-140-3p	1,26	0,29	1,26	0,28	-1,00	0,98
17	hsa-miR-140-5p	1,28	0,19	1,30	0,34	1,01	0,83
18	hsa-miR-143-3p	-1,87	0,83	1,27	0,52	2,37	0,48
19	hsa-miR-145-5p	1,51	0,46	1,19	0,71	-1,26	0,72
20	hsa-miR-148a-3p	1,16	0,78	1,02	0,98	-1,14	0,72
21	hsa-miR-152-3p	1,47	0,27	1,07	0,92	-1,37	0,24
22	hsa-miR-188-5p	1,22	0,62	1,07	0,98	-1,15	0,52
23	hsa-miR-199a-3p	2,19	0,21	1,02	0,99	-2,14	0,20
24	hsa-miR-188-3p	1,05	0,75	1,05	0,81	1,00	0,83
25	hsa-miR-200b-3p	1,75	0,40	1,58	0,45	-1,10	0,91
26	hsa-miR-200c-3p	1,42	0,59	1,21	0,73	-1,17	0,90
27	hsa-miR-141-3p	3,75	0,23	2,98	0,25	-1,26	0,53
28	hsa-miR-429	-1,72	0,28	-1,15	0,48	1,50	0,29
29	hsa-miR-204-5p	1,10	0,97	-1,27	0,63	-1,40	0,56
30	hsa-miR-223-3p	1,63	0,55	-1,02	0,59	-1,66	0,27
31	hsa-miR-218-5p	1,12	0,97	-1,25	0,64	-1,40	0,59
32	hsa-miR-320a	1,42	0,45	1,15	0,85	-1,24	0,48
33	hsa-miR-338-3p	-1,25	0,62	1,23	0,59	1,54	0,35
34	hsa-miR-363-3p	-1,09	0,70	-1,11	0,59	-1,02	0,93

35	hsa-miR-451a	-1,21	0,85	-1,15	0,59	1,05	0,64
36	hsa-miR-494-3p	1,51	0,18	1,60	0,18	1,06	0,65
37	hsa-miR-497-5p	-1,05	0,69	1,50	0,04	1,57	0,01
38	hsa-miR-506-5p	-1,05	0,82	1,48	0,45	1,55	0,43
39	hsa-miR-539-3p	1,70	0,42	1,21	0,52	-1,40	0,56
40	hsa-miR-574-3p	1,80	0,25	1,60	0,42	-1,13	0,77
41	hsa-miR-634	-1,68	0,70	-1,15	0,79	1,46	0,80
42	hsa-let-7c-5p	1,30	0,60	-1,10	0,70	-1,43	0,34
43	hsa-let-7c-5p	1,35	0,55	1,02	0,95	-1,32	0,46
44	hsa-let-7i-5p	1,29	0,36	1,07	0,87	-1,20	0,36
45	hsa-miR-10b-5p	1,01	0,80	-1,57	0,40	-1,58	0,43
46	hsa-miR-17-5p	-1,16	0,39	-1,06	0,53	1,09	0,65
47	hsa-miR-17-3p	-1,11	0,38	1,35	0,11	1,50	0,02
48	hsa-miR-18a-5p	-1,06	0,78	1,15	0,10	1,21	0,25
49	hsa-miR-19a-3p	-1,38	0,29	1,18	0,38	1,63	0,20
50	hsa-miR-20a-5p	-1,15	0,54	1,05	0,55	1,21	0,41
51	hsa-miR-92a-3p	1,01	0,90	1,02	1,00	1,01	0,87
52	hsa-miR-18b-5p	1,09	0,91	-1,28	0,45	-1,40	0,29
53	hsa-miR-21-5p	1,66	0,30	1,71	0,30	1,03	0,84
54	hsa-miR-23a-3p	1,68	0,24	1,46	0,43	-1,15	0,71
55	hsa-miR-23b-3p	1,29	0,66	-1,07	0,80	-1,37	0,44
56	hsa-miR-27a-3p	1,40	0,17	1,97	0,02	1,41	0,23
57	hsa-miR-29a-3p	-1,07	0,67	1,07	0,70	1,14	0,48
58	hsa-miR-31-3p	-1,30	0,27	1,01	0,92	1,31	0,31
59	hsa-miR-93-5p	-1,05	0,56	1,02	0,86	1,06	0,21
60	hsa-miR-142-3p	-4,45	0,20	-1,04	0,74	4,27	0,15
61	hsa-miR-146a-5p	8,03	0,08	6,16	0,15	-1,30	0,90
62	hsa-miR-149-3p	1,32	0,39	1,29	0,21	-1,02	0,77
63	hsa-miR-151a-5p	1,15	0,77	-1,01	0,95	-1,16	0,70
64	hsa-miR-155-5p	1,20	0,59	4,01	0,22	3,33	0,36
65	hsa-miR-181b-5p	1,22	0,66	1,00	0,94	-1,22	0,61
66	hsa-miR-183-5p	1,46	0,46	1,11	0,82	-1,31	0,58
67	hsa-miR-185-5p	1,17	0,59	1,02	0,99	-1,15	0,56
68	hsa-miR-191-5p	1,14	0,89	1,00	0,90	-1,14	0,72
69	hsa-miR-192-5p	1,24	0,57	-1,02	1,00	-1,27	0,60
70	hsa-miR-205-5p	1,54	0,71	-1,51	0,32	-2,33	0,15
71	hsa-miR-210-3p	-1,02	0,86	1,01	0,94	1,02	0,81

72	hsa-miR-214-3p	5,32	0,22	2,61	0,47	-2,04	0,69
73	hsa-miR-221-3p	1,39	0,45	1,37	0,47	-1,02	0,93
74	hsa-miR-222-3p	1,30	0,57	1,43	0,40	1,10	0,71
75	hsa-miR-224-5p	1,38	0,47	1,14	0,80	-1,22	0,64
76	hsa-miR-373-3p	-2,20	0,16	-2,47	0,14	-1,13	0,39
77	hsa-miR-374a-5p	1,09	0,97	-1,14	0,72	-1,24	0,67
78	hsa-miR-421	1,20	0,86	-1,07	0,83	-1,29	0,68
79	hsa-miR-663b	2,66	0,06	1,82	0,21	-1,46	0,24
80	hsa-miR-744-5p	1,16	0,93	-1,06	0,81	-1,23	0,70
81	hsa-miR-4792	1,49	0,13	1,40	0,36	-1,06	0,95
82	hsa-let-7e-5p	1,18	0,76	-1,13	0,79	-1,33	0,55
83	hsa-miR-10a-5p	1,14	0,94	-1,28	0,60	-1,45	0,47
84	hsa-miR-26a-5p	1,13	0,93	-1,03	0,85	-1,17	0,68
85	hsa-miR-132-3p	1,47	0,42	1,37	0,51	-1,07	0,84
86	hsa-miR-144-3p	1,37	0,46	1,01	0,95	-1,35	0,48
87	hsa-miR-181a-5p	1,13	0,81	1,25	0,53	1,10	0,33
88	hsa-miR-184	3,72	0,17	2,84	0,35	-1,31	0,99
89	hsa-miR-203a-3p	1,48	0,38	1,35	0,51	-1,10	0,86
90	hsa-miR-372-3p	-1,39	0,45	-3,40	0,37	-2,45	0,11
91	hsa-miR-378a-3p	1,15	0,67	-1,01	0,88	-1,16	0,45
92	RNU6-6P	-1,17	0,33	-1,18	0,30	-1,01	0,79
93	SNORD68	1,11	0,84	-1,08	0,73	-1,20	0,47
94	SNORD72	1,06	0,83	1,28	0,83	1,21	0,47
95	miRTC	1,22	0,52	1,19	0,49	-1,03	0,83
96	PPC	1,38	0,72	1,08	0,98	-1,29	0,69

Em negrito estão os microRNAs seleccionados por possuírem fold regulation maior que 1,2 e $p < 0,05$.

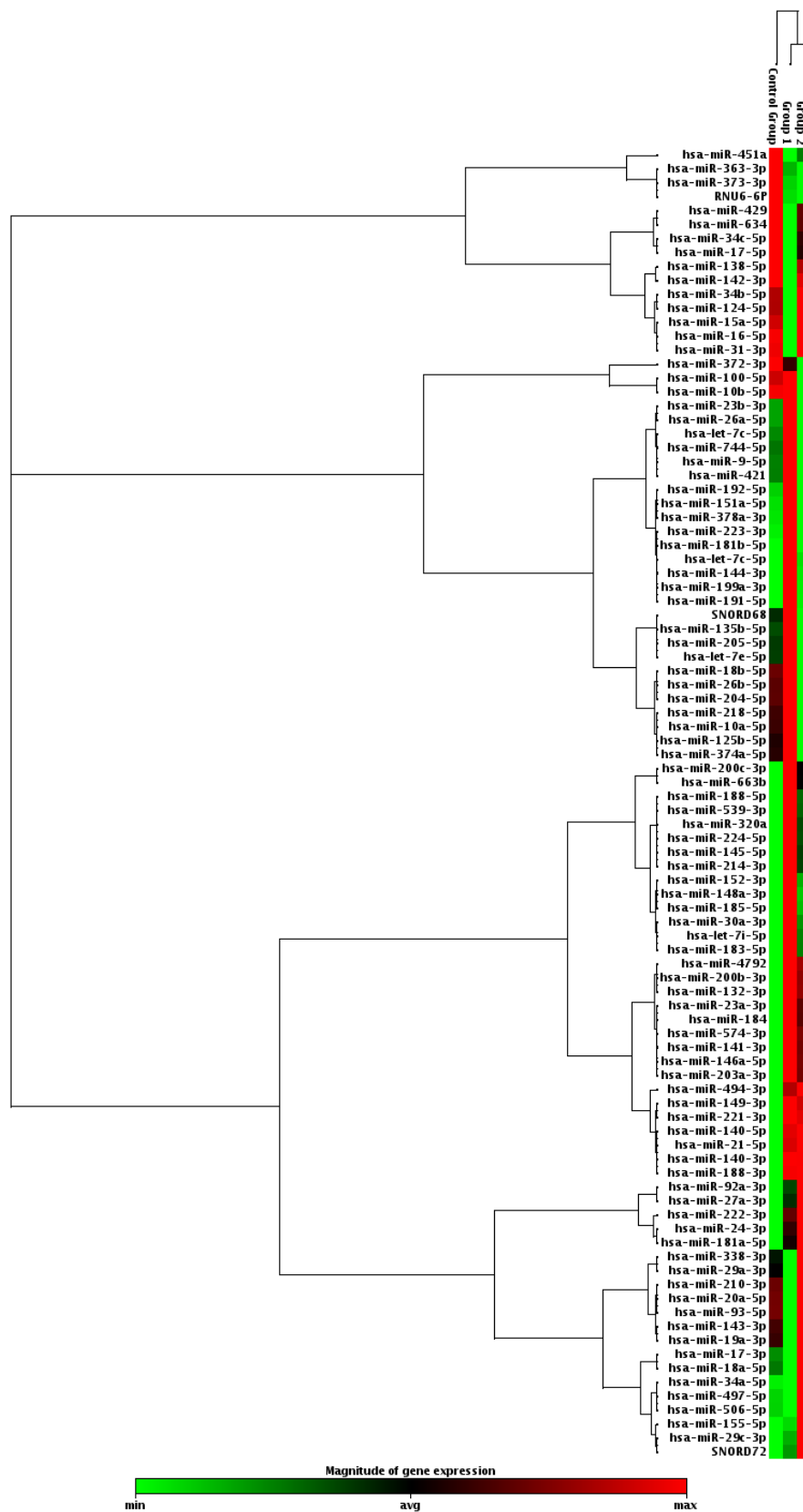


FIGURA S 1 - Clusterização baseado em nível de expressão de todos os microRNAs analisados. Primeira coluna se trata do grupo pZsGreen, seguido por pZsG-LMP1B95-8 e pZsG-LMP1M81.

QUADRO S 4 - Genes alvo dos microRNAs selecionados. Lista completa de todos os alvos preditos in silico para os três microRNAs selecionados.

Nº	Gene	Uniprot	Ref	Nº	Gene	Uniprot	Ref	Nº	Gene	Uniprot	Ref
hsa-miR-17-3p				31	CTNND2	Q9UQB3		66	IGSF1	Q8N6C5	
1	COCH	O43405	263	32	CUEDC1	Q9NWM3	265	67	KCNK9	Q9NPC2	
2	SMEK1	Q6IN85	263,264	33	DGCR2	P98153	265	68	KDM5D	Q9BY66	
hsa-miR-34a-5p				34	DLL1	O00548	265	69	KLF6	Q99612	
1	ABCD1	P33897	265	35	DNM1L	O00429	265	70	KLRK1	P26718	
2	ACSL4	O60488	266	36	EPS15L1	Q9UBC2	265	71	KRI1	Q8N9T8	
3	ACSM2A	Q08AH3		37	FAM162B	Q5T6X4		72	LMBR1L	Q6UX01	279
4	ALG13	Q9NP73	265	38	FAM167A	Q96KS9	265	73	LPO	P22079	
5	ANKRD54	Q6NXT1		39	FAM76A	Q8TAV0	278–281	74	LRPAP1	P30533	
6	AP3M2	P53677		40	FAM83A	Q86UY5	279	75	LRRC40	Q9H9A6	279,284,287
7	ARHGDIB	P52566	265	41	FANCA	O15360	279	76	LRRFIP1	Q32MZ4	287
8	ARHGEF33	A8MVX0		42	FBXO39	Q8N4B4		77	LRRTM2	O43300	
9	ASB4	Q9Y574		43	FES	P07332	279	78	MAP3K15	Q6ZN16	
10	ATPAF1	Q5TC12	265	44	FGD3	Q5JSP0	279	79	MAP7D3	Q8IWC1	267
11	AXL	P30530	267,268	45	FGD6	Q6ZV73	279	80	MAPK13	O15264	279
12	B3GALNT1	O75752	265	46	FLOT2	Q14254	276,282–284	81	MOAP1	Q96BY2	279,288
13	B3GALNT2	Q8NCR0	265	47	FNDC8	Q8TC99		82	MPV17L2	Q567V2	279
14	BCL2	P10415	269–272	48	FOSL1	P15407	279	83	MSL2	Q9HCI7	269,273
15	BMP8B	P34820	265	49	FOXR2	Q6PJQ5		84	MTCH2	Q9Y6C9	
16	BRINP1	O60477		50	FSTL3	O95633	279	85	NFATC4	Q14934	
17	BTBD18	B2RXH4		51	FUCA2	Q9BTY2		86	NOP2	P46087	
18	C16orf58	Q96GQ5	265	52	FUT8	Q9BYC5	279	87	NOS1	P29475	
19	C3orf62	Q6ZUJ4		53	GABRA3	P34903		88	NRIP3	Q9NQ35	279
20	CALB1	P05937		54	GABRB2	P47870		89	NSD1	Q96L73	
21	CAPN6	Q9Y6Q1		55	GATAD2B	Q8WXI9	279	90	NUMBL	Q9Y6R0	279,289
22	CCDC85A	Q96PX6		56	GIN3	Q9BRX5	285	91	OLIG3	Q7RTU3	
23	CCNE2	O96020	273	56	GK5	Q6ZS86	279	92	OVOL2	Q9BRP0	
24	CD164L2	Q6UWJ8		58	GLRX5	Q86SX6	279	93	P2RY14	Q15391	
25	CDON	Q4KMG0	274–276	59	GLTP	Q9NZD2	286	94	PDGFRA	P16234	267,290
26	CIAO1	O76071		60	GOLPH3L	Q9H4A5	286	95	PFKM	P08237	
27	CLIP3	Q96DZ5		61	GSDMB	Q8TAX9		96	PKP4	Q99569	279
28	CORO6	Q6QEF8	265	62	GTF2A1L	Q9UNN4		97	PLAG1	Q6DJT9	
29	CR2	P20023		63	HCN3	Q9P1Z3	279,286	98	PLET1	Q6UQ28	
30	CRTAP	O75718	265,277	64	HK1	P19367	279	99	PNMA3	Q9UL41	
				65	HS2ST1	Q7LGA3	279				

N°	Gene	Uniprot	Ref
100	PPFIA1	Q13136	279
101	PSD4	Q8NDX1	279
102	PTRH1	Q86Y79	
103	PVRL1	Q15223	279,291,292
104	RBM28	Q9NW13	
105	RGS17	Q9UGC6	
106	RNF216	Q9NWF9	279
107	RRAS	P10301	279
108	RUFY2	Q8WXA3	279
109	SAMD3	Q8N6K7	
110	SCN2A	Q99250	
111	SCN2B	O60939	
112	SGSM2	O43147	279
113	SIRT1	Q96EB6	279,293,294
114	SLC25A44	Q96H78	279
115	SLC6A3	Q01959	
116	SLCO3A1	Q9UIG8	
117	SMAD7	O15105	279
118	SPICE1	Q8N0Z3	
119	SSX5	O60225	279
120	STAB2	Q8WWQ8	
121	SYT1	P21579	279
122	TAF5	Q15542	279
123	TGIF2	Q9GZN2	
124	THUMPD3	Q9BV44	
125	TMEM255A	Q5JRV8	
126	TMEM35	Q53FP2	
127	TMEM55A	Q8N4L2	279
128	TMTC3	Q6ZXV5	269,279
129	TRANK1	O15050	
130	TRIM67	Q6ZTA4	
131	TTC19	Q6DKK2	279
132	TWIST2	Q8WVJ9	
133	UBXN7	O94888	
134	UHRF2	Q96PU4	279
135	VCL	P18206	279
136	YDJC	A8MPS7	

N°	Gene	Uniprot	Ref
137	ZCCHC17	Q9NP64	279
138	ZDHHC17	Q8IUH5	
139	ZNF207	O43670	295
140	ZNF264	O43296	
141	ZNF281	Q9Y2X9	267
142	ZNF551	Q7Z340	
143	ZNRF1	Q8ND25	279
144	ZSCAN22	P10073	279
hsa-miR-497-5p			
1	ABHD2	P08910	
3	ACOX3	O15254	
4	ACPP	P15309	
5	AMER1	Q5JTC6	
6	AP1S2	P56377	
7	APLN	Q9ULZ1	
8	AQP11	Q8NBQ7	
9	ARFGAP2	Q8N6H7	
10	ARHGAP5	Q13017	
11	ARL2	P36404	267,296
12	ASB1	Q9Y576	297
13	ASB7	Q9H672	
14	ASH1L	Q9NR48	281,298,299
15	ATG4B	Q9Y4P1	
16	ATXN2	Q99700	
17	BTRC	Q9Y297	300
18	C10orf54	Q9H7M9	
19	CASK	O14936	
20	CCDC19	Q9UL16	
21	CCDC83	Q8IWF9	
22	CCNJL	Q8IV13	
23	CD28	P10747	
24	CDCA4	Q9BXL8	267,296,298
25	CHD5	Q8TDI0	
26	CXorf40B	Q96DE9	
27	CYB5B	O43169	
28	DDX11	Q96FC9	
29	DDX3X	O00571	
30	DNASE1L2	Q92874	

N°	Gene	Uniprot	Ref
31	ERCC6	Q03468	
32	EXT2	Q93063	
33	FAM135A	Q9P2D6	
34	FAM179B	Q9Y4F4	
35	FBXW7	Q969H0	281,296,301,302
36	FGF2	P09038	267,281
37	FGFR1	P11362	
38	FOXK1	P85037	267
39	FRMPD1	Q5SYB0	
40	FZD10	Q9ULW2	
41	GALNT13	Q8IUC8	
42	GFAP	P14136	
41	GPR157	Q5UAW9	296
42	GRM1	Q13255	
43	IGF1R	P08069	296,297,303
44	IP6K1	Q92551	296,297
45	KIF1B	O60333	304
46	KIF21A	Q7Z4S6	281,305
47	KIF23	Q02241	281
48	KIFC2	Q96AC6	
49	LDLRAD4	O15165	
50	LUZP1	Q86V48	296
51	LYSMD2	Q8IV50	
52	MACF1	Q9UPN3	296
53	MGAT4A	Q9UM21	
54	MMS19	Q96T76	
55	MTMR3	Q13615	304
56	MYB	P10242	
57	N4BP1	O75113	281,296,305
58	NEK10	Q6ZWH5	
59	NOMO1	Q15155	
60	NOMO2	Q5JPE7	
61	NOMO3	P69849	
62	OOEP	A6NGQ2	
63	PDCD1	Q15116	
64	PGLS	O95336	

N°	Gene	Uniprot	Ref	N°	Gene	Uniprot	Ref	N°	Gene	Uniprot	Ref
65	PHF19	Q5T6S3		81	RNGTT	O60942		98	TENM2	Q9NT68	
66	PHF20	Q9BVI0	304	82	RPS6KA6	Q9UK32		99	TFAP2A	P05549	
67	PHKA1	P46020		83	RPUSD2	Q8IZ73		100	TGIF2	Q9GZN2	
68	PIK3IP1	Q96FE7		84	RUNX1T1	Q06455		<i>101</i>	<i>TMC7</i>	<i>Q7Z402</i>	
69	PKD1	P98161		85	SELO	Unknown		102	TMCC1	O94876	296
70	PLAG1	Q6DJT9	281	86	SETD3	Q86TU7		<i>103</i>	<i>TMEM100</i>	<i>Q9NV29</i>	
71	POMZP3	Q6PJE2		87	SGK1	O00141	306	104	TSEN2	Q8NCE0	
72	POU2F1	P14859		88	SIDT2	Q8NBJ9		105	UBE2V1	Q13404	296
73	PSMD7	P51665		89	SIK1	P57059	296,297	<i>106</i>	<i>WDTC1</i>	<i>Q8N5D0</i>	
74	PTCH1	Q13635	296	90	SLC20A2	Q08357	296	107	WEE1	P30291	296,304 ,306
75	PVRL1	Q15223	304	91	SLC30A8	Q8IWU4		108	YRDC	Q86U90	296,306
76	RASGEF1B	Q0VAM2		92	SMAD7	O15105	305	<i>109</i>	<i>YWHAH</i>	<i>Q04917</i>	
77	RASSF5	Q8WWW0		93	SNPH	O15079		110	ZBTB34	Q8NCN2	296
78	RBBP6	Q7Z6E9		94	STARD9	Q9P2P6		111	ZC3H12C	Q9C0D7	296
79	RBM6	P78332		95	STK33	Q9BYT3		<i>112</i>	<i>ZC3H13</i>	<i>Q5T200</i>	
			281,296	96	SYDE2	Q5VT97		<i>113</i>	<i>ZP3</i>	<i>P21754</i>	
80	RECK	O95980	297,30 5	97	TAS1R1	Q7RTX1					

Em negrito estão todos aqueles que possuem a interação miR-RNA validada em experimentos. Em itálico estão os alvos que não são expressos no rim.

Review

Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers

Deilson Elgui de Oliveira,^{1,2,*} Bárbara G. Müller-Coan,¹ and Joseph S. Pagano³

Cancer progression begins when malignant cells colonize adjacent sites, and it is characterized by increasing tumor heterogeneity, invasion and dissemination of cancer cells. Clinically, progression is the most relevant stage in the natural history of cancers. A given virus is usually regarded as oncogenic because of its ability to induce malignant transformation of cells. Nonetheless, oncogenic viruses may also be important for the progression of infection-associated cancers. Recently this hypothesis has been addressed because of studies on the contribution of the Epstein–Barr virus (EBV) to the aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma (NPC). Several EBV products modulate cancer progression phenomena, such as the epithelial–mesenchymal transition, cell motility, invasiveness, angiogenesis, and metastasis. In this regard, there are compelling data about the effects of EBV latent membrane proteins (LMPs) and EBV nuclear antigens (EBNAs), as well as nontranslated viral RNAs, such as the EBV-encoded small nonpolyadenylated RNAs (EBERs) and viral microRNAs, notably EBV miR-BARTs. The available data on the mechanisms and players involved in the contribution of EBV infection to the aggressiveness of NPC are discussed in this review. Overall, this conceptual framework may be valuable for the understanding of the contribution of some infectious agents in the progression of cancers.

Oncogenic Viruses

Worldwide, more than 50% of cancer cases are associated with preventable causes, including infections [1]. The population-attributable fraction for malignant neoplasms associated with infectious agents globally in 2008 was 16.1%, ranging from 3.3% in New Zealand to 32.7% in sub-Saharan Africa. About 2 million of all new malignant neoplasms reported in humans were associated with infections, and 1.6 million occurred in less developed regions. More than two-thirds of cancer cases (1.37 million) in 2008 were linked to well-known oncogenic viruses, namely, human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), human hepatitis B and C viruses (HBV and HCV, respectively), human papillomavirus (HPV), Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), and EBV [2].

The oncogenic properties of a given virus are usually defined based on its ability to induce malignant cell transformation, and carcinogenic viruses typically interfere with multiple homeostatic cellular processes. For instance, viruses associated with malignant tumors hijack

Trends

The Epstein–Barr virus (EBV) is implicated in many neoplastic diseases, notably lymphomas and epithelial cancers.

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is strongly associated with EBV infection, and EBV products partially contribute to the aggressiveness of this cancer.

Several EBV products enhance cell motility and invasiveness, and they can also modulate the epithelial–mesenchymal transition.

Challenges in the manipulation of EBV genomes hampered the assessment of the extent of cancer addiction to viral products. New genetic editing tools (e.g., CRISPR/Cas9) will be valuable to create new informative models to address this issue.

Accumulated data on the role of EBV in the biological features of NPC makes it conceivable that some oncoviruses contribute to malignant transformation and have a role in the aggressiveness of the associated cancers due to effects on tumor progression phenomena.

¹Viral Carcinogenesis and Cancer Biology Research Group (ViriCan) at Biotechnology Institute (IBTEC), São Paulo State University (UNESP), Brazil

²Pathology Department at Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Brazil

³Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA

*Correspondence: elgui@virican.net (D. Elgui de Oliveira).



FIGURA S 2 - Revisão desenvolvida em conjunto com o orientador Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira e Dr. Joseph S. Pagano.