

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E REABILITAÇÃO  
PPGMHR

Hipóxia, Vesículas Extracelulares e RNAs Não Codificantes: Da  
Apneia Obstrutiva do Sono à Pesquisa Pré-Clínica em Câncer

JOÃO PEDRO RIBEIRO AFONSO

Anápolis, GO

2025

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E REABILITAÇÃO  
PPGMHR

Hipóxia, Vesículas Extracelulares e RNAs Não Codificantes: Da  
Apneia Obstrutiva do Sono à Pesquisa Pré-Clínica em Câncer

Projeto de pesquisa apresentado ao Exame de  
Defesa de Doutorado em Movimento Humano e  
Reabilitação da Universidade Evangélica de Goiás  
– UNIEVANGÉLICA.

Doutorando: João Pedro Ribeiro Afonso

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Giusepe Insalaco

Anápolis, GO

2025

A257

Afonso, João Pedro Ribeiro.

Hipóxia, vesículas extracelulares e RNAs não codificantes: da apneia obstrutiva do sono à pesquisa pré-clínica em câncer / João Pedro Ribeiro Afonso - Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, 2025.

77p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Giusepe Insalaco.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Movimento Humano e Reabilitação – Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, 2025.

1. Hipóxia    2. Apneia obstrutiva do sono    3. Câncer    4. MicroRNAs  
5. Vesículas extracelulares    I. Oliveira, Luís Vicente de    II. Insalaco, Giusepe  
III. Título

CDU 615.8

## Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, aos meus professores e amigos, cujo apoio incondicional e incentivo foram fundamentais ao longo desta jornada. Sem o carinho, a orientação e a amizade de cada um, este caminho teria sido muito mais desafiador.

## Agradecimentos

Agradeço à minha família por sempre me apoiar na realização dos meus sonhos, especialmente à minha mãe, Elaine Rodrigues, ao meu pai, Rossini Afonso, e ao meu irmão, Emival Junior, que me criaram com todo o carinho e dedicação, proporcionando-me uma base sólida para seguir em frente.

À minha namorada, Bruna Borges, agradeço pela paciência, compreensão e carinho ao longo dessa jornada, sempre estando ao meu lado nos momentos mais desafiadores e celebrando cada conquista comigo.

Sou imensamente grato ao meu orientador, professor Luis Vicente Franco de Oliveira, pela amizade, confiança e pelas oportunidades que sempre me foram dadas. Seu esforço e dedicação foram fundamentais desde o meu trabalho de conclusão de curso na graduação, passando pela dissertação de mestrado, até a construção da minha tese de doutorado.

Expresso minha profunda gratidão ao professor Dr. Giuseppe Insalaco por me receber no *Consiglio Nazionale delle Ricerche*, em Palermo – Itália. Também agradeço aos professores Alessia Lo Curto, Simona Taverna, Analisa Pinsino e Giuseppe Camaratta por contribuírem para minha formação e aprendizado durante minha estadia na Itália.

Aos meus colegas de laboratório, Ricardo Moura, Max Silva, Bruna Martins e Mirian Candida, agradeço pela parceria no dia a dia, pelo auxílio na rotina do laboratório e pelo apoio constante ao longo desse percurso.

Aos amigos da universidade, Roberto Alves, Giovana Lima, Elano Silva e Mariana Gontijo, agradeço por tornarem essa caminhada mais leve e divertida, tornando os desafios acadêmicos mais suportáveis com amizade e companheirismo.

Agradeço à Universidade Evangélica de Goiás e a todos os seus colaboradores pelo suporte essencial durante toda a minha formação acadêmica, proporcionando um ambiente propício para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Por fim, sou grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dos meus estudos, permitindo que eu pudesse me dedicar integralmente à pesquisa e à produção científica ao longo desses anos.

Meu sincero e muito obrigado a todos!

## Epígrafe

**"Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas conquistas." – Vincent Van Gogh**

## Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1 Hipóxia e Condições Patológicas Relacionadas.....	13
2.2 Comunicação Intracelular e Vesículas Extracelulares.....	14
3. Objetivo Geral.....	17
3.1Objetivos Específicos.....	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1 Estabulário de ouriços - do - mar.....	18
4.2 Cultura de células de Paracentrotus lividus.....	19
4.3 Extração de VEs de Paracentrotus lividus .....	20
4.4 Extração de VEs .....	20
4.5 Extração do RNA.....	20
5. Resultados e discussão .....	23
5.1 Extração de Vesículas Extracelulares .....	24
Artigo 1 .....	27
6. Considerações finais .....	71
7. Conclusão .....	72
8. Referências .....	73

## Resumo

A apneia do sono (AOS) pode ser definida como um distúrbio respiratório que resulta em episódios repetitivos de apneia, causando colapso das vias respiratórias durante o sono, resultando em um ambiente hipóxico a nível celular. A hipóxia é um componente fisiopatológico central em várias condições patológicas que resultam em incapacidade de longo prazo e morte. Evidências recentes sugerem vias de sinalização comuns em várias doenças, como câncer, síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) e obesidade. A SAOS no contexto da hipóxia intermitente, pode causar uma inflamação exacerbada no tecido adiposo, onde será liberado adipocinas pró-inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de síndromes metabólicas e um ambiente favorável ao câncer. O fator de transcrição induzível por hipóxia 1 (HIF-1), que é ativado em condições hipóxicas, desempenha um papel fundamental na ativação de vários mecanismos fisiopatológicos que além de agravar os sintomas pode desencadear um ambiente propício para o desenvolvimento de câncer. Os RNA não codificantes, (ncRNAs), empacotados em vesículas extracelulares (VEs), são mediadores importantes em vários processos biológicos. As VEs são um grupo heterogêneo de vesículas revestidas por bicamadas lipídicas liberadas por todas as células, que desempenham papéis importantes na comunicação intercelular. As VEs carregadas com ncRNAs desempenham um importante papel na comunicação celular, influenciando em processos patológicos em tecidos distantes e também em células cancerígenas. Estudos recentes destacaram que ncRNAs, incluindo RNA circular (circRNA), RNA longo não codificante (lncRNA) e microRNAs (miRNAs), são seletivamente selecionados em VEs, modulando aspectos específicos de doenças. O conceito emergente é que as redes de lncRNA-circRNA/miRNA/mRNA respondem à hipóxia para modificar a progressão da doença, com um grande grau de sobreposição entre diferentes condições fisiopatológicas. O principal objetivo desta pesquisa foi compreender os mecanismos moleculares de ação entre hipóxia intermitente e síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), bem como sua relação com o desenvolvimento e progressão do câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hipóxia, apneia obstrutiva do sono, Câncer, microRNAs, vesículas extracelulares

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Comparação entre métodos de extração de vesículas extracelulares .....	27
<b>Tabela 2.</b> Principais achados dos artigos incluídos na revisão.....	35

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estado da arte em biogênese e disseminação de EV no espaço extracelular .....	11
<b>Figura 2.</b> Estabulário de ouriços-do-mar do departamento de Farmacologia Translacional do Consiglio Nazionale delle Ricerche de Palermo. ....	14
<b>Figura 3.</b> Teste de quantificação de Nitrito utilizando o Kit Sera Test NO <sub>2</sub> .....	15
<b>Figura 4.</b> miRNeasy Micro Kit (Qiagen) utilizado para extração de RNA provenientes de VEs .....	18
<b>Figura 5.</b> Leitor de microplacas multimodo Spark® utilizado para realizar a quantificação do RNA extraído das Evs.....	18
<b>Figura 6.</b> Diagrama de fluxo da revisão sistemática atual conduzida de acordo com as diretrizes PRISMA.....	36

## **Lista de abreviaturas**

SAOS	Síndrome da Apneia obstrutiva do sono
ncRNAs	RNA não codificantes
VEs	Vesículas extracelulares
circRNA	Circular RNA
lncRNAs	RNA longo não-codificante
miRNAs	non-coding RNAs
HI	Hipóxia intermitente
AOS	Apneia obstrutiva do sono
HIF-1	Fator induzível por hipóxia
IMC	Índice de massa corporal
PBS	Circular RNAs
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EMT	Transição epitelial mesenquimal
TEXs	Exossomos derivados de tumores
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CH	Hipóxia crônica
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica

## 1. Introdução

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um distúrbio respiratório diretamente ligado ao sono, onde consiste em quadros de hipopneia e apneia durante a respiração (1). Mesmo sendo considerada uma doença comum, é muito complexa, devido a diversos fatores fisiológicos que podem estar relacionados, desencadeando diversas comorbidades, sendo considerada uma síndrome multifatorial que pode aumentar os índices de mortalidade (1,2).

Com isso, devido a redução da quantidade de oxigênio e interrupções sucessivas na respiração, o estado de hipóxia intermitente (HI) resulta em estresse oxidativo, gerando um dano endotelial e inflamação vascular. Além disso, o portador da síndrome pode desenvolver quadros patológicos e metabólicos crônicos, tais como obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (3). A hipóxia intermitente causa um perfil pro inflamatório no tecido adiposo, principalmente ao longo prazo, entretanto, os mecanismos moleculares que ocasionam essa condição ainda não foram descritos completamente (3,4).

Embora a fisiopatologia da inflamação do tecido adiposo na obesidade já esteja bem descrita na literatura, a interação entre hipóxia intermitente e essa inflamação e suas consequências metabólicas necessitam de um estudo maior. A etiologia complexa e variada implica os fatores de desenvolvimento da SAOS com a obesidade como um fator-chave em sua manifestação (5,6). Além disso, inflamações sistêmicas e vasculares com disfunções endoteliais podem causar diversas morbidades relacionadas com os sistemas cardiovascular e metabólico que influenciam diretamente na progressão do câncer (7)

Hipóxias crônicas e intermitentes têm sido consideradas fatores que exercem um papel fundamental na regulação de vários estágios de formação tumoral e suas progressões. Nos últimos anos, alguns estudos importantes mostraram que pacientes com SAOS tendem a ter maior prevalência e incidência de câncer e até mesmo maior prevalência de mortalidade relacionada ao câncer (8-12). Estudos *in vitro* mostraram que, na SAOS, existem propriedades pró-oncogênicas de hipóxia que são mediadas principalmente pelo aumento dos efeitos pós-traducionais do HIF. O HIF é um fator de transcrição que é capaz de regular a expressão de genes em resposta à diminuição do oxigênio celular (7).

RNAs não codificantes (ncRNAs) são biomarcadores potenciais promissores para diagnóstico devido ao seu papel em processos biológicos fundamentais, bem como suas

ligações com vários tecidos patológicos de interesse (7). Esses ncRNAs foram transcritos do DNA, mas não traduzidos para proteínas; no entanto, eles desencadeiam eventos importantes nos processos biológicos, como regulação epigenética, diferenciação celular, inflamação, apoptose, imunidade, metabolismo e sinalização celular (13). A presença seletiva de vesículas extracelulares (EVs) pode fazer com que essas moléculas sejam utilizadas como biomarcadores presentes na circulação sanguínea e fluidos biológicos. As EVs são partículas liberadas por células em diferentes estados fisiológicos e patológicos, podendo auxiliar no tratamento e diagnóstico de doenças (13,14).

Este trabalho pretende elucidar o mecanismo de ação entre hipóxia intermitente, síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) e sua relação com o desenvolvimento e progressão do câncer. Com isso, pretende-se entender os mecanismos moleculares relacionados às condições de hipóxia induzidos pela HI, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas. O estudo de RNAs não codificantes em vesículas extracelulares, como potenciais biomarcadores, possui um grande potencial e pode ser utilizado como um avanço no diagnóstico precoce e tratamento mais eficaz dessa interação complexa entre SAOS e câncer.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Hipóxia e condições patológicas relacionadas**

A hipóxia, caracterizada pela redução nos níveis de oxigênio nos tecidos, desempenha um papel importante em várias patologias, especialmente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular, contando com uma boa quantidade de estudos relacionados (15-18). Um estudo recente explorou a influência da hipóxia intermitente na apneia obstrutiva do sono (AOS) e sua associação com disfunção endotelial crônica. Os autores mostram que as vesículas extracelulares (VEs), especialmente aquelas derivadas de eritrócitos, desempenham um papel fundamental nesse ambiente. Essas VEs carregam miR-144, que é entregue às células endoteliais, reduzindo a expressão do fator nuclear eritroide 2 relacionado. O resultado é uma função endotelial prejudicada, ligada à hipóxia intermitente induzida pela AOS (19).

Além disso, a hipóxia intermitente foi associada à regulação positiva do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) através de vesículas extracelulares liberadas por

células hipóxicas de câncer de pulmão (20). Esses estudos revelaram que os VEs derivados de células hipóxicas de câncer de pulmão conseguem alterar a expressão de PD-L1 em macrófagos, causando imunossupressão. Isso indica que exista uma interação entre a hipóxia intermitente e o microambiente imunológico, influenciando a progressão do câncer (20).

Além das conexões com câncer e disfunção endotelial, a hipóxia está intimamente ligada ao envelhecimento celular e à progressão de doenças cardiovasculares. Estudos destacam que a hipóxia intermitente observada na AOS pode induzir mudanças no conteúdo de exossomos circulantes, exacerbando a senescência das células endoteliais. Esses exossomos, carregados com uma carga específica, podem iniciar e agravar o envelhecimento celular, possivelmente via vias relacionadas ao estresse oxidativo (21).

Por fim, a conexão entre hipóxia, AOS e aterosclerose tem sido objeto de investigação, principalmente em relação ao papel dos exossomos na comunicação intercelular. A hipóxia intermitente na AOS altera o perfil dos exossomos circulantes, impactando a permeabilidade e função das células endoteliais, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (22).

Essas descobertas destacam a complexidade e amplitude dos efeitos da hipóxia em diferentes condições patológicas, desde disfunções endoteliais até o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer, enfatizando a importância de investigar terapias potenciais que visem mitigar esses efeitos nocivos da hipóxia intermitente.

## **2.2 Comunicação intracelular e vesículas extracelulares**

A comunicação intracelular é um fenômeno complexo e fundamental para a coordenação de processos fisiológicos e a resposta a estímulos ambientais. Um componente significativo dessa comunicação é mediado pelas VEs (23). Estas são uma população heterogênea de vesículas de membrana geradas por diversos mecanismos, compreendendo subpopulações distintas, notavelmente ectossomos e exossomos (14) Figura 1. Os ectossomos, como oncosomas e microvesículas, são gerados na membrana

plasmática por brotamento externo, enquanto os exossomos são produzidos internamente na célula, no interior da via endocítica, por brotamento interno da membrana endossômica, formando estruturas vesiculares muito pequenas contidas no lúmen endossômico (24,25).

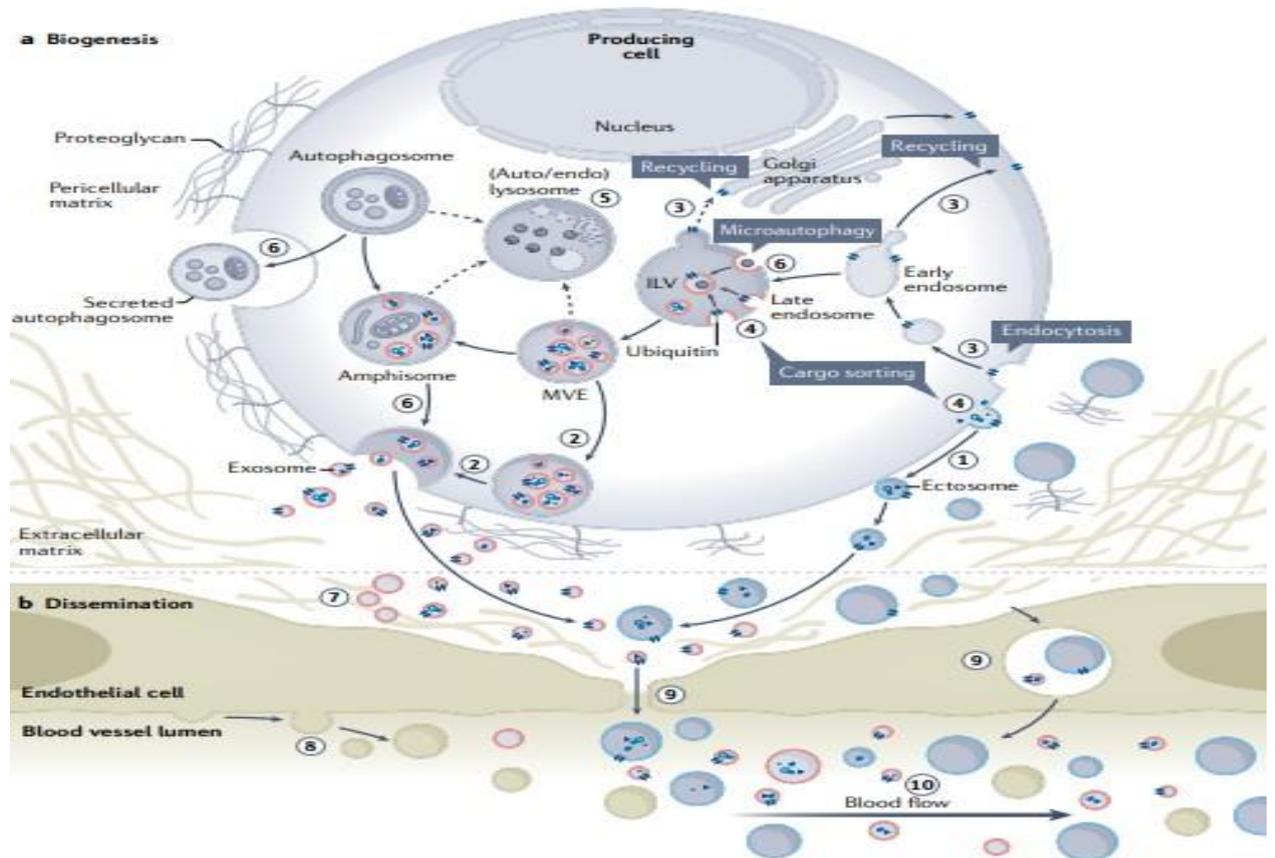


Figura 1: Estado da arte em biogênese e disseminação de EV no espaço extracelular. Fonte: Niel et al, 2021<sup>9</sup>.

A diferenciação precisa entre os subtipos de VEs é um desafio crucial. As estratégias atuais de isolamento se concentram em características como dimensão, concentração ou marcadores de superfície, porém não conseguem discernir com precisão a origem dos VEs, o que torna desafiador diferenciar exossomos e ectossomos (26). Ambos frequentemente compartilham semelhanças em sua composição e tamanho, dificultando a identificação clara entre eles. Esta falta de distinção levou a um uso mais amplo do termo geral "vesículas extracelulares", embora essa designação genérica, por vezes, carece de especificidade (26).

Além disso, a compreensão da formação das VEs representa um campo em constante desenvolvimento. A geração dessas subpopulações de vesículas ainda apresenta lacunas consideráveis. As etapas fundamentais, que incluem a formação de microdomínios na membrana carregados com conteúdos específicos, seguidas pelo

brotamento e separação para criar as vesículas, são reguladas por diversas máquinas moleculares (27). Estas, como a maquinaria ESCRT, a via de síntese da tetraspanina e as proteínas com domínio de arrestina, desempenham um papel crucial ao determinar a inclusão de conjuntos específicos de cargas nas VEs. Desregulações nessas máquinas podem interromper a formação de subpopulações distintas de VEs (27).

Embora muitos estudos tenham se concentrado nas cargas de membrana presentes na superfície das VEs, as informações no lúmen dessas estruturas também são fundamentais. A presença de material genético, como RNA mensageiro (mRNA) e microRNAs (miRNA), no lúmen das VEs, e seu processo de seleção para inclusão, ainda são tópicos emergentes (28). O reconhecimento de sequências específicas no material genético por proteínas de ligação a RNA parece ser um dos mecanismos envolvidos, mas a discriminação entre ácidos nucleicos contidos dentro ou associados às VEs é um desafio, especialmente durante procedimentos de isolamento pouco específicos (28).

Em adição aos ectossomos e exossomos, outras subpopulações de VEs foram recentemente descritas, incluindo migrassomos, autofagossomos secretórios e exóferos, ampliando o repertório de vesículas extracelulares (14). A identificação dessas vias de biogênese tem potencial para fornecer meios adicionais de discriminação entre os diferentes subtipos de VEs, abrindo portas para uma nomenclatura mais definida e uma melhor compreensão da biologia das VEs.

### **3. Objetivo Geral**

Elucidar o mecanismo de ação entre hipóxia intermitente, na síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), bem como sua relação com o desenvolvimento e progressão do câncer.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

Investigar os mecanismos moleculares que interligam a hipóxia intermitente da SAOS, e o desenvolvimento do câncer, com o propósito de identificar novas abordagens para diagnóstico e terapia.

Avaliar o potencial do estudo de RNAs não codificadores em vesículas extracelulares, como potenciais biomarcadores, para o diagnóstico precoce e tratamento mais eficaz da SAOS.

Realizar a extração das vesículas extracelulares (VEs) de ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*) e analisar seu potencial terapêutico relacionado com a hipóxia.

Analisar vesículas extracelulares (VEs) e microRNAs (miRNAs) em modelos animais submetidos a condições de hipóxia para compreender seu papel na progressão do câncer.

## 4. Material e métodos

A parte experimental do projeto foi desenvolvida no Consiglio Nazionale delle Ricerche na cidade de Palermo – Itália, no Instituto de Farmacologia Translacional. Os procedimentos foram realizados no estabulário de ouriços – do – mar e no laboratório de biologia e imunologia molecular. O desenvolvimento desta parte do projeto foi supervisionado pelo professor Dr. Giuseppe Insalaco.

### 4.1 Estabulário de ouriços-do-mar

Os ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*) eram mantidos em aquários com temperatura da água, pH, salinidade e nitrito controlados. Por serem animais sensíveis a alterações ambientais, o ambiente passava por um rigoroso controle diário com o objetivo de certificar que todos os parâmetros estavam dentro da normalidade.

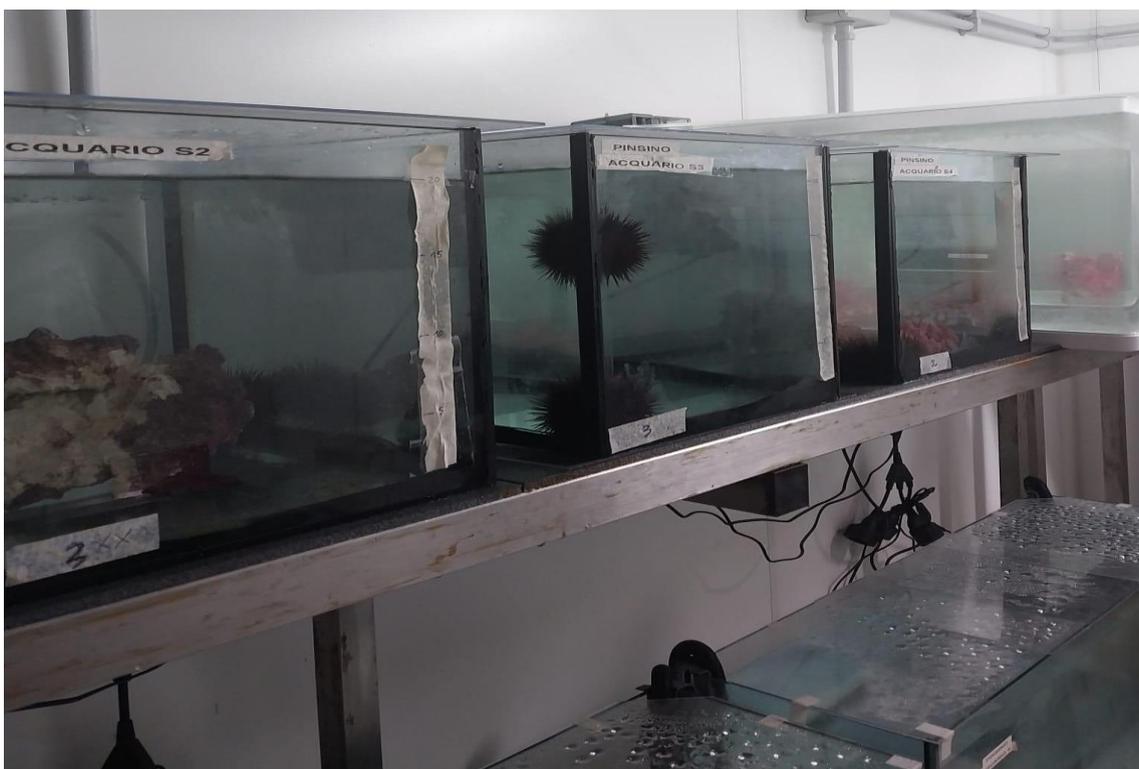


Figura 2 – Estabulário de ouriços-do-mar do departamento de Farmacologia Translacional do Consiglio Nazionale delle Ricerche de Palermo. Fonte: Afonso, 2024.

De início, era feita a medição da salinidade de cada aquário utilizando um Seawater Refractometer HI 96822, seguido do teste de nitrito. A densidade ideal da

água era de 1028 kg/m<sup>3</sup>. Quando a densidade estava muito alta, era necessário adicionar água deionizada, quando estava baixa, era adicionado água com cloreto de sódio.

Para o teste de nitrito, utilizava-se um kit Sera Test NO<sub>2</sub>, no qual foram gotejadas cinco gotas de dois reagentes em 5 mL de água de cada aquário. Caso a água adquirisse uma coloração amarelada, era necessário adicionar 5 microlitros da cultura bacteriana desnitrificante BLQ23 para o tratamento da água, caso se mantesse límpida, era um indicativo de que a quantidade de nitrito estava dentro da normalidade.



Figura 3 – Teste de quantificação de Nitrito utilizando o Kit Sera Test NO<sub>2</sub>. Fonte: Afonso, 2024.

#### 4.2 Cultura de células de *Paracentrotus lividus*

Para a coleta do celoma do ouriço-do-mar, o indivíduo era posicionado em um recipiente com água, facilitando o manuseio e a extração. A agulha era inserida na boca do ouriço, e então realizava-se a coleta de 3 mL de celoma, que era imediatamente transferido para um tubo contendo anticoagulante, mantendo sempre a proporção de 1:1.

Após a coleta, as células eram inseridas em poços de cultura e mantidas em uma estufa por 24 horas a 20°C, para simular a temperatura do mar. Posteriormente, foi feita uma lavagem com PBS (Phosphate-Buffered Saline), e as células foram pipetadas em câmaras de Neubauer para quantificação. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante contendo as vesículas extracelulares era coletado e armazenado a -80°C até o momento de uso.

### **4.3 Extração de VEs de *Paracentrotus lividus***

Para a extração e purificação de VEs foi utilizado o kit ExoQuick (System Biosciences, SBI).

Materiais Necessários

ExoQuick-TC (System Biosciences, SBI)

PBS estéril (sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ )

Tubos de 50 mL e 1,5 mL estéreis

Centrífuga refrigerada

Pipetas e ponteiros estéreis

Água livre de RNase (se for extrair RNA posteriormente)

### **4.4 Extração de VEs**

Primeiro foi feita a coleta de 50 ml do meio de cultura celular. Após isso, a amostra foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 4°C para remoção celular e submetida a uma segunda centrifugação a 2000 x g por 20 min a 4°C para remover os corpos apoptóticos. Posteriormente foi utilizado um filtro de 0,22 µm para remover impurezas grandes.

Para a precipitação das vesículas, 5 ml do meio condicionado foi transferido para um tubo estéril e foi adicionado 1 ml do ExoQuick –TC. Após isso, a solução foi misturada gentilmente e incubada por um período de 24 horas a 4°C. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 1500 x g por 30 min a 4°C, onde é possível visualizar um sobrenadante branco, que após ser descartado cuidadosamente com a pipeta, foi adicionado 500 uL de PBS e QIAzol para obtenção do RNA.

### **4.5 Extração do RNA**

Materiais utilizados

miRNeasy Micro Kit (Qiagen)

Etanol absoluto (96-100%)

Centrífuga refrigerada

Tubos estéreis de 1,5 mL e 2 mL

Pipetas e ponteiros livres de RNase

Água livre de RNase

Para a extração de RNA proveniente de vesículas extracelulares utilizando o miRNeasy Micro Kit (Qiagen), inicia-se com a lise das vesículas seguido de homogeneização. Primeiro, foi transferido 500  $\mu\text{L}$  do eluato das vesículas purificadas (obtido pelo protocolo exoEasy) para um tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de QIAzol Lysis Reagent diretamente com a amostra. Em seguida, a mistura foi vortexada por 30 segundos para realizar a lise celular e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a separação das proteínas do RNA.

A etapa seguinte consiste na fase de separação, utilizando a extração com fenol-clorofórmio. Foi adicionado 140  $\mu\text{L}$  de clorofórmio à mistura, agitando devagar por 15 segundos e incubando-se por 3 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi transferida para centrifugação a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , resultando na separação em três fases: a fase aquosa superior (transparente), que contém o RNA; a fase intermediária (branca), rica em proteínas e DNA; e a fase orgânica inferior (rosa), que contém lipídios. Aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo sem misturar com as outras camadas.

Para a precipitação do RNA, foi adicionado 1,5 volume de etanol absoluto ( $\sim 450 \mu\text{L}$ ) à fase aquosa e mistura a solução. A amostra foi transferida para uma coluna RNeasy MinElute acoplada a um tubo de coleta de 2 mL e centrifugada a  $12.000 \times g$  por 15 segundos à temperatura ambiente, descartando-se o fluxo após o procedimento.

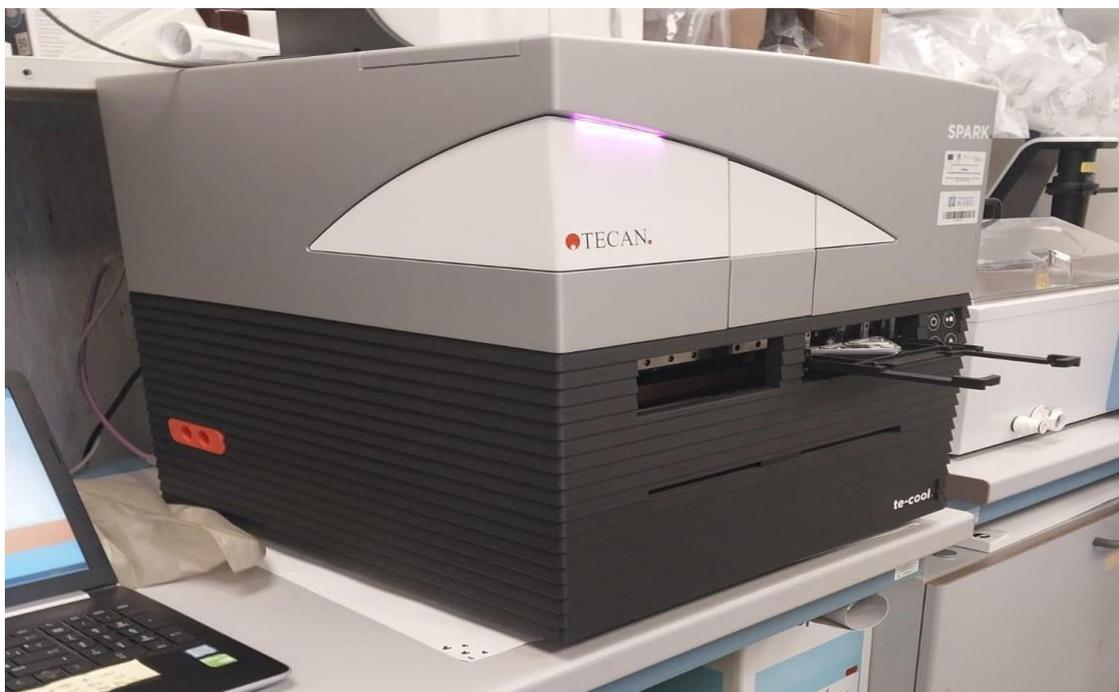
Para a fase de lavagem, foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de Buffer RWT à coluna, submetido à centrifugação a  $12.000 \times g$  por 15 segundos e descarte do fluxo através do recipiente. Em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de Buffer RPE, realizou-se outra centrifugação e o fluxo novamente foi descartado. Por fim, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80%, centrifugando a  $12.000 \times g$  por 5 minutos para garantir a secagem completa da membrana e a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL.

Na fase de eluição do RNA, foi pipetado 14  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase diretamente no centro da membrana da coluna, incubou por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar a  $12.000 \times g$  por 1 minuto para coletar o RNA purificado.

Após o procedimento de extração, o RNA foi quantificado através de um leitor de microplacas multimodo Spark® e foi armazenado a temperatura de -80°C até ser utilizado na próxima etapa do projeto.



**Figura 4** - miRNeasy Micro Kit (Qiagen) utilizado para extração de RNA provenientes de VEs. Fonte: Afonso, 2024



**Figura 5** - Leitor de microplacas multimodo Spark® utilizado para realizar a quantificação do RNA extraído das Evs. Fonte: Afonso, 2024.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Extração de Vesículas Extracelulares

As células de *P. lividius* foram coletadas, cultivadas e utilizadas para a extração das VEs e do seu RNA não codificante. O objetivo da extração das VEs, é utiliza-las como um possível tratamento para células cultivadas em condições hipóxicas ou células que expressam a proteína HIF, que regula a resposta e o desenvolvimento celular nessas condições. Essa hipótese foi levantada, devido ao *P. lividius* adultos viverem em locais com alto fluxo de  $CO_2$  e apresentarem uma alta capacidade antioxidante, um bom equilíbrio de oxidação celular e homeostase do sistema imunológico, proporcionando uma adaptação a vida em ambientes com baixos pH e condições hipóxicas (29,30).

A metodologia de extração de VEs utilizada neste trabalho foi a de precipitação polimérica, que utiliza polímeros hidrofílicos para gerar agregação das VEs que serão separadas por centrifugação posteriormente (31). Esse método possui algumas vantagens, por se tratar de um procedimento simples, relativamente barato, rápido, pode ser utilizado para a obtenção de VEs de amostras com grandes volumes e possui uma boa aplicabilidade em estudos clínicos (31).

Por outro lado, apresenta algumas limitações quando comparado com métodos que serão discutidos daqui em diante. A baixa especificidade devido a presença de proteínas e lipoproteínas podem comprometer a pureza da amostra. Além disso, muitos métodos de quantificação de VEs utilizam o índice de proteínas totais, a presença de contaminantes pode gerar uma quantificação pouco precisa. Devido a presença de contaminantes, é um método não recomendado para estudos que pretendem realizar ensaios funcionais com Evs (31). Entretanto, alguns outros métodos podem ser utilizados de acordo com a necessidade de cada experimento.

Existem vários métodos descritos na literatura para extração de VEs, como ultrafiltração, captura por imunoafinidade, ultracentrifugação, centrifugação por gradiente de densidade, precipitação baseada em polímeros e cromatografia de exclusão de tamanho (32). Ao trabalhar com essas moléculas deve ser observado a eficiência das técnicas de isolamento de VEs e o seu rendimento. Esses parâmetros estão relacionados com vários fatores como grau de pureza, rendimento, viabilidade das vesículas e custo-benefício.

Trabalhos que necessitem de vesículas com um alto grau de pureza podem recorrer a métodos como o de captura por imunoafinidade ou centrifugação de gradiente de densidade. O primeiro, consegue extrair vesículas com altos graus de pureza, entretanto, possui um custo elevado e pode ser aplicado apenas em menores quantidades de amostra (33). O segundo, além de conseguir uma extração com alta pureza, também é capaz de separar contaminantes como proteínas e lipoproteínas, entretanto, exige um tempo maior e equipamentos especializados (34,35).

No que se refere ao rendimento, o método de ultracentrifugação é o padrão ouro nesse requisito, além de não comprometer tanto a pureza, possibilita o trabalho com grandes quantidades de amostra (36). Uma desvantagem, é que devido ao alto número de rotações por minuto, as vesículas podem se agregar e sofrem danos que inviabilizam sua utilização (36,37). A técnica de precipitação baseada em polímeros também apresenta um alto rendimento, principalmente quando se utiliza fluidos biológicos, todavia, apresenta uma pureza baixa devido a coisolação de contaminantes presentes na amostra (38).

Método	Pureza	Rendimento	Custo	Tempo	Equipamento necessário
Precipitação polimérica	Média	Alto	Baixo	Rápido	Nenhum especializado
Ultracentrifugação	Alta	Médio	Alto	Demorado	Ultracentrifuga
Cromatografia de exclusão por tamanho	Alta	Médio	Médio	Médio	Colunas cromatográficas
Ultrafiltração	Média	Médio	Médio	Rápido	Filtros de membrana

Tabela 1 – Comparação entre métodos de extração de vesículas extracelulares.

## 5.2 Extração de RNA e implicações dos miRNAs na AOS e câncer

Em relação a extração do RNA, esse componente pode ser utilizado para testar diferentes MiRNAs e circRNAs com intuito de identificar sua presença e compreender os impactos relacionados a função fisiológica, e também, uma possível inibição de células hipóxicas ou cancerígenas. A extração de microRNAs é de grande importância para estudos que envolvem hipóxia e câncer, devido a capacidade que esses componentes têm de regular a resposta celular em diversas situações (39,40). Análises

de miRNAs foram realizadas para observar sua participação na regulação de processos patológicos como a AOS.

No contexto da AOS, alguns estudos mostram que os exossomos circulantes de pacientes portadores da condição estão diretamente relacionados com a indução de senescência em células endoteliais humanas (41,42). Esse efeito ocorre devido a maior expressão do gene p16 (CDKN2A), enquanto houve uma redução na expressão dos genes SIRT1 e SIRT6. Essas alterações, além de estarem diretamente relacionadas com a AOS, também sofrem influências do impacto dos miRNAs na expressão desses genes (42). Esses achados indicam que tanto a hipóxia quanto a OSA podem acelerar o envelhecimento vascular através de mecanismos relacionados com exossomos e estresse oxidativo, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Além desses efeitos, existe uma associação entre a gravidade da AOS e a incidência do câncer, entretanto deve ser considerado como um fator secundário, quando comparado com fatores como idade, IMC e tabagismo (43). No entanto, como a AOS crônica promove inflamação sistêmica, é possível que funcione como um fator de risco indireto criando um ambiente favorável ao crescimento tumoral (43). Um fator ainda pouco investigado por esses estudos que relacionam AOS e câncer é como a transição epitelial mesenquimal (EMT), é afetada sob os efeitos dessas condições patológicas (44). Estudos indicam que a EMT exerce um papel fundamental na remodelação da matriz extracelular e na formação de nichos pré-metástáticos, o que permite que as células tumorais entrem na circulação potencializando as chances de causarem metástases (44).

No contexto dos exossomos derivados de tumores (TEXs), além de atuarem na indução da EMT em outras células tumorais, são capazes de induzir a diferenciação de células-tronco em fibroblastos associados ao câncer, (CAFs) (45). Esses CAFs, também liberam exossomos capazes de ativar vias de sinalização promovendo migração celular e a progressão tumoral. Além disso, microRNAs oncogênicos contidos nos exossomos também regulam a EMT. Um exemplo é o miR-23a, que regula a expressão de E-caderina em câncer de pulmão (46,47).

Diante dessas evidências, é importante que estudos futuros que envolvam a OSA e o câncer aprofundem a investigação da função dos exossomos e dos miRNAs pois ainda é uma lacuna significativa na pesquisa. Muitos estudos já evidenciam como essas estruturas estão fortemente relacionadas com a modulação do microambiente tumoral e

metástases, além de estarem envolvidos com processos importantes como a angiogênese em tumores. Com isso, compreender melhor esses mecanismos podem oferecer insights importantes para o entendimento da fisiopatologia da doença e também para o desenvolvimento de novas terapias.

## **Artigo 1**

### ***Vesículas extracelulares induzidas por hipóxia e RNAs não codificantes no câncer: uma revisão sistemática da dinâmica tumoral e implicações terapêuticas em modelos animais pré-clínicos***

Afonso JPR<sup>1,2</sup>; Oliveira LVF<sup>2</sup>; Cammarata G<sup>1</sup>., Pinsino A<sup>1</sup>., Insalaco G<sup>1</sup>; Taverna S<sup>1</sup>;

1 Instituto de Farmacologia Translacional (IFT), Conselho Nacional de Pesquisa (CNR), 90146 Palermo, Itália.

2 Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, Programa de Pós-Graduação em Movimento Humano e Reabilitação. Anápolis, Brasil.

#### **Resumo**

O câncer é uma patologia heterogênea e dentre os fatores causais podemos destacar expressões gênicas que podem influenciar seu desenvolvimento. Técnicas moleculares que utilizam vesículas extracelulares (VEs) e RNAs não codificantes (Noncode RNA) se mostram de grande valia para a compreensão da progressão tumoral, seu diagnóstico precoce e até mesmo possíveis terapias. Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes Preferred Items for Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), e teve como objetivo principal avaliar os efeitos da hipóxia celular em diferentes tipos de câncer, exclusivamente em modelos animais, destacando o papel regulador dos miRNAs e circRNAs no desenvolvimento tumoral. Foi realizada uma revisão bibliográfica nas bases de dados PubMed/Medline e Scopus sem limitações de ano. A busca inicial encontrou 171 artigos. Após serem analisados conforme os critérios de inclusão e exclusão, restaram 25 estudos para compor a revisão. A análise dos dados mostra que os modelos animais fornecem insights detalhados sobre diferentes tipos de cânceres submetidos a condições hipóxicas. Além disso, os resultados sugerem que, em alguns tipos de câncer, a liberação de EVs pode facilitar a progressão do tumor e a metástase. Por outro lado, a manipulação da expressão do ncRNA causa mudanças significativas na resposta do tumor, o que sugere uma resposta terapêutica. Esta pesquisa mostra que o uso de modelos animais é essencial para explorar os mecanismos moleculares do câncer e estabelecer novas abordagens terapêuticas.

**Palavras-chave:** Hipóxia; Modelos animais; Vesículas extracelulares; RNAs não codificantes; Progressão tumoral

#### **1. Introdução**

O câncer é uma condição patológica heterogênea decorrente de vários fatores, incluindo expressão gênica desregulada e alterações no microambiente tumoral.<sup>1</sup> Pesquisas mostram que cerca de 3% das sequências codificadoras do DNA humano são

traduzidas em moléculas de proteína, mas mais de dois terços, 75%, são transcritas em RNAs não codificadores (ncRNAs).<sup>2</sup> Os ncRNAs foram estudados extensivamente ao longo dos anos, a maioria dos quais inclui microácidos ribonucleicos, microRNA (miRNAs), RNAs longos não codificadores (lncRNAs), RNAs circulares (circRNAs) e RNAs interativos com Piwi (piRNA), todos com funções distintas, predominantemente na regulação da expressão gênica.<sup>3-5</sup>

Fundamentalmente, com tecnologia de alto rendimento e alta precisão, como sequenciamento de genoma e bioinformática, a compreensão do câncer e seu processo biológico de desenvolvimento e tratamento melhorou muito.<sup>6</sup> Esses ncRNAs estão envolvidos em múltiplas atividades celulares, incluindo degradação do RNA alvo, inibição de fatores de transcrição e regulação de interações proteicas, contribuindo assim para o desenvolvimento de muitos cânceres.<sup>7</sup> Entre as muitas classes de ncRNAs, os miRNAs ganharam relevância crítica na biologia do câncer devido à sua capacidade de direcionar e inibir a expressão gênica, o que pode auxiliar na progressão e regressão do câncer.<sup>8</sup> Por outro lado, ncRNAs do câncer como lncRNAs e circRNAs são importantes na carcinogênese porque podem regular a expressão gênica no nível transcricional e interações proteicas por meio de sua ligação ao DNA, RNA ou proteínas.<sup>4</sup> Portanto, os ncRNAs são centrais para qualquer discussão sobre mudanças temporais na expressão gênica e podem servir como base para o desenvolvimento de regimes de tratamento para neoplasias.<sup>9</sup>

A deficiência de oxigênio, ou hipóxia, também é uma característica típica da grande maioria dos tumores sólidos com uma prevalência aproximada de 90%.<sup>10</sup> O microambiente hipóxico das células tumorais ativa fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs) que alteram a expressão de centenas de genes e facilitam a reprogramação metabólica da célula para condições de baixo oxigênio.<sup>11</sup> Os HIFs são essenciais para a reprogramação transcricional celular, especialmente em processos como a angiogênese; eles também promovem o crescimento do tumor e a resistência às terapias.<sup>12-15</sup> Essas alterações nas adaptações do tumor a esse ambiente deficiente em oxigênio se tornam um obstáculo no tratamento de cânceres, portanto, a necessidade de estudar HIFs na biologia do câncer se torna uma questão muito mais pertinente.<sup>16</sup>

Nesse contexto, as vesículas extracelulares (EVs) surgiram como uma área significativa de foco. Essas são uma classe de nanopartículas derivadas de células que

são liberadas das células e estão envolvidas na comunicação célula-célula, bem como em muitas funções na saúde e na doença, incluindo o câncer.<sup>17-19</sup> Elas também podem alterar o microambiente das células-alvo por meio de moléculas bioativas, como ncRNAs, miRNAs e circRNAs, que são de grande relevância no diagnóstico precoce e na vigilância do câncer.<sup>20</sup> Além da baixa toxicidade e biocompatibilidade, a capacidade dos EVs de se acumularem em sítios patológicos os torna candidatos ideais na pesquisa do câncer e no desenvolvimento terapêutico.<sup>21,22</sup> Para criar novas abordagens terapêuticas, é fundamental examinar a associação de ncRNAs e a regulação gênica nas condições de hipóxia. Com ou sem inflamação, a indução de ncRNAs em tumores tem crescido rapidamente, mostrando um quadro claro do tratamento baseado em ncRNAs de cânceres com e sem ambientes hipóxicos não tumorais.<sup>23,24</sup>

Devido à heterogeneidade de fatores que levam ao desenvolvimento do câncer, é necessário desenvolver modelos de estudo que demonstrem como esses processos funcionam. Embora os modelos *in vitro* ofereçam insights valiosos para uma melhor compreensão da doença, eles ainda apresentam limitações que impedem a avaliação precisa de seus efeitos no organismo. Portanto, modelos animais devem ser usados como um método valioso para observar a dinâmica dos fatores que levam ao desenvolvimento de cânceres em organismos vivos, permitindo a reprodução de interações celulares complexas, validação de biomarcadores e alvos terapêuticos.

Portanto, o trabalho atual visa avaliar os efeitos da hipóxia celular em diferentes tipos de câncer, exclusivamente em modelos animais, enfatizando o papel da regulação de miRNAs e circRNAs no desenvolvimento tumoral e sua função como um possível biomarcador e alvo terapêutico. A análise de modelos animais nos permite identificar padrões moleculares relacionados à expressão gênica e insights que modelos *in vitro* não são capazes de fornecer, confirmando a importância deste estudo para uma melhor compreensão do câncer em condições hipóxicas por meio de pesquisa translacional.

## **2. Metodologia**

Esta revisão sistemática foi conduzida seguindo as diretrizes Preferred Items for Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)<sup>25</sup> (Materiais Suplementares).

## **2.1. Critérios de Elegibilidade**

Somente estudos que usaram modelos animais para investigar a interação entre hipóxia, EVs e ncRNAs em diferentes tipos de câncer foram selecionados. Os estudos compararam condições hipóxicas e normóxicas para explorar o papel dos ncRNAs na progressão do tumor e respostas celulares ao estresse hipóxico. Artigos de revisão, estudos in vitro que não envolvem testes em animais, relatos de casos, séries de casos, opiniões e resumos foram excluídos.

## **2.2. Informações de Pesquisa**

Uma busca eletrônica de literatura foi conduzida no PubMed/Medline e Scopus sem limitações no ano de publicação em setembro de 2024. Além disso, uma busca manual das referências de estudos e especialistas foi conduzida para localizar quaisquer publicações não identificadas eletronicamente.

## **2.3. Estratégias de busca**

As seguintes palavras-chave e suas combinações foram usadas:

1 - "Hipóxia" OU Deficiências de Oxigênio OU Deficiência de Oxigênio OU Anoxemia) E ("Neoplasias" OU Tumores OU Neoplasia OU Neoplasias OU Neoplasia OU Tumor OU Câncer OU Cânceres OU Neoplasia Maligna OU Malignidade OU Malignidades OU Neoplasias Malignas OU Neoplasias Benignas OU Neoplasia Benigna)) E ("RNA, Circular" OU circRNA OU circRNAs OU RNA Circular OU RNAs Circulares OU RNA Circular Fechado OU RNA Intrônico Circular OU ciRNA)

2 - "Neoplasias" OU Tumores OU Neoplasia OU Neoplasias OU Neoplasia OU Tumor OU Câncer OU Cânceres OU Neoplasia Maligna OU Malignidade OU Malignidades OU Neoplasias Malignas OU Neoplasias Benignas OU Neoplasia Benigna) E ("Hipóxia" OU Deficiências de Oxigênio OU Deficiência de Oxigênio OU Anoxemia)) E ("Vesículas Extracelulares" OU Vesícula extracelular OU Exovesícula OU Exovesícula OU Corpos apoptóticos OU Corpo apoptótico)) E ("MicroRNAs" OU Micro RNA OU MicroRNA OU miRNA OU miRNAs OU RNA temporal pequeno OU stRNA OU MicroRNA primário OU pri-miRNA OU pri miRNA OU miRNA primário OU pre-miRNA OU pre miRNA)) E ("RNA, circular" OU circRNA OU circRNAs OU RNA circular OU RNAs circulares OU RNA circular fechado OU RNA intrônico circular OU ciRNA)

## **2.4. Seleção de estudos**

Os pesquisadores realizaram a seleção de estudos em um processo de duas etapas. Na fase um, JPRA e LVFO, dois autores avaliaram independentemente os títulos e resumos para procurar estudos que atendessem aos critérios de elegibilidade. Os pesquisadores incluíram estudos que atendessem aos critérios de inclusão e aderiram a diretrizes rígidas na revisão posterior. Na segunda fase, os mesmos autores verificaram independentemente os textos completos dos estudos selecionados para confirmar sua inclusão. Um terceiro autor (TS) resolveu as divergências quando os revisores iniciais não conseguiram chegar a um acordo, mas somente após terem discutido as questões conforme necessário.

## **2.5. Extração de dados**

O mesmo processo independente de dupla revisão foi utilizado para reunir todos os dados relevantes e facilitar as comparações subsequentes. Quaisquer divergências encontradas durante esta fase foram abordadas por meio de discussão e, quando necessário, um consenso final foi alcançado com a assistência de um terceiro autor.

O mesmo processo independente de dupla revisão foi utilizado para coletar todos os dados relevantes e facilitar as comparações subsequentes. Apenas estudos experimentais foram incluídos, com foco específico em estudos *in vivo* envolvendo animais e células ou tecidos derivados de humanos implantados em modelos animais xenotransplantados. Quaisquer desacordos encontrados durante esta fase foram resolvidos por meio de discussão e, quando necessário, um consenso final foi alcançado com a assistência de um terceiro revisor. Características descritivas de todos os estudos incluídos na análise foram extraídas, cobrindo detalhes como nomes dos autores, ano de publicação, tipo de modelo (*in vivo*) e especificidades dos modelos *in vivo* (incluindo espécies animais). Além disso, o tipo de câncer investigado, descrições de condições hipóxicas (como concentração de oxigênio, duração e método de indução), o papel dos EVs (incluindo tipos estudados e seu papel no câncer sob hipóxia), ncRNAs investigados (por exemplo, miRNAs, circRNAs) e sua regulação sob condições hipóxicas, bem como resultados-chave relacionados ao impacto da hipóxia na progressão do câncer, implicações terapêuticas e aplicações diagnósticas foram observados. Nos casos em que os dados essenciais estavam incompletos ou

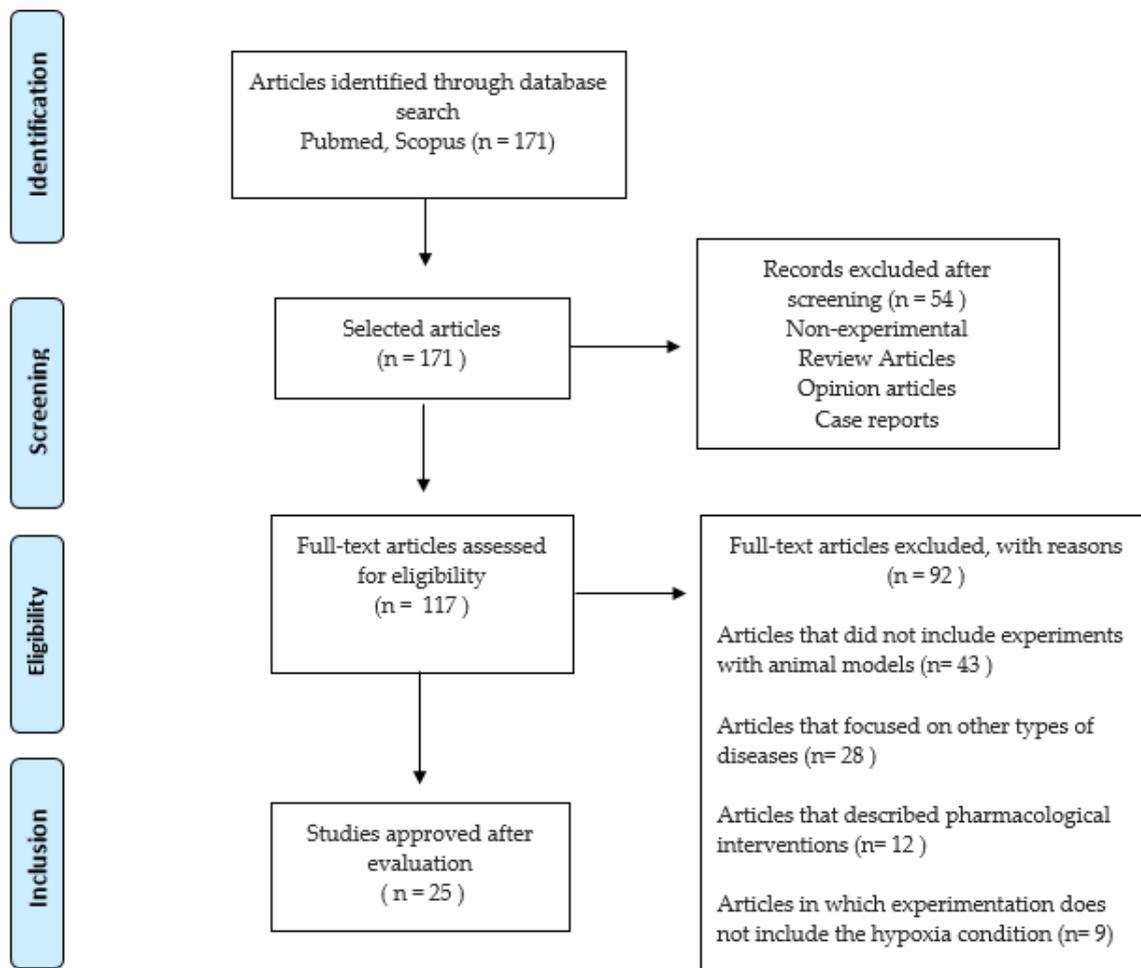
indisponíveis, os autores do estudo foram contatados para fornecer as informações ausentes.

## **2.6. Risco de viés em estudos individuais**

Para analisar o risco de viés em cada artigo incluído nesta revisão, a ferramenta de risco de viés SYRCLE (Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation)<sup>26</sup> foi usada para avaliar o viés potencial em estudos com animais. Esta ferramenta é especificamente recomendada para avaliar o viés em ensaios randomizados, conforme incluído nas Cochrane Reviews, mas foi adaptada para abordar formas particulares de viés exclusivas de estudos de intervenção animal.

## **3. Resultados**

No curso da exploração dos bancos de dados Pubmed e Scopus, os autores identificaram um total de 171 publicações. Em uma fase de triagem secundária, onde apenas títulos e resumos foram analisados, 54 estudos foram omitidos porque eram artigos não experimentais, revisões, relatos de caso, editoriais ou cartas. No total, 117 estudos foram considerados elegíveis para análise de texto completo, dos quais 92 foram eliminados dos critérios de inclusão e exclusão pré-descritos, levando a 25 estudos sendo finalmente adotados para esta pesquisa. Um diagrama de fluxo ilustrando a seleção de estudos e os resultados da busca bibliográfica de acordo com o PRISMA está disponível na Figura 1.



**Figura 6.** Diagrama de fluxo da revisão sistemática atual conduzida de acordo com as diretrizes Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis (PRISMA).

### 3.1 Risco de viés

A Figura 2 abaixo descreve o risco de viés em estudos com animais. Entre os 25 estudos, 17 foram julgados como tendo alto risco de viés, principalmente devido à falta de alocação aleatória de animais para diferentes grupos e à falta de cegamento dos investigadores de resultados. Além disso, outros detalhes, como a forma como a questão dos dados ausentes foi tratada e outros vieses, não foram adequadamente abordados nos estudos avaliados.

### 3.2 Características dos estudos

Um total de 25 artigos foram analisados neste estudo, incluindo quatro artigos sobre câncer de mama, 4 sobre câncer colorretal, 4 sobre câncer de pulmão, 4 sobre

carcinoma hepatocelular, 3 sobre câncer de pâncreas, 2 sobre câncer de ovário e 1 sobre carcinoma espinocelular de esôfago, osteossarcoma, câncer de bexiga e glioma. Todos os estudos exploraram vários tipos de ncRNAs. Oito artigos se concentraram exclusivamente em circRNA, enquanto 17 artigos avaliaram mais de um tipo de ncRNA, que incluía circRNA e miRNA. Todos os estudos utilizaram modelos de hipóxia de tratamento celular e incluíram diferentes modelos animais para explorar, entender e experimentar os mecanismos moleculares dos ncRNAs relativos ao crescimento tumoral e metástase.

Tipo de câncer	RNAs não codificantes	Condições de hipóxia	Desfechos
Câncer de mama (CM)	CircPFKFB4	1% O <sub>2</sub>	Crescimento tumoral
Câncer de mama (CM)	circ_0001982, miR-1287-5p, MUC19	Câmara de hipóxia com 1% O <sub>2</sub>	Crescimento tumoral, metástase e glicólise
Câncer de mama (CM)	circDENND4C	Câmara de hipóxia com 1% O <sub>2</sub>	Inibição do crescimento e metástase tumoral
Câncer de mama (CM)	circWSB1	1% de O <sub>2</sub> em incubadora de tri-gás	Crescimento tumoral
Câncer colorretal (CCR)	circRNA-133, miR-133a	1% de O <sub>2</sub> em culturas de células	Crescimento e metástase tumoral
Câncer colorretal (CCR)	miR-214, circEIF3K	94% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 1% O <sub>2</sub>	Aumento do volume e peso do tumor
Câncer colorretal (CCR)	Hsa_circ_0000826, mmu_circ_0000807	Câmara de hipóxia com 1% O <sub>2</sub> ; 10% de O <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Câncer colorretal (CCR)	circINSIG1	1% O <sub>2</sub> e 100 µM CoCl <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Câncer de pulmão (CNP)	circ_0000376, miR-1182	1% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> e 94% N <sub>2</sub>	Crescimento tumoral
Câncer de pulmão (CNP)	circ_0007386, CIRBP, YAP1, EIF4A3	37°C em câmara hipoxêmica com 1% O <sub>2</sub> e 5% CO <sub>2</sub>	Crescimento tumoral
Câncer de pulmão (CNP)	circPLEKHM1	Incubação a 37 °C sob 1% O <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Câncer de pulmão (CNP)	circ-0001875	1% O <sub>2</sub> em câmara hipoxêmica	Crescimento e metástase tumoral
Hepatocarcinoma (CHC)	circPRDM4	1% O <sub>2</sub>	Crescimento tumoral e controle imune

Hepatocarcinoma (CHC)	circ_0008450, miR-431	94% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 1% O <sub>2</sub> por 48 horas	Crescimento tumoral
Hepatocarcinoma (CHC)	circMAT2B, miR-338-3p	Incubação em câmara hipoxêmica com 1% O <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Hepatocarcinoma (CHC)	miR-532-3p, circ-LNPEP	1% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 94% N <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Câncer gástrico (CG)	circC6orf132, miR-873-5p	1% O <sub>2</sub>	Crescimento tumoral e inibição tumoral
Câncer gástrico (CG)	circSLAMF6, miR-204-5p	1% O <sub>2</sub> por 0, 3, 6, 12, 24 e 48 h	Crescimento tumoral
Câncer pancreático (CP)	circPDK1, miR-628-3p	1% O <sub>2</sub> por 48 horas	Crescimento e metástase tumoral
Câncer pancreático (CP)	circZNF91, miR-23b-3p	% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> e 94% N <sub>2</sub> a 37 °C	Sensibilidade à gencitabina em xenotransplantes.
Câncer pancreático (CP)	circATG7, miR-766-5p	1% O <sub>2</sub> por vários períodos (0, 3, 6, 12, 24 e 48 h)	Crescimento e metástase tumoral
Carcinoma de células escamosas do esôfago (CCEE)	circ-ZNF609, miR-150-5p	5% CO <sub>2</sub> com 0,5% O <sub>2</sub>	Crescimento e metástase tumoral
Câncer de bexiga	circELP3	Cultivo sob 1% O <sub>2</sub>	Crescimento tumoral
Osteossarcoma (OS)	circCYP51A1, miR-490-3p	1% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> e 94% N <sub>2</sub> para intervalos de 0 a 48 horas	Crescimento tumoral
Glioma	Circ101491, miR-125b-5p	1% O <sub>2</sub> (hipóxia) e 20% O <sub>2</sub> (normoxia)	Crescimento e metástase tumoral

Tabela 2 – Principais informações dos artigos incluídos na revisão.

## **4. Discussão**

### **4.1 Modelos animais em hipóxia e pesquisa sobre câncer**

Os estudos nesta revisão descrevem diferentes técnicas para simular condições hipóxicas, que podem ser aplicadas a estudos *in vitro* ou *in vivo*. *In vitro*, os pesquisadores geralmente cultivam células em uma incubadora de CO<sub>2</sub> sob condições hipóxicas controladas, com concentrações de oxigênio variando de 0,5% a 5%, para replicar as condições de baixo oxigênio do microambiente tumoral. A duração da exposição à hipóxia varia dependendo do experimento, permitindo o estudo dos efeitos agudos e crônicos de baixos níveis de oxigênio.<sup>44,47</sup>

A hipóxia também pode ser induzida diretamente em modelo animal. Por exemplo, células hipóxicas preparadas em experimentos *in vitro* e suspensas em soluções salinas ou em Matrigel, que são então injetadas em animais para criar xenoinxertos tumorais. Alternativamente, elas criam condições hipóxicas em um animal privando o organismo de oxigênio por pinçamento vascular localizado ou redução sistêmica dos níveis de oxigênio por meio do uso de câmaras hipobáricas ou intervenções respiratórias específicas<sup>33</sup>.

Espera-se que esses modelos repliquem as interações dinâmicas e complexas das células tumorais com seu ambiente privado de oxigênio, oferecendo, portanto, insights sobre a progressão do tumor e as respostas terapêuticas.

No modelo de metástase, a veia caudal é uma escolha prática para injeção de células tumorais, pois fornece acesso fácil em camundongos e ratos, permitindo administração precisa e repetitiva.<sup>31,33,37,38,41,47</sup> Essa abordagem imita de perto o processo

metastático natural; após entrar na circulação sistêmica, as células tumorais seguem um caminho semelhante ao das células metastáticas em humanos, viajando pela corrente sanguínea para colonizar órgãos distantes.

O modelo de xenotransplante, no qual o tecido tumoral humano é implantado diretamente no animal, oferece vantagens significativas para o estudo do câncer.<sup>34</sup> No entanto, ele permite uma replicação mais precisa do tumor original, preservando a arquitetura celular e o microambiente tumoral, incluindo componentes tumorais importantes, como células estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular. Este modelo espelha melhor as características tumorais dos pacientes. Além disso, o xenotransplante permite o estudo da progressão tumoral e da invasividade no organismo hospedeiro, demonstrando aspectos importantes da evolução do tumor e da interação com o sistema imunológico.

Os modelos de xenotransplante de câncer são uma excelente opção para testar a resposta a terapias personalizadas, incluindo terapias direcionadas e imunoterapias. Esses modelos permitem uma avaliação mais precisa da eficácia de várias abordagens terapêuticas. Ao carregar as características do câncer humano, os modelos de xenoenxerto aumentam a relevância translacional das descobertas para a clínica. Esses modelos são valiosos para estudar metástases e interações tumor-hospedeiro, permitindo a avaliação de processos metastáticos espontâneos.

#### **4.2 Escolha do modelo animal para experimentação**

Esta revisão abrange apenas os estudos em que os modelos experimentais são camundongos. Tal predominância indica os méritos do uso de modelos de camundongos na pesquisa do câncer, principalmente por meio de linhagens consanguíneas ou geneticamente modificadas. Esses camundongos têm excelente uniformidade genética pela qual a variabilidade experimental pode ser minimizada de modo que os resultados sejam comprovados como consistentes e reprodutíveis.

Cepas específicas de camundongos, como camundongos nus BALB/c, camundongos NOD-SCID e camundongos NCG, são candidatos ideais para estudos de xenoenxerto porque sua imunodeficiência e outras características do sistema

imunológico impedem a rejeição de células ou tecidos cancerígenos humanos implantados.

Além disso, os camundongos podem facilmente ser submetidos à engenharia genética para imitar o comportamento biológico dos cânceres humanos, como crescimento tumoral, metástase ou mesmo resposta ao tratamento, tornando-os altamente suscetíveis a modelos de tumores humanos. Tais características, com amplo acesso a dados de base e fácil praticidade com camundongos devido ao seu tamanho e baixa manutenção e custo, tornam os camundongos o modelo mais adequado e mais frequentemente usado nos estudos desta revisão.

Entre os estudos incluídos nesta revisão, quinze usaram camundongos nus BALB/c como modelo experimental, seis usaram camundongos nus, dois camundongos NOD-SCID, um camundongo NCG e um camundongo BALB NU/NU. O camundongo BALB/c está entre os modelos consanguíneos mais amplamente usados em pesquisa sobre câncer.

Os camundongos BALB/C ‘nude’ são camundongos da linhagem BALB/C com alterações genéticas resultando em ausência de pelos e falta de células T, levando a um sistema imunológico comprometido. Eles são úteis em estudos de câncer que envolvem supressão de células T para permitir o crescimento de tumores humanos sem rejeição.<sup>52</sup>

Os camundongos nus incluem várias variantes de imunocomprometidos com uma mutação no gene *Foxn1*, que causa a ausência de células T e a falta de pelos. Eles são amplamente usados em estudos de câncer, especialmente para transplante de tumores, devido à sua capacidade de tolerar enxertos de tecidos heterólogos.<sup>52</sup>

Os camundongos NOD-SCID (Imunodeficiência Combinada Grave Diabética Não Obesa) têm deficiências nas células T e B, tornando-os ainda mais imunocomprometidos do que os camundongos “nude”. Eles também têm deficiências nas células natural killer (NK) e são mais suscetíveis a desenvolver diabetes espontâneo. Eles são ideais para estudos que exigem um sistema imunológico praticamente ausente, permitindo enxertos humanos mais complexos, como transplantes de medula óssea e estudos de resposta imune.<sup>53</sup>

Os camundongos NCG (NOD-Prkdc scid IL2rg null) são derivados de camundongos NOD-SCID, com uma deleção adicional do receptor gama para interleucina-2 (IL2rg), que também não possui células NK, além de células T e B. Eles oferecem um ambiente extremamente imunocomprometido, sendo um dos melhores modelos para transplantes de células e tecidos humanos, ideal para estudos de câncer metastático e modelos de doenças humanas.<sup>53</sup>

Os camundongos BALB NU/NU são semelhantes aos camundongos BALB/c nude. Eles são imunodeficientes devido à falta de células T e têm características genéticas específicas da linhagem BALB/c. Eles são usados em experimentos de transplante de tumores e em estudos que exigem a ausência de uma resposta imune adaptativa para evitar a rejeição do enxerto<sup>53</sup>.

### **4.3 Aplicabilidade e limitações de modelos animais**

As câmaras de hipóxia têm sido frequentemente adotadas para cultivar células tumorais em uma baixa concentração de oxigênio, 1% O<sub>2</sub>, para imitar a condição hipóxica dos tumores sólidos, o que facilita atividades biológicas cruciais, como angiogênese, reprogramação metabólica e mecanismos de resistência terapêutica. Esses modelos animais ajudam a entender os efeitos na saúde de estar em um ambiente de baixo oxigênio, incluindo o caminho controlado por fatores de transcrição induzidos pela hipóxia, promovendo a formação de tumores. Entretanto, a hipóxia pode se manifestar de diferentes maneiras dentro do microambiente tumoral, exibindo padrões distintos que influenciam a progressão do câncer

Em relação aos diferentes tipos de hipóxia relacionados à progressão do câncer, destacam-se a hipóxia crônica e a intermitente, pois afetam o organismo de maneiras distintas.<sup>54</sup> A hipóxia crônica está associada à rápida proliferação celular sem vascularização adequada, resultando em privação constante de oxigênio em regiões dentro do tumor.<sup>54,55</sup> Esse ambiente de baixo oxigênio favorece a ativação de fatores induzíveis por hipóxia (HIFs), que regulam a transcrição de genes responsáveis pela adaptação e sobrevivência celular nessas condições.<sup>54,55</sup> Em contraste, a hipóxia intermitente é caracterizada pela oscilação dos níveis de oxigênio devido a uma variação no fluxo sanguíneo resultante de anomalias estruturais dos vasos sanguíneos

tumorais.<sup>56,57</sup> Essas oscilações podem ocorrer em diferentes períodos de tempo, promovendo características tumorais mais agressivas, aumentando sua taxa de crescimento, resistência à apoptose e maior capacidade metastática.<sup>58</sup> Devido à complexidade dos diferentes tipos de hipóxia em câncer, modelos experimentais são essenciais para estudar seus efeitos no nível celular e molecular.

Além disso, os modelos experimentais são aprimorados pelas variações nos tempos de exposição à hipóxia observados nos estudos de Fang et al. (2021) e He et al. (2012), pois as células exibem comportamentos diferentes ao longo do tempo. Por exemplo, no estudo de Fang et al. (2021), as células foram submetidas a condições hipóxicas em níveis de 1% O<sub>2</sub> por períodos específicos de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, permitindo uma avaliação precisa das mudanças causadas pela hipóxia ao longo do tempo. Da mesma forma, He et al. (2012) analisaram a duração da hipóxia em 1% O<sub>2</sub> ao longo de um período, reiterando a necessidade de considerar os efeitos da hipóxia curta e prolongada em processos celulares, como divisão, morte e atividade genética. O método empregado neste trabalho é altamente eficaz para analisar a duração da hipóxia em tumores humanos e entender como ela varia significativamente em estudos *in vitro*.

A investigação conduzida por Shi et al. (2020) é um esforço crucial para recriar situações de hipóxia intermitente crônica em roedores privados de oxigênio, pois foi realizada em uma caixa feita sob medida preenchida com 10% de O<sub>2</sub> e moldada hiperbolicamente por 12 horas por dia durante 6 semanas consecutivas. Este protocolo estendido investiga fatores como hipóxia crônica, que pode governar o crescimento do tumor, especialmente reprogramação metabólica, vasculatura e parâmetros imunológicos e sistêmicos. No entanto, este modelo tem algumas desvantagens, como a impossibilidade de recriar os microambientes dinâmicos contendo diferentes graus de oxigênio encontrados em crescimentos tumorais humanos e prováveis respostas imunológicas incompatíveis de camundongos e humanos.

Além disso, a investigação usando camundongos APC Min/+ (adenomatous polyposis coli multiple intestinal neoplasia) como um modelo natural de patologia do câncer revelou outra abordagem para avaliar a hipóxia. Esta mutação heterozigótica (Min/+) causa supressão tumoral em camundongos, levando à formação espontânea de adenoma intestinal e servindo como um modelo bem administrado para câncer

colorretal (CCR). Os camundongos foram colocados sob hipóxia intermitente (12 horas por dia durante 6 semanas), o que imitou um microambiente tumoral em mudança. Este regime, com uma administração intravenosa de um vetor adenoviral visando o circRNA, mmu\_circ\_0000807, permitiu estudar o impacto da hipóxia na proliferação de tumores de câncer colorretal (CCR).

Os resultados indicaram que a hipóxia aumentou a incidência e a frequência do tumor em camundongos, com a progressão do tumor sendo observada na ausência de mmu\_circ\_0000807. Os tecidos tumorais e os biomarcadores séricos exibiram níveis elevados de mmu\_circ\_0000807 em resposta a condições hipóxicas, sugerindo seu uso como um biomarcador sistêmico ativo e alvo terapêutico. Esses testes em modelos animais são benéficos, pois retratam condições dinâmicas e semelhantes às humanas no microambiente tumoral, aumentando assim o conhecimento dos mecanismos controlados pela hipóxia no CCR.

Apesar desses benefícios, os pesquisadores ainda podem melhorar certos aspectos desses modelos. Continua difícil replicar os gradientes dinâmicos heterogêneos de oxigênio típicos de tumores sólidos humanos e aplicar esses resultados à arquitetura genética e imunológica de pacientes heterogêneos. Modelos avançados que incorporam estimulação de oxigênio com exploração mecanicista aprofundada podem ser empregados em estudos futuros para identificar e caracterizar novos alvos terapêuticos com importância clínica transcendente.

#### **4.4 Limites e desafios**

As limitações desses métodos experimentais baseados em técnicas de cultura de células e modelos animais são bem documentadas, e esses resultados não devem ser extrapolados para a saúde humana. Por exemplo:

1. Heterogeneidade do tumor: A estrutura geral e as propriedades do tumor são determinadas pela diversidade de tipos de células e expressão gênica em cada tecido específico. Embora as culturas de células sejam clonais, os modelos animais são mais complexos, mas não podem representar o espectro biológico completo dos tumores humanos.

2. Respostas imunológicas: O sistema imunológico do camundongo é diferente do humano, restringindo, portanto, a aplicabilidade dos resultados, principalmente em relação à hipóxia e seus efeitos na modulação imunológica.

3. Condições de tempo: O comprometimento do sistema imunológico sobre a capacidade funcional total em camundongos foi observado nos estudos de tempo limitado de Fang et al. (2021) e He et al. (2021). Esses estudos têm exemplos que variam no tempo para extensão hipóxica e sua eficiência e eficácia; por outro lado, o protocolo Shi et al. (2020) defende a exposição prolongada, mas em intervalos regulares. Embora útil na criação de um modelo para hipóxia recorrente, essa intermitência pode simular apenas parcialmente a hipóxia crônica, que varia em grau e duração, como visto nas flutuações dinâmicas da maioria dos microambientes tumorais humanos.

4. Exposição de longo prazo e suas consequências: Usar uma exposição hipóxica intermitente de 6 semanas em ratos fornece insights críticos sobre mudanças de longo prazo. Essas mudanças são, por exemplo, na vascularização do tumor, metabolismo celular e comportamento invasivo. A limitação desse modelo é que ele pode ignorar certos fatores que são muito mais críticos em um ambiente clínico, como a presença de gradientes sonoros auditivos ou interações com terapias específicas.

## **5. Tipos de cânceres estudados em condições hipóxicas**

### **5.1 Influência da hipóxia no câncer**

A hipóxia tem um efeito direto na progressão do tumor em cânceres de mama ao modular a expressão do circRNA. A expressão do circPFKFB4 pode ser induzida por HIF1 $\alpha$ , o que leva ainda mais ao aumento da progressão do câncer ao degradar p27. Pelo processo de proliferação celular, isso prova que o circPFKFB4 regulado por hipóxia se correlaciona com mau prognóstico e funcionalidade significativa na progressão da doença (Chen et al, 2022).

De acordo com Qiu et al. (2021), a redução do hsa\_circ\_0001982 inibe significativamente o crescimento do tumor. Este circRNA atua no MUC19 ao esponjar o

miR-1287-5p. Além disso, o aumento da expressão dos circRNAs no microambiente hipóxico sugere que circRNAs selecionados podem estar proliferando indutivamente o crescimento de alvos moleculares específicos no microambiente.

A depleção de CircDENND4C reduziu consideravelmente o volume do tumor, consequentemente elevando os níveis de miR-200b e miR-200c e regulando negativamente a expressão de HIF1A no tecido tumoral. O baixo nível de HIF1A observado resultante da redução de circDENND4C indica que este circRNA fornece condições para a sobrevivência do tumor de mama em ambientes hipóxicos, estabelecendo condições de baixo oxigênio ao redor do tumor.

Além disso, essa interação no eixo HIF1A fornece evidências de que circDENND4C pode ser um novo candidato para futuras intervenções terapêuticas antitumorais. A subexpressão de circWSB1 estimula o crescimento em tumores, enquanto a supressão de suas atividades reduz a progressão do tumor e melhora a sobrevivência dos animais. Essa descoberta está de acordo com outras observações de circRNAs específicos no desenvolvimento do câncer sob condições hipóxicas, nas quais os tumores são mais agressivos.

A influência da regulação do circRNA induzida por hipóxia no carcinoma colorretal foi percebida muito além do câncer de mama. Alguns aspectos do carcinoma colorretal, como crescimento, expansão e metástase do tumor, são manifestados devido à regulação do circRNA sob condições hipóxicas. Descobertas posteriores de Yang et al. (2020) e Shi et al. (2020) indicaram que alguns dos circRNAs induzidos por hipóxia (hsa\_circ-133, mmu\_circ\_0000807 e hsa\_circ\_0000826) estão associados a maior agressividade de tumores e progressão metastática. A ativação do eixo circ-133/GEF-H1/RhoA, que causa diminuição da E-caderina, leva ao aumento de células tumorais circulantes (CTCs), promovendo invasão e migração.

Yang et al. (2021) mostraram que circEIF3K regula o eixo miR-214/PD-L1 para aumentar a expressão e contribuir para uma forma mais agressiva de câncer colorretal caracterizada por doença em estágio avançado e baixas taxas de sobrevivência. Os transcritos de circRNA, sob apoptose, aumentam a evasão imunológica enquanto modulam algumas vias imunossupressoras, a saber, o eixo PD-L1.

Mecanismos semelhantes são observados no câncer de pulmão, onde o papel do circRNA na proliferação e metástase de células tumorais sob condições de hipóxia. CircRNAs sob condições hipóxicas regulam a progressão do câncer de pulmão afetando a proliferação e metástase de células tumorais. O silenciamento de hsa\_circ\_0000376 na verdade inibe o crescimento do tumor regulando o eixo hsa\_miR-1182/NOVA2. Conseqüentemente, essas observações indicam que a inibição de circRNAs selecionados sob hipóxia pode ajudar a controlar a progressão do tumor do câncer de pulmão.

O circRNA hsa\_circ\_0007386 induz o crescimento do tumor e a proliferação celular através do eixo hsa\_miR-383-5p/CIRBP. YAP1-EIF4A3 regula hsa\_circ\_0007386 sob circunstâncias hipóxicas, fortalecendo assim sua ação na adaptação do tumor a condições hipóxicas.

Wang et al. demonstrou que o tratamento com hsa\_circPLEKHM1-ASO reduz significativamente a metástase até mesmo para os ossos em NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas). O tratamento prolongou a sobrevivência de camundongos com destruição óssea reduzida e polarização de macrófagos modificada. Assim, hsa\_circPLEKHM1 foi colocado como um jogador importante na adaptação tumoral induzida por hipóxia.

Para generalizar, hsa\_circ\_0001875 geralmente aumenta o crescimento e a metástase em adenocarcinomas de pulmão, e podemos levantar a hipótese de que a regulação positiva desse fator pode, portanto, favorecer a proliferação e a metástase, enquanto uma regulação negativa pode ter o efeito oposto. Como hsa\_circ\_0001875 está envolvido no comportamento do tumor e na metástase em condições hipóxicas, esse circRNA é proposto como um biomarcador candidato e alvo terapêutico.

Os mecanismos pelos quais a hipóxia impulsiona a expressão do circRNA promovem o crescimento e a invasão do tumor, ao mesmo tempo em que obstruem a depuração imunológica no CHC. Conforme proposto por Chen e colegas (2023), o circPRDM4 promove a progressão do tumor e a evasão imunológica por meio da inibição da infiltração de células T CD8+ e por meio do aumento da expressão de CD274 (PD-L1), que por sua vez apoia a sobrevivência da célula tumoral.

De acordo com Du et al. (2020), a regulação negativa de circ\_0008450 seria benéfica na medida em que as atividades anticâncer de miR-431 e AKAP1 são consideradas; portanto, isso implica que, de fato, alguns circRNAs podem atuar como inibidores do crescimento tumoral por meio da hipóxia pela modulação de alguns domínios de interação entre certos miRNAs com seus alvos.

A regulação negativa de circ-0008450 seria vantajosa para as atividades anticâncer de miR-431 e AKAP1, conforme argumentado por Du et al. (2020); segue-se que alguns circRNAs provavelmente inibem o crescimento tumoral por meio da hipóxia por meio da modulação de certas interações entre miRNAs e seus alvos.

Li et al. (2019) mostraram o envolvimento de circMAT2B na captação de glicose, crescimento tumoral e metástase, fornecendo regulação negativa do eixo miR-338-3p/PKM2. A correlação direta dos níveis aumentados de circMAT2B com resultados negativos do paciente apoia seu papel como um regulador metabólico chave da progressão do tumor em hipóxia.

A partir da pesquisa de Ouyang et al., em 2021, a superexpressão de receptores de andrógeno atende aos requisitos para a inibição do crescimento do tumor, bem como da metástase; no entanto, a presença de circ-LNPEP demonstrou combater isso por meio da esponja de miR-532-3p, levando à regulação positiva de RAB9A, aumentando assim a invasão celular e a agressividade dos tumores no câncer de fígado em condições hipóxicas.

A mesma descoberta foi observada no câncer gástrico, pois a expressão de circRNA induzida por hipóxia promove a sobrevivência a longo prazo de um tumor. Chen et al. (2021) relataram que o silenciamento de circC6orf132 em camundongos com câncer gástrico resultou na diminuição do volume do tumor e na diminuição da atividade glicolítica, incluindo a expressão de GLUT1, HK2, lactato e captação de glicose. Os marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA foram regulados negativamente, enquanto miR-873-5p foi regulado positivamente, sugerindo que circC6orf132 contribui para um fenótipo pró-tumor por meio da regulação do metabolismo energético.

Cheng et al. (2021) observaram que a restauração da expressão de circSLAMF6 em camundongos aumentou o volume e o peso do tumor, o que foi inversamente

correlacionado com os níveis de expressão de MYH9 e os níveis de miR-204-5p. Isso mostra que circSLAMF6 induz o câncer gástrico a regular proteínas da MEC e miRNAs sob hipóxia.

Ao mesmo tempo, a importância da investigação de circRNA no câncer pancreático, hipóxia, bem como no desenvolvimento do tumor e nas respostas ao tratamento. Lin et al. (2022) sugerem que o aumento na expressão de circPDK1 e hipóxia está associado ao crescimento do tumor e ao câncer preditivo. Exossomos hipóxicos contendo circPDK1 promovem o peso e o tamanho do tumor; Entretanto, a regulação negativa de circPDK1 (exossomos sh1-circPDK1) diminui em metástases e marcadores de transição epitelial-mesenquimal (EMT).

Da mesma forma, He et al. (2022) descobriram que circATG7 regula o crescimento tumoral, invasão e autofagia no câncer pancreático por meio dos mecanismos miR-766-5p/ATG7 e HUR/ATG7, destacando o papel dos circRNAs na adaptação do tumor a condições hipóxicas.

Os circRNAs também estão implicados na adaptação tumoral no câncer de esôfago, onde contribuem para a angiogênese e remodelação vascular. Mao et al. (2024) relataram que circZNF609, codificado por um gene localizado no cromossomo 20, está contido em EVs, aumentando a angiogênese e induzindo toxicidade endotelial vascular. Esta observação demonstra que os processos associados ao aumento do crescimento tumoral e à formação de novos vasos sanguíneos são ativados pela influência da hipóxia (Mao et al., 2024).

No câncer de bexiga, pesquisadores estabeleceram que o circELP3 aumenta a resistência ao tratamento e promove a adaptação à hipóxia, demonstrando uma resposta adaptativa totalmente desenvolvida ao baixo oxigênio no tumor (Su et al., 2019). No osteossarcoma, pesquisadores relataram que a hipóxia afeta a expressão do circCYP51A1, e seu silenciamento reduz as metástases pulmonares e o crescimento da massa do tumor primário (Yang et al., 2022)

Finalmente, em gliomas, o circRNA101491 que geralmente é superexpresso nesses tumores promove tanto o crescimento quanto a atividade metastática, mostrando

mais clareza no papel da hipóxia na modulação desproporcional de alguns circRNA promotores de tumores (Zhang et al., 2023).

Essencialmente, a hipóxia desempenha um papel importante na regulação mediada por circRNA em todos os tipos de câncer para auxiliar na adaptação do tumor, evasão imunológica e resistência à terapia. Essas descobertas sugerem que os circRNAs podem ter o potencial de serem desenvolvidos para fins de biomarcadores e alvos terapêuticos, dando origem a opções interessantes para medicina de precisão em oncologia.

## **5.2 Papel dos VEs em condições hipóxicas**

Sob hipóxia, EVs mediam a comunicação célula a célula dentro do microambiente tumoral. Durante o avanço do câncer de mama, a hipóxia induz a geração e liberação de EVs, que são particularmente enriquecidos com circRNAs não codificantes. EVs podem ser concebidos como "nano-portadores" de RNAs não codificantes, incluindo os circRNAs regulados por hipóxia acima mencionados que entregam circPFKFB4, circDENND4C e circWSB1 para células-alvo, desencadeando sinalização pró-tumorigênica.

A estimulação da secreção de eritropoietina no câncer de mama durante a hipóxia via fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) influencia profundamente o empacotamento de circRNAs em EVs. Este mecanismo foi explicitamente abordado no contexto do câncer de mama, destacando sua relevância na adaptação hipóxica a tais tumores. Tal mecanismo oferece adaptação do tumor à baixa oxigenação via evasão linfática, invasão e evasão imunológica. Mecanismos semelhantes em outros tipos de câncer apoiam a ideia de um papel mais amplo dos EVs na adaptação hipóxica. Por exemplo, EVs carregados com circDENND4C podem apoiar a sinalização de HIF1 $\alpha$  em células receptoras para sua adaptação hipóxica, portanto, promovendo o crescimento do tumor.

O mesmo acontece de outra forma: assim como os EVs desempenham um papel na adaptação hipóxica do câncer de mama, eles também promovem a invasão de células tumorais e a evasão imunológica no câncer colorretal. Os circRNAs pró-metastáticos, como hsa\_circ-133 e circEIF3K, são abrangidos pelos EVs e servem na hipóxia como mediadores críticos do desenvolvimento do câncer colorretal.

No estágio avançado do câncer colorretal, a baixa taxa de sobrevivência dos pacientes é atribuída a um EV enriquecido com circEIF3K, indicando que eles podem ter feito transferência de informação genética favorecendo a evasão imunológica. Isso ocorre pela mediação da regulação do eixo miR-214/PD-L1, indicando que ele pode alterar o microambiente tumoral para promover a progressão do tumor e a resistência à imunoterapia.

Não apenas o câncer colorretal, mas também o câncer de pulmão exibiram adaptação tumoral de forma mediada por EV sob microrganismos de hipóxia. Isso prova que os EVs são conservados entre diferentes tipos de câncer na progressão do tumor. A hipóxia também pode auxiliar na progressão do câncer de pulmão, com a possibilidade de que os EVs mediarão a interação célula-microambiente tumoral. Por exemplo: ignorar a regulação de hsa\_circPLEKHM1 induz um efeito na polarização do macrófago M2 e enfatiza sua importância na comunicação do microambiente tumoral.

Portanto, esses EVs com circRNAs atuam como mediadores de sinais primários entre células e componentes TME para impulsionar a progressão do tumor sob condições adversas que ajudariam a facilitar a invasão e assistência do tumor.

Semelhante ao câncer de pulmão, o carcinoma hepatocelular (HCC) também depende de EVs sob hipóxia para sustentar a progressão do tumor e a modulação microambiental. Em condições de baixo oxigênio, os EVs contribuem para a evolução do HCC, especialmente em relação à disseminação do tumor e sua interação com o microambiente circundante. Foi demonstrado que esses EVs carregam elementos circRNA, como circMAT2B e circPRDM4, que facilitam a supressão imunológica e aumentam a captação de glicose. Em particular, a exposição de células tumorais a EVs que encapsulam circPRDM4 promove um aumento no ponto de verificação imunológico PD-L1 em células tumorais, permitindo que a evasão imunológica ocorra com mais probabilidade.

Com base no papel dos EVs no CHC, seu envolvimento no câncer gástrico destaca sua importância nas adaptações metabólicas e de sobrevivência induzidas por hipóxia. Em praticamente todas as formas possíveis, as vesículas extracelulares (EVs) com circRNAs elevados agem de forma semelhante à mudança do microambiente tumoral para o de hipóxia. A hipóxia é comum na maioria dos tumores sólidos,

incluindo o câncer gástrico. Os EVs com circRNAs relacionados à hipóxia influenciam as alterações do metabolismo energético e a sobrevivência para favorecer o crescimento do tumor, com os componentes ativos sendo circC6orf132 e circSLAMF6. Os circRNAs, com o auxílio de miRNAs e proteínas que eles controlam na célula, asseguram condições para o crescimento e progressão do tumor, mesmo em um ambiente pobre em oxigênio.

Foi bem documentado no câncer gástrico que os EVs mediam importantes adaptações hipóxicas no câncer pancreático, especialmente determinando mecanismos de resistência a medicamentos. Os EVs desempenham um papel fundamental na evolução do tumor sob condições de hipóxia, permitindo conversas cruzadas entre células tumorais dentro do microambiente tumoral. Um exemplo disso é quando Zeng e colegas mostraram que EVs hipóxicos contendo hsa\_circ\_ZNF91 foram absorvidos por células de câncer pancreático resistentes à gemcitabina (2021). No entanto, esses EVs carregados com mimético siCircZNF91 ou miR-23b-3p — projetados para neutralizar a resistência induzida pela hipóxia — demonstraram o efeito dualístico dos EVs em facilitar e superar a resistência aos medicamentos.

Além disso, a capacidade dos EVs hipóxicos de alterar a expressão do marcador EMT implica um papel significativo na determinação da capacidade metastática e da plasticidade celular. Além dos principais tipos de câncer discutidos, os EVs também mediam respostas hipóxicas em outras malignidades, reforçando seu papel universal na adaptação do tumor.

No cenário de hipóxia, os EVs se tornam o principal modo de comunicação entre as células tumorais e o estroma associado ao tumor. No carcinoma espinocelular esofágico, por exemplo, diz-se que EVs portadores de circZNF609 promovem a invasão tumoral ao causar disfunção da barreira endotelial e promover a angiogênese (Mao et al., 2024).

Da mesma forma, cânceres ósseos como o osteossarcoma são agora reconhecidos por empregar EVs ricos em circCYP51A1 em seus processos metastáticos, enfatizando assim seu papel como transportadores de agentes pró-tumorigênicos (Yang et al., 2022). Em gliomas, condições hipóxicas permitem a comunicação intercelular via circRNAs, incluindo circ101491, por meio de EVs,

aprimorando vias de malignidade e regulando negativamente miRNAs terapeuticamente relevantes, como miR-125b-5p. O acúmulo de circRNAs em EVs deve ser considerado muito relevante para a progressão da doença, apoiando o crescimento do tumor e a resistência ao tratamento (Zhang et al., 2023).

### **5.3 EVs e ncRNAs como biomarcadores**

No câncer de mama, os circRNAs que foram analisados anteriormente podem se tornar potenciais biomarcadores prognósticos e diagnósticos. A expressão e regulação de circPFKFB4, circDENND4C e circWSB1 sob condições hipóxicas indicam que eles podem ser transportados em EVs e usados como marcadores não invasivos de tumores de mama agressivos. Além disso, fica claro que a consideração de circRNA-HIF1 $\alpha$  nos estudos pode auxiliar na classificação dos tumores que apresentam uma resposta hipóxica distinta, indicando assim sua possível utilidade na previsão do comportamento do tumor.

No câncer colorretal e hepático, os circRNAs regulados por hipóxia também foram estudados além do câncer de mama. Seus níveis no câncer de mama (Chen et al., 2022), câncer colorretal (Yang et al., 2020) e câncer de fígado (Li et al., 2019) revelam que os circRNAs regulados por hipóxia, em particular hsa-miR-1287-5p, mostram expressão diferencial com base na origem do tumor. Essa expressão diferencial ajuda a entender os mecanismos de progressão tumoral e resistência terapêutica.

Além disso, EVs carregando circRNAs e miRNAs são excelentes biomarcadores para diagnóstico e prognóstico em câncer colorretal. Os achados desta revisão indicam que hsa\_circEIF3K, hsa\_circ-133 e mmu\_circ\_0000807, quando associados ao aumento da invasividade e agressividade tumoral em condições hipóxicas, podem ser usados como biomarcadores confiáveis para diagnóstico precoce de câncer e monitoramento de seu desenvolvimento. Além disso, a expressão desses circRNAs em exossomos circulantes pode ajudar a desenvolver tratamentos personalizados, desde que seja possível identificar fatores importantes da doença do paciente, como agressividade tumoral e risco de metástase.

Para entender melhor a especificidade tecidual dos biomarcadores induzidos por hipóxia, diferentes tipos de câncer devem ser observados, como câncer colorretal e

câncer de pulmão. Tal comparação pode elucidar como esses biomarcadores podem atuar de maneira específica ao tecido. Por exemplo, enquanto no câncer colorretal, a evasão imune está associada a hsa\_circEIF3K, outros tipos de câncer apresentam biomarcadores específicos que sugerem a progressão da proliferação celular ou angiogênese.

No câncer de pulmão, circRNAs exossômicos podem ser relevantes para o prognóstico e a previsão de resultados. Por exemplo, a presença e os níveis de circ\_0007386 e circ\_0001875 em exossomos circulantes servem como biomarcadores para agressividade tumoral e potencial metástase que facilitam o diagnóstico precoce e a avaliação da progressão da doença (Li et al., 2024; Wu et al., 2022). É importante ressaltar que a detecção desses circRNAs nos fluidos corporais, particularmente no sangue, fornece métodos bioinvasivos para monitorar a resposta ao tratamento da carga tumoral e a progressão do câncer em condições hipóxicas.

Além disso, circRNAs específicos como circPLEKHM1 no câncer de pulmão modulam a interação cruzada dentro do microambiente tumoral, diferentemente de suas contrapartes comparativas em outros cânceres, como o câncer retal (Wang et al., 2024). Em concordância, circRNAs circ\_0001875 e circ\_0007386 servem como marcadores de metástase e crescimento celular (Li et al., 2024; Wu et al., 2022). Esta avaliação comparativa ressalta o papel relativo da hipóxia na iniciação ou ativação de diferentes biomarcadores em diferentes cânceres e enfatiza a possibilidade de personalizar modalidades de tratamento e monitorar a progressão da doença de acordo com as diferenças na expressão circunstancial de circRNAs baseados em ambiente hipóxico.

Da mesma forma, no carcinoma hepatocelular (CHC), fatores determinados em EVs circulantes incorporados em exossomos, incluindo circRNA, são marcadores promissores para diagnóstico e prognóstico. Por exemplo, circMAT2B se correlaciona com metabolismo alterado e prognóstico tumoral, indicando invasão tumoral em pacientes com CHC em estágio avançado (Li et al., 2019). Da mesma forma, o fato de quantidades excessivas de circPRDM4 serem encontradas em vesículas pode sugerir que o hospedeiro está em um estado imunoprivilegiado e, portanto, altamente exposto ao câncer, pois o cistron está envolvido no êxodo do sistema imunológico (Chen et al., 2023).

Quando esses biomarcadores são colocados contra outros cânceres, é evidente que os circRNAs em EVs visam principalmente respostas metabólicas e imunológicas sob hipóxia. Em contraste com outros tipos de câncer, que permitem que o circRNA estimule o crescimento celular e a metástase prevista, no CHC, também há direcionamento de processos metabólicos e supressão de respostas imunológicas, que são importantes para a capacidade do câncer de prosperar em baixos níveis de oxigênio. Esses resultados visam dar suporte ao uso de circRNAs como identificadores raros de um tipo específico de câncer e seu microambiente, permitindo o desenvolvimento de terapias e diagnósticos direcionados.

Além do HCC, no câncer gástrico, há uma possibilidade notável de usar circRNAs isolados de EVs, por exemplo, circC6orf132 e circSLAMF6, para fins diagnósticos e prognósticos. Por exemplo, circC6orf132 pode sugerir avanço do tumor, pois parece ser responsável pelo aumento do glicometabolismo e aumento da proliferação celular, o que pode ser visto até mesmo nas regiões hipóxicas de um tumor como uma adaptação metabólica e um potencial alvo terapêutico (Chen et al., 2021). Outro exemplo fornecido é o de circSLAMF6, pois sua atividade está relacionada à motilidade e à proliferação das células. Assim, tal mudança pode sugerir tumores mais agressivos e sua possível disseminação no câncer gástrico (Fang et al., 2021).

A análise de biomarcadores associados ao câncer no câncer gástrico exibe uma diferença em relação a outros tipos de malignidades, pois há um envolvimento mais profundo de circRNAs no desenvolvimento da adaptação hipóxica no câncer gástrico por meio da modulação da glicólise e do aumento do crescimento celular. Esses circRNAs são diferentes dos biomarcadores de outros cânceres ao abordar topicamente a adaptação metabólica para superar ambientes extremos, tornando-os mais importantes no que diz respeito a intervenções terapêuticas destinadas a restringir o crescimento metastático.

Além disso, de acordo com os artigos incluídos, circRNAs derivados de EVs hipóxicos foram identificados como biomarcadores promissores para câncer de pâncreas. Alguns estudos exploraram que altos níveis de circPDK1 estão associados a um prognóstico ruim do paciente, sugerindo seu alto potencial como um marcador prognóstico importante (Lin et al., 2022). Além disso, as evidências indicam que

circZNF91 contribui significativamente para o aumento da resistência à gemcitabina, tornando-o um preditor útil da resposta ao tratamento (Zeng et al., 2021).

Comparando o câncer pancreático com outros cânceres mediados por hipóxia, fica claro que esses biomarcadores são altamente específicos para cada caso. No câncer pancreático, mecanismos de resistência, como sensibilidade reduzida à gemcitabina, surgem à medida que EVs hipóxicos promovem esses efeitos, conforme demonstrado por Zeng et al., 2021. Por outro lado, no câncer colorretal, há circRNAs como circEIF3K que estão mais associados à evasão imunológica, enquanto no câncer de pulmão, circRNAs como circPLEKHM1 previnem ativamente a metástase e alteram o microambiente tumoral. Essas variações destacam a natureza específica do tecido dos circRNAs responsivos à hipóxia e enfatizam a presença de várias vias regulatórias ativadas por vesículas.

Finalmente, EVs contendo circRNAs são biomarcadores valiosos para pacientes com vários tipos de câncer em estágios de prognóstico e diagnóstico. Em um exemplo ilustrativo, os níveis de circZNF609 em EVs de pacientes com câncer de esôfago estão associados ao avanço do tumor, tornando-o um fator prognóstico potencial de desfecho ruim (Mao et al., 2024). Da mesma forma, no câncer de bexiga, os pesquisadores previram a resistência ao tratamento demonstrando a regulação positiva de circELP3 em condições hipóxicas (Su et al., 2019).

Além disso, em osteossarcomas, espera-se que pacientes com EVs portadores de circCYP51A1 tenham maior risco de desenvolver metástase, enquanto para gliomas, a expressão de circ101491 em níveis elevados se correlaciona com agressividade e pior prognóstico (Yang et al., 2022; Zhang et al., 2023). Portanto, essas evidências fortalecem o possível uso de circRNAs como meio para diagnósticos e alvos para medicina personalizada contra hipóxia.

## **6. Aplicabilidade clínica**

### **6.1 Es e ncRNAs: Perspectivas como biomarcadores tumorais**

EVs também possuem circRNAs e miRNAs como seus ncRNAs; nesse sentido, esses EVs podem ser considerados um dos biomarcadores mais específicos e promissores para diagnóstico, monitoramento e prognóstico de várias malignidades.

Esses ncRNAs regulados por hipóxia estão envolvidos na progressão do tumor e na resposta a medicamentos.

CircPFKFB4, circDENND4C e circWSB1 são ncRNAs regulados por hipóxia no câncer de mama, sendo significativamente associados à agressividade do tumor e ao mau prognóstico; portanto, são considerados ótimos candidatos para uso em biomarcadores não invasivos do progresso da doença (Chen et al., 2022).

No câncer colorretal, circRNAs como circEIF3K, circ-133 e mmu\_circ\_0000807 foram identificados como estando ligados à evasão imunológica e à disseminação da invasividade tumoral aumentada. Portanto, essas características tornam os circRNAs indicadores altamente confiáveis para diagnóstico precoce e avaliação de risco de metástase (Yang et al., 2020).

Os circRNAs associados ao potencial metastático do câncer de pulmão incluem circPLEKHM1, circ\_0007386 e circ\_0001875. No sangue, eles fornecem um meio menos invasivo de monitorar a carga tumoral e a resposta ao tratamento em condições hipóxicas, sendo encontrados em exossomos circulantes (Li et al., 2024; Wu et al., 2022).

CircRNAs metabólicos circulantes, como circMAT2B e circPRDM4, foram associados a alterações metabólicas e evasão imunológica no carcinoma hepatocelular, duas características essenciais da evolução do tumor adaptadas a ambientes de baixo oxigênio. Uma quantidade considerável de circPRDM4 em EVs indica um sistema imunológico suprimido, enquanto circMAT2B é um identificador para pacientes com CHC avançado (Li et al., 2019; Chen et al., 2023).

No câncer gástrico, circRNAs, incluindo circC6orf132 e circSLAMF6, surgiram como fatores que contribuem para o metabolismo das células tumorais em ambientes hipóxicos. Enquanto isso, esses biomarcadores são atividades proliferativas e atividades de motilidade e, portanto, indicam tipos de tumores mais agressivos com potencial metastático mais significativo (Fang et al., 2021).

CircPDK1 e circZNF91 são circRNAs relatados como indicadores prognósticos no câncer pancreático. A expressão aumentada de circPDK1 é menos favorável em

relação ao prognóstico, e circZNF91 pode prever resistência à gemcitabina, um agente de tratamento essencial no câncer de pâncreas (Lin et al., 2022; Zeng et al., 2021).

No câncer de esôfago, níveis aumentados de circZNF609 em Evs da circulação foram correlacionados com a progressão do tumor e têm um valor preditivo negativo. Este circRNA pode não apenas prever o estágio do câncer, mas também pode desempenhar um papel no desenvolvimento de terapêuticas mais direcionadas e ser menos invasivo no monitoramento da progressão da doença (Mao et al., 2024).

A hipóxia regula a expressão do circRNA circELP3 no câncer de bexiga, e a hipóxia aumenta a expressão de circELP3. O aumento de circELP3 foi identificado como um fator importante na resistência à terapia e pode servir como um biomarcador preditivo no câncer de bexiga, indicando uma maior chance de resistência à terapia e pior resposta ao tratamento (Su et al., 2019).

No osteossarcoma, a presença de circCYP51A1 em EVs previu o risco de metástase, enquanto no glioma, níveis circunferenciais aumentados se correlacionaram bem com doença agressiva e prognóstico ruim, reforçando a relevância desses circRNAs como biomarcadores no contexto de malignidades do sistema nervoso central (Yang et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Estes são alguns exemplos de como os ncRNAs em EVs podem definir a extensão da agressividade em tumores, oferecer um método não invasivo para quantificar dinamicamente diferentes tipos de câncer e podem ser essenciais para adaptar o tratamento clínico e prever a resposta ao tratamento, especialmente em contextos hipóxicos. Assim, eles dão origem a novos horizontes para terapias direcionadas e terapêuticas mais precisas.

## **6.2 miRNAs em diferentes tipos de câncer: indicadores de prognóstico e progressão**

ncRNAs, como miRNAs, foram identificados para regular vários tipos de câncer no desenvolvimento de tumores e resposta à hipóxia. miR-1287-5p é o candidato mais forte entre miRNAs que mediam vias centrais no câncer de mama; portanto, sua expressão pronunciada se correlacionou com tumores agressivos e prognóstico ruim (Qiu et al., 2021). miR-133a e miR-214 foram estudados por seus papéis no controle da progressão tumoral e escape imunológico no câncer colorretal. A expressão aberrante de

ambos os miRNAs foi associada a estágios posteriores da doença e resultados ruins para o paciente (Yang et al., 2020; Yang et al., 2021).

No câncer de pulmão, o miR-1182 altera a proliferação em condições hipóxicas, o que pode ser considerado um excelente marcador prognóstico porque seus níveis estão associados a um melhor prognóstico (Li et al., 2020). Além disso, o miR-383-5p é um regulador crucial do crescimento e proliferação tumoral por meio do eixo circRNA-circ\_0007386/miR-383-5p/CIRBP; sob hipóxia, sua regulação seria modificada pela associação de YAP1-EIF4A3 que delinea sua função na dinâmica do tumor (Li et al., 2024). O miR-431, o miR-338-3p e o miR-532-3p interferirão na regulação da dinâmica e do metabolismo do tumor do carcinoma hepatocelular. Níveis mais altos de miR-431 e miR-338-3p estão atualmente associados a uma pior sobrevivência (Du et al., 2020; Li et al., 2019; Ouyang et al., 2021). Os níveis de miR-873-5p e miR-204-5p são altos em células de câncer gástrico, uma mudança que afeta a sobrevivência celular e a resistência à terapia, e existe uma correlação positiva entre esses níveis altos e doenças mais avançadas e resistência ao tratamento (Chen et al., 2021; Fang et al., 2021).

Por exemplo, miR-628-3p, miR-23b-3p e miR-766-5p, com o impacto na progressão das células do câncer pancreático e na resistência aos medicamentos, e que desregula ainda mais leva à pior sobrevivência e manifestações agressivas, foram citados por Lin et al. (2022), Zeng et al. (2021) e He et al. (2022). Na verdade, o nível de expressão muito baixo de miR-150-5p indica mau prognóstico no fenótipo tumoral agressivo de cânceres de esôfago (Mao et al., 2024). No osteossarcoma, a regulação negativa de miR-490-3p regula a invasividade e a metástase por meio das vias KLF12; alto potencial metastático está relacionado à invasão (Yang et al., 2022). A baixa expressão de miR-125b-5p foi recentemente associada a mau prognóstico, fenótipos tumorais agressivos e condições hipóxicas em glioma (Zhang et al., 2023).

Em conclusão, os miRNAs são agentes reguladores críticos durante condições tumorais hipóxicas e envolvem proliferação, metástase e resistência ao tratamento em diferentes tipos de câncer. A expressão aberrante de diferentes miRNAs, como miR-1287-5p no câncer de mama e miR-1182 no câncer de pulmão, é indicativa de suas habilidades como biomarcadores e novos alvos terapêuticos. Mais estudos serão

necessários para determinar sua significância clínica em futuras terapias personalizadas contra o câncer.

## **7. Aplicações terapêuticas potenciais**

### Câncer Colorretal

Em circRNAs, circ-eif3k e circ-rna-133 estão envolvidos na evasão imunológica e agressividade do tumor. circRNA-133 regula diretamente miR-133a, o que pode impedir o progresso do câncer. Pode ser possível usar miR-133a em abordagens terapêuticas via Evs para neutralizar o efeito pró-tumor de circRNA-133. mmu\_circ\_0000807 também está associado à metástase e à dinâmica tumoral do câncer colorretal. Prevenir sua expressão pode restringir a capacidade metastática também. Entre os ácidos microrribonucleicos que regulam vias tumorais específicas críticas para o câncer colorretal, especialmente durante a hipóxia, miR-214 é ressuscitável em tumores com terapia baseada em EV ou lipossomo.

A modulação de circRNA e miRNA pode abrir novos caminhos em inovações terapêuticas ao levar o tratamento personalizado para abordagens menos invasivas. A administração seletiva mediada por EV pode proteger parte do sangue de encontrar novos caminhos para cooperar com terapias. Emitir precisamente esses ncRNAs também é a opção mais brilhante para terapia direcionada contra progressão tumoral e resistência ao tratamento.

### Câncer de mama

Além do miRNA-1287-5p, vários outros circRNAs e miRNAs funcionam em conjunto como participantes importantes na progressão do tumor de câncer de mama e também podem servir como alvos terapêuticos. O circPFKFB4 induzido promove a progressão do tumor por meio do metabolismo e proliferação responsáveis pela tumorigênese. Terapias como inibição seletiva ou sistema de edição genética CRISPR/Cas9 para silenciar a expressão do circPFKFB4 reduzirão a proliferação e o comportamento invasivo das células tumorais.

Um importante circRNA relacionado ao câncer de mama é o circ\_0001982. Seus papéis importantes envolvem o controle do miR-1287-5p e do gene MUC19, que afeta a progressão do tumor. miR-1287-5p também é um regulador negativo de muitos genes

associados à resistência à apoptose na proliferação celular. O volume e o peso do tumor diminuem após a redução do circ\_0001982, sugerindo que a modulação deste circRNA pode ser uma estratégia terapêutica. Assim como os tumores resistentes à terapia, o fornecimento externo de miR-1287-5p usando EVs ou nanopartículas lipídicas pode restaurar o efeito inibitório do miRNA.

circDENND4C é outro circRNA importante do câncer de mama. Ele está envolvido com miR-200b e modifica a capacidade de proliferação celular das células do câncer de mama que desenvolvem condições especialmente hipóxicas. Silenciar o circDENND4C reduz significativamente a proliferação celular e a capacidade metastática, conforme comprovado por modelos experimentais. Muitos benefícios podem ser derivados pela adoção de estratégias terapêuticas que restrinjam a invasão e a metástase por meio da inibição desse circRNA.

Além disso, o circWSB1 promove o crescimento do tumor por meio de vias de sobrevivência celular e resistência à terapia, o que é importante para a progressão do tumor. A inibição do circWSB1 pode reduzir a formação de metástases e tornar os tumores menos agressivos. A inibição da interação do circWSB1 com seus miRNAs alvo, por exemplo, miR-1287-5p é promissora para o tratamento da progressão do câncer de mama.

Métodos terapêuticos que empregam modulação de circRNA e miRNA para tratar câncer de mama incluem administração exógena de miRNA e inibição de circRNA. EVs podem aumentar ainda mais a eficácia dessas terapias porque podem direcionar os agentes terapêuticos diretamente para as células tumorais, superando as limitações dos métodos convencionais. Quando adaptadas com base no perfil molecular do tumor, essas abordagens prometem tratamentos mais eficazes e menos invasivos para os pacientes..

### Câncer de pulmão

No câncer de pulmão, exossomos circulantes carregando circRNAs circ\_0007386 e circ\_0001875 se correlacionam com metástase e agressividade tumoral. Abordagens terapêuticas visando inibir esses circRNAs, usando siRNAs ou bloqueadores em sistemas de entrega baseados em EV, reduziriam a invasividade das

células tumorais. Além disso, miR-1182 é um mir supressor de tumor produzido por meio de circRNAs em condições hipóxicas que inibem o crescimento celular. A restauração do efeito inibitório de miR-1182 em modelos tumorais seria possível por meio da introdução deste mir com quantidades minúsculas de EV ou introdução de lipossomos. Além disso, circ\_0000376 associado ao crescimento pró-células em condições hipóxicas promoveria ainda mais a progressão do tumor, reduzindo a proliferação celular por meio do bloqueio terapêutico deste circRNA para seus miRNAs alvo.

#### Carcinoma hepatocelular (HCC)

Em resumo, o circMAT2B gerencia o metabolismo de células tumorais em condições de hipóxia de baixa pressão de oxigênio e estágios de imunossupressão em condições de estado de doença mais avançado. Em projetos experimentais, mesmo em aplicações de abordagens de edição genética, como a de CRISPR/Cas9 ou inibidores específicos por meio de entrega em EVs, pode ter um impacto terapêutico para reduzir a expressão do circMAT2B. O circ\_0008450 governa o miR-431 e promove a sobrevivência celular e a invasão tumoral. Portanto, bloquear sua interação com o miR-431 inibiria a invasão e a metástase no HCC. O miRNA miR-532-3p está associado a processos cruciais de regulação molecular no HCC, que, quando restaurados, podem reduzir significativamente o comportamento agressivo do tumor. A reintrodução do miR-532-3p em tumores por meio de EVs modificados pode potencialmente emergir como um modo de ação terapêutico eficaz.

#### Câncer gástrico

No câncer gástrico, circRNAs-circC6orf132 e circSLAMF6- estão associados a miR-873-5p e miR-204-5p e têm potencial terapêutico. Terapias envolvendo EVs para a modulação de tais ncRNAs seriam um passo para restringir a proliferação de células e a motilidade de tumores, diminuindo assim o pool de potencial metastático e aumentando a eficácia de terapias convencionais..

#### Câncer de Pâncreas

CircZNF91 e miR-23b-3p têm o potencial de quebrar a resistência contra a gemcitabina, um dos quimioterápicos mais usados no câncer de pâncreas. A administração exógena de circZNF91 via EVs sensibilizará as células tumorais ao

tratamento. Além disso, circATG7 por meio de miR-766-5p pode ser avaliado para reduzir a progressão do tumor e melhorar os resultados clínicos.

Neoplasia esofágica, câncer de esôfago, pode ser alvo de tratamento por meio de moléculas miR-150-5p adequadas para uso terapêutico na progressão do câncer de esôfago. EVs que continham esse miRNA poderiam modular as vias tumorais e, portanto, melhorar os resultados do paciente em estágios avançados do tumor.

#### Câncer de bexiga

Em condições hipóxicas, a regulação positiva de circELP3 ocorre em associação com os mecanismos subjacentes à resistência ao tratamento no câncer de bexiga; portanto, essas representam abordagens terapêuticas que alteram a expressão desse circRNA para melhorar a resposta à quimioterapia.

#### Osteossarcoma

miR-490-3p e a via associada com KLF12 poderiam deter o alto risco metastático no osteossarcoma. Outra maneira possível de administrar miR-490-3p para suprimir a invasão tumoral seria por meio de EVs.

#### Glioma

No glioma, miR-125b-5p está envolvido em processos tumorais sob hipóxia. O comportamento agressivo do tumor poderia ser reduzido por terapias direcionadas que modulam esse miRNA. A administração de miR-125b-5p no tecido afetado por meio de EVs poderia, portanto, ser mais uma nova estratégia terapêutica em gliomas resistentes ao tratamento..

### **7. Limitações e desafios**

No entanto, há desafios significativos nessa direção; a aplicação clínica translacional de EVs e ncRNAs é muito promissora no campo do câncer, mas complica muito as situações. Um grande obstáculo diz respeito à padronização em protocolos de isolamento e caracterização de EVs, uma vez que esses fatores críticos são essenciais para garantir a reprodutibilidade e aplicações em larga escala. Além disso, a maioria dos ncRNAs é funcionalmente redundante, o que representa mais dificuldades na

determinação de sua especificidade neste cenário complexo de microambiente tumoral e na relevância da aplicabilidade clínica. Isso induz a necessidade de estudos elaborados sobre esses ncRNAs para validar sua significância em várias condições clínicas.

Embora os modelos animais sejam indispensáveis à pesquisa pré-clínica, eles não preveem totalmente os resultados humanos. No entanto, eles fornecem insights valiosos no nível pré-clínico e estabelecem as bases para a compreensão de como os EVs e os ncRNAs funcionam na biologia tumoral e em contextos terapêuticos. As diferenças na fisiologia, resposta imune e progressão tumoral devem ser reconhecidas porque influenciam fortemente os resultados que podem diferir nos experimentos. No entanto, os testes em animais ainda fornecerão orientação significativa para experimentos iniciais, testes de hipóteses e otimização de estratégias de tratamento, que podem então prosseguir para testes em humanos.

## **8. Perspectivas futuras**

Indicadores de que a integração de EVs e ncRNAs na prática clínica pode revolucionar o tratamento do câncer. Isso inclui caminhos promissores nos quais a identificação precoce de biomarcadores em fluidos corporais, ou seja, biópsias líquidas, pode ser integrada com intervenções terapêuticas baseadas em ncRNAs funcionais. Abordagens de tratamento individualizadas direcionadas por perfis moleculares específicos dos EVs em questão provavelmente mudarão o cenário terapêutico em relação ao câncer, particularmente em casos de hipóxia, onde as abordagens terapêuticas atuais são limitadas.

Uma abordagem empolgante já realizada em algumas investigações é a configuração do câncer em modelos animais, seguida pelo tratamento com EVs para verificar sua eficácia na redução do tumor.<sup>54-56</sup> Esse modelo experimental pode permitir avaliações dos efeitos desses EVs no tamanho do tumor e seus efeitos inibitórios sobre circRNAs e miRNAs envolvidos no crescimento e metástase do tumor. Além disso, pode interromper vias metabólicas críticas, como a glicólise. Portanto, oferece uma excelente oportunidade para testar novas terapias que prometem melhorar o prognóstico do paciente por meio da modulação desses ncRNAs, o que pode contribuir para um prognóstico ruim do paciente.

## 9. Conclusão

Esta revisão sistemática visa reunir informações existentes sobre os papéis regulatórios de miRNAs e circRNAs em condições hipóxicas em relação a diferentes tipos de câncer usando modelos animais. O uso de modelos animais para abordar essa questão fornece as informações mais valiosas, preenchendo a lacuna nas informações fornecidas por modelos *in vitro*. Isso nos permite entender melhor os mecanismos relacionados ao câncer e avançar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Entender as interações entre essas moléculas e a perspectiva de EVs como portadores de ncRNAs pode estabelecer novas maneiras de avançar abordagens terapêuticas e tratamentos personalizados. Essas descobertas exigem estudos adicionais sobre a validação desses biomarcadores em termos de relevância clínica, abrindo caminho para um gerenciamento de câncer mais eficaz e personalizado em ambientes hipóxicos.

A coleta de dados atual envolvendo modelos animais ajuda a estabelecer bases críticas de conhecimento, no entanto, ensaios clínicos são indicados para avaliar a eficácia e a segurança dessas estratégias quando aplicadas a pacientes humanos. Estudos clínicos bem projetados serão necessários para transferir as evidências para a prática e garantir seus possíveis benefícios para o tratamento do câncer em contextos realistas.

### Declaração de Interesse

Os autores não têm conflito de interesses

### Disponibilidade de dados

Nenhum dado foi usado para a pesquisa descrita no artigo.

### Referências

1. Plutynski, A. How is cancer complex?. *Euro Jnl Phil Sci* **11**, 55 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13194-021-00371-8>
2. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem.* 2021 Oct 27;65(4):625-639. doi: 10.1042/EBC20200032. PMID: 33860799; PMCID: PMC8564738.

3. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247. PMID: 22955616; PMCID: PMC3439153.
4. Zhang, F., Jiang, J., Qian, H. et al. Exosomal circRNA: emerging insights into cancer progression and clinical application potential. *J Hematol Oncol* 16, 67 (2023). <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01452-2>
5. Taverna S, Masucci A, Cammarata G. PIWI-RNAs Small Noncoding RNAs with Smart Functions: Potential Theranostic Applications in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 1;15(15):3912. doi: 10.3390/cancers15153912. PMID: 37568728; PMCID: PMC10417041.
6. Wang H, Meng Q, Qian J, Li M, Gu C, Yang Y. Review: RNA-based diagnostic markers discovery and therapeutic targets development in cancer. *Pharmacol Ther*. 2022 Jun;234:108123. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108123. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35121000.
7. Büttner-Teleagă A, Kim YT, Osel T, Richter K. Sleep Disorders in Cancer-A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Nov 7;18(21):11696. doi: 10.3390/ijerph182111696. PMID: 34770209; PMCID: PMC8583058.
8. Cowland, J.B., Hother, C. and Grønbaek, K. (2007), MicroRNAs and cancer<sup>‡</sup>. *APMIS*, 115: 1090-1106. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_775.xml.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_775.xml.x)
9. Wen D, Danquah M, Chaudhary AK, Mahato RI. Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: Promises and obstacles. *J Control Release*. 2015 Dec 10;219:237-247. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.011. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26256260; PMCID: PMC4749151.
10. Ye Y, Hu Q, Chen H, Liang K, Yuan Y, Xiang Y, Ruan H, Zhang Z, Song A, Zhang H, Liu L, Diao L, Lou Y, Zhou B, Wang L, Zhou S, Gao J, Jonasch E, Lin SH, Xia Y, Lin C, Yang L, Mills GB, Liang H, Han L. Characterization of Hypoxia-associated Molecular Features to Aid Hypoxia-Targeted Therapy. *Nat Metab*. 2019 Apr;1(4):431-444. doi: 10.1038/s42255-019-0045-8. Epub 2019 Mar 18. PMID: 31984309; PMCID: PMC6980239.

11. Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Sci China Life Sci.* 2017 Oct;60(10):1114-1124. doi: 10.1007/s11427-017-9178-y. Epub 2017 Oct 13. PMID: 29039125; PMCID: PMC6131113.
12. Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, D'Orazi G. Inhibition of HIF-1alpha activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis. *Mol Cancer.* 2009 Jan 7;8:1. doi: 10.1186/1476-4598-8-1. PMID: 19128456; PMCID: PMC2628864.
13. Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jul;7(7):1961-73. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0198. PMID: 18645006.
14. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):613-21. PMID: 15695406.
15. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019 Nov 11;18(1):157. doi: 10.1186/s12943-019-1089-9. PMID: 31711497; PMCID: PMC6844052.
16. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2021 May 27;22(11):5703. doi: 10.3390/ijms22115703. PMID: 34071836; PMCID: PMC8199012.
17. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25288114.
18. Taverna S, Giusti I, D'Ascenzo S, Pizzorno L, Dolo V. Breast Cancer Derived Extracellular Vesicles in Bone Metastasis Induction and Their Clinical Implications as

- Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020 May 18;21(10):3573. doi: 10.3390/ijms21103573. PMID: 32443642; PMCID: PMC7278927.
19. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2019 Apr 2;18(1):75. doi: 10.1186/s12943-019-0991-5. PMID: 30940145; PMCID: PMC6444571.
  20. Eguchi T, Sheta M, Fujii M, Calderwood SK. Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2022 Nov;86(Pt 1):112-126. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.01.003. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35032650.
  21. Di Bella MA, Taverna S. Extracellular Vesicles: Diagnostic and Therapeutic Applications in Cancer. *Biology (Basel).* 2024 Sep 12;13(9):716. doi: 10.3390/biology13090716. PMID: 39336143; PMCID: PMC11446462.
  22. Osaid Z, Haider M, Hamoudi R, Harati R. Exosomes Interactions with the Blood-Brain Barrier: Implications for Cerebral Disorders and Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 26;24(21):15635. doi: 10.3390/ijms242115635. PMID: 37958619; PMCID: PMC10648512.
  23. He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, Xie H, Peng X, Yin W, Tao Y, Wang X. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci.* 2020 Jul 19;16(14):2628-2647. doi: 10.7150/ijbs.47203. PMID: 32792861; PMCID: PMC7415433.
  24. Coan M, Haefliger S, Ounzain S, Johnson R. Targeting and engineering long non-coding RNAs for cancer therapy. *Nat Rev Genet.* 2024 Aug;25(8):578-595. doi: 10.1038/s41576-024-00693-2. Epub 2024 Feb 29. PMID: 38424237.
  25. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, Shekelle P, Stewart LA; PRISMA-P Group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev.* 2015 Jan 1;4(1):1. doi: 10.1186/2046-4053-4-1. PMID: 25554246; PMCID: PMC4320440.
  26. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res*

- Methodol. 2014 Mar 26;14:43. doi: 10.1186/1471-2288-14-43. PMID: 24667063; PMCID: PMC4230647.
27. Chen H, Yang R, Xing L, Wang B, Liu D, Ou X, Deng Y, Jiang R, Chen J. Hypoxia-inducible CircPFKFB4 Promotes Breast Cancer Progression by Facilitating the CRL4<sup>DDb2</sup> E3 Ubiquitin Ligase-mediated p27 Degradation. *Int J Biol Sci.* 2022 Jun 6;18(9):3888-3907. doi: 10.7150/ijbs.72842. PMID: 35813480; PMCID: PMC9254479.
  28. Qiu Z, Wang L, Liu H. Hsa\_circ\_0001982 promotes the progression of breast cancer through miR-1287-5p/MUC19 axis under hypoxia. *World J Surg Oncol.* 2021 Jun 3;19(1):161. doi: 10.1186/s12957-021-02273-8. PMID: 34082777; PMCID: PMC8176694.
  29. Ren S, Liu J, Feng Y, Li Z, He L, Li L, Cao X, Wang Z, Zhang Y. Knockdown of circDENND4C inhibits glycolysis, migration and invasion by up-regulating miR-200b/c in breast cancer under hypoxia. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Sep 5;38(1):388. doi: 10.1186/s13046-019-1398-2. PMID: 31488193; PMCID: PMC6727545.
  30. Yang R, Chen H, Xing L, Wang B, Hu M, Ou X, Chen H, Deng Y, Liu D, Jiang R, Chen J. Hypoxia-induced circWSB1 promotes breast cancer progression through destabilizing p53 by interacting with USP10. *Mol Cancer.* 2022 Mar 29;21(1):88. doi: 10.1186/s12943-022-01567-z. PMID: 35351136; PMCID: PMC8961958.
  31. Yang H, Zhang H, Yang Y, Wang X, Deng T, Liu R, Ning T, Bai M, Li H, Zhu K, Li J, Fan Q, Ying G, Ba Y. Erratum: Hypoxia induced exosomal circRNA promotes metastasis of Colorectal Cancer via targeting GEF-H1/RhoA axis: Erratum. *Theranostics.* 2024 May 18;14(8):3081. doi: 10.7150/thno.98415. Erratum for: *Theranostics.* 2020 Jul 9;10(18):8211-8226. doi: 10.7150/thno.44419. PMID: 38855172; PMCID: PMC11155405.
  32. Yang K, Zhang J, Bao C. Exosomal circEIF3K from cancer-associated fibroblast promotes colorectal cancer (CRC) progression via miR-214/PD-L1 axis. *BMC Cancer.* 2021 Aug 19;21(1):933. doi: 10.1186/s12885-021-08669-9. PMID: 34412616; PMCID: PMC8375187.

33. Shi L, Tao C, Tang Y, Xia Y, Li X, Wang X. Hypoxia-induced hsa\_circ\_0000826 is linked to liver metastasis of colorectal cancer. *J Clin Lab Anal.* 2020 Sep;34(9):e23405. doi: 10.1002/jcla.23405. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32633429; PMCID: PMC7521269.
34. Xiong L, Liu HS, Zhou C, Yang X, Huang L, Jie HQ, Zeng ZW, Zheng XB, Li WX, Liu ZZ, Kang L, Liang ZX. A novel protein encoded by circINSIG1 reprograms cholesterol metabolism by promoting the ubiquitin-dependent degradation of INSIG1 in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2023 Apr 22;22(1):72. doi: 10.1186/s12943-023-01773-3. PMID: 37087475; PMCID: PMC10122405.
35. Li C, Liu H, Niu Q, Gao J. Circ\_0000376, a Novel circRNA, Promotes the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating the miR-1182/NOVA2 Network. *Cancer Manag Res.* 2020 Aug 24;12:7635-7647. doi: 10.2147/CMAR.S258340. PMID: 32922073; PMCID: PMC7455537.
36. Li L, Liu D, Chen T, Wei C, Qiao Y, Liu W, Liang Y, Liang Z, Chen C, Li D, Wu B, Zhao X, Huang D, Wu D. Hypoxia-enhanced YAP1-EIF4A3 interaction drives circ\_0007386 circularization by competing with CRIM1 pre-mRNA linear splicing and promotes non-small cell lung cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2024 Jul 20;43(1):200. doi: 10.1186/s13046-024-03116-6. PMID: 39030638; PMCID: PMC11264895.
37. Wang D, Wang S, Jin M, Zuo Y, Wang J, Niu Y, Zhou Q, Chen J, Tang X, Tang W, Liu X, Yu H, Yan W, Wei HH, Huang G, Song S, Tang S. Hypoxic Exosomal circPLEKHM1-Mediated Crosstalk between Tumor Cells and Macrophages Drives Lung Cancer Metastasis. *Adv Sci (Weinh).* 2024 Jun;11(22):e2309857. doi: 10.1002/advs.202309857. Epub 2024 Mar 21. PMID: 38509870; PMCID: PMC11165461.
38. Wu D, Chen T, Zhao X, Huang D, Huang J, Huang Y, Huang Q, Liang Z, Chen C, Chen M, Li D, Wu B, Li L. HIF1 $\alpha$ -SP1 interaction disrupts the circ-0001875/miR-31-5p/SP1 regulatory loop under a hypoxic microenvironment and promotes non-small cell lung cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Apr 27;41(1):156. doi: 10.1186/s13046-022-02336-y. PMID: 35473752; PMCID: PMC9044860.
39. Chen ZQ, Zuo XL, Cai J, Zhang Y, Han GY, Zhang L, Ding WZ, Wu JD, Wang XH. Hypoxia-associated circPRDM4 promotes immune escape via HIF-1 $\alpha$  regulation of

- PD-L1 in hepatocellular carcinoma. *Exp Hematol Oncol.* 2023 Feb 6;12(1):17. doi: 10.1186/s40164-023-00378-2. PMID: 36747292; PMCID: PMC9903500.
40. Du Q, Han J, Gao S, Zhang S, Pan Y. Hypoxia-induced circular RNA hsa\_circ\_0008450 accelerates hepatocellular cancer progression via the miR-431/AKAP1 axis. *Oncol Lett.* 2020 Dec;20(6):388. doi: 10.3892/ol.2020.12251. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33193848; PMCID: PMC7656113.
  41. Li Q, Pan X, Zhu D, Deng Z, Jiang R, Wang X. Circular RNA MAT2B Promotes Glycolysis and Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Through the miR-338-3p/PKM2 Axis Under Hypoxic Stress. *Hepatology.* 2019 Oct;70(4):1298-1316. doi: 10.1002/hep.30671. Epub 2019 May 28. PMID: 31004447.
  42. Ouyang X, Yao L, Liu G, Liu S, Gong L, Xiao Y. Loss of androgen receptor promotes HCC invasion and metastasis via activating circ-LNPEP/miR-532-3p/RAB9A signal under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 11;557:26-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.120. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33862456.
  43. Chen W, Ji Y. CircC6orf132 Facilitates Proliferation, Migration, Invasion, and Glycolysis of Gastric Cancer Cells Under Hypoxia by Acting on the miR-873-5p/PRKAA1 Axis. *Front Genet.* 2021 Sep 30;12:636392. doi: 10.3389/fgene.2021.636392. PMID: 34659329; PMCID: PMC8514671.
  44. Fang X, Bai Y, Zhang L, Ding S. Silencing circSLAMF6 represses cell glycolysis, migration, and invasion by regulating the miR-204-5p/MYH9 axis in gastric cancer under hypoxia. *Biosci Rep.* 2020 Jun 26;40(6):BSR20201275. doi: 10.1042/BSR20201275. PMID: 32496549; PMCID: PMC7313448.
  45. Lin J, Wang X, Zhai S, Shi M, Peng C, Deng X, Fu D, Wang J, Shen B. Hypoxia-induced exosomal circPDK1 promotes pancreatic cancer glycolysis via c-myc activation by modulating miR-628-3p/BPTF axis and degrading BIN1. *J Hematol Oncol.* 2022 Sep 6;15(1):128. doi: 10.1186/s13045-022-01348-7. PMID: 36068586; PMCID: PMC9450374.
  46. Zeng Z, Zhao Y, Chen Q, Zhu S, Niu Y, Ye Z, Hu P, Chen D, Xu P, Chen J, Hu C, Hu Y, Xu F, Tang J, Wang F, Han S, Huang M, Wang C, Zhao G. Hypoxic exosomal HIF-1 $\alpha$ -stabilizing circZNF91 promotes chemoresistance of normoxic pancreatic cancer

- cells via enhancing glycolysis. *Oncogene*. 2021 Sep;40(36):5505-5517. doi: 10.1038/s41388-021-01960-w. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34294845.
47. He Z, Cai K, Zeng Z, Lei S, Cao W, Li X. Autophagy-associated circRNA circATG7 facilitates autophagy and promotes pancreatic cancer progression. *Cell Death Dis*. 2022 Mar 14;13(3):233. doi: 10.1038/s41419-022-04677-0. PMID: 35288538; PMCID: PMC8921308.
  48. Mao Y, Wang J, Wang Y, Fu Z, Dong L, Liu J. Hypoxia induced exosomal Circ-ZNF609 promotes pre-metastatic niche formation and cancer progression via miR-150-5p/VEGFA and HuR/ZO-1 axes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death Discov*. 2024 Mar 12;10(1):133. doi: 10.1038/s41420-024-01905-8. PMID: 38472174; PMCID: PMC10933275.
  49. Su Y, Yang W, Jiang N, Shi J, Chen L, Zhong G, Bi J, Dong W, Wang Q, Wang C, Lin T. Hypoxia-elevated circELP3 contributes to bladder cancer progression and cisplatin resistance. *Int J Biol Sci*. 2019 Jan 1;15(2):441-452. doi: 10.7150/ijbs.26826. PMID: 30745833; PMCID: PMC6367558.
  50. Yang J, Liu Z, Liu B, Sun L. Silencing of circCYP51A1 represses cell progression and glycolysis by regulating miR-490-3p/KLF12 axis in osteosarcoma under hypoxia. *J Bone Oncol*. 2022 Sep 28;37:100455. doi: 10.1016/j.jbo.2022.100455. PMID: 36276300; PMCID: PMC9579499.
  51. Zhang XH, Song YC, Qiu F, Wang ZC, Li N, Zhao FB. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal circ101491 promotes the progression of glioma by regulating miR-125b-5p/EDN1. *Brain Res Bull*. 2023 Apr;195:55-65. doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.02.006. Epub 2023 Feb 14. PMID: 36796652.
  52. Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2018;66(3):225-230. doi: 10.1248/cpb.c17-00789. PMID: 29491256.
  53. Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells*. 2019 Aug 13;8(8):889. doi: 10.3390/cells8080889. PMID: 31412684; PMCID: PMC6721637.

54. Korbecki J, Simińska D, Gąssowska-Dobrowolska M, Listos J, Gutowska I, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-κB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 2;22(19):10701. doi: 10.3390/ijms221910701. PMID: 34639040; PMCID: PMC8509318.
55. Tanaka, T.; Wiesener, M.; Bernhardt, W.; Eckardt, K.U.; Warnecke, C. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem. J.* 2009, 424, 143–151
56. Span, P.N.; Bussink, J. Biology of hypoxia. *Semin. Nucl. Med.* 2015, 45, 101–109.
57. Baluk, P.; Morikawa, S.; Haskell, A.; Mancuso, M.; McDonald, D.M. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 2003, 163, 1801–1815.
58. Lanzen, J.; Braun, R.D.; Klitzman, B.; Brizel, D.; Secomb, T.W.; Dewhirst, M.W. Direct demonstration of instabilities in oxygen concentrations within the extravascular compartment of an experimental tumor. *Cancer Res.* 2006, 66, 2219–2223.

## **6. Considerações finais**

A presente tese explorou o papel das vesículas extracelulares (EVs) e dos RNAs não codificantes (ncRNAs), em especial os miRNAs e circRNAs, na resposta celular à hipóxia, com ênfase em câncer. Os achados apresentados ao longo deste trabalho reforçam a influência crítica da hipóxia na progressão tumoral e destacam as EVs como importantes mediadoras na comunicação celular sob essas condições.

No contexto do câncer, a análise de modelos experimentais revelou que as EVs transportando ncRNAs modulam mecanismos fundamentais do microambiente tumoral, favorecendo a adaptação das células neoplásicas ao estresse hipóxico. A identificação de biomarcadores relevantes nesses vesículos oferece novas perspectivas para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da resposta terapêutica, consolidando o potencial da biópsia líquida como ferramenta promissora na oncologia. No entanto, para

a translação desses achados à prática clínica, ensaios bem controlados e padronizados são necessários, visando garantir a reprodutibilidade e a aplicabilidade dos resultados.

Os desafios metodológicos ainda representam um obstáculo significativo para a implementação das EVs como biomarcadores clínicos, devido à falta de padronização na sua caracterização e isolamento. No entanto, avanços tecnológicos, incluindo aprendizado de máquina e inteligência artificial, podem facilitar a descoberta e validação de novos biomarcadores baseados em EVs e ncRNAs, acelerando sua aplicação na medicina de precisão.

Diante dos achados apresentados, esta tese reforça a importância da investigação de EVs e ncRNAs na adaptação celular à hipóxia no câncer. A compreensão aprofundada desses mecanismos poderá não apenas aprimorar o diagnóstico e prognóstico dessas doenças, mas também abrir novas frentes para abordagens terapêuticas mais eficazes e personalizadas. Estudos futuros, incluindo ensaios clínicos e inovações biotecnológicas, serão fundamentais para validar o potencial das EVs e ncRNAs como ferramentas translacionais, consolidando seu papel na oncologia e na medicina do sono.

## **7. Conclusão**

A apneia do sono é uma doença multifatorial e complexa que acomete um grande número de pessoas em todo o mundo. Nos casos de apneia grave, um ambiente hipóxico se torna predominante, causando alterações fisiológicas nas células que, a longo prazo, juntamente com outros fatores de risco, estão relacionados ao surgimento do câncer. Dessa forma, a hipóxia intermitente atua como um fator crucial para a progressão tumoral.

Este trabalho explorou os mecanismos moleculares relacionados à hipóxia e sua relação com a biologia do câncer, com enfoque nas vesículas extracelulares e nos RNAs não codificantes, que desempenham um papel essencial na comunicação celular e na adaptação ao microambiente tumoral.

Os resultados apresentados mostram que as EVs desempenham um papel importante na biologia do câncer por meio das respostas celulares à hipóxia, transportando ncRNAs que influenciam processos críticos no desenvolvimento tumoral, como proliferação e resistência terapêutica. Além disso, as análises com circRNAs demonstram sua função regulatória em condições hipóxicas, evidenciando seu potencial

como biomarcadores para diagnóstico e resposta terapêutica.

Este trabalho também aborda a importância da utilização de modelos animais em estudos sobre hipóxia e câncer, destacando a necessidade de experimentos metodologicamente bem desenhados para testar achados *in vitro* e desenvolver novas abordagens terapêuticas que possam ser aplicadas na prática clínica. Além disso, organismos com adaptações evolutivas para sobreviverem a condições hipóxicas, como o ouriço-do-mar, podem ser utilizados como modelos para uma melhor compreensão dessa condição e para o desenvolvimento de terapias inovadoras.

Mesmo com os avanços, alguns desafios ainda persistem, como a padronização das metodologias para a utilização das EVs como biomarcadores, bem como o emprego de circRNAs como ferramentas diagnósticas e terapêuticas. É fundamental que ensaios clínicos sejam conduzidos para validar essas estratégias, possibilitando novas abordagens para a modulação da resposta hipóxica no câncer.

As descobertas apresentadas neste trabalho oferecem uma base para futuras investigações e reforçam a importância do desenvolvimento de estratégias variadas e translacionais para a criação de terapias cada vez mais eficazes e acessíveis no combate ao câncer.

## **8. Referências**

1. Gottlieb, DJ.; Punjabi, NM. Diagnosis and Management of Obstructive Sleep Apnea: A Review. *JAMA*. 2020;14;323;14:1389-1400.
2. Isidoro, SI.; Salvaggio, A.; Bue, AL.; Romano, S.; Marrone, O.; Insalaco, G. Effect of obstructive sleep apnea diagnosis on health related quality of life. *Health Qual Life Outcomes*. 2015;29;13:68.
3. Lv, R.; Liu, X.; Zhang, Y.; Dong N.; Wang, X.; He, Y.; et al. Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches in obstructive sleep apnea syndrome. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;25;8;1:218.
4. Kim, DH.; Kim, B.; Han, K.; Kim, SW. The relationship between metabolic syndrome and obstructive sleep apnea syndrome: a nationwide population based study. *Sci. Rep*. 2021;11;8751.
5. Young, T.; Skatrud, J.; Peppard, PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA*. 2004;291;2013–2016.
6. Peppard, P. E. et al. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am*.

J. Epidemiol. 2013;177;1006–1014. Entendido! Vou formatar as referências de 8 a 12 para corresponder à formatação da referência 7. Aqui estão as referências revisadas:

7. Taverna, S.; Amodeo, V.; Saieva, L.; Russo, A.; Giallombardo, M.; Leo, G.; Alessandro, R. Exosomal shuttling of miR-126 in endothelial cells modulates adhesive and migratory abilities of chronic myelogenous leukemia cells. *\*Mol Cancer\**. 2014;13:169.
8. Campos-Rodriguez, F.; Martinez-Garcia, M.A.; Martinez, M.; Duran-Cantolla, J.; Peña, M.D.L.; Masdeu, M.J.; Gonzalez, M.; Campo, F.D.; Gallego, I.; Marin, J.M.; et al. Association between Obstructive Sleep Apnea and Cancer Incidence in a Large Multicenter Spanish Cohort. *\*Am. J. Respir. Crit Care Med\**. 2013;187:99–105.
9. Cao, J.; Feng, J.; Li, L.; Chen, B. Obstructive sleep apnea promotes cancer development and progression: A concise review. *\*Sleep Breath\**. 2015;19:453–457.
10. Dewan, N.A.; Nieto, F.J.; Somers, V.K. Intermittent hypoxemia and OSA: Implications for comorbidities. *\*Chest\**. 2015;...
11. Gottlieb, D.J.; Punjabi, N.M.; Mehra, R.; Patel, S.R.; Quan, S.F.; Babineau, D.C.; Tracy, R.P.; Rueschman, M.; Blumenthal, J.B.; Redline, S. CPAP versus Oxygen in Obstructive Sleep Apnea. *\*N. Engl. J. Med\**. 2014;370:2276–2285.
12. Loffler, A.M.; Arzt, M. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *\*Eur. Respir. Rev\**. 2019;28:180100.
13. Urabe, F.; Kosaka, N.; Ito, K.; Kimura, T.; Egawa, S.; Ochiya, T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;1;318;1:C29-C39.

14. Niel, G.; Carter, DRF.; Clayton, A.; Lambert, DW.; Raposo, G.; Vader, P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23;5:369-382.
15. Carratù, P.; Ciaula, A.; Dragonieri, S.; Ranieri, T.; Ciccone, M.; Portincasa, P.; et al. Relationships between Obstructive Sleep Apnea Syndrome and cardiovascular risk in a naïve population of southern Italy. *Int J Clin Pract* 2021;75:14952
16. Veasey, SC.; Rosen, IM. Obstructive sleep apnea in adults. *N Engl J Med.* 2019;380:1442–1449.
17. Arnaud, C.; Bochaton, T.; Pépin, JL.; Belaidi, E. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences: pathophysiological mechanisms. *Arch Cardiovasc Dis* 2020;113:350–358.
18. Gopalakrishnan,P.; Tak, T. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Cardiol Rev.* 2011;19: 279–290
19. Zhang, H.; Peng, L.; Wang, Y.; Zhao, W.; Lau, WB.; Wang, Y.; et al. Extracellular vesicle-derived miR-144 as a novel mechanism for chronic intermittent hypoxia-induced endothelial dysfunction. *Theranostics.* 2022;16;12;9:4237-4249.
20. Liu, Y.; Lu, M.; Chen, J.; Li, S.; Deng, Y.; Yang, S.; et al. Extracellular vesicles derived from lung cancer cells exposed to intermittent hypoxia upregulate programmed death ligand 1 expression in macrophages. *Sleep Breath.* 2022;26;2:893-906.
21. Khalyfa, A.; Marin, JM.; Qiao, Z.; Rubio, DS.; Gozal LK.; Gozal, D. Plasma exosomes in OSA patients promote endothelial senescence: effect of long-term adherent continuous positive airway pressure. *Sleep.* 2020;13;43;2:zsz217.
22. Cai, PY.; Zheng, YL.; Zhou, YF.; Wang, WD.; Li, MM.; Shi, YC.; et al. Research progress on the role of exosomes in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome-related atherosclerosis. *Sleep Med Rev.* 2022;66:101696.
23. M6, MY.; Siljander, PR.; Andreu, Z.; Zavec, AB.; Borràs, FE.; Buzas, EI.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;14;4:27066.
24. Colombo, M.; Moita, C.; Niel, G.; Kowal, J.; Vigneron, J.; Benaroch, P.; et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci.* 2013;15;126;24:5553-65.
25. Mathieu, M.; Névo, N.; Jouve, M.; et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat Commun.* 2021;12:4389.
26. Shah, R.; Patel, T.; Freedman, JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N Engl J Med.* 2018;6;379;10:958-966.
27. Abels, ER.; Breakefield, XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36;3:301-12.

28. O'Brien, K.; Breyne, K.; Ughetto, S.; Laurent, LC.; Breakefield, XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21;10:585-606.
29. Low, N.H.N.; Micheli, F. Short- and long-term impacts of variable hypoxia exposures on kelp forest sea urchins. *Sci. Rep.* 2020, 10, 2632, doi:10.1038/s41598-020-59483-5.
30. Alijagic, A.; Russo, R.; Scuderi, V.; Ussia, M.; Scalese, S.; Taverna, S.; Engwall, M.; Pinsino, A. Sea urchin immune cells and associated microbiota co-exposed to iron oxide nanoparticles activate cellular and molecular reprogramming that promotes physiological adaptation. *J. Hazard. Mater.* 2024, 485, 136808, doi:10.1016/j.jhazmat.2024.136808.
31. Brown, P.N.; Yin, H. Polymer-Based Purification of Extracellular Vesicles. *Methods Mol. Biol.* 2017, 1660, 91–103.
32. Di Bella MA, Taverna S. Extracellular Vesicles: Diagnostic and Therapeutic Applications in Cancer. *Biology (Basel)*. 2024 Sep 12;13(9):716. doi: 10.3390/biology13090716. PMID: 39336143; PMCID: PMC11446462.
33. Tauro, B.J.; Greening, D.W.; Mathias, R.A.; Ji, H.; Mathivanan, S.; Scott, A.M.; Simpson, R.J. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 2012, 56, 293–304.
34. Karimi, N.; Cvjetkovic, A.; Jang, S.C.; Crescitelli, R.; Hosseinpour Feizi, M.A.; Nieuwland, R.; Lötval, J.; Lässer, C. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, 75, 2873–2886.
35. Arab, T.; Raffo-Romero, A.; Van Camp, C.; Lemaire, Q.; Le Marrec-Croq, F.; Drago, F.; Aboulouard, S.; Slomianny, C.; Lacoste, A.-S.; Guigon, I.; et al. Proteomic characterisation of leech microglia extracellular vesicles (EVs): Comparison between differential ultracentrifugation and Optiprep™ density gradient isolation. *J. Extracell. Vesicles* 2019, 8, 1603048.
36. Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2006, 30, 3.22.1–3.22.29.
37. Konoshenko, M.Y.; Lekchnov, E.A.; Vlassov, A.V.; Laktionov, P.P. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Res. Int.* 2018, 2018, 8545347
38. Brown, P.N.; Yin, H. Polymer-Based Purification of Extracellular Vesicles. *Methods Mol. Biol.* 2017, 1660, 91–103.
39. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5451-5465. doi: 10.1002/jcp.27486. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30471116.

40. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet.* 2023 Dec;24(12):816-833. doi: 10.1038/s41576-023-00611-y. Epub 2023 Jun 28. PMID: 37380761; PMCID: PMC11087887.
41. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Khalyfa AA, Philby MF, Alonso-Álvarez ML, Mohammadi M, Bhattacharjee R, Terán-Santos J, Huang L, Andrade J, Gozal D. Circulating Plasma Extracellular Microvesicle MicroRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Nov 1;194(9):1116-1126. doi: 10.1164/rccm.201602-0323OC. PMID: 27163713; PMCID: PMC5114451.
42. Lázaro, J., Sanz-Rubio, D., Clavería, P. et al. Effect of positive pressure ventilation and bariatric surgery on extracellular vesicle microRNAs in patients with severe obesity and obstructive sleep apnea. *Int J Obes* 47, 24–32 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01230-z>
43. Ross J. Marriott, Bhajan Singh, Nigel McArdle, Ellie Darcey, Stuart King, Daniela Bond-Smith, Ayesha Reynor, William Noffsinger, Kim Ward, Sutapa Mukherjee, David R. Hillman, Gemma Cadby. Does OSA Increase Risk for Cancer?: A Large Historical Sleep Clinic Cohort Study, *CHEST*, Volume 164, Issue 4, 2023, Pages 1042-1056, ISSN 0012-3692, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2023.04.043>.
44. Maren Diepenbruck, Gerhard Christofori, Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 43, 2016, Pages 7-13, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>.
45. Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, Fu W, Yi J, Wang J, Du G. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Sep;11(9):2783-2797. doi: 10.1016/j.apsb.2021.01.001. Epub 2021 Jan 7. PMID: 34589397; PMCID: PMC8463268.
46. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9621-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722. Epub 2010 Nov 23. PMID: 21098712.
47. Luga V, Wrana JL. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013 Dec 1;73(23):6843-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1791. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24265274