

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
Escola de Ciências Médicas e da Vida  
Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina)

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE MicroRNAs NO MELANOMA  
MALIGNO: REVISÃO SISTEMÁTICA**

**GOIÂNIA**  
**2022**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
Escola de Ciências Médicas e da Vida  
Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina)

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE MicroRNAs NO MELANOMA  
MALIGNO: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Pesquisa realizada como Trabalho de  
Conclusão do Curso de Medicina da Pontifícia  
Universidade Católica de Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Márcio Teodoro  
Cordeiro Silva

**KAMYLLA LOHANNYE FONSECA E SILVA**  
**VITOR SILVA EVANGELISTA**

**GOIÂNIA**  
**2022**

## RESUMO:

**Objetivo:** Identificar os principais microRNAs envolvidos no melanoma cutâneo maligno para uma melhor compreensão da doença, bem como sua relação com aspectos do prognóstico e tratamento dos pacientes. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, com a busca de artigos nas bases de dados: PubMed e Periódicos CAPES, acerca dos microRNAs envolvidos no melanoma cutâneo maligno, nos últimos 5 anos. **Resultados:** Foram selecionados 24 artigos relacionados ao tema proposto, contendo ao todo 108 microRNAs associados ao melanoma cutâneo, utilizando as seguintes metodologias de análise: RT-qPCR, cultura de células e ensaio MTT. Assim, alguns microRNAs tiveram sua ação envolvida na formação do câncer estudado, como: *miR-301a*, *miR-214* e *miR-21*; e alguns microRNAs foram observados como protetores contra o surgimento da doença, como: *miR-205*, *miR-137* e *miR-186*. **Conclusão:** Observa-se que o melanoma cutâneo apresenta vários fatores epigenéticos envolvidos na sua fisiopatogenia, dentre eles, destacam-se os microRNAs, esses quando superexpressos ou hipoexpressos podem influenciar no prognóstico e no tratamento do melanoma.

**Palavras-chave:** Melanoma; microRNAs; neoplasias; epigenética.

## INTRODUÇÃO

Na região basal, da epiderme, existe um tipo de célula, conhecida como melanócito, responsável pela produção do pigmento, que confere a coloração característica da pele, denominada melanina. Por meio da resposta, pela radiação ultravioleta, um outro tipo celular, com o nome de queratinócito, produz o hormônio estimulador de alfa-melanócitos ( $\alpha$ -MSH, do inglês, *alpha-melanocyte stimulating hormone*), que se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R, do inglês, *melanocortin 1 receptor*), presente na membrana celular do melanócito, para induzir a síntese de melanina. A partir da produção desse pigmento, por meio de projeções citoplasmáticas, o melanócito distribui a melanina pela grande população de queratinócitos presentes na camada da epiderme, configurando importante barreira de proteção aos raios solares. Adicionalmente, a medida que os queratinócitos vão amadurecendo, sofrem queratinização, perda de seu núcleo e, conseqüentemente, morte celular, elaborando outra forma de defesa à incidência solar na pele (1).

O melanoma, considerado o câncer de pele mais agressivo, é um tumor maligno epitelial, altamente invasivo, derivado de melanócitos provenientes da crista neural, localizados entre a camada basal da epiderme, na úvea, meninges, bulbo capilar e orelhas (2,3). Esse tipo de malignidade está entre os 20 tipos de cânceres que mais acomete os indivíduos, ao redor do mundo, e ocupa o 23º lugar dentre aqueles que mais levam ao óbito (4). A ocorrência de melanoma é prevalente na população mais idosa e a faixa etária mais acometida é a de 65 a 74 anos, a partir de então, há aumento de casos com o avanço da idade. Outra particularidade, desse tipo de neoplasia maligna, é a sua prevalência em homens, chegando a ser cerca de uma vez e meia maior, quando comparados os números de casos em mulheres (3).

Existem diversos mecanismos, intrínsecos e extrínsecos, responsáveis pelo desenvolvimento do melanoma. Dentre os fatores intrínsecos, pode-se citar: as mutações genéticas, as mais comuns (~50%) acometem o gene *BRAF*; alterações em expressões gênicas; eventos epigenéticos; e estresse oxidativo. O fator extrínseco mais relatado é a radiação ultravioleta, pelo seu alto poder de produzir alterações genéticas, tanto pela geração de espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), pelo UVA, quanto pela quebra de DNA, pelo UVB, ao não ser absorvido pela melanina (3,5–7).

A epigenética compreende os mecanismos moleculares que promovem a modificação da expressão de um gene sem alterações na sequência de DNA. Mecanismos envolvidos nesse processo incluem: metilação do DNA, modificações de histonas, conformação da cromatina, microRNAs e RNAs não codificantes. Com isso, a epigenética mostra-se útil na detecção precoce, no tratamento e em melhores prognósticos do melanoma (2,3,7,8). Além disso, a epigenética pode estar associada a mutações diretas do DNA ou variação do número de cópias. Neste contexto, sabe-se que mutações no DNA ocorrem durante a gênese do câncer e a sua concomitância com a epigenética pode ser um facilitador para a apresentação dessa doença. Um exemplo, é a metilação do DNA, influenciada por alguns genes, cruciais na formação do melanoma, como: *LKB1*, *RB1* e *RASSF1A*. Assim, as modificações do número de cópias, caracterizadas como mutação, podem transregular a metilação do DNA e favorecer o desenvolvimento do melanoma, o que nos mostra uma relação entre vários mecanismos, simultaneamente, para a formação final do melanoma (9).

Especificamente, os MicroRNAs são importantes fatores epigenéticos envolvidos no mecanismo formador do melanoma. Assim, microRNAs podem ser definidos como RNAs não codificantes curtos de, aproximadamente, 22 nucleotídeos, de fita simples, que modulam a expressão gênica por inibição pós-transcricional, agindo na clivagem do RNA mensageiro e na inibição direta de genes codificantes de proteínas específicas. Com base nessa perspectiva, observa-se que microRNAs podem agir, produzindo efeitos oncogênicos, pela inibição de um RNA mensageiro que teria papel na supressão do tumor, o que favorece a formação do melanoma, mas também podem apresentar efeito protetor, ao inibir RNA mensageiro envolvido na formação do câncer (10,11). Assim, torna-se claro a importância de conhecer o envolvimento de diferentes microRNAs no melanoma maligno para uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia da doença e os possíveis benefícios na avaliação diagnóstica, prognóstica e terapêutica.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar os microRNAs envolvidos no melanoma maligno.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo qualitativo, a partir de uma revisão sistemática da literatura, relativa aos aspectos epigenéticos no melanoma cutâneo maligno, com foco nos microRNAs. A revisão foi conduzida nas bases de dados: PubMed e Periódico CAPES, com os descritores: “*malignant melanoma AND epigenetic AND cancer*” e “*epigenetic AND skin AND cancer*”. Foram utilizados os filtros: artigos publicados nos últimos cinco anos e referente a seres humanos. Como critério de inclusão, foi utilizado artigos publicados em português ou inglês, cujos títulos ou resumos estavam diretamente relacionados com os mecanismos epigenéticos dos microRNAs que atuam diretamente no melanoma cutâneo maligno. Além disso, foram excluídos artigos que, pelo título ou resumo, não atenderam aos objetivos da presente pesquisa, ou que foram publicados em quaisquer outros idiomas que não os mencionados.

O procedimento de coleta das informações foi realizado a partir do protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (Anexo 1) (12).

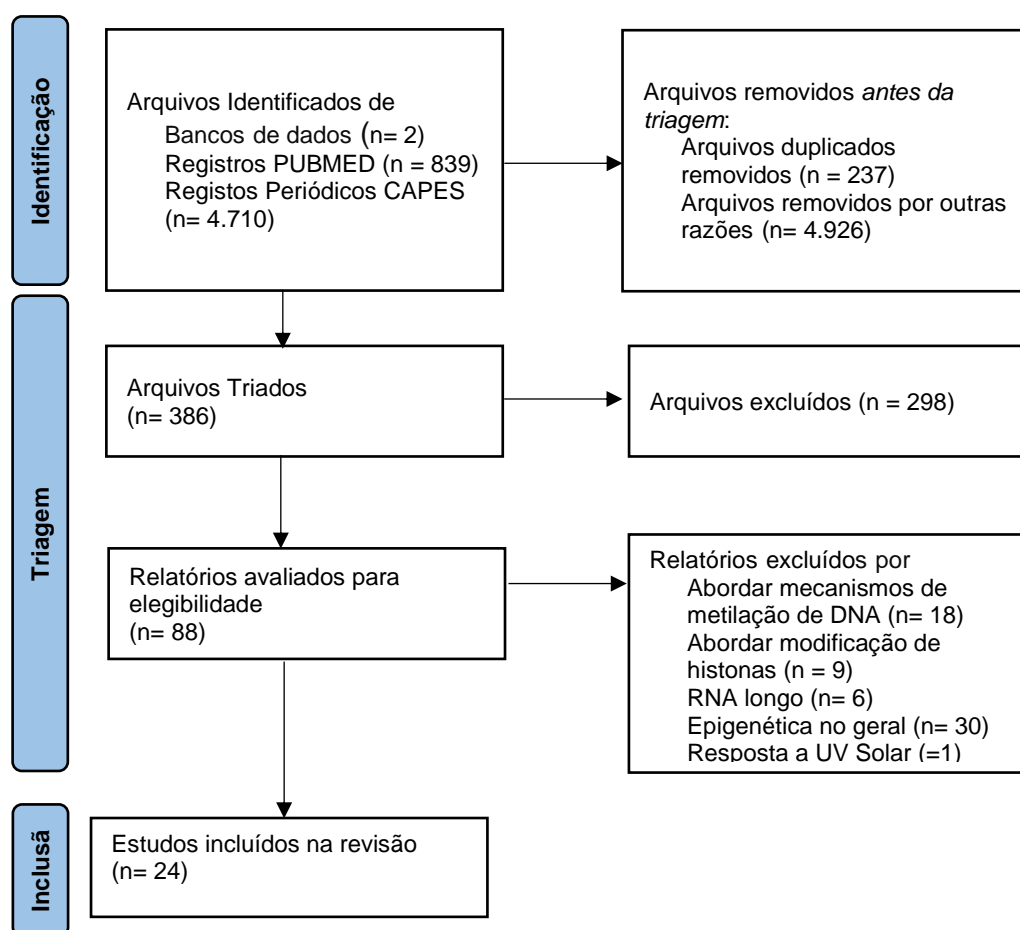
O estudo não necessitou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, pois não foram realizados quaisquer tipos de contato direto ou indireto com pessoas, sendo, portanto, uma busca de informações em bases de dados de domínio público.

## **RESULTADOS**

### **SELEÇÃO DOS ESTUDOS**

A busca de estudos nas bases de dados PubMed e Periódico CAPES resultou em 5.549 títulos. Após a leitura dos títulos, 237 duplicatas foram excluídas e mais 4.926 foram retirados, por não estarem de acordo com o tema do estudo proposto. A análise dos resumos resultou na seleção de 88 artigos que avaliaram os mecanismos epigenéticos dentro do contexto do melanoma maligno. Em seguida, foram excluídos 63 relatórios que não tinham como tema principal os microRNAs. Ao final, 24 artigos foram incluídos nesta revisão sistemática. A Figura 1 descreve o processo de seleção dos estudos.

**Figura 1.** Fluxograma da seleção de artigos.



## CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS SELECIONADOS

No total, foram analisados 108 microRNAs, nos 24 artigos incluídos, apresentando informações acerca de sua função e expressão nos tecidos com melanoma maligno. Todos os estudos analisaram a expressão dos microRNAs, utilizando uma combinação dos seguintes ensaios ou métodos: RT-qPCR, cultura de células, ensaio de Western Blot, ensaio MTT, análise por citometria de fluxo, ensaio de Transwell e ensaio de repórter de luciferase. Os estudos incluídos foram desenvolvidos em institutos de pesquisa, hospitais e universidades, sendo: 7 da China, 2 da Itália, 2 dos Estados Unidos da América e um em cada um dos seguintes países: Espanha, Suíça, Austrália, Irã, Rússia, Alemanha. Dentro desses dados, 7 dos artigos analisados não trouxeram dados sobre a origem dos pacientes estudados.

## MicroRNAs ENVOLVIDOS NO MELANOMA MALIGNO

Os estudos incluídos demonstraram associação entre os níveis de expressão dos 108 microRNAs circulantes e o desenvolvimento do melanoma maligno. Desses, 15 estavam superexpressos, 54 estavam hiperexpressos, 28 estavam hipoexpressos, 2 estavam indiferentes e 9 não tiveram sua expressão nos tecidos com melanoma maligno relatados. Além disso, observou-se que 53 microRNAs estavam a favor da melanogênese, 53 estavam contrários a esse evento e 2 microRNAs não tiveram suas funções esclarecidas.

Os microRNAs que foram mais citados e estudados pelos artigos analisados, em ordem decrescente, foram: o *miR-125b*, citado em 6 artigos; o *miR-222*, mencionado em 5 estudos; o *miR-155*, *miR-100* e *miR-221* que apareceram em 4 artigos; o *miR-21*, *miR-146a*, *miR-200c* e *miR-211* foram relatados cada um em 3 artigos; os demais microRNAs estiveram presentes em dois ou um dos 24 artigos analisados.

Dentre os principais microRNAs ditos como protetores contra o surgimento, proliferação ou progressão do melanoma cutâneo maligno, foram identificados: o *miR-205*, *miR-137*, *miR-186*, *miR-466-5p* e *miR-145-5p*.

Assim, o *miR-205* teve sua participação, principalmente, na inibição da proliferação celular e promoção de apoptose. Em relação ao *miR-137*, indivíduos com seus níveis aumentados obtiveram melhor prognóstico e agressividade reduzida da doença. O *miR-186*, por sua vez, teve seu papel identificado pela interrupção do ciclo celular e mitose de células melanocíticas. Além desses, o *miR-466-5p* demonstrou importante papel na inibição da invasão celular. Já o *miR-145-5p* se revelou como um indutor da apoptose celular do melanoma, ao inibir as vias MAPK; além disso, ele também inibe a proliferação e a migração celular.

Em relação aos principais microRNAs ditos como facilitadores do surgimento, proliferação e progressão do melanoma cutâneo maligno, destacam-se: o *miR-301a*, *miR-214*, *miR-21*, *miR-4286* e *miR-148*.

Neste contexto, o *miR-301a*, quando superexpresso, teve participação na progressão de metástase e, conseqüentemente, em menor sobrevivência dos pacientes. Em relação ao *miR-214*, este se apresentou como um forte auxiliador da proliferação e invasão celular tumoral. Dessa maneira, o *miR-214*, quando presente em maiores



quantidades, indicou resistência ao tratamento medicamentoso, com vemurafenibe e selumetinibe. O importante *miR-21* esteve envolvido em uma das principais vias de surgimento do melanoma maligno (RAS-BRAF-MEK-ERK), sendo, portanto, um microRNA que tem participação ativa na gênese do tumor, principalmente, no bloqueio da apoptose e na proliferação celular. Entre as atividades desempenhadas pelo *miR-4286*, destacam-se: a proliferação e viabilidade dos oncócitos e a inibição da apoptose. Destaca-se também que o *miR-4286* está hiperexpresso em oncogenes e hipoexpresso em genes supressores de tumor. Por fim, o *miR-148* desempenha papel relevante na invasão celular, no entanto, ele encontra-se hipoexpresso nas células do melanoma.

Já o *miR-203* demonstrou efeito dual, agindo tanto como um indutor do melanoma maligno, em alguns estudos, e, em outras pesquisas, agindo contra essa enfermidade. Suas principais funções destacadas foram sua atuação como um transformador sobre os melanócitos, metástase, ação antioncogênica e supressão tumoral.

Os dados dos microRNAs podem ser vistos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características dos microRNAs envolvidos no melanoma maligno (MM). Revisão sistemática, 2022.

Nº	Autor / Ano	microRNAs estudados	Função	Expressão em tecidos com MM
1	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Polini et al., 2019; Varamo et al., 2017	211	Supressão de tumor, regulação melanocítica e diminuição da invasividade	Hiperexpresso
2	Komina et al., 2016	4286	Proliferação e viabilidade de células cancerígenas; inibe a apoptose	Hiperexpresso em genes promotores de tumor e hipoexpresso em genes supressores de tumor
3	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	145	Supressão da proliferação celular e migração	Hiperexpresso
4	Zhao, Wei e Guo, 2020	107	Reduz a proliferação celular de células cancerígenas. Reduz a via de sinalização POU3F2	Hipoexpresso
5	Li et al., 2016; Peres et al., 2017	137	Supressor de tumor; indicador de pior prognóstico, (mecanismo não esclarecido, hipótese	Hipoexpresso

			principal é que age inibindo a via MITF	
6	Mumford et al., 2018; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Felli et al., 2016; Varamo et al., 2017	221	Aumenta a proliferação regulando o ciclo celular p27 na linhagem celular de melanoma; oncogene	Hipoexpresso
7	Mumford et al., 2018. Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Felli et al., 2016; Varamo et al., 2017; Motti et al., 2020	222	Aumenta a proliferação celular	Hiperexpresso
8	Melnik et al., 2020; Thyagarajan Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	21	Inibe os principais supressores de tumor da via de sinalização RAS-BRAF, aumentando a proliferação e a progressão; induz à apoptose	Hiperexpresso
9	Sánchez-Sendra et al., 2020; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	205	Supressão tumoral agindo na proliferação celular; induz à apoptose	Hipoexpresso
10	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	196a	Progressão e invasão	Hiperexpresso
11	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	149*	Regulador oncogênico; indução à apoptose	Hiperexpresso
12	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020; Varamo et al., 2017; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	155	Inibe a proliferação celular do melanoma, tem como alvo os novos mecanismos de escape imune do melanoma no microambiente inflamatório	Superexpresso
13	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	506-514	Transformação de melanócitos e crescimento do melanoma	Superexpresso
14	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	218	Transformação de melanócitos e crescimento do melanoma	Superexpresso
15	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	206	Parada do ciclo celular G1 e inibe a proliferação celular	Superexpresso

16	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	143	Parada do ciclo celular G1 e inibe a proliferação celular	Hipoexpresso
17	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	9	Proliferação celular e migração	Hiperexpresso, mas está frequentemente perdido no MM
18	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	145	Supressão da proliferação celular e da migração	Hiperexpresso
19	Felli et al., 2016; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	126 & 126*	Progressão do melanoma	Hiperexpresso
20	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	494	Aumenta a expressão de células supressoras derivada de mielóide expandidos no tumor	Hiperexpresso
21	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	182	Modulação epigenética, metástase e invasão celular	Hiperexpresso
22	Varamo et al., 2017	148	Invasão celular	Hipoexpresso
23	Sahranavardfard et al., 2019; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	203	Transformação de melanócitos; metástase Supressão tumoral	Hipoexpresso
24	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	15/16	Inibição da viabilidade celular	Hipoexpresso
25	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	1908	Metástase	Não relatado
26	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	365	Inibição da invasão celular e metástase	Hipoexpresso
27	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	194	Inibição da proliferação celular e metástase	Superexpresso
28	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	124	Inibição da invasão celular	Hipoexpresso
29	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	141	Inibição da viabilidade celular	Hipoexpresso
30	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	Família de miR-96/182	Inibição da viabilidade celular	Hiperexpresso
31	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	32	Supressor tumoral e exibe efeitos sinérgicos com vemurafenibe	Hipoexpresso
32	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	7	Reversão da resistência à terapia direcionada	Hipoexpresso

33	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Wang et al., 2019	100	Restauração da resistência ao vemurafenib; envolvido na aquisição de resistência do melanoma a inibidores de checkpoint imunológico; inibidor de metástase	Hiperexpresso
34	Polini et al., 2019	4731	Supressão tumoral	Hiperexpresso
35	Motti et al., 2020	28	Envolvido na aquisição de resistência do melanoma a inibidores do checkpoint imunológico	Hiperexpresso
36	Polini et al., 2019	1280	Supressão tumoral	Superexpresso
37	Varamo et al., 2017; Wang et al., 2019	150	Classificar os pacientes com MM em alto e baixo risco de recorrência; Inibição da metástase	Hiperexpresso
38	Polini et al., 2019	210	Oncogene	Hiperexpresso
39	Motti et al., 2020	1246	Envolvidos na aquisição de resistência de células do melanoma à inibidores de MAPK	Hiperexpresso
40	Motti et al., 2020	4443	Envolvidos na aquisição de resistência de células do melanoma à inibidores de MAPK	Hiperexpresso
41	Motti et al., 2020	4488	Envolvidos na aquisição de resistência de células do melanoma à inibidores de MAPK	Hiperexpresso
42	Prabhakar et al., 2019; Varamo et al., 2017	214	Contribui para a progressão do tumor de melanoma através da supressão do TFAP2C	Hiperexpresso
43	Su et al., 2018	186	Inibe a proliferação das células de melanoma e causam a parada do ciclo celular; suprime a migração e invasão de células melanocítica; supressor de tumor	Superexpresso
44	Motti et al., 2020; Polini et al., 2019	211-5p	Supressor de tumor, envolvido na aquisição de resistência de células de melanoma à inibidores de MAPK	Hiperexpresso
45	Liu et al., 2017; Polini et al., 2019	145-5p	Inibição da proliferação, invasão e migração celular; induz a apoptose celular do	Hipoexpresso

			melanoma inibindo as vias MAPK	
46	Andrews et al., 2016	29b-3p	Regula o fenótipo celular, não sabe sua função no melanoma, mas tem sido associado a prognósticos adversos, pode estar regulando a invasão celular no melanoma	Não relatado
47	Zou et al., 2018	4633-5p	Inibe a invasão celular	Superexpresso
48	Polini et al., 2019	221-3p	Oncogene; biomarcador útil para estadiamento do MM; medeia a atividade do resveratrol	Hipoexpresso
49	Polini et al., 2019	205-5p	Supressão tumoral	Superexpresso
50	Polini et al., 2019	16-5p	Supressão tumoral	Hiperexpresso
51	Polini et al., 2019	200c-3p	Supressão tumoral	Hiperexpresso
52	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	Let-7a	Invasão celular	Hiperexpresso
53	Polini et al., 2019	193-3p	Supressão tumoral	Superexpresso
54	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020	Let-7e	Atividade protumoral pela conversão de monócitos em MDSC. Resposta reduzida aos inibidores de PD-1 e CTLA-4; reposta reduzida ao ipilimumab e nivolumab	Hiperexpresso
55	Polini et al., 2019	9-5p	Supressão tumoral	Hiperexpresso
56	Polini et al., 2019	126-5p	Supressão tumoral	Hiperexpresso
57	Motti et al., 2020	126-3p	Envolvidos na aquisição de resistência de células do melanoma à inibidores de MAPK	Hipoexpresso
58	Polini et al., 2019	30b-5p	Oncogene	Superexpresso
59	Motti et al., 2020; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	34a/c	Regulação da imunidade inata no melanoma; envolvido na aquisição de resistência do melanoma à inibidores de checkpoint imunológico	Hiperexpresso
60	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	34b	Invasão celular e motilidade	Hipoexpresso

61	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	34b/c	Suprime a invasividade e metástase	Hiperexpresso
62	Polini et al., 2019	182-5p	Oncogene	Superexpresso
63	Sun et al., 2020	148b	Supressor do comportamento biológico maligno do melanoma inibindo a SIRT7	Hiperexpresso
64	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	148a	Regulação da metilação do DNA, mas é incerto o seu efeito	Hipoexpresso
65	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	30b/d	Invasão celular e supressão imune	Hiperexpresso
66	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	302c	Toxicidade mediada por células natural killers para células tumorais	Hipoexpresso
67	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	520c	Toxicidade mediada por células natural killers para células tumorais	Hipoexpresso
68	Motti et al., 2020; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	200c	Inibe a progressão do melanoma e a resistência aos medicamentos	Hiperexpresso
69	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	Let-7b	Regulação do ciclo celular e proliferação	Hiperexpresso
70	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	193b	Regulação do ciclo celular e proliferação	Hiperexpresso
71	Motti et al., 2020; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	106b	Parada do ciclo celular G1 e inibição do crescimento; envolvido na aquisição de resistência do melanoma a inibidores de checkpoint imunológico.	Hipoexpresso
72	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	200c/a	Morfologia e plasticidade das células	Hipoexpresso
73	Polini et al., 2019	15b-5p	Oncogene	Superexpresso
74	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	15a	Inibe o crescimento e a invasão	Hiperexpresso
75	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	15b	Indução à apoptose	Hiperexpresso

76	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	10b	Metástase	Hiperexpresso
77	Motti et al., 2020	199b-5p	envolvidos na aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	Hipoexpresso
78	Varamo et al., 2020	199a	Invasão celular	Hiperexpresso
79	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	199a-5p	Promove a metástase	Hiperexpresso
80	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Varamo et al., 2017	199a-3p	Promove a metástase	Hiperexpresso
81	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	30- BasedRNAinterferência	Metástase	Não relatado
82	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	339-3p	Supressão de tumor e invasão celular	Não relatado
83	Andrews et al., 2016; Huber et al., 2018; Motti et al., 2020; Mumford et al., 2018; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Zhang et al., 2016	125b	Invasão celular	Hipoexpresso
84	Andrews et al., 2016; Svedman et al., 2018	125b-5p	Reduz a proliferação celular	Superexpresso
85	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020	125a	Envolvidos na aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	Hiperexpresso
86	Motti et al., 2020	125a-5p	Envolvido na aquisição de resistência do melanoma à inibidores de checkpoint imunológico	Não relatado
87	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018; Wang et al., 2019	29c	Regula mecanismos de ação da combinação de Temsirolimus e Bevacizumab; inibe a metástase	Hiperexpresso
88	Motti et al., 2018; Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018	514a	Modula a sensibilidade BRAFi; envolvido na aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	Superexpresso
89	Motti et al., 2018;	579-3p	Resistência a terapia alvo/envolvidos na	Hipoexpresso

	Thyagarajan, Shaban e Sahu, 2018		aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	
90	Polini et al., 2019	28-5p	Supressão tumoral	Não relatado
91	Motti et al., 2020; Polini et al., 2019	204-5p	Supressão tumoral/envolvidos na aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	Hipoexpresso
92	Polini et al., 2019	33a-5p	Supressão tumoral	Hipoexpresso
93	Varamo et al., 2017	33a	classificar os pacientes com MM em alto e baixo grupo de risco de recorrência	Hiperexpresso
94	Polini et al., 2019	425-5p	Supressão tumoral	Não relatado
95	Motti et al., 2020; Varamo et al., 2017	532-5p	Envolvido na aquisição de resistência de melanoma a inibidores de checkpoint imunológico	Hiperexpresso
96	Polini et al., 2019	150-5p	Desconhecido/incerto	Não relatado
97	Polini et al., 2019	301a-3p	Oncogene	Hiperexpresso
98	Motti et al., 2020	550a-3-5p	Envolvidos na aquisição de resistência de células de melanoma a inibidores de MAPK	Hipoexpresso
99	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020	99b	Envolvido na aquisição de resistência de melanoma a inibidores de checkpoint imunológico	Hiperexpresso
100	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020; Varamo et al., 2017	146a	Envolvido na aquisição de resistência de melanoma a inibidores de checkpoint imunológico e na regulação da ativação de células mieloides clássicas e alternativas	Hiperexpresso
101	Huber et al., 2018; Motti et al., 2020	146b	Envolvido na aquisição de resistência de melanoma a inibidores de checkpoint imunológico e na regulação da ativação de células mieloides clássicas e alternativas	Hiperexpresso
102	Wang et al., 2019	142-3p	Inibe a metástase	Hiperexpresso
103	Wang et al., 2019	516a-2	Inibe a metástase	Hiperexpresso



104	Komina et al., 2016	3591-3p	Envolvido na carcinogênese	Hiperexpresso
105	Komina et al., 2016	513a-5p	Envolvido na carcinogênese	Indiferente
106	Komina et al., 2016	363-3p	Envolvido na carcinogênese	Indiferente
107	Cui et al., 2016	301a	Metástase, crescimento e formação de colônias	Hiperexpresso
108	Svedman et al., 2018	497-5p	Supressor de tumor	Não relatado

## DISCUSSÃO

### ***MicroRNAs protetores: ação contra o surgimento e progressão da doença miR-205***

O *miR-205* pode afetar a expressão de alguns genes no melanoma humano (tipo A375). Ao realizar uma análise de um tecido controle doente, com a superexpressão deste microRNA, observou-se alterações biológicas importantes, como: regulação negativa na proliferação celular e redução de RNA mensageiros participantes de genes tumorais. Dentre os genes, significativamente, relacionados com o *miR-205*, foram identificados os genes: *INPPL1*, *ATF4* e *BTBD3*. Na presença da superexpressão do *miR-205* esses genes foram regulados negativamente, o que levou a menores processos metastáticos e menor resistência à insulina. Cabe ressaltar que os que tiveram inibição do gene *INPPL1* obtiveram, significativamente, melhor sobrevida, tanto em relação à redução da metástase, quanto à própria agressividade do melanoma em si, demonstrando um fator prognóstico importante. Concluindo que, quanto maior a quantidade de *miR-205*, menor a chance de metástase e maior a chance de sobrevida (11).

### ***miR-137***

Ao analisar a expressão quantitativa de *miR-137*, por reação em cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR), demonstrou-se que tecidos com melanoma cutâneo maligno apresentaram valores reduzidos deste microRNA, em comparação a células normais. Clinicamente, isso indica que os casos com menores quantidades do *miR-137* apresentaram estágio avançado da doença, bem como o aparecimento de

úlceras. Além disso, pacientes com baixa expressão do *miR-137* obtiveram prognóstico desfavorável. Pacientes com melanoma cutâneo foram acompanhados por 60 meses, sendo que 53 vieram a óbito, e, destes, 49 estavam no grupo de baixa expressão do microRNA. Com isso, a presença desse RNA pode ser dita como fator protetor contra a expressão do melanoma, sendo um importante supressor tumoral, em vários tipos de tumores, como: o melanoma, o câncer de pulmão de não pequenas células e o câncer gástrico. Além disso, sua ausência / redução é um fator prognóstico ruim na sobrevida do paciente (13).

### ***miR-186***

Na comparação entre o melanoma cutâneo maligno e um melanócito hígido, observou-se que menores quantidades de *miR-186*, no primeiro grupo. Esse microRNA está relacionado, principalmente, como fator protetor contra o aparecimento do melanoma maligno, visto que ele atua na inibição da proliferação de oncócitos, interrompendo seu ciclo celular e impede a migração / invasão. Apesar dessa afirmativa, alguns estudos demonstraram que o microRNA em questão apresenta função positiva na formação do tumor, devendo ser realizadas novas pesquisas para identificar sua verdadeira atuação na gênese do câncer (14).

### ***MicroRNAs promotores da doença***

#### ***miR-301a***

Inicialmente, foi realizada a comparação de nevo melanocítico benigno (BNM) e melanoma maligno (MM) contendo a presença do *miR-301a*. Nos tecidos estudados, observou-se, significativamente, maiores quantidades deste microRNA no melanoma cutâneo. Além disso, ao se comparar melanomas que sofreram metástase e aqueles que não sofreram, observou-se que o primeiro grupo apresentava superexpressão do *miR-301a*. Dessa forma, entende-se que pacientes, com a presença de maiores quantidades de *miR-301a*, obtiveram sobrevida global reduzida, sugerindo que a regulação positiva desse tipo de RNA desempenha papel na progressão da doença. Especificamente sobre sua atuação, observou-se que no melanoma humano (tipo A375), a presença do *miR-301a* participou no aumento da proliferação, capacidade

migratória e invasão celular, além disso, sua ausência permitiu maior apoptose de células tumorais. Esse processo estaria relacionado, principalmente, ao gene *PTEN*, gene supressor de tumor que tem seu mRNA e suas proteínas inibidas na presença do *miR-301a*. Em relação ao tratamento, objetivou-se investigar se o *miR-301a* teria capacidade de proteger as células MM contra agentes quimioterápicos e sua ação citotóxica, usando agentes quimioterápicos, como o CDDP (*cis-diaminodicloroplatin*), composto da cisplatina e ADR, composto da adriamicina. Assim, pela análise de citometria de fluxo, observou-se que a apoptose foi, significativamente, menor naquelas células que apresentavam maiores quantidades de *miR-301a*, sugerindo sua participação na diminuição da quimiossensibilidade das células tumorais (15).

### ***miR-214***

Existe importante relação entre a via de sinalização  $\beta$ -catenina e o *miR-214*, na progressão do melanoma cutâneo maligno. Essa via atua na inibição da proliferação e migração celular e auxilia na polaridade celular. Em um tecido melanocítico, pode ocorrer desregulação da via da  $\beta$ -catenina, cursando com mutações no mRNA. Dessa forma, ao induzir a superexpressão de *miR-214* em linhagem de melanoma metastáticos, observou-se redução de 50% dos RNA mensageiros de  $\beta$ -catenina. Assim, o aumento nos níveis do microRNA estudado está relacionado ao *feedback* positivo na proliferação e migração celular tumoral, sendo observado por ensaios MTT, na linhagem de células MRA2 e MRA4. Curiosamente, tal aspecto não foi observado em linhagens MRA6, que, paradoxalmente, expressam maiores quantidades de *miR-214*. Esse fator fortalece a perspectiva de que a presença de um microRNA não é o único determinante para surgimento da doença ou que exista sítios de ligação diferentes desses microRNAs, dificultando sua atuação. Em relação ao tratamento, foi utilizado inibidores de *BRAF* V600E (vemurafenibe) e inibidores de *MEK* (selumetinibe), em células com superexpressão de *miR-214*, e células controle, com 1  $\mu$ M, por 72 horas, tendo redução, respectivamente, de 50% e 70%, na sobrevivência das células tumorais. Apesar dessa porcentagem, a presença do microRNA reduziu a sensibilidade dessas células a esses inibidores em cerca de 20% do valor citotóxico esperado, indicando resistência ao tratamento (16).

## ***miR-21***

O *miR-21* está relacionado com os principais genes envolvidos na tumorigênese e progressão do MM, tendo envolvimento na proliferação celular, invasão da doença e inibição da apoptose de células cancerígenas. Em comparação com nevos benignos, o melanoma cutâneo maligno expressou 8,6 vezes mais esse tipo de microRNA. Assim, como fator prognóstico, observa-se que a sobrevida dos indivíduos, com altos valores de *miR-21*, foi reduzida, significativamente, sendo o conjunto desses fatores um forte indicativo de que esse microRNA seja um oncomiR de melanoma. Além disso, importante aspecto do *miR-21* seria sua atuação inibitória diante dos principais supressores tumorais da via de sinalização RAS-BRAF-MEK-ERK. Essa via está ativada em situações como exposição crônica à radiação ultravioleta, fazendo com que ocorra maior proliferação e progressão da doença. Dessa forma, a expressão do *miR-21* é explicada, principalmente, pelas proteínas: STAT3 (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*) e AP-1 (do inglês, *activator protein-1*) (17).

Dentre os fatores ambientais que regulam positivamente o aparecimento do *miR-21*, podem ser mencionados: a radiação ultravioleta, pelo dano induzido ao DNA, o estresse oxidativo e a inflamação. Além disso, a radiação eletromagnética e a radiação ionizante cósmica também demonstraram estimular o aparecimento do microRNA estudado, visto que pilotos de avião que são submetidos a esses tipos de radiação apresentaram níveis elevados de *miR-21*. Em relação a fatores hormonais, os andrógenos apresentaram relação com a agressividade do câncer. Indivíduos com receptor androgênico positivo na célula do melanoma apresentaram menor sobrevida em comparação com aqueles negativos (17).

Dentre os tratamentos estudados que podem ser realizados menciona-se: a vemurafenibe, importante para o manejo dos casos de melanoma metastático, com mutação em *BRAF*; metformina, descrita como fármaco que reduz o crescimento de células MM *in vitro*; anti-*miR-21*, fármaco específico em reduzir o *miR-21*, denominado anti-*miR-21* mesil fosforamidato oligodesoxinucleotídeo, induzindo apoptose, redução da proliferação celular e impede a migração de células tumorais (17).

## ***miR-203***

Ao analisar as funções desenvolvidas pelo *miR-203*, observou-se que ele possui importante papel como indutor da progressão do melanoma maligno, nas células que estão em circulação. Entre os papéis desempenhados por esse microRNA, estão a sua extrema habilidade em repovoar células, na tumorigenicidade, na sua autorrenovação e no seu poder de levar a metástase celular. Além disso, destacou-se possível papel desempenhado pelo *miR-203*, nos oncócitos, preparando-os para uma segunda sementeira. Para ter essa demonstração dos papéis desempenhados pelo *miR-203*, utilizou-se linhagens celulares de melanoma humano A375, NA8 e D10.

Ao produzirem células com superexpressão do *miR-203*, perceberam que houve regulação positiva do gene *BRAF*, o que resultou em uma proliferação celular e sobrevivência de células do melanoma. Além do mais, destacou-se o aumento do tamanho das melanosferas e o número de colônias formadas, efeito direto da regulação positiva dos genes: *SOX2*, *KLF4* e *OCT4*, sendo eles os fatores transcricionais principais na regulação da habilidade pluripotente de uma célula. Foi notado que os níveis de *miR-203* diferem no soro, a depender dos padrões dos tecidos avaliados, conseqüentemente, isso poderá elucidar sobre o seu papel importante na indução de células-tronco do melanoma ou até mesmo nas células invadidas por melanoma. Por fim, a regulação negativa do gene *CDH1* e regulação positiva dos genes *VIM* e *SNAI1*, após a superexpressão do *miR-203*, resultou em um aumento da motilidade das células (18).

## **CONCLUSÃO**

Observa-se que o melanoma cutâneo maligno apresenta em sua fisiopatogenia o envolvimento de mecanismos multifatoriais. Dentre esses, a epigenética, em especial, os microRNAs demonstraram funções relevantes em diferentes aspectos da doença. Destaca-se que mais de 100 microRNAs já foram identificados como participantes do melanoma cutâneo maligno, entretanto, estudos futuros são necessários para elucidar suas funções e, talvez, identificar novos tipos desses RNAs.

Em relação aos microRNAs analisados, esses podem ser divididos entre promotores do desenvolvimento da doença e protetores contra sua formação. Assim, microRNAs promotores podem agir de diferentes formas no melanoma cutâneo maligno, como: aumento da proliferação celular, redução da apoptose de oncócitos, resistência ao tratamento farmacológico, diminuição da sobrevida dos pacientes, aumento da agressividade / invasão do câncer e pior prognóstico. Outros microRNAs, por sua vez, podem agir a favor da não progressão do câncer, por meio: de inibição da proliferação celular, redução da formação de mRNA de genes tumorais, evitar metástase, apresentar relação com o aumento da sobrevida e com diminuição da agressividade dos sintomas.

## Referências Bibliográficas

1. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366–79.
2. Mannavola F, D'oronzio S, Cives M, Stucci LS, Ranieri G, Silvestris F, et al. Extracellular vesicles and epigenetic modifications are hallmarks of melanoma progression. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1).
3. Sang Y, Deng Y. Current insights into the epigenetic mechanisms of skin cancer. *Dermatol Ther.* 2019;32(4).
4. Population I, Population M, Sum P. International Agency for Research on Cancer. *WHO Chron.* 1969;23(7):323–6.
5. Obrador E, Liu-Smith F, Dellinger RW, Salvador R, Meyskens FL, Estrela JM. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biol Chem.* 2019;400(5):589–612.
6. Hsieh CC, Shen CH. The Potential of Targeting P53 and HSP90 Overcoming Acquired MAPKi-Resistant Melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(3).
7. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK signaling pathway in melanoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1–37.
8. Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. *Lab Investig.* 30 de agosto de 2014;94(8):822–38.
9. Kato S, Weng QY, Insko ML, Chen KY, Muralidhar S, Pozniak J, et al. Gain-of-Function Genetic Alterations of G9a Drive Oncogenesis. *Cancer Discov.* julho de 2020;10(7):980–97.
10. Varamo C, Occelli M, Vivenza D, Merlano M, Lo Nigro C. MicroRNAs role as potential biomarkers and key regulators in melanoma. *Genes Chromosom Cancer.* 2017;56(1):3–10.
11. Sánchez-Sendra B, Serna E, Navarro L, González-Muñoz JF, Portero J, Ramos A, et al. Transcriptomic identification of miR-205 target genes potentially involved in metastasis and survival of cutaneous malignant melanoma. *Sci Rep.* 16 de dezembro de 2020;10(1):4771.
12. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (prisma-p) 2015: Elaboration and explanation. *BMJ.* 2015;349(January):1–25.
13. Li N. Low expression of mir-137 predicts poor prognosis in cutaneous

- melanoma patients. *Med Sci Monit.* 2016;22:140–4.
14. Su BB, Zhou SW, Gan C Bin, Zhang XN. MIR-186 inhibits cell proliferation and invasion in human cutaneous malignant melanoma. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(8):S60–4.
  15. Cui L, Li Y, Lv X, Li J, Wang X, Lei Z, et al. Expression of MicroRNA-301a and its Functional Roles in Malignant Melanoma. *Cell Physiol Biochem.* 2016;40(1–2):230–44.
  16. Prabhakar K, Rodriguez CI, Jayanthi AS, Mikheil DM, Bhasker AI, Perera RJ, et al. Role of miR-214 in regulation of  $\beta$ -catenin and the malignant phenotype of melanoma. 2020;58(11):1–19.
  17. Melnik BC, John SM, Carrera-Bastos P, Schmitz G. MicroRNA-21-enriched exosomes as epigenetic regulators in melanomagenesis and melanoma progression: The impact of western lifestyle factors. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):1–40.
  18. Sahranavardfard P, Firouzi J, Azimi M, Khosravani P, Heydari R, Emami Razavi A, et al. MicroRNA-203 reinforces stemness properties in melanoma and augments tumorigenesis in vivo. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20193–205.



**Anexo 1. Protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis*)**

**PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols) 2015 checklist: recommended items to address in a systematic review protocol\***

Section and topic	Item No	Checklist item
<b>ADMINISTRATIVE INFORMATION</b>		
Title:		
Identification	1a	Identify the report as a protocol of a systematic review
Update	1b	If the protocol is for an update of a previous systematic review, identify as such
Registration	2	If registered, provide the name of the registry (such as PROSPERO) and registration number
Authors:		
Contact	3a	Provide name, institutional affiliation, e-mail address of all protocol authors; provide physical mailing address of corresponding author
Contributions	3b	Describe contributions of protocol authors and identify the guarantor of the review
Amendments	4	If the protocol represents an amendment of a previously completed or published protocol, identify as such and list changes; otherwise, state plan for documenting important protocol amendments
Support:		
Sources	5a	Indicate sources of financial or other support for the review
Sponsor	5b	Provide name for the review funder and/or sponsor
Role of sponsor or funder	5c	Describe roles of funder(s), sponsor(s), and/or institution(s), if any, in developing the protocol
<b>INTRODUCTION</b>		
Rationale	6	Describe the rationale for the review in the context of what is already known
Objectives	7	Provide an explicit statement of the question(s) the review will address with reference to participants, interventions, comparators, and outcomes (PICO)
<b>METHODS</b>		
Eligibility criteria	8	Specify the study characteristics (such as PICO, study design, setting, time frame) and report characteristics (such as years considered, language, publication status) to be used as criteria for eligibility for the review
Information sources	9	Describe all intended information sources (such as electronic databases, contact with study authors, trial registers or other grey literature sources) with planned dates of coverage
Search strategy	10	Present draft of search strategy to be used for at least one electronic database, including planned limits, such that it could be repeated
Study records:		

Data management	11a	Describe the mechanism(s) that will be used to manage records and data throughout the review
Selection process	11b	State the process that will be used for selecting studies (such as two independent reviewers) through each phase of the review (that is, screening, eligibility and inclusion in meta-analysis)
Data collection process	11c	Describe planned method of extracting data from reports (such as piloting forms, done independently, in duplicate), any processes for obtaining and confirming data from investigators
Data items	12	List and define all variables for which data will be sought (such as PICO items, funding sources), any pre-planned data assumptions and simplifications
Outcomes and prioritization	13	List and define all outcomes for which data will be sought, including prioritization of main and additional outcomes, with rationale
Risk of bias in individual studies	14	Describe anticipated methods for assessing risk of bias of individual studies, including whether this will be done at the outcome or study level, or both; state how this information will be used in data synthesis
Data synthesis	15a	Describe criteria under which study data will be quantitatively synthesised
	15b	If data are appropriate for quantitative synthesis, describe planned summary measures, methods of handling data and methods of combining data from studies, including any planned exploration of consistency (such as $I^2$ , Kendall's $\tau$ )
	15c	Describe any proposed additional analyses (such as sensitivity or subgroup analyses, meta-regression)
	15d	If quantitative synthesis is not appropriate, describe the type of summary planned
Meta-bias(es)	16	Specify any planned assessment of meta-bias(es) (such as publication bias across studies, selective reporting within studies)
Confidence in cumulative evidence	17	Describe how the strength of the body of evidence will be assessed (such as GRADE)

**\* It is strongly recommended that this checklist be read in conjunction with the PRISMA-P Explanation and Elaboration (cite when available) for important clarification on the items. Amendments to a review protocol should be tracked and dated. The copyright for PRISMA-P (including checklist) is held by the PRISMA-P Group and is distributed under a Creative Commons Attribution Licence 4.0.**

*From: Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, Shekelle P, Stewart L, PRISMA-P Group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols*