



FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA DE MOSSORÓ
CAMPUS MOSSORÓ – RIO GRANDE DO NORTE
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

DAVI LINCON DE SOUZA MENDONÇA

MICRORNA 200C COMO POTENCIAL MARCADOR METASTÁTICO: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA

MOSSORÓ – RN

2020

DAVI LINCON DE SOUZA MENDOÇA

**MICRORNA 200C COMO POTENCIAL MARCADOR METASTÁTICO: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina da
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança.

Orientador: Prof. *Dr.* Rosueti Diógenes de
Oliveira Filho

MOSSORÓ - RN

2020

Faculdade Nova Esperança de Mossoró/RN – FACENE/RN.
Catalogação da Publicação na Fonte. FACENE/RN – Biblioteca Sant'Ana.

M539m Mendonça, Davi Lincon de Souza.
MicroRNA 200c como potencial marcador metastático:
uma revisão sistemática / Davi Lincon de Souza Mendonça.
– Mossoró, 2020.
31 f.

Orientador: Prof. Dr. Rosueti Diógenes de Oliveira
Filho.

Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade
Nova Esperança de Mossoró.

1. Câncer. 2. Metástase. 3. MicroRNA. 200c. 4.
Marcador molecular. I. Oliveira Filho, Rosueti Diógenes de. II.
Título.

CDU 616-006.6

DAVI LINCON DE SOUZA MENDOÇA

**MICRORNA 200C COMO POTENCIAL MARCADOR METASTÁTICO: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA**


Projeto apresentado pelo discente Davi Lincon de Souza Mendonça, do curso de Bacharelado em Biomedicina, que obteve conceito _____ conforme a apreciação da Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Aprovado em: ____/____/____.

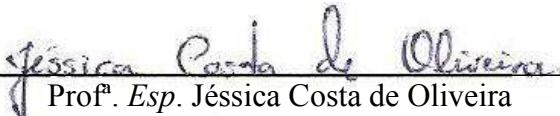
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rosuete Diógenes de Oliveira Filho
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (Facene/RN)
Orientador



Prof. Esp. Dassayev Anderson de Oliveira Lopes
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (Facene/RN)
Membro I



Prof.^a Esp. Jéssica Costa de Oliveira
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (Facene/RN)
Membro II

MOSSORÓ - RN

2020

AGRADECIMENTOS

Não há palavras para que eu possa expressar a eterna gratidão aos meus vinhos e à toda minha família, incluindo Thor “zezinho”, Morceguinho “nego”, Lola “gata safada” e Alvin “Geraldinho”, por todo o aporte necessário para que eu tornasse um ser que habita esta constelação de ideias e sentimentos.

Ademais, sou grato aos meus amigos, em especial à Ana Júlia Gomes, José Nyedson Gois e Manuel Amâncio Neto, os quais me acompanham em uma relação mútua de companheirismo em quaisquer horas e circunstâncias. Que nossa relação se perpetue ao longo da nossa existência.

Agradeço ainda a todos os meus professores, que me ensinaram como tornar-me um ser pensante, sobretudo ao meu orientador, Dr. Rosueti Diógenes, pela atenção e compreensão; à Esp. Jéssica Costa, que me orientou, idealizou e contribuiu com a elaboração do projeto que alicerçou esta pesquisa; e ao Esp. Dassayev Anderson, por trazer contribuições e ideias para desenvolvê-la.

Não obstante, agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente, do meu pequeno trajeto nessa imensidão que é a vida. Obrigado a todos os seres que se foram e que partiram, vocês estão imortalizados em minha memória.

RESUMO

O câncer é uma das maiores causas de mortes em pacientes antes dos 70 anos, no qual um dos avanços dessa enfermidade é a metástase. Assim, viu-se a necessidade de se rastrear mecanismos moleculares que possam identificar o início deste processo. A desregulação da expressão do microRNA está relacionado a diversas patologias, incluindo o câncer, no qual foi verificado que um microRNA específico da família 200s, está envolvida na regulação da metástase. Assim, foi estudado o microRNA 200c (mir-200c), no qual foram encontradas várias relações moleculares com a metástase. O presente estudo teve como finalidade a pesquisa bibliográfica com análise qualitativa por meio de uma revisão sistemática. Foram utilizados os bancos de dados PubMed, MEDLINE e Science Direct, na investigação do microRNA 200c como um potencial marcador molecular. Na fase de triagem foram selecionados 72 artigos, no qual foram excluídos 18 duplicados e na fase de elegibilidade foram excluídos 40 artigos, sobrando assim, 14 artigos para a discussão, tratando-se de estudos *in vitro* (3), *in vivo* (5) e *ex vivo* (6). Após a extração dos dados, foi realizada a relação da concentração do miR-200c com diferentes tipos e estágios tumorais. Dessa forma, observou-se que as concentrações de microRNA estavam reguladas para baixo em tumores metastáticos de último estágio. Concluiu-se que o mir-200c tem uma grande relevância nos tumores metastáticos, mas não seria o único, necessitando de mais pesquisas de cunho clínico para se chegar em uma melhor especificidade como um marcador molecular.

Palavras-Chaves: Câncer, Metástase, MicroRNA 200c, Marcador molecular.

ABSTRACT

Cancer is a major cause of death in patients before the age of 70, in which one of the advances of this disease is metastasis. Thus, there was a need to trace molecular mechanisms that can identify the beginning of this process. The deregulation of microRNA expression is related to several pathologies, including cancer, in which it was found that a specific microRNA from the 200s family is involved in the regulation of metastasis. Thus, microRNA 200c (mir-200c) was studied in which several molecular relationships with metastasis were found. The present study was aimed at bibliographic research with qualitative analysis through a systematic review. The PubMed, MEDLINE and Science Direct databases were used in the investigation of microRNA 200c as a potential molecular marker. In the screening phase, 72 articles were selected, in which 18 duplicates were excluded and in the eligibility phase 40 articles were excluded, thus leaving 14 articles for discussion, dealing with *in vitro* (3), *in vivo* (5) and *ex vivo* (6) studies. After data extraction, the concentration of miR-200c was compared with different tumor types and stages. Thus, it was observed that the microRNA concentrations were down-regulated in last stage metastatic tumors. It is concluded that mir-200c has a great relevance in metastatic tumors, but it would not be the only one, needing more clinical research to arrive at a better specificity as a molecular marker.

Keywords: Cancer, Metastasis, MicroRNA 200c, Molecular marker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do resultado da busca, seleção e inclusão dos estudos.....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos artigos incluídos na revisão sistemática sobre os estudos do miR-200c nas neoplasias.....	21
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AGO 2	Proteína argonauta-2
DANT	Doenças e Agravos Não Transmissíveis
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MiR	MicroRNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
SNAIL1	Zinc finger protein
SWI	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TWIST	Twist-related protein 1
XPO5	57510 Exportin-5
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox
RISC	RNA-induced silencing complex

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 INCIDÊNCIA DAS NEOPLASIAS.....	14
3.1 CARACTERÍSTICAS DAS NEOPLASIAS.....	14
3.2 CARACTERÍSTICAS DA METÁSTASE.....	15
3.4 OS MICRORNAS.....	17
3.4.1 MicroRNAs da família 200s	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 PESQUISA SISTEMÁTICA DE LITERATURA	18
4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA DE ARTIGOS.	18
4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ESTUDOS	18
4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

No Brasil e no mundo, o câncer é uma das principais problemáticas na saúde pública, pois sua incidência e taxa de mortalidade é de alta relevância. Assim, foi estimado que entre 2020 e 2022, o câncer no Brasil irá chegar à marca de 625 milhões de casos. Com isso, mostra-se a importância da pesquisa e avanços na tecnologia para combater e rastrear essa doença que possui mais de 100 tipos diferentes (INCA, 2019).

Os novos estudos sobre oncogênese mostraram que o câncer surge de mutações ou variações genéticas. Essas alterações podem ser causadas por desestabilização do DNA, erros no processo de biossíntese do DNA e RNA, mutações genéticas que causam diferenciações fisiológicas e morfológicas, polimorfismos genéticos, ação externa, como desestabilização do gene ou cadeia das bases nitrogenadas, devido ao manejo de produtos químicos e radioativos que produzem íons e também infecções virais que podem modificar a estrutura dessas moléculas, já que são multiplicadores intracelulares. Para que haja um tipo de carcinoma é necessário que aconteça pelo menos 4 mutações específicas, pois existem vários reguladores que impede a síntese, multiplicação e proliferação (ONUUCHI; CHAMMAS, 2010).

Sendo assim, um dos estágios mais cruciais do câncer é a metástase, caracterizada no momento em que as células cancerígenas deixam de ter características epiteliais do tecido para ter características mesenquimais. Com isso, permite a maior permeabilidade dessas células para outros tecidos próximos. Uma das características do EMT (epithelial-mesenchymal transition) é a perda de expressão da proteína caderina epitelial E, uma glicoproteína Ca^{2+} transmembranar que é responsável pela manutenção da polaridade celular, mediando a adesão célula-célula e substrato-célula. Desse modo, torna-se mais invasivo, devido a produção de proteases que são capazes de permear a membrana basal subjacente e migrar (SAVAGNER, 2001; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007). Como parte dessa transição de células cancerígenas epiteliais para mesenquimais, essas células produzem vários fatores de transcrição, sendo um desses fatores os microRNAs. Já foi constatado que em determinados tipos de carcinoma metastáticos as expressões de microRNAs são desreguladas positivamente ou negativamente, dependendo do tipo de microRNA, do local e estágio do carcinoma (PENCHAVA; TAVAZOIE, 2013).

Os microRNAs são formas do RNA não codificantes que tem pequenas cadeias de bases nitrogenadas com cerca de 19 a 25 nucleotídeos. Até o momento, são catalogados pela miRBASE sequências de microRNAs de 271 organismos, 38.589 precursores em grampos e

48.860 sequências maduras de microRNAs. Essas pequenas cadeias de RNA têm como função a regulação pós-traducional do RNA mensageiro (RNAm) e estão implicadas em toda as etapas da vida celular como: proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional. Esses microRNAs se ligam ao fragmento 3' não codificado pelo RNAm, por consequência tendo seu efeito regulatório ao se ligar com RNAm impedindo a transcrição da proteína. Assim, apresentam importância como biomarcadores, já que estão em todo o ciclo normal e anormal de celularidade (JÚLIO; FILHO; KIMURA, 2006; SANDORVAL, 2011; KOZOMARA; BIRGAOANU; JONES, 2019).

A expressão de microRNAs pode estar desregulada em várias patologias, inclusive no câncer, podendo alterar algumas fases do processo celular. Desse modo, pode-se investigar alguns tipos de microRNAs específicos para o estudo aprofundado da metástase cancerígena, nesse caso o grupo de estudo seria a família miR-200, a qual contém 5 microRNAs homólogos (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 e miR-141). Essa família compartilha das mesmas sequências de nucleotídeos e mesmos alvos que suprimem a transição epitelial mesenquimal e têm correlação inversa com algumas proteínas que possuem natureza de células cancerígenas epiteliais (PARK et al., 2008; DYKXHOOM et al., 2009). A perda da expressão do miR-200 gera um agravamento do processo cancerígeno, pois sua regulação homeostática é capaz de regular positivamente a transcrição da caderina E, que desempenha um papel fundamental na regulação da interação célula-célula e conseqüentemente no EMT (PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; SHIRAKIHARA; SAITOH; MIYAZONO, 2007).

Assim, visto que a desregulação da expressão da família miR-200s tem contato direto com a EMT e conseqüentemente a metástase, foi observado o papel de um dos microRNAs que compõem a família 200s, o microRNA 200c, no qual apresentou várias expressões nos cânceres metastáticos. Desse modo, tem-se como objetivo o estudo do miR-200c e seu potencial uso como marcador metastático a partir de trabalhos já publicados e selecionados por meio de uma revisão sistemática.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão sistemática dos estudos sobre microRNA 200c e sua relação com o câncer como potencial marcador metastático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender aspectos sobre o miR-200c e sua relação com as metástases;
- Analisar dados sobre estudo *in vitro* e *in vivo* sobre concentrações de miR-200c.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INCIDÊNCIA DAS NEOPLASIAS

O câncer é um problema de saúde mundial caracterizado como uma Doença e Agravo Não Transmissível (DANT) responsável pela segunda principal causa de mortalidade em pacientes antes dos 70 anos. As principais causas desse crescente aumento são as condições socioeconômicas, estilo de vida da população, exposição a fatores de risco, crescimento demográfico e envelhecimento da população, tendo como resultado o aumento e prevalência do câncer em países desenvolvidos e emergentes (BRAY et al., 2018).

Conforme estimado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2019), para o Brasil, nos anos de 2020 a 2022, estão previstos 625 mil novos casos de câncer. Os índices em relação ao sexo são predominantemente em homens, sendo 215,86/100 mil habitantes, enquanto que em mulheres é 145,00/100 mil habitantes. Em relação às regiões, todas apresentaram altos índice de câncer de próstata e mama, embora cada região tenha seus perfis epidemiológicos. O Sudeste é a região que tem o maior índice chegando a 60 % juntamente com a região Sul, a caracterizada com a maior prevalência de câncer de intestino e pulmão. No Centro Oeste, prevalece os cânceres de colo de útero e estômago. Nas regiões Norte e Nordeste, prevalecem o de colo de útero e estômago, sendo a região Norte a única que tem a taxa de colo de útero e de mama equiparadas.

Para a região Nordeste, especificamente para o Rio Grande do Norte, a estimativa é que a taxa bruta para homens seja de 327,19/100 mil habitantes e para mulheres 292,56/100 mil habitantes, com os homens mais acometidos por câncer de próstata, estômago, traqueia, brônquio e pulmão, e as mulheres por câncer de mama, cólon, reto e colo do útero (INCA, 2019).

3.1 CARACTERÍSTICAS DAS NEOPLASIAS

As neoplasias ou tumores classificam-se em dois tipos: maligno e benigno. Os tumores malignos se classificam pelos folhetos embrionários que são constituídos por: origem epitelial (carcinoma), origem mesenquimal (sarcoma) e origem embrionária (teratoma), já os benignos são classificados pelos seus constituintes e pela sua origem com o sufixo oma, como por exemplo, linfoma, hepatoma e melanoma. Além disso, podemos diferenciar esses tumores

benignos e malignos pela diferenciação celular, taxa de crescimento, invasão local e metástase (FILHO, 2016).

Em relação à diferenciação, as neoplasias benignas apresentam-se semelhantes a célula de origem. Já as neoplasias malignas têm sua diferenciação bem diversa, caracterizando-se por ampla gama de diferenciação celular parenquimatosas, podendo chegar a uma simples diferenciação até uma total diferenciação. Os tumores malignos ainda apresentam característica de anaplasia, sendo a total perda da diferenciação, apresentando variações celulares, tais como: pleomorfismos, hipercromasia, proporção núcleo/citoplasma, mitoses numerosas, perda de polaridade e células tumorais gigantes (ABBAS; KUMAR; ASTER, 2013).

Nas neoplasias benignas, as células geralmente têm pouca taxa de crescimento. Já nos tumores malignos, o seu crescimento tende a ser mais acelerado sendo inversamente proporcional à sua diferenciação. Tanto as células benignas como as malignas podem sofrer influência hormonal, tendo sua taxa de crescimento alterada, assim modificando algumas características predominantes (ABBAS; KUMAR; ASTER, 2013).

Outra característica das neoplasias benignas é a permanência fixa no seu local de origem, com isso essas células não têm propriedades de invasão celular. Essa característica se dá por apresentarem uma cápsula originada das células do tecido hospedeiro, devido a pressão celular que o tumor confere sobre as células do tecido hospedeiro. Os tumores malignos têm como principal característica a metástase (FILHO, 2016).

3.2 CARACTERÍSTICAS DA METÁSTASE

A metástase é a disseminação do tumor em outros órgãos distais ou proximais, estando presente apenas em neoplasias malignas. As neoplasias metastáticas são comumente achadas em cânceres anaplásicos e com grande dimensão, podendo esses tumores se disseminarem por três estruturas de sementeiras: nas cavidades corporais, pelo tecido linfático e pela disseminação hematogênica (ABBAS; KUMAR; ASTER, 2013).

Dessa forma, é observado em várias pesquisas que o papel da EMT tem como uma das principais causas a metástase. Durante a progressão da metástase as células cancerígenas expressam informações que modificam e realizam proteólise para a adesão celular, fazendo com que perca a polaridade celular, a desestabilização das junções célula-célula, supressão do apoptose, remodelação das estruturas citoesqueléticas e início da motilidade (BERX et al., 2007).

A EMT tem como finalidade a adesão e migração celular em sua homeostasia, sendo utilizada na embriogênese na formação das três camadas (ectoderma, mesoderma e endoderma) na agregação celular de animais para formação de complexos e na cicatrização (THIERY, 2002). Já nas patologias, há um aumento desse processo, principalmente nas neoplasias malignas. A perda da expressão da caderina E está relacionada diretamente a EMT e consequentemente à metástase. A caderina E é uma glicoproteína que tem domínio extracelular, tendo como função principal a adesão célula-célula, sendo composta por 5 subdomínios. Essa expressão das caderinas podem ser perdidas pela inativação mutacional, pela ativação dos genes beta-catenina que tem ação proto-oncogene e na expressão inadequada dos fatores de transcrição SNAIL1 (Zinc finger protein) e TWIST1 (Twist-related protein 1), sendo as primeiras fases da metástase a ser constituída (BERX; VAN ROY, 2001; ABBAS; KUMAR; ASTER, 2013).

Dois fatores estão internamente ligados com a caderina E e EMT, as proteínas E-box ZEB1 e ZEB2 (Zinc finger E-box-binding homeobox). Essas proteínas são importantes na formação embrionária dos vertebrados, entretanto foi demonstrado que suas concentrações podem interferir no bem-estar do indivíduo formado. Tendo a alteração homeostasia da transcrição E-box ZEB, esta proteína irá se ligar em um gene CDH1, no qual é um promotor genético da caderina E, alterando assim a polaridade celular. Outra consequência da ligação ao gene CDH1, é a formação e recrutamento de proteínas de remodelação de cromatina SWI (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), que irá levar na acumulação de CDH1 transicional, afetando a EMT. Como a caderina E é um percurso da EMT, a família de proteína ZEB se torna um ativador da EMT. Com isso, vindo em estudos que a alta concentração de ZEB pode sim estar relacionada a uma metástase (POSTIGO et al., 2003; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; KORPAL et al., 2008).

Em seguida, as células neoplásicas vão produzir enzimas proteolíticas ou induzir a células estromais em formar proteases, com isso irá resultar na clivagem do colágeno e proteoglicanos, por consequência irá ser degradado os receptores epiteliais (integrinas, laminina e colágeno), com isso o tumor terá uma permeabilidade na membrana basal. A última etapa será a quimiotaxia para os tecidos adjacentes, muito dos fatores que compõem essa quimiotaxia são citosinas produzidas pelos próprios tumores e os produtos dos resultados das proteólises, com isso a célula terá configurações e estruturas que irão possibilitar a invasão para a matriz extracelular e possivelmente nos sistemas linfático ou hematológico (ABBAS, KUMAR; ASTER, 2013).

3.4 OS MICRORNAS

Os microRNAs são uma classe de RNAs não codificantes composta por 19 a 25 bases nitrogenadas e tem como função a regulação da expressão genética pós-transcricional, sendo sintetizados de duas formas em miRNA primário (pri-miRNAs) e microRNA, que irão ser produzidos por três principais proteínas: RNase III, Drosha e Dicer (HA; KIM, 2014).

Inicialmente, os microRNA serão formados pela RNA polimerase II ou III, que irá possuir uma grande quantidade de nucleotídeos que tem formato de grampo, sendo constituído por uma extremidade cap 5' 7-metil guanósina e uma calda poli A. Com isso, o pri-microRNA irá ser processado pela ribonuclease III Drosha e o cofator DGCR8 que reconhece e cliva próximo a junção de grampo e ssRNA (RNA fita simples), como produto desse processo formará o pré-microRNA que compõe de 60 a 100 nucleotídeos em formato de grampo. Esses pré-microRNA irão ser transportados para o citoplasma por um receptor nuclear XPO5 (57510 Exportin-5) dependente de RanGTP. No citoplasma, o pré-microRNA será clivado pela ribonuclease III chamada de Dicer, que resulta nas microRNAs maduros que estão em dupla fitas entorno de 21 a 22 nucleotídeos para serem inseridos na proteína AGO 2 (Proteína argonauta-2) (DESIGNES et al., 2015; WATSON et al., 2015).

Para haver o silenciamento do mRNA, precisa-se de associação da proteína AGO 2 com o microRNA que irá desenrolar a dupla fita, no qual uma fita será selecionada para se complementar ao RISC (RNA-induced silencing complex). Como resultado da formação do complexo RISC, o RNA mensageiro específico pode sofrer degradação, desestabilização ou inibição da tradução, tendo em vista que o complexo irá se ligar na porção 3' do mRNA (O'BRIEN; HAYDER; PENG, 2018; WATSON et al., 2015).

3.4.1 MicroRNAs da família 200s

A família miR-200s é composta pelos membros específicos miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 e miR-141. Assim, os miR-200s podem ser divididos em 2 grupos que se originam em diferentes localizações cromossômicas, sendo compostos por miR-200a, miR-200b e miR-429 que se originam do cromossomo 1p36 e miR-200c, e miR-141 estando localizado no cromossomo 12p13. Mesmo com origens diferentes estes dois grupos de miR-200s tem suas sequências de nucleotídeos muito parecidas mudando apenas a uracila (miR-200a/b e miR-429) para citosina (miR-200c e miR-141) (UHLMANN et al., 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 PESQUISA SISTEMÁTICA DE LITERATURA

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes dos itens de relatório de preferências para revisão sistemática e meta-análises (declaração PRISMA) com modificações.

Para condução deste estudo foi considerada a seguinte questão: O microRNA 200c possui relação com a metástase ao ponto de ser um marcador biomolecular?

4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA DE ARTIGOS.

A pesquisa foi realizada de setembro a novembro de 2020, nas bases PubMed, Science Direct e MEDLINE. Foram analisados artigos e publicações em periódicos científicos entre 2014 a 2019. Foram utilizados os seguintes DeCS (Descritores em Ciência e Saúde) “MicroRNA”, “Neoplasm Metastasis”, “Epithelial-Mesenchymal Transition” e “Biomarkers”. Também utilizando no rastreamento da pesquisa o operador lógico “AND” para combinação dos descritores.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ESTUDOS

A seleção dos artigos foi realizada de acordo com os termos de busca encontrados nos títulos e resumos, seguido de seleção e leitura na íntegra dos artigos, a fim de identificar estudos que atendessem aos critérios de inclusão e exclusão. Para tal, foram considerados os seguintes critérios de inclusão: a) estudos que tiveram o tema de microRNA 200c e metástases, b) período de publicação de 2014 a 2019 e c) publicação em inglês. Os critérios de exclusão foram artigos que fugissem da proposta do tema, artigos de meta-análise, revisão sistemática, revisão integrativa, revisão de literatura, resumos de anais, editoriais, cartas ao editor, artigos duplicados e aqueles que não respondiam à questão norteadora que compôs esse estudo e publicados antes de 2014.

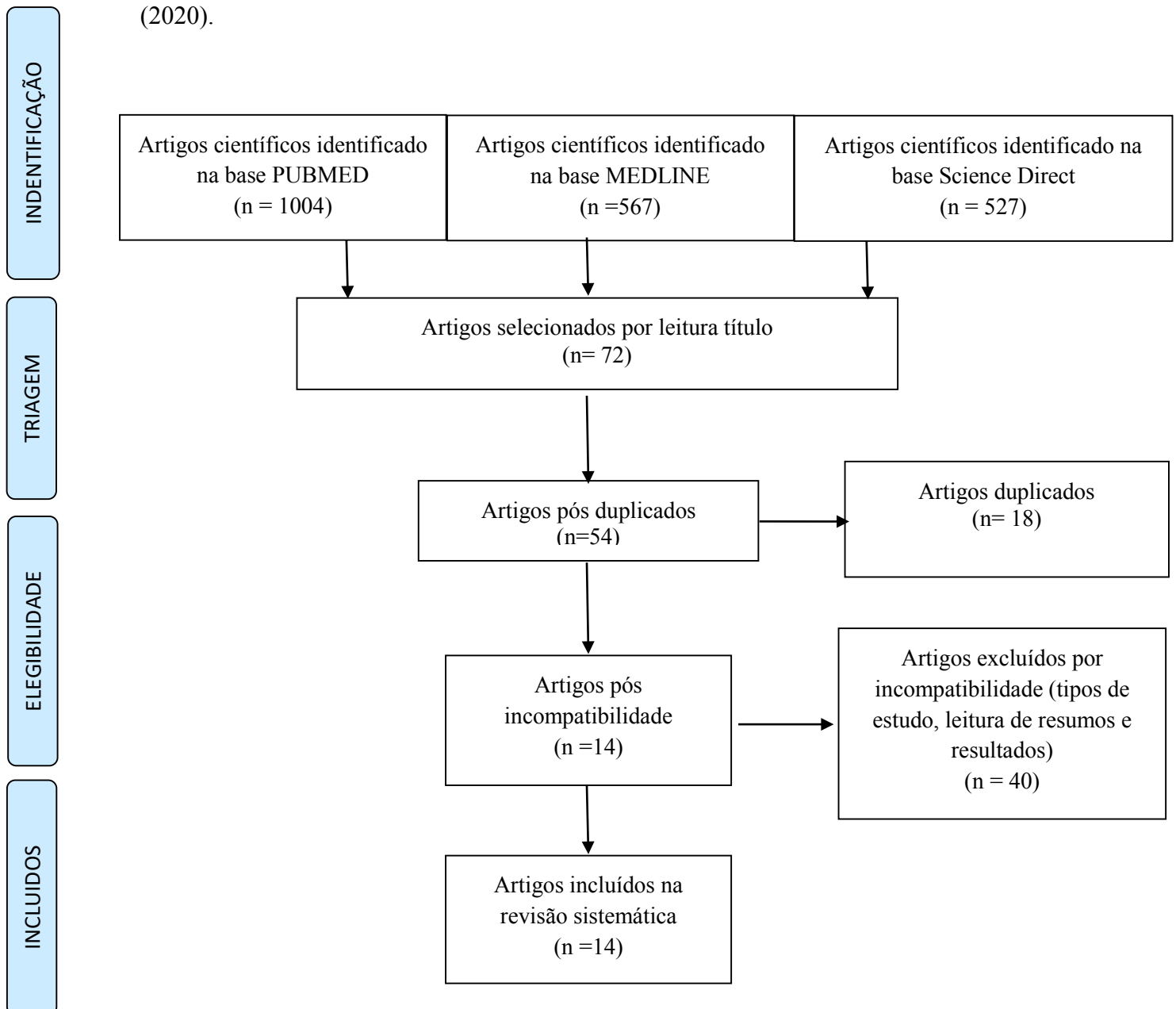
4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

A análise dos estudos foram caracterizadas por três etapas: pré-análise, exploração dos artigos e interpretação dos dados. As interpretações e informações foram descritas em Minayo (2014), sendo a interpretação que mais se adequa ao tipo de análise. Os dados foram extraídos das bases Science Direct, MEDLINE e PubMed sendo extraídos os artigos manualmente e organizado em forma de tabela. As variáveis extraídas de cada artigo e incluídas na revisão foram: Autores e ano, amostra de estudo, tipo de estudo, metodologia utilizada e tipo de câncer.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 2098 artigos obtidos na busca inicial nas 3 bases de dados, sendo eles PUBMED com 1004, MEDLINE 567 e Scienced Direc 527. Foram selecionados por títulos 72 artigos na primeira etapa, dentre esses foram excluídos 18 artigos duplicados, com isso, sobrando 54 artigos selecionados para fase de elegibilidade, no qual 40 foram excluídos pela incompatibilidade dos resumos e resultados apresentados com o tema. Restando assim, 14 artigos para realizar a leitura na íntegra e compor a revisão sistemática. Os resultados da busca estão representados no fluxograma abaixo (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma do resultado da busca, seleção e inclusão dos estudos. Fonte: O autor (2020).



Autor (ano)	Amostras	Tipo de estudo	Metodologia utilizada	Tipo de câncer
Tamagawa et al. (2014)	Cultura celular	<i>In vitro</i>	qRT-PCR	Células escamosas de cabeça e pescoço
Chang et al. (2014)	Cultura celular	<i>In vitro</i>	qRT-PCR e Western blotting	Células mamárias
Li et al (2014)	Cultura celular e xenoenxerto em camundongos	<i>In vitro/in vivo</i>	Imunohistoquímica e Western blotting	Células pulmonares não pequenas
Toiyama et al. (2014)	182 pacientes	<i>Ex vivo</i>	Hibridização <i>in situ</i> e qRT-PCR	Células colorretais
Tejero et al. (2014)	155 peças cirúrgicas	<i>Ex vivo</i>	Imunohistoquímica e Western blotting	Células pulmonares não pequenas
Lu et al. (2014)	48 biópsias	<i>Ex vivo</i>	Western blotting e qRT-PCR	Células ovarianas
Yeh et al. (2014)	1240 pacientes	<i>In vivo</i>	Imunohistoquímica, Western blotting e qRT-PCR	Carcinoma hepatocelular com trombo de tumor de ducto biliar
Ibrahim et al. (2015)	44 pacientes	<i>In vivo</i>	qRT-PCR e hibridização LNA <i>in situ</i>	Células ovarianas
Sundararajan et al. (2015)	Cultura celular	<i>In vitro</i>	qRT-PCR , Western blotting e Imunofluorescência	Células mamárias
Li et al. (2016)	39 biópsias	<i>Ex vivo</i>	Imunohistoquímica, qRT-PCR,	Células do endotélio

Muto et al. (2016)	16 pacientes	<i>In vivo</i>	Imunohistoquímica e qRT-PCR	Células colorretais
Zhang et al. (2017)	Cultura celular e ensaios em camundongos	<i>In vitro/in vivo</i>	qRT-PCR e Western blotting	Células epiteliais nasofaringe
Damiano et al. (2017)	51 Biópsias e peças cirúrgicas	<i>Ex vivo</i>	Imunoprecipitação de cromatina, qRT- PCR e Western blotting	Células mamárias
Bhardwaj et al. (2017)	42 peças cirúrgicas	<i>Ex vivo</i>	Imunohistoquímica e qRT-PCR	Glândulas sebáceas palpebral

Tabela 1. Características dos artigos incluídos na revisão sistemática sobre os estudos do miR-200c nas neoplasias. Fonte: O autor (2020).

Foram analisados artigos e publicações em periódicos científicos entre 2014 a 2019, porém, não foram encontrados estudos nos anos de 2018 e 2019 que atendessem aos critérios da pesquisa. Restando assim, 14 estudos científicos para discussão do papel do MicroRNA 200c na metástase. Dentre os trabalhos selecionados, há estudos pré-clínicos e clínicos, utilizando vários meios *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (Tabela 1).

Tamagawa *et al.* (2014) correlacionaram os microRNAs 200c e 141 a 13 linhagens de carcinoma metastático espinocelular de cabeça e pescoço à expressão dos genes E-caderina, ZEB1 e ZEB2. No presente estudo, demonstrou-se uma expressão positiva do mir-200c e mir-141 com o marcador genético E-caderina e inversa com ZEB2, contudo apenas o mir-141 foi relacionado inversamente ao ZEB1. Visto assim, os autores relataram que a utilização desses dois microRNAs seria de fundamental importância na relação da metástase espinocelular de cabeça e pescoço, pois a expressão dos mir-200c e mir-141 estaria ligado à manutenção da característica epitelial e seu déficit afetaria positivamente os genes ZEB1 e ZEB2, assim ganhando características mesenquimais.

No estudo de Chang *et al.* (2014), se pressupôs um viés diferente das vias ZEB1 e ZEB2, os autores fornecem que a expressão da proteína do HBMGB1 no câncer de mama tem relação genética com o microRNA 200c. Demonstrou-se que o mir-200c tem relação proporcional com a expressão ectópica da proteína HBMGB1, que por sua vez, vai alterar as estruturas do

citoesqueleto e ativando quinases, dando assim motilidade celular para estas células cancerígenas.

Li *et al.* (2014), apresentaram mais uma vez as concentrações baixas de microRNA 200c em relação à metástase avançada, sendo especificado em cânceres pulmonares não pequenos. Além de confirmar esta prerrogativa, os autores ainda fizeram uma relação com a proteína USP25, que é membro da família de proteases da ubiquitina, que em cânceres metastáticos avançados pulmonares não pequenos, apresentou uma alta concentração de RNA mensageiro e da própria proteína, em contrapartida, os níveis de microRNA 200c teve uma baixa, em relação aos carcinomas mais avançados.

Na pesquisa de Toiyama *et al.* (2014), foi analisado o papel do microRNA 200c em níveis séricos em câncer colorretal. Observou-se que os níveis deste microRNA em nível sérico foi maior nos estágios de câncer IV do que o estágio I, em contrapartida no tecido do câncer colorretal foi o inverso. Os autores relatam que isto se dá pela relação do avanço da metástase, devido as metástases linfonodais, hepatocelular e em outros órgãos aumentaram os níveis de mir-200c na corrente sanguínea. Com isso, Toiyama et al. (2014) sugerem que o microRNA 200c seja um grande biomarcador para a metástase linfonodal de câncer colorretal.

Tejero *et al.* (2014), relacionaram as concentrações de miR-200c em adenocarcinomas pulmonares não pequenos em relação à sobrevida. Os achados do estudo, mostraram que em adenocarcinomas que expressava níveis de microRNA 200c mais elevados, a sua sobrevida era de 61,2 meses, já os que expressam níveis menores a sobrevida dos pacientes é de 145,5 semanas. Os autores destacam que a correlação com o microRNA 141 seria de essencial importância, pois os níveis de sobrevida nesses dois microRNAs expressam níveis significativamente importantes para a clínica médica.

Lu *et al.* (2014), demonstram a relação do câncer ovariano com a expressões de mir-200c e com a proteína ZEB2. Na pesquisa, os autores tiveram como base a transfecção tanto da proteína ZEB2 como de seus mediadores, para a avaliação do mir-200c. Mostrou-se os resultados parecidos com os discutidos, que o mir-200c foi diminuído significativamente quando teve uma alta expressão de ZEB2 exibindo mais uma vez sua correlação inversa com o microRNA 200c.

Yeh *et al.* (2014) correlacionaram toda a família 200s com os principais fatores de EMT no carcinoma hepatocelular com trombo de tumor de ducto biliar, no qual se chegou a algumas conclusões. Foi relatado que o potencial do microRNA 200c nesse tipo de carcinoma seria os

efeitos inibitórios da proliferação celular, pois nesse tipo de câncer demonstrou feedback positivo com a caderina-E.

Ibrahim *et al.* (2015) tiveram como base o câncer de ovário epitelial seroso, no qual foi relacionado com o microRNA 200c e 31. A pesquisa relacionada como mir-200c foi realizada em meio de cultura de células ovarianas, no qual obtiveram as concentrações negativas do miR 200c que foi relacionado ao aumento do gene supressor de tumor DLC-1, no qual a suprexpressão do microRNA 200c levou o aumento da proliferação de células cancerígenas.

Para reforçar o papel da relação do mir-200c com o ZEB1, Sundararajan *et al.* (2015) realizaram uma pesquisa para a busca de novos genes que fomentassem ainda mais essa relação. Nos seus achados, os genes MYLK e TKS5 foram avaliados em linhagem de câncer de mama e o ZEB1 teve sua expressão reduzida e conseqüentemente os valores de MYLK e TKS foram reduzidos, enquanto o mir-200c foi aumentado.

No estudo de Li *et al.* (2016), correlacionaram o RNA MALAT1 com expressão forçada para baixo no microRNA 200c em câncer de endotrial endometriode. Como os autores relatam, o RNA MALAT1 está ligado ao núcleo celular, no qual, quando ocorre alterações no núcleo, o MALAT1 é expresso em grande quantidade. Analisou-se e este RNA está envolvido em diversas patologias, incluindo a metástase, a baixa expressão do microRNA 200c. Observou-se que o caminho inverso, a superexpressão de mir-200c está suprimindo os valores de MALAT1 e conseqüentemente diminuindo a EMT1. Entretanto, os autores fizeram uma ressalva, que este tipo de RNA está correlacionado com mir-200c neste tipo de câncer, pois o câncer de endotrial endometriode apresenta várias peculiaridades, sendo necessários estudos mais detalhado sobre a relação de MALAT1 com o microRNA 200c.

Muto *et al.* (2016) pesquisaram as relações das proteínas ZEB no câncer de colorretal. Relacionaram família 200s com a proteína ZEB, que primeiramente não mostrou concentrações relevantes para se correlacionar, mas o papel do mir-200c foi destacado, já que teve uma diferença significativa em comparação com os cânceres metastáticos e não metastáticos. No estudo a proteína ZEB1 não teve nem uma relação significativa com o mir-200c.

Enquanto no estudo de Zhang *et al.* (2017), o microRNA 200c teve um papel inverso dos outros estudos. Realizaram uma pesquisa em células cancerígenas da nasofaringe, fazendo tanto em meio de cultura celular, quanto em camundongos. Transfectaram anti-mir200c em células cancerígenas que teve como resultado um volume tumoral menor comparado ao grupo

controle, e também observaram que a capacidade de invasão na matriz intracelular foi diminuída, já com a superexpressão do microRNA 200c não teve diferença significativa em comparação com o grupo controle, observando no estudo *in vivo* pelo dessecamento de camundongos.

Zhang *et al.* (2017), sugerem que o mir-200c se comporta como um fator de crescimento para alguns tipos de carcinoma, e que é preciso delinear os papéis da família microRNA 200s para a identificação dos cânceres, já que em alguns se comporta de maneiras e concentrações diferentes.

Em estudos em biópsias, foram analisadas as baixas concentrações de mir-200c em relação à metástase de câncer de mama triplo negativo. Na pesquisa do Damiano *et al.* (2017), foi demonstrado a relação ZEB1 com o microRNA 200c para comprovar os achados no câncer de mama triplo negativo. Foram analisadas as peças cirúrgicas e biópsias, observando-se que em câncer que tiveram uma sobrevida menor, os valores de ZEB1 estavam elevados, já nos microRNAs 200c estavam diminuídos. Os autores apontam que os tamanhos dos tumores não foram relacionados com os valores genéticos de mir-200c e ZEB, mas sim as invasões linfonodais.

No estudo Bhardwaj *et al.* (2017), relacionaram os mir-141 e mir-200c com os valores de ZEB1 e ZEB2 no câncer glandular palpebral. Os autores encontraram dois microRNAs que tinham relação inversa com a expressão da proteína ZEB2, já com o ZEB1 não tiveram correlação significativa. Assim, foi demonstrado mais uma vez a correlação dos microRNAs 141 e 200c na regulação positiva pela expressão da caderina-E, tendo como um controle homeostático da EMT.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do trabalho foi almejado, pois foi encontrado a relação do miR-200c na patologia molecular da metástase. A pesquisa evidenciou a investigação no microRNA no qual a metástase foi mais relevante, assim sendo escolhido um dos microRNAs da família 200s, o microRNA 200c. Este microRNA apresentou vários achados moleculares, pois sua regulação estava ligada com fatores de crescimento celular, fatores de polaridade, adesão, mecanismos de invasão mensenquimais e proporções de núcleo/citoplasma. Sendo observado nos estudos selecionados para a revisão sistemática que os cânceres de últimos estágios e de maiores tamanhos apresentaram os menores níveis de microRNA 200c, observando assim, que seus fatores são inversamente proporcionais ao crescimento do tumor.

Foi analisado que alguns tumores se comportam de maneiras diferentes, no qual o câncer pode ter várias peculiaridades, sendo influenciadores hormonais, diferenciação histoquímica, vascularização e sítio celular cancerígeno. Entretanto, na atual pesquisa foram analisados 14 artigos em nove sítios celulares diferentes, no qual, destes oito se comportaram de maneira igual

às concentrações de microRNA 200c no avanço da metástase. É importante salientar, que faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas de cunho clínico para se fomentar este tipo de estudo, pois precisasse de vários equipamentos, métodos sofisticados e infraestrutura de ponta e alto custo, que comprove sua utilização como marcadores metastáticos.

Foi observado em alguns artigos que apenas a presença do miR-200c não seria suficiente para caracterizar a metástase, pois alguns fatores como as concentrações da proteína ZEB1 não foram modificadas com a desregulação deste microRNA, necessitando-se de outros achados moleculares para ter uma melhor especificidade.

A desregulação do microRNA 200c está fortemente correlacionada ao desenvolvimento de diferentes células metastáticas, apesar de ter estudos relevantes e específicos, ainda necessitam-se de estudos clínicos que abordem um controle e especificidade maior em relação às concentrações e seus mecanismos moleculares. O atual trabalho teve como finalidade de correlacionar a metástase com o microRNA, assim buscando em plataformas de pesquisas os melhores artigos para contribuir com o meio acadêmico. Delinear as características deste miR-200c em cânceres específicos, pode avaliar melhor o seu papel como um marcador metastático, até mesmo podendo ser utilizado como terapia molecular, havendo assim um grande avanço para pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; KUMAR, V.; ASTER, J. C.; **Robbs Patologia Básica**. 9º edição. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro. 2013 P.162-198.

BERX, G.; VAN ROY, F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Res**. v.3, p. 289–293, 2001.

BERX, G. et al. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in câncer. **Jornal for Clinical & Experimental Metastasis** v.24, p. 587–597. Nov 2007.

BHARDWAJ, M. et al. miRNA-200c and miRNA-141 as potential prognostic biomarkers and regulators of epithelial-mesenchymal transition in eyelid sebaceous gland carcinoma. **Br J Ophthalmol**. v.101, e.4, p.536-542. 2017.

BRAY, F.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v.68, n.6, p. 394-424, Nov. 2018.

CHANG, B. et al. miR-200c inhibits metastasis of breast cancer cells by targeting HMGB1. **J Huazhong Univ SciTechnolog Med Sci**. v. 40 p.201-206. 2014.

CEPPI P.; MUDDLURU G.; KUMARSWAMY R.; RAPA I.; Scagliotti G.V.; PAPOTTI M.; et all. Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non–Small Cell Lung Cancer. **Mol Cancer Res**. v.8, p.1207-1216. 2010.

DAMIANO, V. et al. Epigenetic silencing of miR-200c in breast cancer is associated with aggressiveness and is modulated by ZEB1. **Genes Chromosomes Cancer**. v.56 e.2 p.147-158. 2017.

DESVIGNES, T. et al. MicroRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, OR, 97403, USA. v.162, p.885-899, 2015.

DYKXHOOM, D. M. et al. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. **PLoS One**. 2009.

FILHO, G. B.; **Bogliolo Patologia**. 9º edição. Editora Guanabara Koogan LTDA. Rio de Janeiro. 2016. p. 308-354.

HA, M.; KIM V. M.; Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15 , p. 509 – 524. 2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120 p.: il. color. <ISBN 978-85-7318-389-4> (versão eletrônica).

IBRAHIM, F. et al. MicroRNA-200c and microRNA-31 regulate proliferation, colony formation, migration and invasion in serous ovariancancer. **J Ovarian Res**. v.12, e.8, n56. 2015.

JÚLIO, C. M.; FILHO, R.; KIMURA, E. T.; MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Bras Endocrinol Metab** v.50 n.6 São Paulo dez. 2006.

KORPAL M. et al. 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**. 2008.

KOZOMARA A.; BIRGAOANU M.; JONES S. G.; miRBase: from microRNA sequences to function. *Rev. Nucleic Acids Research*. v.47, p.155 – 162, Edição D1, 08 de janeiro de 2019.

LI, Q. et al. Disrupting MALAT1/miR-200c sponge decreases invasion and migration in endometrioid endometrial carcinoma. **Cancer Lett**. v.383, e.1, p.28-40. 2016.

LI, J. et al. miRNA-200c inhibits invasion and metastasis of human non- small cell lung cancer by directly targeting ubiquitin specific peptidase 25. **Mol Cancer**. v.6, e.13, n.166. 2014.

LU, Y. et al. miR-200c modulates ovarian cancer cell metastasis potential by targeting zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) expression. **Med Oncol.** v.31, e.8, n.134. 2014.

MINAYO, M.C. de S. (Org.) Pesquisa social: teoria, método e criatividade. 33. ed. Rio de Janeiro: Vozes, 2014.

MUTO, Y. et al. Heterogeneous expression of zinc-finger E-box-binding homeobox 1 plays a pivotal role in metastasis via regulation of miR-200c in epithelial-mesenchymal transition. **Int J Oncol.** v.49, p.1057-1067. 2016.

O'BRIEN J.; HAYDER H.; PENG C.; Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation Department of Biology, York University, Toronto, ON, Canada. v.9 2018

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R.; Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo).** v.89 p.21-31. 2010.

PARK S.M. et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes Dev.** v. 22: p. 894-907. 2008.

PEINADO H.; OLMEDA, D.; CANO, A.; Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?; **Nat Rev Cancer.** 2007.

PENCHEVA, N.; TAVAZOIE, S. F.; Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. **Nat Cell Biol.** V.15, p.546-554. 2013

POSTIGO, A. et al. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. **EMBO J.** 2003.

RICHARDSON, R. J.; **Pesquisa social: métodos e técnicas.** Editora Atlas, 3º edição. São Paulo. 1998. p.156-177

SANDORVAL F. T. B.; **Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.** 86 páginas. Dissertação (Mestrado na área de genética). Universidade de São Paulo. Instituto de Biociência Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. São Paulo. 2011 disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-10062011-170455/publico/FlavioTrevisan_rev.pdf> Acessado em 20/04/2020

SUNDARARAJAN, V. et al. The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS5. **Oncotarget.** v.6 p. 27083-27096. 2015

SAVAGNER P.; Leaving the neighborhood: Molecular mechanisms involved during epithelial–mesenchymal transition. **Rev BioEssays** v.23 p.912-923. 2001

SHIRAKIHARA T.; SAITOH M.; MIYAZONO K.; Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in the epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β . **Molecular Biology of the Cell.** V. 18, N. 9, 2007.

RICHARDSON, R. J.; **Pesquisa social: métodos e técnicas.** Editora Atlas, 3^o edição. São Paulo. 1998. p.156-177

TAMAGAWA, S. et al. Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Mol Med** v.33, p.879-886, 2014.

TEJERO, R. et al. miR-141 and miR-200cas markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. **PLoS One.** v.9, e101899. 2014

THIERY J.P.; Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer** v.2, p.442–454. 2002

TOIYAMA, Y. et al. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. **Ann Surg.** v.259, e.4, p.735-743

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. **Rev Oncogene**. v.29, p.4297-4309, 2010.

VILELA, Fernanda A. MANZINI, Eduardo J. Tipos de pesquisa: enfoque na educação especial. **Revista de Iniciação Científica da FFC**, v.9, n.3, p.285-292. 2009

WATSON, J. et al. **Biologia molecular do gene**. 7º edição. Editora Artmed. Porto Alegre. 2015. p. 711-727.

YEH, T. et al. Expression profile of microRNA-200 family in hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus. **Ann Surg**. v.259, e.2, p.346-354. 2014.

ZHANG, Z. et al. MicroRNA-200c plays an oncogenic role in nasopharyngeal carcinoma by targetingPTEN. **Tumour Biol**. v.39 e.5 p.1-11. 2017.