

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2018.



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**

|          |                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                  | <b>14</b> |
| 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        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                  | <b>28</b> |
| 2.1      | Objetivo geral .....                                    | 28        |
| 2.2      | Objetivos específicos .....                             | 28        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                         | <b>29</b> |
| 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        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                             | <b>44</b> |
| 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        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                                                                              | <b>53</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....                                                                                             | <b>57</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                             | <b>58</b> |
| <b>8</b> | <b>ANEXOS</b> .....                                                                                                 | <b>74</b> |

## 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 infectado<sup>11</sup>. ..... 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. <sup>48,49</sup> ..... 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*<sup>262</sup>. ..... 52

## Lista de Quadros

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>QUADRO 1</b> - Programas de latência do EBV e principais produtos virais expressos.....                                                                                                                   | 19 |
| <b>QUADRO 2</b> - Sequências relacionadas à LMP1 das variantes B95.8 e M81 do EBV obtidas junto ao NCBI. ....                                                                                                | 31 |
| <b>QUADRO 3</b> - 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 |
| <b>QUADRO 4</b> - Discriminação das condições experimentais para preparação dos vetores de expressão da oncoproteína LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV. ....                                              | 35 |
| <b>QUADRO 5</b> - MicroRNAs selecionados com base na literatura para realização do qPCR array separados didaticamente em três grupos: supressores tumorais, oncomirs e com dupla função ..                   | 42 |
| <b>QUADRO 6</b> - Genes alvo dos miRs selecionados com validação na literatura da interação miR-RNAm. ....                                                                                                   | 48 |
| <b>QUADRO 7</b> - 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 ( $\alpha$ ) - 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- $\kappa$ 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- $\beta$ (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 álcool<sup>1</sup>.

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 infecciosas<sup>2</sup>.

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 cânceres<sup>3</sup>.

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 helmintos<sup>4</sup>. 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 uterino<sup>5</sup>.

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 <sup>5</sup>.

### 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 <sup>6</sup>.

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 <sup>7</sup>.

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 <sup>7</sup>. 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 <sup>8</sup>.

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 <sup>9</sup>.

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 <sup>10</sup> 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 <sup>11</sup>.

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 <sup>9</sup>.

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 <sup>12</sup>. Seu estadiamento pode ser associado à alta titulação viral, principalmente quando nos estádios clínicos avançados <sup>13</sup>.

## 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 <sup>14</sup>.

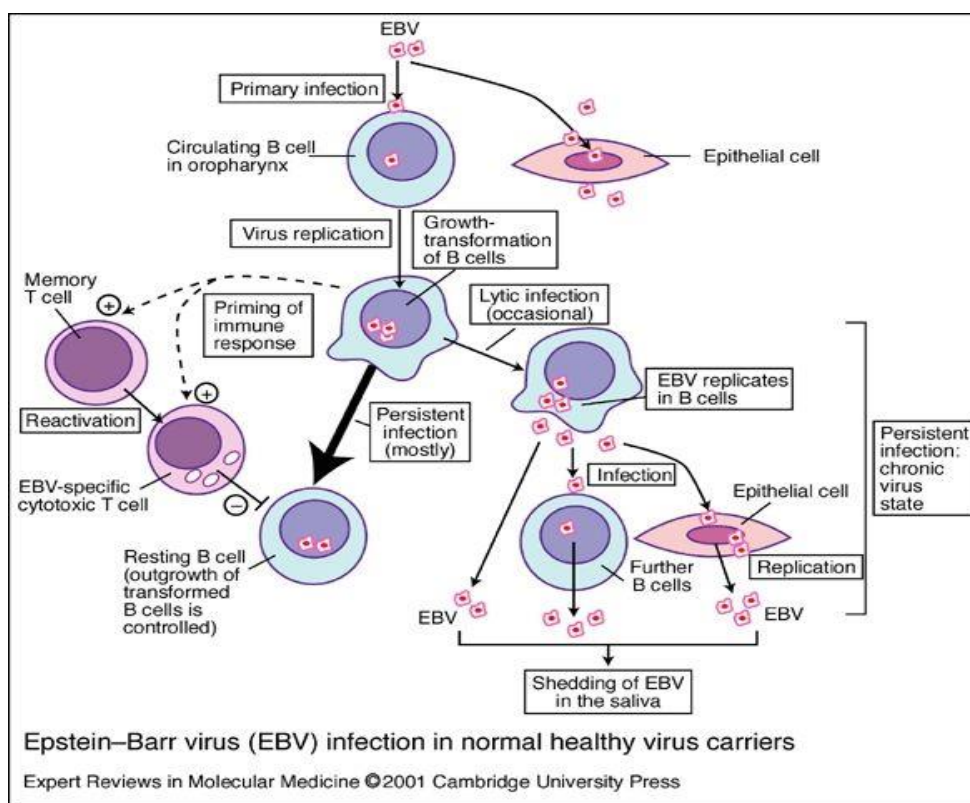
O EBV contribui no desenvolvimento de diversos cânceres humanos, notadamente alguns tipos de carcinoma gástrico (principalmente o carcinoma linfoepitelial), linfoma de Burkitt (*Burkit Lymphoma- BL*) e carcinoma de nasofaringe, como descrito anteriormente <sup>15</sup>.

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 <sup>16</sup>.

Trata-se de um vírus envelopado contendo DNA dupla fita com 172kb de comprimento, codificando mais de 80 genes <sup>17</sup>. 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)<sup>11</sup>.



**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 infectado<sup>11</sup>.

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 <sup>18</sup>. 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 <sup>19</sup>.

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 tumorais<sup>20</sup>.

**QUADRO 1** - Programas de latência do EBV e principais produtos virais expressos<sup>21</sup>.

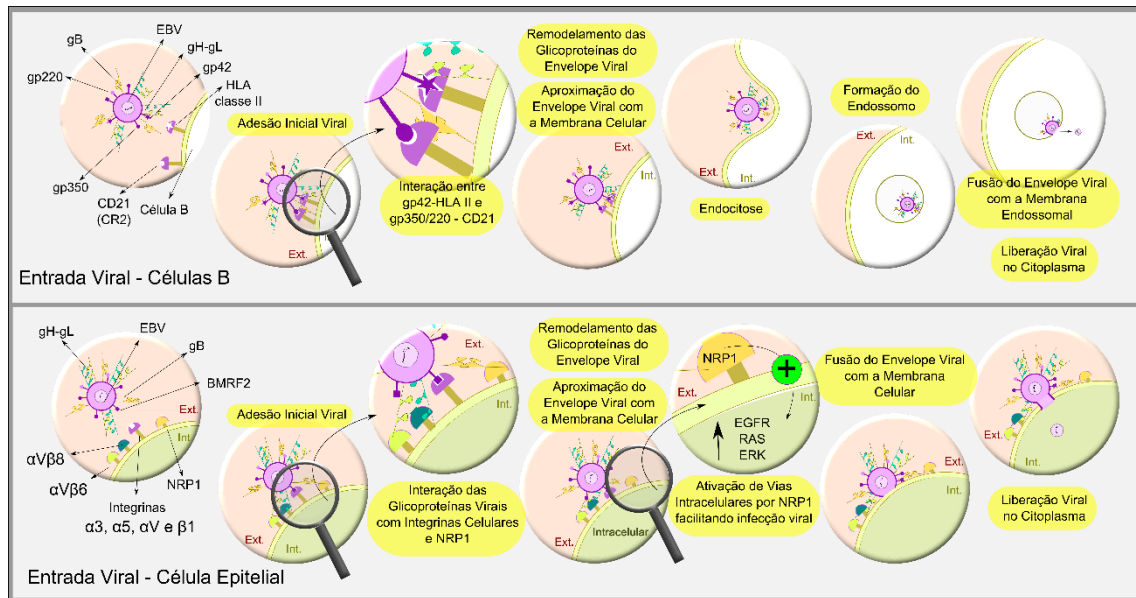
| Programa de Latência | Principais produtos virais expressos                   | Contextos da infecção pelo EBV                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tipo I               | EBERs, BARF0, EBNA1, (LMP2A)                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B de memória em proliferação e linfoma de Burkitt <i>in vivo</i></li> <li>• Carcinoma gástrico associado ao EBV<sup>1</sup></li> </ul>                                                                                           |
| Tipo II              | EBERs, BARFs, EBNA1, LMPs (1, 2A e 2B)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B do centro germinativo</li> <li>• Células neoplásicas de NPC e linfoma de Hodgkin clássico EBV positivo</li> </ul>                                                                                                              |
| Tipo III             | EBERs, BARFs, EBNA1 (1, 2, 3) e LP e LMPs (1, 2A e 2B) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B naïve e linhages celulares linfoblastóides</li> <li>• Células provenientes de doenças linfoproliferativas em hospedeiros imunossuprimidos (e.g., PTLD<sup>2</sup> e linfoma não Hodgkin do Sistema nervosa central)</li> </ul> |

<sup>1</sup>Alguns casos de carcinoma gástrico associado ao EBV podem expressar LMP2A.

<sup>2</sup>Doença 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 <sup>22</sup>.



**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 B95-8<sup>23</sup>. 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 <sup>24</sup>.

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 <sup>25</sup>. CTAR-2, por sua vez, ativa NF-κB por meio da interação com TRADD (*Tumoral Necrosis Factor Receptor Associated Death Domain Proteins – TRADD*) <sup>26</sup>. 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 <sup>27</sup>.

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 <sup>28</sup>.

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 <sup>29</sup>.

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) <sup>30</sup>, agir sobre o metabolismo celular e a importação de glicose <sup>31</sup>.

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) <sup>32</sup>. Adicionalmente, dentro da família das MAP quinases, destacam-se ERK (*Extracellular signal-regulated kinase – ERK*), que auxilia a progressão do ciclo celular <sup>33</sup>, 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 <sup>34</sup>.

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 <sup>35,36</sup>. Adicionalmente, LMP1 oferece um estímulo contínuo às vias de sinalização JAK-STAT<sup>37</sup> e Hedgehog, levando a uma modulação da resposta imunitária <sup>38</sup> e manutenção das CSCs (*Cancer Stem Cells – CSCs*) ou CSC-like, respectivamente <sup>39</sup>. 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 <sup>40</sup>. 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 <sup>41</sup>.

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 <sup>42</sup>. 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.

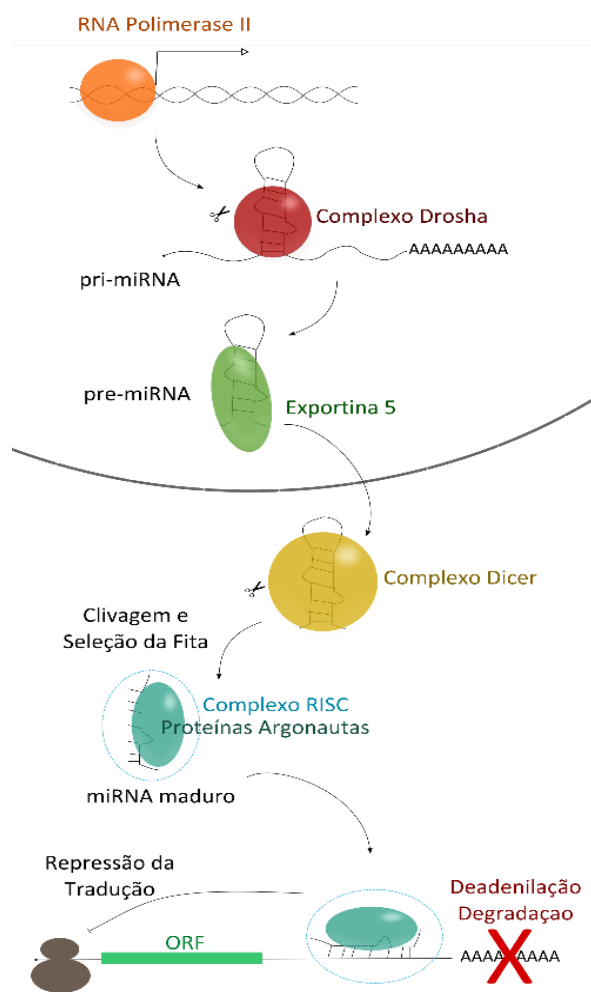
A biogênese de miRNAs requer ação da RNA polimerase II, que forma pri-miRNAs – grandes moléculas de RNA precursoras que são processadas no núcleo pela RNase III



(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) <sup>43</sup>. 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 GW182<sup>44</sup>. As proteínas AGO possuem sítios que podem levar a inibição da transcrição, deadenilação ou até mesmo degradação dos RNAm<sup>45</sup>.

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*)<sup>46</sup>. 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 <sup>47</sup>.

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 <sup>48</sup>.



**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 <sup>42</sup>. 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. <sup>50</sup>.

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 <sup>51</sup>.

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

Diversos miRNAs foram implicados em fenômenos importantes da carcinogênese, incluindo angiogênese, inibição da apoptose, proliferação celular, transição epitelial-mesenquimal e metástase <sup>55-57</sup>. 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) <sup>55-57</sup>. 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 <sup>58</sup>.

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 <sup>12,58</sup>.

#### **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 <sup>20</sup>.

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 <sup>12</sup>. 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 <sup>59</sup>.

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 <sup>23</sup>. 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 <sup>23</sup>. 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.

## 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- $\kappa$ 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 $\alpha$  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/ $\beta$ -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- $\beta$  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- $\kappa$ 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  $\beta$ 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/ $\beta$ -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  $\beta$  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- $\beta$  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- $\kappa$ B pathway via IKBKB/IKK- $\beta$  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  $\beta$ 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 $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\beta$ 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 $\alpha$ . *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- $\beta$ -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- $\kappa$ 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- $\beta$ 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 $\beta$ -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- $\kappa$ B-HIF-1 $\alpha$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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).