

Jean Lucas Parpinelli Barbosa

**Mecanismos de ação do microRNA-196a sobre a progressão do ciclo celular
em câncer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Patricia Severino

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

BARBOSA, J. L. P. **Mecanismos de ação do miR-196a sobre a progressão do ciclo celular em câncer.** 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os microRNAs compreendem uma família de pequenos RNAs que não codificam proteínas, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. MicroRNAs regulam uma parte significativa dos genes humanos através da inibição da tradução. Dentre estes genes encontram-se genes responsáveis por controlar o crescimento celular, diferenciação e a apoptose, caracterizando seu papel no desenvolvimento e progressão ou na supressão tumoral. O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) está entre as neoplasias mais comuns no mundo e, apesar dos avanços dos tratamentos, a taxa de sobrevivência é inferior a 50% em 5 anos. O tabaco e álcool foram identificados como principais fatores de risco para o CECP. Um estudo de expressão gênica global realizado anteriormente por nosso grupo identificou maior expressão do miR-196a em amostras de CECP quando comparadas às suas respectivas margens cirúrgicas, assim como maior expressão do miRNA-196 em linhagens celulares de CECP em relação a queratinócitos orais normais. Além disso, através de estudos de ganho de função, pudemos identificar um possível papel desse microRNA na diminuição da proliferação de queratinócitos orais e de linhagens celulares derivadas de CECP 72 horas após a super-expressão do miR-196a. Desse modo, com o intuito de compreender o efeito do miR-196 sobre a regulação do ciclo celular, avaliamos a expressão de genes relacionados à esta regulação e a expressão de proteínas repressoras do ciclo até 48 horas após a super-expressão do miR-196a. Identificamos alterações na expressão de genes relacionados às diferentes fases do ciclo celular, incluindo genes ativadores e repressores, e observamos diminuição na expressão de p27, alvo do miR-196a. Apesar de um relativo equilíbrio entre a expressão de genes repressores e ativadores do ciclo celular ter sido observado ao longo do tempo, observamos que após 48 horas de super-expressão de miR-196a a maioria dos genes repressores do ciclo celular, estavam mais expressos, fato possivelmente associado à diminuição da proliferação após 72 horas de super-expressão do miR-196a. Uma vez que a expressão deste microRNA pode intervir em uma das principais características do câncer, sugerimos que a super-expressão do miR-196a possa ser considerada como uma terapia para o tratamento do CECP.

Palavras-chave: MicroRNA. Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Ciclo celular.

ABSTRACT

BARBOSA, J. L. P. **Mechanisms of action of microRNA-196 on cell cycle progression in cancer.** 2015. 74 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MicroRNAs are a family of small RNAs with ~22 nucleotides in length that don't encode proteins. MicroRNAs regulate a significant proportion of human genes through translation inhibition. Among these, there are genes responsible for controlling cell growth, differentiation and apoptosis, characterizing its role as oncogenes or tumor suppressor. The squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC) is among the most common malignancies worldwide. Despite advances in treatment, the survival rate is less than 50% in 5 years. Tobacco and alcohol have been identified as major risk factors for HNSCC. A global gene expression study conducted previously by our group identified enhanced expression of miR-196a in HNSCC samples compared with respective surgical margins, as well as increased expression of miR-196a in HNSCC-derived cell lines compared to primary cultures of oral keratinocytes. Furthermore, following a gain of function study, we observed decreased oral keratinocyte and HNSCC cell line proliferation 72 hours after overexpression of miR-196a. Thus, in order to understand the effect of miR-196a on cell cycle regulation, gene expression and repressor protein levels were assessed along 48 hours after overexpression of miR-196a. We identified changes in gene expression related to the different phases of the cell cycle, including activator and repressor genes, and we also observed decreased expression of p27, a gene targeted by miR-196a. We observed a balance in the expression of cell cycle activators and repressors, but that at 48 hours following the overexpression of miR-196a most checkpoint inhibitor genes were more expressed. This fact could be associated with the decrease in cell proliferation observed at 72 hours after overexpression of miR-196a. Since the expression of this microRNA may interfere with one of the most important characteristics of cancer, we suggest that the overexpression of miR-196a is considered as tool for HNSCC therapy.

Keywords: MicroRNA. Head and neck squamous cells carcinoma. Cell cycle.

1 INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs que não codificam proteínas, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, que regulam a expressão gênica principalmente a nível pós-transcricional. Em mamíferos, acredita-se que miRNAs podem interferir na atividade de cerca de 50% dos genes codificadores de proteínas (BARTEL, 2009; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009), participando de diversos processos biológicos, como desenvolvimento, diferenciação, metabolismo, crescimento, proliferação e apoptose (CALIN; CROCE, 2006).

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993, quando Lee, Feinbaum e Ambros (1993) estudavam o desenvolvimento larval de um nematoide, com nome *Caenorhabditis elegans*. Eles observaram que o *lin-4* regulava negativamente o nível de expressão da proteína LIN-14, que aparece no primeiro estágio larval do *C. elegans*. O segundo miRNA descrito foi descoberto somente em 2000 quando pesquisadores observaram que o miRNA let-7 estaria relacionado com a transição entre as fases larval e adulta do *C. elegans* (REINHART et al., 2000).

Os miRNAs são geralmente transcritos por uma RNA polimerase II em um transcrito no formato de grampo (*hairpin*) denominado de pri-miRNA. Após ser processado pela RNase III Drosha este transcrito adquire um comprimento de aproximadamente 70-100 nucleotídeos (nt) e é chamado de pre-miRNA. O pre-miRNA é então transferido para o citoplasma através da Exportina 5 e no citoplasma é processado novamente, por uma RNase III Dicer, adquirindo o tamanho de aproximadamente 22 nt, ainda em fita dupla. A fita dupla é então separada por ação da Dicer e uma das fitas é incorporada em um complexo de silenciamento com proteínas Argonautas e poderá exercer a sua função como miRNA maduro. A outra fita é geralmente degradada, mas há evidências de que também pode exercer uma função (IORIO; CROCE, 2012). O miRNA maduro, tem a capacidade de regular a expressão gênica a nível pós-transcricional se ligando na porção 3' UTR de RNAs mensageiros (RNAm), denominados "alvo". Esta ligação acontece por complementaridade total ou parcial de bases nitrogenadas, levando à degradação ou inibição da tradução desse RNAm em proteína, respectivamente (BRODERICK; ZAMORE, 2011; HA; KIM, 2014; IORIO; CROCE, 2012; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

A nomenclatura dos miRNAs tem como principais características um prefixo, que se refere à espécie, como por exemplo hsa que se refere a *Homo sapiens*, e um sufixo numérico, que se refere à ordem em que esses miRNAs são descritos. Sequências precursoras de origens distintas no genoma, mas que expressam a mesma sequência de miRNA maduro é dado um outro sufixo numérico, além do que refere-se à ordem de descrição (por exemplo, dme-mir-6-1 e dme-mir-6-2), e quando as sequências maduras são semelhantes porém não idênticas, é adicionado um sufixo com letras (por exemplo, hsa-mir-196b e hsa-mir-196c). Quando a sequência é predominante (a fita que normalmente não é degradada) é adicionado o sufixo -5p (por exemplo, hsa-mir-140-5p) e quando a sequência é oposta à predominante (geralmente a fita degradada) adiciona-se o sufixo -3p ou um asterisco (por exemplo, hsa-mir-140-3p ou hsa-mir-53*) (GRIFFITHS-JONES et al., 2008).

1.1 MiRNAs e o câncer

A partir do conhecimento sobre a capacidade de regulação gênica dos miRNAs e sabendo que células tumorais se comportam diferentemente de células normais, pesquisadores iniciaram pesquisas visando encontrar perfis de expressão de miRNAs associados ao câncer, identificando, de fato, miRNAs diferencialmente expressos entre tumores e tecidos livres de tumor (GARZON; CALIN; CROCE, 2009; LU et al., 2005; VOLINIA et al., 2006). As alterações nos níveis de expressão de miRNAs em células tumorais podem estar associadas a diversos mecanismos, como mutação, amplificação, deleção e fatores epigenéticos (CALIN et al., 2002; GARZON; CALIN; CROCE, 2009).

Por volta de 2004 surgiram os primeiros trabalhos para identificar a contribuição de miRNAs específicos em câncer. Takamizawa et al. (2004), por exemplo, realizaram ensaios funcionais com o let-7 em pulmão, pois esse miRNA já havia sido identificado em diversos tecidos e o pulmão era o tecido onde havia maior expressão desse miRNA. Estes autores observaram que pacientes que passavam por ressecção deste tipo de tumor e apresentavam baixa expressão deste miRNA no tecido tumoral apresentavam pior prognóstico. Através de ensaios funcionais, onde super-expressaram o let-7 em linhagens celulares, observaram inibição do crescimento tumoral e associaram este efeito ao pior prognóstico de pacientes com baixa expressão de let-7. Em 2005, Hayashita et al. (2005), realizaram ensaios

funcionais com o cluster de miRNAs miR-17-92 também em câncer de pulmão. Eles observaram que com a super-expressão desse cluster havia aumento do crescimento do tumor de pulmão, um efeito, portanto, oposto ao efeito de let-7.

A expressão de determinados miRNAs em câncer pode indicar um papel semelhante aos conhecidos genes supressores de tumor, isso quando esses miRNAs tem como alvos genes que estão relacionados, por exemplo, com o aumento da proliferação, progressão e ativação do ciclo celular, uma vez que esses miRNAs vão regular negativamente esses genes controlando assim a proliferação exacerbada de uma célula (CALIN; CROCE, 2006; ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; HE et al., 2007). MiRNAs podem também se comportar como oncogenes, quando eles têm como alvos genes com funções de supressão tumoral, por exemplo, aumentando a proliferação celular (CALIN; CROCE, 2006; ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). A tabela 1 relaciona miRNAs e cita referências onde estes comportamentos foram estudados.

Tabela 1 – Estudos envolvendo a ação de miRNAs na regulação da proliferação celular.

miRNAs	Tipo de Câncer	Modulação	Efeito do miRNA	Referências
let-7c	Carcinoma hepatocelular	CDC25A, Ciclina D1, CDK6, pRb e E2F2	Supressor	Zhu et al., 2015
miR-9	Carcinoma oral	CXCR4	Supressor	Yu et al., 2014
miR-16	Câncer de mama	Ciclina D1 e BCL2	Supressor	Mobarra et al., 2015
miR-21	Câncer de estômago	PTEN	Oncogene	Zhang et al., 2012
miR-26a	Câncer de vesícula biliar	HMG2A	Supressor	Zhou et al., 2014
miR-26a	Carcinoma hepatocelular	Ciclina D2 e Ciclina E2	Supressor	Kota et al., 2009
miR-30a-3p	Carcinoma hepatocelular	Vimentina, E-caderina e MMP3	Supressor	Wang et al., 2014
miR-195	Glioblastoma	E2F3, CCND3 e p27	Supressor	Zhang et al., 2011
miR-203	Câncer de esôfago	E2F1	Supressor	Zhang et al., 2015
miR-206	Câncer colorretal	NOTCH3	Supressor	Wang et al., 2015
miR-211	Câncer de ovário	Ciclina D1 e CDK6	Supressor	Xia et al., 2015
miR-338-3p	Carcinoma hepatocelular	FOXP4	Supressor	Wang et al., 2015
miR-378-5p	Câncer colorretal	BRAF	Supressor	Wang et al., 2015
miR-429	Carcinoma renal	BMI1 e E2F3	Supressor	Qiu et al., 2015
miR-449a	Neuroblastoma	CDK6 and LEF1	Supressor	Zhao et al., 2015
miR-503	Câncer de endométrio	Ciclina D1	Supressor	Xu et al., 2013
miR-1228	Carcinoma hepatocelular	p53	Oncogene	Zhang et al., 2015
miR-1274a	Câncer de estômago	FOXO4, ciclina D1, MMP-2 e MMP-9	Oncogene	Wang et al., 2015

Nestes estudos a ação dos miRNAs como supressores tumorais ou como oncogenes foi mensurada de acordo com seu efeito em aumentar ou diminuir a proliferação celular após ensaios de super-expressão desses miRNAs em células derivadas de câncer.

1.2 Ciclo celular, miRNA e câncer

O câncer é uma patologia que possui entre as suas principais características moleculares a desregulação da progressão do ciclo celular (LIANG; HE, 2011). A Figura 1 apresenta, de forma resumida, as principais fases do ciclo celular e seus mecanismos de regulação. Em condições normais, para uma célula sair da fase G₀, ou quiescência, e entrar na fase G₁ do ciclo celular, dando início à sua proliferação, ela obrigatoriamente necessita do estímulo de fatores mitogênicos (ORFORD; SCADDEN, 2008; SHERR; ROBERTS, 1999). Fatores mitogênicos são moléculas, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que se ligam a receptores na membrana de células alvo. Estes receptores possuem domínios para tirosina quinases e desencadeiam uma cascata de fosforilação sendo o resultado disso a expressão de genes de resposta imediata que são essenciais para ativação do ciclo celular (RODRIGUES; GRIFFITH; WELLS, 2010).

Os genes de resposta imediata como c-myc, c-fos, c-jun são essenciais na ativação do ciclo celular, ativando, por exemplo, a Ciclina D (BOUCHARD et al., 1999). Quando a Ciclina D é ativada, ela se liga e forma complexos com as Ciclinas Dependentes de Quinases, CDK4 e CDK6, que começam a fosforilar proteínas Retinoblastoma (pRB) que reprimem, em células quiescentes, os fatores de transcrição ativadores do ciclo celular da família E2F (E2F1, E2F2 e E2F3) (LIANG; HE, 2011; SHERR; ROBERTS, 1999). Esses fatores de transcrição são reprimidos preferencialmente por pRB e não por outras proteínas do tipo Retinoblastoma (p107 e p130), como os fatores de transcrição da família E2F que são repressores do ciclo celular (E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 e E2F8) (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013).

Assim, os complexos de Ciclinas D com CDK4 e CDK6 liberam E2F 1, 2 e 3, através da fosforilação de pRB e genes essenciais para a progressão do ciclo celular envolvidos com a síntese de DNA como di-hidrofolato redutase, timidina quinase e DNA polimerase alfa, começam a ser transcritos. E2F também é encontrado nos

promotores de proto-oncogenes como c-myc, N-myc, Ciclina D1, e também em promotores de genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular, como Ciclina E e Ciclina A (DEGREGORI; KOWALIK; NEVINS, 1995). Portanto, quando certo nível de fosforilação de pRB é atingido, os fatores de transcrição E2F permitem a síntese de genes efetores do ciclo celular, quando isso não ocorre, pode haver parada do ciclo ao invés de sua progressão (HAHM; SINGH, 2007).

A presença dos fatores mitogênicos ativando as Ciclinas D para formarem complexos com as CDK4/6 e assim fosforilando pRB para a liberação de E2F1, 2 e 3 é necessária até que os fatores de transcrição E2F passem a ativar as Ciclinas E que em complexos com CDK2 terminaram de fosforilar pRB, a partir desse momento não é mais necessária a ativação de fatores mitogênicos para a progressão do ciclo celular (BLAGOSKLONNY; PARDEE, 2002; ORFORD; SCADDEN, 2008). A Ciclina E em complexo com CDK2 é importante para a esta completa fosforilação de pRB. No final da fase G1, p27 é sequestrado pelo complexo Ciclina D2 com CDK4 e facilita a passagem pelo primeiro *checkpoint*, na transição de fase G1-S, se o nível de fosforilação for alto o suficiente para prosseguir com o ciclo celular (BOUCHARD et al., 1999).

Os níveis de Ciclina B aumentam durante a fase G2 do ciclo celular e isso permite o acúmulo do complexo Ciclina B – CDK1, importante para a separação dos centríolos (KRÄMER et al., 2004). Após a divisão celular, a célula pode entrar em estado de quiescência ou iniciar o ciclo celular novamente, se houver algum tipo de estímulo por fatores mitogênicos ou se houver alguma mutação em genes que desencadeiem uma cascata de sinalização para que a célula entre novamente no ciclo (ORFORD; SCADDEN, 2008).

É importante ressaltar que o correto funcionamento do ciclo celular é a todo o momento monitorado, e em especial nos chamados *checkpoints*. Existem 3 famílias de proteínas inibitórias que regulam negativamente as CDKs por inibir a formação de complexos com as ciclinas. Uma delas é a família INK, que é composta por p15, p16, p18 e p19. Elas modulam principalmente a transição de fase G1-S, tendo como alvo CDK4 e CDK6. Outra família é a Cip/Kip que tem três membros, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, que regulam negativamente os complexos CDK2/Ciclina A e CDK2/Ciclina E, mas regulam positivamente os complexos CDK4/6 com Ciclina D. E por fim a família de pRB que tem como membros a p107 e p130. Essas proteínas inibem

fatores de transcrição e inibem também o complexo Ciclina A/E com CDK2 (ORFORD; SCADDEN, 2008).

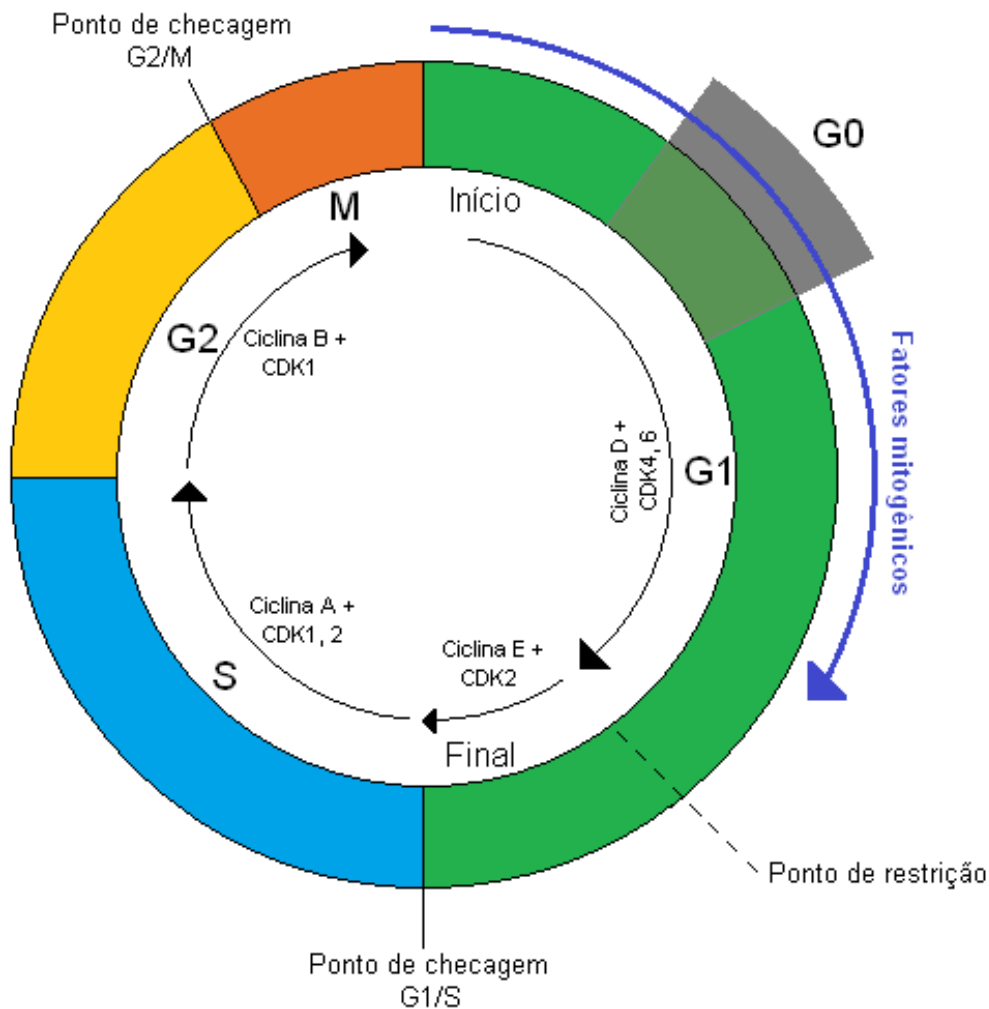


Figura 1. Esquema do ciclo celular. Durante a fase G1 do ciclo celular a célula responde a estímulos por fatores mitogênicos, podendo sair da quiescência (G0). Essa resposta é uma consequência da ativação das Ciclinas e CDKs. Após o ponto de restrição o ciclo celular segue sem necessidade da presença dos fatores mitogênicos. Após o ponto de checagem na transição de fase G1/S, a célula começa a síntese de DNA em resposta aos genes ativados pelas Ciclinas na fase G1 tardia e S. Após a fase S a célula é preparada para a divisão pelos genes ativados pelos complexos de Ciclinas/CDKs da fase G2. A Mitose consiste na divisão celular propriamente dita e então as novas células voltam à fase G1 ou se não receberem estímulo de fatores mitogênicos, permanecem em G0.

Os miRNAs, por participarem da regulação gênica, são também estudados como reguladores do ciclo celular e já se sabe que modulam a expressão de genes essenciais como ciclinas, CDKs, proteínas Rb e fatores de transcrição da família E2F (LIANG; HE, 2011), conforme indicado na Figura 2. Como exemplo de miRNAs modulando o ciclo celular, He et al. (2007), viram que o miR-34 tem um papel de

supressor tumoral por induzir a parada de ciclo celular em células tumorais. Este miRNA tem como alvos genes relacionados com a progressão do ciclo celular, como CDK4, CCNE2 e MET (HE et al., 2007). O trabalho de Liu et al. (2008) mostra que o miR-16 pode induzir a parada do ciclo celular por ter como alvo a Ciclina D1. Outros genes parecem ser desregulados por outros membros da família de miR-16, como Ciclina D3, Ciclina E1 e CDK6. No trabalho de Ivanovska et al. (2008), os autores mostram que a família do miRNA-106b está super-expressa em diversos tipos de tumor. Promovendo a super-expressão desse miRNA eles observaram progressão no ciclo celular e, por fim, verificaram que o miRNA-106 modulava o ciclo celular por ter como alvo CDKN1A/ p21.

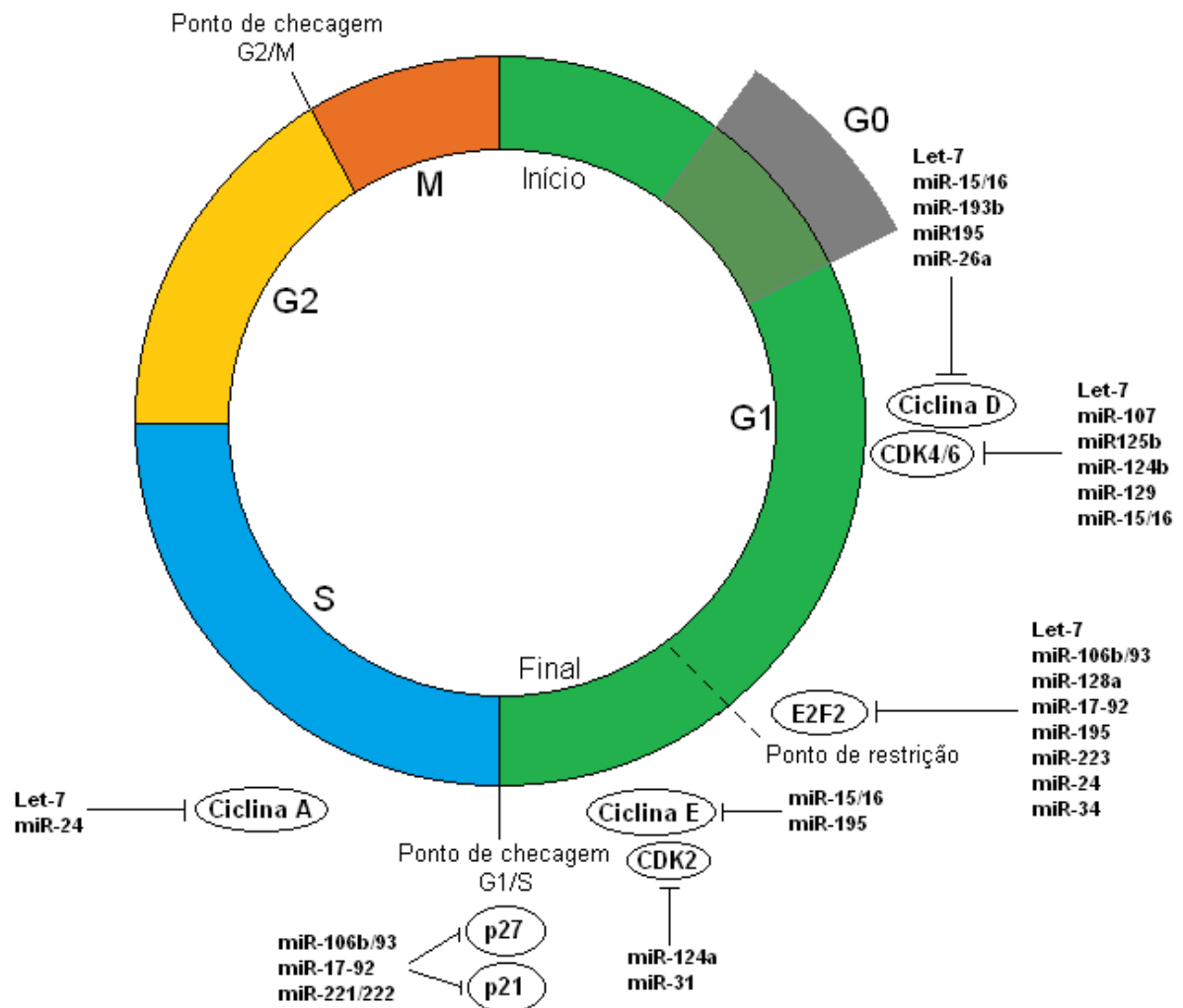


Figura 2. MiRNAs interferindo no ciclo celular. Os miRNAs podem ter como alvos genes importantes na regulação do ciclo celular de forma que se a expressão do miRNA é desregulada, isso pode trazer algum impacto na progressão do ciclo celular.

1.3 MiRNA e o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço

O número de casos de carcinoma de cabeça e pescoço em 2012 foi de aproximadamente 510 mil no mundo, incluindo homens e mulheres de todas as idades, com aproximadamente 280 mil mortes (FERLAY et al., 2015). No Brasil, em 2014, foram de aproximadamente 22 mil casos, considerando apenas os casos de cavidade oral e laringe (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014). A estimativa mundial de novos casos para 2015 é de aproximadamente 550 mil casos e 300 mil mortes, no Brasil, a estimativa de novos casos é de aproximadamente 20 mil e 12 mil mortes (FERLAY et al., 2015). Sabe-se que mais de 95% dos tumores de cabeça e pescoço é do tipo carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011).

Apesar dos avanços nos tratamentos de CECP, sobrevida global em 5 anos é uma das mais baixas entre os principais tipos de câncer, sendo que mais de 50% dos novos casos não atingem a cura e 10% desenvolvem metástases em órgãos distantes (BABA et al., 2012). O tabaco e álcool são os principais fatores de risco para o CECP (FARSHADPOUR et al., 2011; HASHIBE et al., 2009), levando a diversas mutações dentre as quais as associadas aos genes EGFR-MEK, NOTCH, PI3K, PTEN, AKT (SUH et al., 2014), HRAS, TP53 e CDKN2A (TAN; MYERS; AGRAWAL, 2013). Estas mutações são capazes de alterar a regulação do ciclo celular, promovendo o aumento de proliferação celular (SUH et al., 2014; TAN; MYERS; AGRAWAL, 2013).

Além de mutações existem estudos evidenciando a relação de miRNAs com carcinogênese de CECP (MIN et al., 2015; SETHI et al., 2014). Alguns trabalhos demonstram miRNAs agindo como supressores tumorais ou como oncogenes em CECP. No trabalho de Nohata et al. (2011), por exemplo, eles relatam a ação de supressor tumoral do miR-375 em CECP através da regulação do oncogene AEG-1/MTDH. Já no trabalho de Liu et al. (2009) o efeito de supressão tumoral é realizada pelo miR-138 que diminui a invasão e aumenta a apoptose celular. No artigo de Kinoshita et al. (2012) o miR-218 inibe a migração e a invasão, mostrando seu efeito como supressor tumoral. No trabalho de Zhang et al. (2013), o miR-135b age como oncogene pois aumenta a proliferação, migração celular através da ativação de HIF-1 α em um modelo de CECP (ZHANG et al., 2013).

1.4 MiR-196a e CECP

Um estudo publicado por nosso grupo em 2013 analisou o perfil de expressão de miRNAs em amostras de CECP e em margem livre de tumor (SEVERINO et al., 2013). Constatou-se desregulação de uma série de miRNAs, dentre eles, destacou-se o miR-196a, aproximadamente 8 vezes mais expresso no tumor epidermóide oral quando comparado ao tecido adjacente livre de tumor. Demonstramos ainda que a expressão basal do miRNA-196 era mais elevada em linhagens celulares de CECP quando comparada à expressão em queratinócitos orais de cultura primária (ANDREGHETTO et al., 2011). Verificamos que a indução da expressão do miR-196a em queratinócitos orais normais fez reduzir a proliferação celular após 72h de cultivo celular e em ensaios para avaliar os níveis de expressão gênica global destas células observou-se diferença em alguns genes relacionados funcionalmente à progressão do ciclo celular, mas não foi possível concluir de qual forma o miR-196a poderia regular a progressão do ciclo em CECP.

Em 2009, Kim et al. (2009), já haviam observado um efeito semelhante na proliferação ao super-expressarem o miR-196a em células mesenquimais derivadas de tecido adiposo, porém, não avaliaram a expressão gênica ou proteínas relacionadas ao ciclo celular. Em contrapartida, após a super-expressão do miR-196a em células de carcinoma de útero, Hou et al. (2014) observaram menor expressão de genes e proteínas relacionadas ao ciclo celular como p27, Ciclina D1 e p21 e conseqüentemente maior proliferação celular, assim como Sun et al. (2012) que já haviam observado o mesmo resultado em células de carcinoma de estômago.

Na literatura há poucos trabalhos sobre a relação do miR-196a e o CECP. Além dos dois trabalhos do nosso grupo descritos acima, há o trabalho de Suh et al. (2014) no qual relatam que a super-expressão do miR-196, diminui a expressão do gene que codifica a Anexina A1, aumentando proliferação, migração, invasão e também induzindo a transição epitélio-mesênquima. Christensen et al. (2010) identificaram um polimorfismo na sequência no miR-196a que parece estar associado ao risco de desenvolvimento e ao prognóstico de CECP. Além desses trabalhos também há o de Darda et al. (2015), que relatam que o miR-196a exerce um fenótipo pró-tumorigênico em células derivadas de CECP.

Foram encontrados três genes que codificam miR-196 em vertebrados. O gene que codifica miR-196a-1 está localizado no cromossomo 17 (17q21), o miR-

196a-2, no cromossomo 12 (12q13) (CALIN et al., 2004) e o miR-196b, no cromossomo 4 (7q15) em humanos (POPOVIC et al., 2009). MiRNA-196a-1 e miRNA-196a-2 tem a mesma sequência funcional (UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG), já a sequência funcional do miRNA-196b difere dos outros dois por apenas um nucleotídeo (UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG) (CHEN et al., 2011; KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014).

O miR-196a tem como alvos validados genes como HOXB8, HOXC8, HOXD8, HOXA7, HOXB7, ERG, HMGA2, ANXA1, S100A9, SPRR2C, KRTS, como mostra a revisão de Chen et al. (2011), MAMDC2 (DARDA et al., 2015), e inclusive CDKN1B (p27), gene relacionado ao ciclo celular (SUN et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi compreender melhor o papel do miR-196a na regulação do ciclo celular através da análise da expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular em séries temporais utilizando linhagens derivadas de CECP super-expressando o miRNA-196. Uma vez que o miR-196a encontra-se mais expresso em CECP quando comparados a tecidos livres de tumor, o modelo ideal para um estudo do seu papel utilizando ensaios de super-expressão, seria utilizar queratinócitos orais normais, como publicado por nosso grupo. Entretanto, tanto a super-expressão de miR-196a em queratinócitos orais normais (SEVERINO et al., 2013) quanto em células derivadas de CECP (ANDREGHETTO, 2011), levaram à diminuição da proliferação no período de 72 horas. Desse modo, optamos por utilizar linhagens celulares derivadas de CECP para este estudo uma vez que este modelo permite avaliar a influência de diferentes mutações características do tumor sobre o efeito do miRNA.

Duas técnicas para a super-expressão do miRNA foram avaliadas: a transdução por vetor lentiviral e a transfecção por oligonucleotídeos. A vantagem da transdução é promover uma super-expressão estável do gene através da sua inserção no genoma, permitindo a seleção de clones estáveis para estudos funcionais. Em estudos anteriores utilizamos a transfecção para a super-expressão de miRNAs com sucesso e observamos a super-expressão do miR-196a até 72 h (SEVERINO et al., 2013). Apesar de não ser possível a obtenção dos clones estáveis para estudos posteriores através desta técnica, o tempo de super-expressão é suficiente para a análise das séries temporais.

6 CONCLUSÃO

1 – Utilizamos com sucesso a privação de SFB por 48 horas como método para a sincronização do ciclo celular das linhagens derivadas de CECF e avaliamos a dinâmica de crescimento após a privação de SFB. Observamos que a linhagem SCC25 foi a que melhor respondeu tanto à sincronização do ciclo celular como à introdução do soro para reestabelecimento do crescimento.

2 – Padronizamos os experimentos de transdução e transfecção para super-expressão do miRNA 196a. A parada da proliferação das células transduzidas com miR-196 foi inesperada e portanto optamos por utilizar a transfecção como método para este estudo.

3 – Avaliamos o efeito do miR-196a sobre a expressão de genes e proteínas relacionados com o ciclo celular. Ao realizarmos a super-expressão do miR-196a na linhagem SCC-25, conseguimos observar uma desregulação da expressão de genes ativadores e de genes repressores do ciclo celular. Além disso, também notamos que a maior expressão do miR-196a diminuiu os níveis da proteína p27, repressora do ciclo celular, mas não houve interferência na porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo em relação ao controle.

Concluimos que o aumento de expressão de genes que estão relacionados à repressão do ciclo celular, principalmente no período de 48 horas após o aumento da expressão do miR-196a, foi provavelmente o suficiente para diminuir a proliferação celular no período de 72 horas após sua super-expressão, resultado encontrado em trabalho anterior. Desse modo, acreditamos que o miR-196a poderia ser usado como alvo de terapia, uma vez que reduziu a proliferação em células tumorais, mesmo já estando mais expresso nessas células.

REFERÊNCIAS¹

ANDREGHETTO, F. M. **Estudo funcional de miRNAs associados ao carcinoma epidermoide em cultura de células orais**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ANDREGHETTO, F. M. et al. Evaluation of microRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. **Einstein**, v. 9, p. 442-448, 2011.

ALCORTA, D. A. et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 24, p. 13742-13747, 1996.

BABA, Y. et al. Present and future of EGFR Inhibitors for head and neck squamous cell cancer. **J. Oncol.**, v. 2012, p. 986725, 2012.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 8, p. 518-528, 2013.

BLAGOSKLONNY, M. V.; PARDEE, A. B. The restriction point of the cell cycle. **Cell Cycle**, v. 1, n. 2, p. 103-110, 2002.

BOUCHARD, C. et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. **EMBO J.**, v. 18, n. 19, p. 5321-5333, 1999.

BRODERICK, J. A.; ZAMORE, P. D. MicroRNA therapeutics. **Gene Ther.**, v. 18, n. 12, p. 1104-1110, 2011.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev. Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857-866, 2006.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, 2004.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009.

CHEN, C. et al. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. **J. Cell Mol. Med.**, v. 15, n. 1, p. 14-23, 2011.

CHRISTENSEN, B. C. et al. Mature microRNA sequence polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 14, p. 3713-3720, 2010.

DARDA, L. et al. The role of HOXB9 and miR-196a in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122285, 2015.

DAVIS, P. K.; HO, A.; DOWDY, S. F. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. **Biotechniques**, v. 30, n. 6, p. 1322-1326, 1328, 1330-1, 2001.

DEGREGORI, J.; KOWALIK, T.; NEVINS, J. R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 8, p. 4215-4224, 1995.

DUAN, Z. et al. Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. **J. Orthop. Res.**, v. 28, n. 6, p. 746-752, 2010.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-269, 2006.

FARSHADPOUR, F. et al. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: influence of smoking and drinking. **Head Neck**, v. 33, n. 6, p. 817-823, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

GARZON, R.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs in Cancer. **Annu. Rev. Med.**, v. 60, p. 167-179, 2009.

GIRARD, F. et al. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1169-1179, 1991.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. Database issue, p. D154-158, 2008.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 8, p. 509-524, 2014.

HAHM, E. R.; SINGH, S. V. Honokiol causes G0-G1 phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells in association with suppression of retinoblastoma protein level/phosphorylation and inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Mol. Cancer Ther.**, v. 6, n. 10, p. 2686-2695, 2007.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 18, n. 2, p. 541-550, 2009.

HAYASHITA, Y. et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. **Cancer Res.**, v. 65, n. 21, p. 9628-9632, 2005.

HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1130-1134, 2007.

HOU, T. et al. MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1. **Br. J. Cancer**, v. 110, n. 5, p. 1260-1268, 2014.

HUANG, F. et al. MiR-196a promotes pancreatic cancer progression by targeting nuclear factor kappa-B-inhibitor alpha. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87897, 2014.

HUANG, Y.; SRAMKOSKI, R. M.; JACOBBERGER, J. W. The kinetics of G2 and M transitions regulated by B cyclins. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e80861, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/>>. Acesso em: 28 out. 2015.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Mol. Med.**, v. 4, n. 3, p. 143-159, 2012.

IVANOVSKA, I. et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. **Mol. Cell Biol.**, v. 28, n. 7, p. 2167-2174, 2008.

KIM, Y. J. et al. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **J. Bone Miner. Res.**, v. 24, n. 5, p. 816-825, 2009.

KINOSHITA, T. et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget.**, v. 3, n. 11, p. 1386-1400, 2012.

KOTA, J. et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1005-1017, 2009.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, 2014.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat. Rev. Genet.**, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010.

KRÄMER, A. et al. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of

cyclin-B-Cdk1 kinase. **Nat. Cell Biol.**, v. 6, n. 9, p. 884-891, 2004.

LEE, J. K. et al. Inactivation patterns of p16/INK4A in oral squamous cell carcinomas. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n. 2, p. 165-171, 2004.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LEONTIEVA, O. V.; BLAGOSKLONNY, M. V. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. **Cell Cycle**, v. 12, n. 18, p. 3063-3069, 2013.

LIANG, L. H.; HE, X. H. Macro-management of microRNAs in cell cycle progression of tumor cells and its implications in anti-cancer therapy. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 32, n. 11, p. 1311-1320, 2011.

LITOVCHICK, L. et al. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. **Mol. Cell**, v. 26, n. 4, p. 539-551, 2007.

LIU, Q. et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. 16, p. 5391-5404, 2008.

LIU, X. et al. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **Cancer Lett.**, v. 286, n. 2, p. 217-222, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

MARTIN, D. et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 8906-8923, 2014.

MIN, A. et al. MicroRNAs as important players and biomarkers in oral carcinogenesis. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 186904, 2015.

MOBARRA, N. et al. Overexpression of microRNA-16 declines cellular growth, proliferation and induces apoptosis in human breast cancer cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 51, n. 6, p. 604-611, 2015.

NICHOLS, A. C. et al. Exploiting high-throughput cell line drug screening studies to

identify candidate therapeutic agents in head and neck cancer. **BMC Pharmacol. Toxicol.**, v. 15, p. 66, 2014.

NOHATA, N. et al. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **J. Hum. Genet.**, v. 56, n. 8, p. 595-601, 2011.

OBATA, A. et al. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Int. J. Cancer**, v. 89, n. 2, p. 187-193, 2000.

ORFORD, K. W.; SCADDEN, D. T. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, n. 2, p. 115-128, 2008.

PEPPER, S. D. et al. The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 273, 2007.

POPOVIC, R. et al. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. **Blood**, v. 113, n. 14, p. 3314-3322, 2009.

QIAGEN. RT² Profiler PCR Arrays. Disponível em: <<http://qiagen.com/>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

QIU, M. et al. MicroRNA-429 suppresses cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by direct targeting of BMI1 and E2F3 in renal cell carcinoma. **Urol. Oncol.**, v. 33, n. 7, p. 332.e9-18, 2015.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-906, 2000.

RODRIGUES, M.; GRIFFITH, L. G.; WELLS, A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 1, n. 4, p. 32, 2010.

SAITO, K. et al. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71480, 2013.

SARFRAZ, S. et al. Modulations of cell cycle checkpoints during HCV associated disease. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, p. 125, 2009.

SCHIMANSKI, C. C. et al. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 17, p. 2089-2096, 2009.

SCHWANHÄUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337-342, 2011.

SETHI, N. et al. MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research. **Eur. J. Cancer**, v. 50, n. 15, p. 2619-2635, 2014.

SEVERINO, P. et al. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in

cell proliferation. **BMC Cancer**, v. 13, p. 533, 2013.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, v. 13, n. 12, p. 1501-1512, 1999.

SIPORT™ *NEOFX*™ TRANSFECTION AGENT. Invitrogen. Disponível em: <<http://thermofischer.com/>>. Acesso em: 01 set. 2015.

SUH, Y. et al. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. **Cell Death Dis.**, v. 5, p. e1018, 2014.

SUH, Y. E. et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. **Int. J. Cancer**, v. 137, n. 5, p. 1021-1034, 2014.

SUN, M. et al. MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1). **Mol. Cancer Ther.**, v. 11, n. 4, p. 842-852, 2012.

TAKAMIZAWA, J. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Res.**, v. 64, n. 11, p. 3753-3756, 2004.

TAN, M.; MYERS, J. N.; AGRAWAL, N. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma genomics. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 46, n. 4, p. 545-566, 2013.

VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.

WANG, G. et al. MicroRNA-338-3p inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by target forkhead box P4 (FOXP4). **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 1, p. 337-344, 2015.

WANG, G. J. et al. The role of microRNA-1274a in the tumorigenesis of gastric cancer: accelerating cancer cell proliferation and migration via directly targeting FOXO4. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 459, n. 4, p. 629-635, 2015.

WANG, W. et al. MicroRNA-30a-3p inhibits tumor proliferation, invasiveness and metastasis and is downregulated in hepatocellular carcinoma. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 40, n. 11, p. 1586-1594, 2014.

WANG, X. W. et al. MicroRNA-206 attenuates tumor proliferation and migration involving the downregulation of NOTCH3 in colorectal cancer. **Oncol. Rep.**, v. 33, n. 3, p. 1402-1410, 2015.

WANG, Z. et al. MicroRNA-378-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting BRAF. **Cancer Cell Int.**, v. 15, p. 40, 2015.

XIA, B. et al. miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-

cycle progression by targeting Cyclin D1 and CDK6. **Mol. Cancer**, v. 14, p. 57, 2015.

XU, Y. Y. et al. MicroRNA-503 suppresses proliferation and cell-cycle progression of endometrioid endometrial cancer by negatively regulating cyclin D1. **FEBS J.**, v. 280, n. 16, p. 3768-3779, 2013.

YOSHIZAWA-SUGATA, N.; MASAI, H. Cell cycle synchronization and flow cytometry analysis of mammalian cells. **Methods Mol. Biol.**, v. 1170, p. 279-293, 2014.

YU, T. et al. MicroRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncogene**, v. 33, n. 42, p. 5017-5027, 2014.

ZHANG, B. G. et al. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. **Oncol. Rep.**, v. 27, n. 4, p. 1019-1026, 2012.

ZHANG, K. et al. miR-203 is a direct transcriptional target of E2F1 and causes G1 arrest in esophageal cancer cells. **J. Cell Physiol.**, v. 230, n. 4, p. 903-910, 2015.

ZHANG, L. et al. MicroRNA-135b acts as a tumor promoter by targeting the hypoxia-inducible factor pathway in genetically defined mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 331, n. 2, p. 230-238, 2013.

ZHANG, Q. Q. et al. MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion. **Neuro. Oncol.**, v. 14, n. 3, p. 278-287, 2012.

ZHANG, Y. et al. miR-1228 promotes the proliferation and metastasis of hepatoma cells through a p53 forward feedback loop. **Br. J. Cancer**, v. 112, n. 2, p. 365-374, 2015.

ZHAO, Z. et al. microRNA-449a functions as a tumor suppressor in neuroblastoma through inducing cell differentiation and cell cycle arrest. **RNA Biol.**, v. 12, n. 5, p. 538-554, 2015.

ZHOU, H. et al. MicroRNA-26a acts as a tumor suppressor inhibiting gallbladder cancer cell proliferation by directly targeting HMGA2. **Int. J. Oncol.**, v. 44, n. 6, p. 2050-2058, 2014.

ZHU, X. et al. MicroRNA let-7c inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting cdc25a in human hepatocellular carcinoma. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124266, 2015.