

Carlos André Araújo Duarte Monteiro

# MicroRNAs no cancro: Biomarcadores e alvos terapêuticos

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



Imagem da capa retirada de [http://www.labtimes.org/labtimes/method/methods/2011\\_07.lasso](http://www.labtimes.org/labtimes/method/methods/2011_07.lasso)  
[Acedido a 05 de Setembro de 2013]

Tutor da Monografia

---

(Professor Doutor João Nuno Moreira)

Aluno

---

(Carlos André Araújo Duarte Monteiro)

Eu, Carlos André Araújo Duarte Monteiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008010347, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2013

---

# Índice

---

Lista de abreviaturas.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Introdução .....	1
1. Contexto histórico .....	2
2. MicroRNAs.....	3
2.1. O que são?.....	3
2.2. Como são sintetizados no organismo humano? Onde são encontrados? .....	3
2.3. Qual a sua função e como a exercem? .....	5
3. MicroRNAs e o cancro.....	6
3.1. Qual a utilidade dos microRNAs como biomarcadores no cancro?.....	7
3.2. Qual a utilidade dos microRNAs como potenciais alvos das terapêuticas anti-tumorais? .....	8
4. Base de dados dos microRNAs (miRBase).....	11
5. MicroRNAs e o mercado farmacêutico .....	13
Conclusão.....	16
Bibliografia .....	v

## Lista de abreviaturas

---

*DGCR8* – DiGeorge syndrome critical region gene8

DNA – Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

FDA – Food and Drug Administration

IND – Investigational New Drug

miRBase – MicroRNA database (Base de dados de microRNAs)

miRNA – MicroRNA

mRNA – Messenger RNA (RNA mensageiro)

PCR – Polymerase chain reaction (Reacção em cadeia da polimerase)

Ran-GTP – Ran-Guanosine-5'-triphosphate (Ran- guanosina-5'-trifosfato)

RISC – RNA-Induced Silencing Complex

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

RT-PCR – Reverse-transcription polymerase chain reaction (Reacção em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)

TRBP – Transactivator RNA-binding protein

## Resumo

---

Até ao início dos anos 90 apenas se dava importância aos genes que levavam à formação de proteínas. A partir de 1993, quando se descobriu os microRNAs, o interesse por estas moléculas foi imediato.

Com o passar dos anos foi descoberta a sua via de síntese e o seu papel em diversas patologias, como no cancro. Sabe-se agora que estas moléculas são muito promissoras nas doenças oncológicas, tanto como biomarcadores como alvos terapêuticos. Como biomarcadores têm potencial para sinalizar indivíduos com elevado risco de desenvolver a doença, fazer o diagnóstico, diferenciar tumores benignos de malignos, estratificar o tipo de cancro quanto à resistência às terapêuticas, realizar o prognóstico e ainda monitorizar a resposta à terapêutica. Como alvos terapêuticos, podem permitir uma terapêutica personalizada, dirigida, com menores efeitos secundários.

Existem já empresas que se dedicam à investigação nesta área, com o intuito de introduzir os microRNAs na prática clínica. Ainda assim, existe um longo caminho a percorrer.

Deste modo, pretende-se fornecer uma visão geral sobre estas moléculas promissoras explicando os sucessos já alcançados e os desafios futuros.

## Abstract

---

Until the beginning of the 90's only the genes that led to protein formation were considered important. After 1993, when microRNAs were found, the interest for these molecules was immediate.

Throughout the years their biogenesis pathway was discovered as well as their role in several diseases, as in cancer. It is known now that these molecules are very promising in oncological diseases, both as biomarkers and therapeutic targets. As biomarkers they have potential to identify individuals with high risk to develop the disease, to make the diagnosis, to differentiate benign and malignant tumors, to classify the type of cancer according to the resistance to the therapy, to make the prognosis, and to monitor response to therapy. As therapeutic targets, they may enable personalized and targeted therapy, with fewer side effects.

There are already some companies dedicated to the research in this area, in order to introduce microRNAs in clinical practice. Still, there is a long way to go.

Thus, it is intended to provide an overview of these promising molecules explaining the successes already achieved and the challenges ahead.



# Introdução

---

Actualmente as doenças oncológicas são um dos maiores problemas de saúde pública, sendo responsáveis por mais de um quarto da mortalidade em muitos países. Prevê-se um aumento da incidência ao longo do tempo, estimando-se que se atinja os 15 milhões de novos casos por ano em 2020. <sup>(1)</sup> Em Portugal, tal como no resto do mundo, a incidência de cancro tem vindo a aumentar, e estima-se que cerca de 25 mil pessoas morrem todos anos devido a esta doença. <sup>(2)</sup>

Apesar de toda a investigação efectuada com o intuito de compreender melhor esta doença, ainda não se conseguiu alcançar avanços significativos ao nível do diagnóstico precoce e da terapêutica.

Desde a sua descoberta, em 1993, os microRNAs (miRNAs) despertaram grande interesse. Nos últimos anos têm mesmo emergido como uma classe de moléculas com grande potencial como biomarcadores tumorais, e são considerados as moléculas da próxima geração na terapêutica anti-tumoral. <sup>(3)</sup>

Na presente monografia, pretende-se fornecer uma visão geral sobre estas moléculas promissoras resultante dos avanços conseguidos desde a sua descoberta. Os tópicos abordados serão: miRNAs (o que são, a sua origem e acção); miRNAs e o cancro (como biomarcadores e como potencial alvo nas terapêuticas anti-tumorais); a base de dados dos miRNAs (miRBase) e miRNAs e o mercado farmacêutico.

# I. Contexto histórico

Até ao início dos anos 90 a comunidade científica focava-se apenas nos genes que levavam à síntese proteica, pois todos aceitavam o dogma de o Ácido desoxirribonucleico (DNA) ser transcrito em Ácido ribonucleico (RNA) e este ser traduzido em proteínas. Deste modo, não se estudava as sequências que não codificavam proteínas por se considerar que não tinham funções relevantes. A existência e a importância dos miRNAs era então completamente desconhecida.

Em 1993 foi descoberto o primeiro miRNA a partir do gene *lin-4* do genoma do nemátodo *Caenorhabditis elegans*.<sup>(4),(5)</sup> Apesar do interesse imediato nestas moléculas, só em 2001 se começou a descobrir como são sintetizadas no nosso organismo e em 2002 foram publicados os primeiros dados a relacioná-las com as doenças oncológicas. A partir desta altura a investigação nesta área aumentou significativamente.<sup>(4)</sup> (Fig. 1)

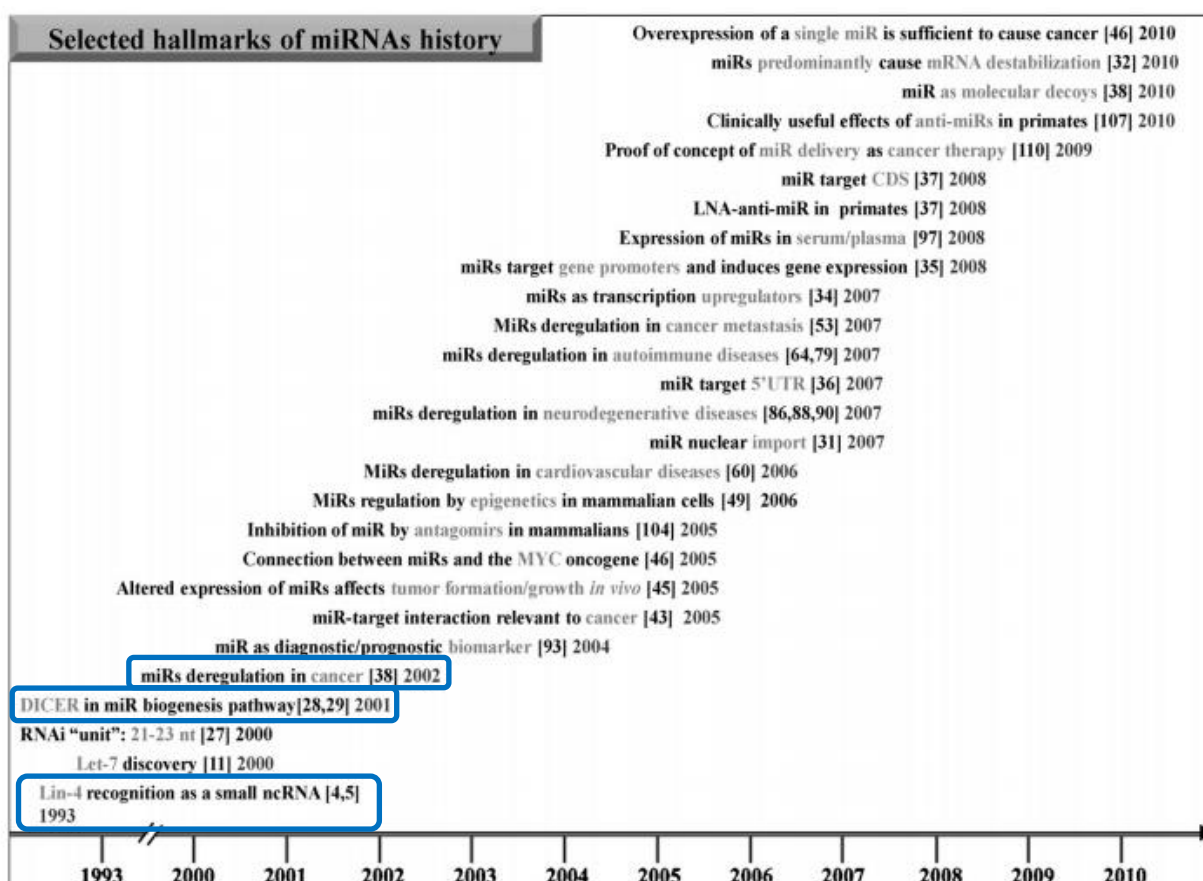


Fig. 1 – Esquema dos principais marcos na história dos miRNAs. (Retirado ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. - *MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers*. Mutation Research. 717 (2011), 1-8)

## 2. MicroRNAs

### 2.1. O que são?

Os microRNAs são pequenas moléculas de cadeia simples de RNA com cerca de 21 a 23 ribonucleótidos. (Fig. 2) Estas moléculas são não-codificantes, ou seja, a sua tradução não leva à produção de proteínas, e são compostos endógenos. <sup>(6)</sup>



Fig. 2 – Esquema de uma molécula de miRNA. (Adaptado de [http://www.laskerfoundation.org/awards/2008\\_b\\_description.htm](http://www.laskerfoundation.org/awards/2008_b_description.htm)) [Acedido a 27 de Agosto de 2013]

### 2.2. Como são sintetizados no organismo humano?

#### Onde são encontrados?

A biogénese dos miRNAs é um processo complexo constituído por diversas etapas. <sup>(6)</sup> Os genes que codificam para os miRNAs estão localizados maioritariamente em regiões intergénicas, mas também são encontrados dentro de regiões exónicas e intrónicas. Os genes destas moléculas podem estar organizados como genes individuais ou como grupos de genes representando famílias de miRNAs. Estas famílias estão normalmente relacionadas na sua função.

Em relação ao processo de síntese, este inicia-se no núcleo, local onde os genes dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II. Esta enzima pode usar o seu próprio promotor ou então o promotor do “gene hospedeiro” onde estão os genes dos miRNAs. Com a acção da RNA polimerase II resultam precursores de miRNAs de grandes dimensões, denominados miRNAs primários (pri-miRNAs). Estas moléculas possuem uma estrutura *cap* na extremidade 5’ e uma cadeia poliadenilada (poli-adeninas) na extremidade 3’. Ainda no núcleo, os pri-miRNAs sofrem a acção de um complexo microprocessador constituído pela RNase III Drosha associada a DiGeorge syndrome critical region gene8 (DGCR8). Daqui resultam os pré-miRNAs, precursores dos miRNAs com cerca de 70 ribonucleótidos que têm uma estrutura secundária imperfeita do tipo *stem-loop hairpin* (Fig. 3). Esta estrutura resulta quando duas regiões da mesma cadeia possuem nucleótidos

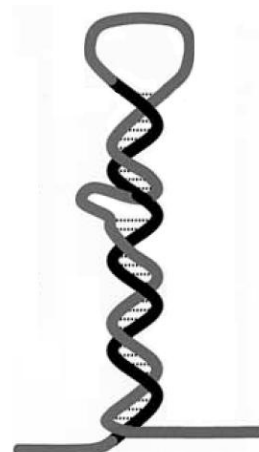


Fig. 3 – *Stem-loop hairpin*. (Retirado de SVOBODA, P.; CARA, A. D. - **Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance**. Cellular and Molecular Life Sciences. 63 (2006) 901-918)

complementares quando lida em direcções opostas e por isso forma-se uma dupla cadeia que termina com um ciclo desemparelhado. <sup>(7),(8),(9)</sup> Os pré-miRNAs são depois exportados para o citoplasma por intermédio da exportina 5 (proteína de exportação nuclear que utiliza como co-factor Ran-GTP). <sup>(9)</sup> No citoplasma, os pré-miRNAs são clivados pela RNase III Dicer (enzima que cliva moléculas de cadeia dupla de RNA) resultado uma molécula com aproximadamente 22 nucleótidos de comprimento. Esta “nova” molécula de cadeia dupla contém a cadeia do miRNA madura e a sua cadeia complementar. A cadeia de miRNA madura é normalmente seleccionada de acordo com as propriedades termodinâmicas. Em relação à cadeia complementar pensava-se que esta seria degradada. No entanto, alguns estudos recentes sugerem que esta cadeia pode ser seleccionada como uma cadeia funcional e ter também um importante papel biológico. Por fim, a cadeia madura é preferencialmente incorporada no *RNA-induced silencing complex* (RISC), complexo essencial à função do miRNA. O miRNA guia o RISC para o RNA mensageiro que contenha sequências complementares (mRNA alvo). <sup>(7),(8),(9)</sup> (Fig. 4)

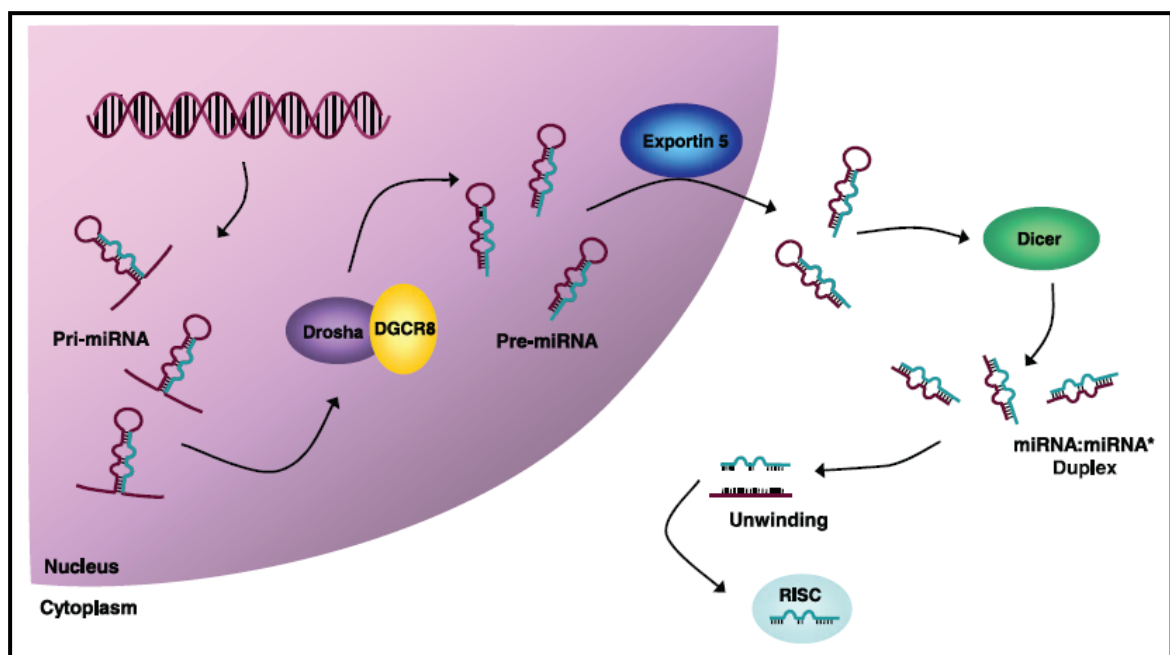


Fig. 4 – Esquema da síntese dos miRNAs nas células humanas. (Adaptado de BARTELS, C. L.; TSONGALIS, G. J. – **Novel Biomarkers for Human Cancer**. *Clinical Chemistry*. 55, 4 (2009), 624)

Para além dos miRNAs que se encontram no interior das células, torna-se ainda importante explicar que existe um conjunto de miRNAs que foram encontrados no soro, denominados miRNAs circulantes. Verificou-se que estas moléculas actuam nas células da mesma maneira dos miRNAs celulares. Surgiu então a dúvida se estas moléculas resultariam da morte e lise das células ou de secreção celular. Provou-se que estes miRNAs não estão associados à morte das células nem a fragmentos celulares, e que existem de forma estável e

protegida no soro. Ainda assim, não se sabe quais os mecanismos que determinam se os miRNAs são secretados ou retidos nas suas células originais. <sup>(10)</sup>

### 2.3. Qual a sua função e como a exercem?

Os miRNAs regulam a expressão de mais de trinta por cento de todos os genes que codificam proteínas. Estas moléculas exercem a sua função por regulação génica a um nível pós-transcrição, uma vez que se ligam a moléculas de mRNA alvo. Para o reconhecimento do alvo é muito importante a sequência de bases entre a base dois e a oito da extremidade 5' da cadeia do miRNA maduro pois esta é a região específica de reconhecimento. Dependendo da complementaridade desta sequência com a sequência da região 3' não traduzida do mRNA alvo, a forma como o miRNA exerce a função irá ser diferente. Assim, quando as duas sequências são perfeitamente complementares, a ligação induz a via do RNA interferência levando à clivagem do mRNA pela proteína argonata do complexo RISC. Porém, o mais comum é que as sequências não sejam totalmente complementares, o que leva a uma ligação imperfeita das sequências e conseqüentemente à repressão da tradução. Deste modo, os miRNAs podem reduzir os níveis de proteínas sem alterar significativamente os níveis dos mRNAs. <sup>(7),(11)</sup>

Foram ainda identificados alguns miRNAs que activam a expressão de certos genes-alvo de uma forma específica em vez de os silenciar. Este processo foi denominado *RNA activation*. Assim, foi criada uma nova percepção das funções dos miRNAs, pois para além do efeito inibitório, mais comum, também podem promover a expressão de certos genes. <sup>(11)</sup> (Fig. 5)

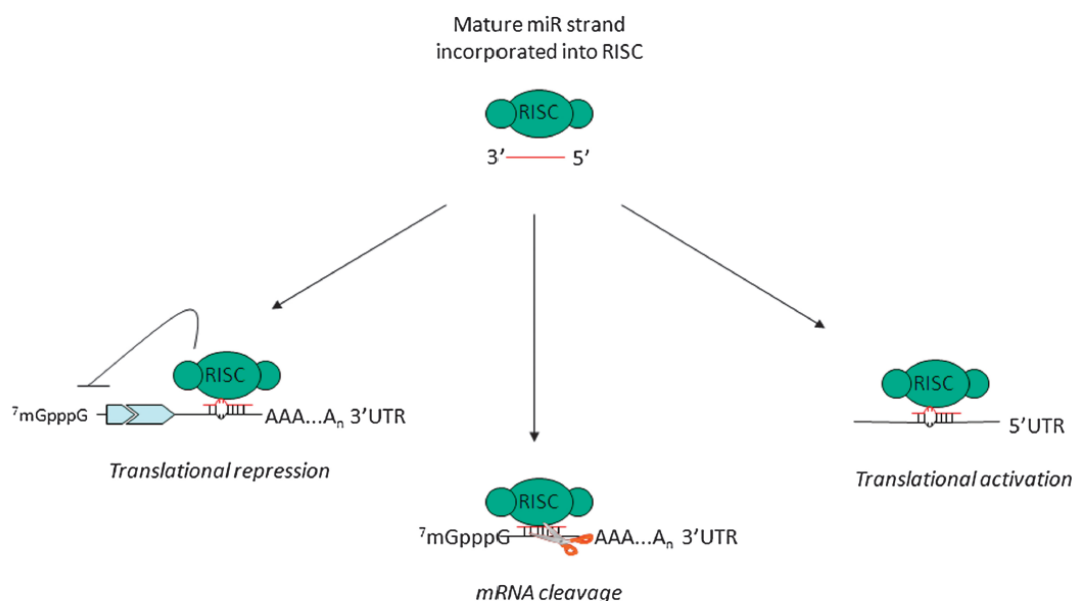


Fig. 5 – Efeitos dos miRNAs nas moléculas alvo.

(Retirado de IORIO, M. V.; CROCE, C. M. – **microRNA involvement in human cancer**. *Carcinogenesis*. 33 (2012) 1126-1133)

Existem imensos miRNAs no genoma humano que são expressos em diferentes tecidos e tipos de células. Cada um pode potencialmente regular diversos mRNAs. Os miRNAs estão assim envolvidos e têm um papel muito importante em quase todos os processos biológicos, como sejam a diferenciação, proliferação e a apoptose celular. Estas pequenas moléculas têm ainda um importante papel em diversas patologias, como é o caso das doenças oncológicas. <sup>(7),(8)</sup>

### 3. MicroRNAs e o cancro

---

Desde 2002 tem havido um grande esforço pela comunidade científica para perceber qual o papel dos miRNAs no cancro.

A utilização de diversas técnicas, como a reacção em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa, permitiu demonstrar que a expressão de miRNAs era anormal em muitos dos tumores humanos. Esse foi o primeiro passo para se considerar que realmente estas pequenas moléculas tinham de ter um papel importante no cancro. <sup>(6)</sup> Na verdade, os miRNAs podem ter um efeito muito relevante na carcinogénese, existindo estudos que evidenciam o seu papel em diversos processos, como na proliferação celular, angiogénese, apoptose, metastização e na invasão. <sup>(11)</sup> Dados recentes sugerem que o papel regulador destas moléculas não se limita às células tumorais mas também a todo o microambiente tumoral. Por exemplo, as células tumorais podem escapar aos ataques das células B e T através da libertação de miRNAs imunossupressivos <sup>(10),(11)</sup> ou por diminuição dos níveis de miRNAs importantes na síntese de células do sistema imunitário. De facto, um estudo revelou que os níveis de miR-142-3p se encontram diminuídos em certas neoplasias, levando a um bloqueio da diferenciação das células mielóides. <sup>(12)</sup> Desta forma, as células tumorais protegem-se através do enfraquecimento do sistema imunitário. Estas células podem ainda “recrutar” vasos sanguíneos através de miRNAs angiogénicos. Já as células do microambiente tumoral podem secretar miRNAs supressivos que bloqueiam o crescimento e propagação do tumor. Assim, pode ser estabelecido um equilíbrio entre sinais prós e contra o desenvolvimento tumoral. A quebra deste equilíbrio pode resultar em crescimento tumoral. <sup>(10),(11)</sup>

Assim, pelos diversos estudos realizados é notório o potencial destas moléculas para as doenças oncológicas.

### 3.1. Qual a utilidade dos microRNAs como biomarcadores no cancro?

A elevada mortalidade nas doenças oncológicas está frequentemente relacionada com o facto de o diagnóstico ser realizado já numa fase tardia e de ser difícil estabelecer um prognóstico correcto. <sup>(13)</sup> Embora os marcadores tumorais facilitem o diagnóstico, os actualmente disponíveis (principalmente enzimas e proteínas) necessitam de procedimentos invasivos, desagradáveis e ainda apresentam uma baixa sensibilidade e especificidade. <sup>(14)</sup> Assim, novos biomarcadores são urgentemente necessários para melhorar o diagnóstico, orientar para a terapêutica e monitorizar a resposta à terapêutica. <sup>(15)</sup>

Em 2008 foram identificados os primeiros miRNAs na circulação sanguínea, num estudo no qual os investigadores concluíram que os miRNAs produzidos pela placenta eram detectados no plasma materno. Também neste estudo 17 miRNAs placentários (hsa-miR-141 e hsa-miR-299, por exemplo) foram identificados como candidatos a marcadores para a monitorização da gravidez. <sup>(16)</sup> Noutro estudo verificou-se que doentes com linfoma difuso de células B grandes apresentavam níveis séricos elevados de alguns miRNAs (miRNA-155, miRNA-210 e miRNA-21) quando comparados com indivíduos saudáveis. <sup>(17)</sup> Começou então a considerar-se o potencial destas moléculas como biomarcadores. De facto, os miRNAs têm algumas das características ideais dos bons biomarcadores: são moléculas estáveis na circulação sanguínea (miRNAs resistem à digestão por RNAses) e resistem à manipulação; muitas das suas sequências são conservadas ao longo das espécies; mudanças nos níveis dos miRNAs em circulação têm sido associadas a diferentes estados patológicos e a parâmetros de prognóstico bem estabelecidos <sup>(7),(10)</sup> (Por exemplo, verificou-se num estudo que os níveis de miR-29a e miR-92a em amostras de plasma de doentes com neoplasia colo-rectal avançado eram significativamente maiores relativamente a controlos saudáveis. <sup>(18)</sup> Noutro estudo, os miRNAs miR-125 e miR-200a foram detectados em níveis muito inferiores na saliva de doentes com carcinoma epidermóide oral em relação a indivíduos controlo. <sup>(19)</sup>); e os níveis destas moléculas podem ser facilmente determinados por diversos métodos, como a PCR. Assim, os miRNAs circulantes poderiam ser considerados biomarcadores sensíveis e minimamente invasivos. <sup>(7),(10)</sup>

Dado o potencial inerente a estas moléculas, diversos estudos foram conduzidos com o objectivo de estabelecer relações entre os níveis de expressão dos miRNAs circulantes e as características dos indivíduos (doentes / saudáveis). Pretendia-se perceber as diferenças de expressão entre indivíduos saudáveis e doentes e ainda estratificar os doentes consoante

diferentes características que apresentassem (resistência a determinada terapêutica, sobrevivência média após diagnóstico, por exemplo). Estes estudos revelaram que o uso de miRNAs como biomarcadores no cancro apresenta diversas potenciais aplicações: sinalizar



Fig. 6 – Potencialidades dos microRNAs como biomarcadores no cancro.

indivíduos com elevado risco de desenvolver a doença; fazer o diagnóstico, diferenciando as pessoas saudáveis dos doentes (mesmo numa fase inicial da doença); diferenciar tumores benignos de malignos; estratificar o tipo de cancro quanto à resistência às terapêuticas; realizar o prognóstico; e ainda monitorizar a resposta à terapêutica. (Fig. 6) Tendo em conta estas informações poder-se-ia instituir uma terapêutica personalizada num estado precoce da doença, levando a uma maior probabilidade de sucesso.

No entanto, apesar dos avanços conseguidos nesta área, ainda existem alguns tópicos que devem ser explorados, nomeadamente a falta de reprodutibilidade dos métodos usados para a detecção destas moléculas, que continua a ser a principal dificuldade. Esta limitação é justificada pelo facto das moléculas apresentarem um tamanho muito pequeno e existirem diversas sequências muito semelhantes. Existe também falta de consenso em relação aos controlos e aos procedimentos para armazenar e manipular as amostras mais adequados. <sup>(7),(10),(20),(21)</sup>

### 3.2. Qual a utilidade dos microRNAs como potenciais alvos das terapêuticas anti-tumorais?

As opções terapêuticas disponíveis actualmente no mercado para os diversos tipos de tumores são muito escassas e apresentam imensos efeitos adversos. Ainda que os novos tratamentos tenham permitido uma maior sobrevivência, os resultados não são os desejados. Isto deve-se ao facto de se continuar a tratar os doentes com características clínicas semelhantes mas que apresentam variações a nível molecular com a mesma terapêutica, o que afecta o sucesso do tratamento. <sup>(6)</sup> Assim, tem havido um esforço no sentido de desenvolver terapêuticas dirigidas, específicas a cada caso. Os miRNAs podem ter um papel fundamental nesta área. <sup>(22)</sup>



Antes de mais, é importante explicar o fundamento da terapia com base na acção dos miRNAs. Assim, tal como explicado anteriormente, a expressão dos genes alvo é geralmente regulada negativamente pelos miRNAs, uma vez que estes levam à clivagem ou inibição da tradução dos mRNAs resultantes da transcrição dos genes. Os miRNAs podem ter então uma função oncogénica, se o gene alvo for um gene supressor tumoral, ou uma função supressora tumoral, se o gene alvo for um oncogene. <sup>(23)</sup> De salientar que estas moléculas podem regular múltiplos genes e, por isso, podem ser capazes de ter um papel activo nas

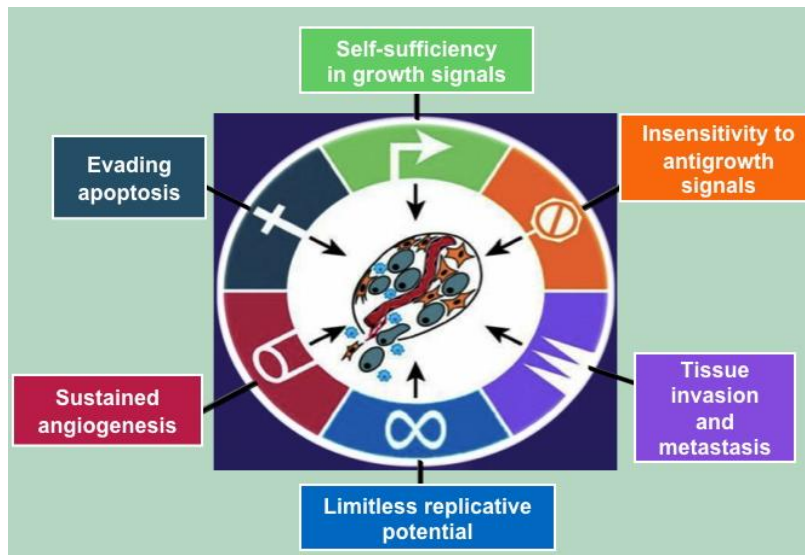


Fig. 7 – Seis características essenciais na progressão de um cancro. (Retirado de <http://cancergrace.org/cancer-101/files/2011/08/hallmarks-of-cancer.jpg>) [Acedido a 02 de Setembro de 2013]

seis características essenciais na progressão do cancro: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, manutenção da angiogénese e capacidade de invadir outros tecidos - metástases. (Fig. 7) <sup>(23),(24)</sup>

Através do estudo dos níveis de miRNAs e da sua função, estabeleceram-se duas abordagens principais para utilizar estas moléculas no tratamento do cancro. Estas abordagens têm como base tentar restabelecer a quantidade de miRNAs expressos que se verificam nos tecidos saudáveis.

Quando o nível de expressão destas moléculas se encontra aumentado e estas se encontram a inibir a acção de genes supressores tumorais, a estratégia terapêutica baseia-se na entrega de oligorribonucleótidos sintéticos anti-miRNAs alvo, ou seja, complementares à sequência destes. Assim, devido à ligação dos oligorribonucleótidos aos miRNAs alvo, diminui-se a quantidade disponível destas moléculas, levando, pois, a uma actividade anti-tumoral. (Fig. 8, ramo A) Os oligorribonucleótidos utilizados são modificados de modo a terem maior resistência às nucleases celulares. Uma modificação que pode ser usada é a metilação do resíduo 2-OH da ribose.

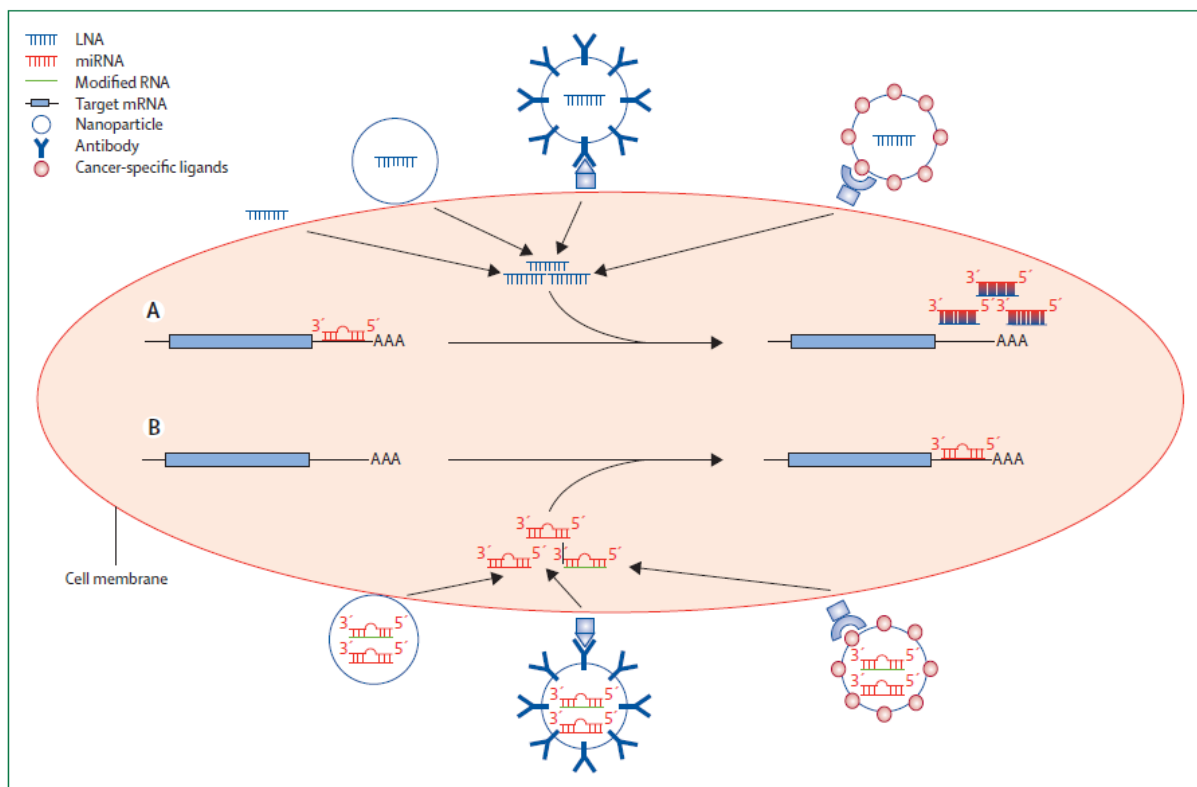


Fig. 8 – Tratamento baseado nos miRNAs.  
 (Retirado de KONG, Y. et al. – **microRNAs in cancer management**. The Lancet Oncology. 13 (2012), 249-258)

Outra abordagem para diminuir a quantidade de moléculas de miRNAs disponíveis passa pela inibição dos componentes essenciais à produção das moléculas de miRNAs maduras, como as enzimas Droscha e Dicer. Porém, esta forma de actuar tem a grande desvantagem de se interferir na síntese de moléculas de miRNAs maduras sem especificidade, podendo levar a efeitos imprevisíveis que não são de todo desejáveis.

Noutras situações, o nível de miRNAs no ambiente tumoral encontra-se demasiado baixo em relação aos tecidos normais, o que nos leva a considerar que possa existir a sobreexpressão de genes importantes para o desenvolvimento tumoral. Assim, o objectivo passa a ser aumentar a quantidade de moléculas de miRNAs. Para tal, pode-se incorporar o miRNA pretendido num vector de forma a entregá-lo às células. (Fig. 8, ramo B) Os vectores utilizados podem ser virais ou não-virais. Os vectores virais acarretam certas questões de segurança devido, por exemplo, à possibilidade de induzirem respostas imunes no hospedeiro. Assim, apesar da menor eficiência, os vectores não-virais são mais vantajosos. Contudo, o uso de vectores contendo miRNAs (virais ou não virais) permite apenas alcançar estados transitórios, pelo que para se conseguir uma terapêutica persistente seria necessário uma abordagem transgene. <sup>(6),(7),(25),(26)</sup>

No entanto, apesar dos avanços conseguidos nesta área, ainda existem alguns problemas que têm impedido o desenvolvimento de tratamentos baseados em miRNAs. Um dos problemas detectados é a falta de estabilidade dos miRNAs quando introduzidos *in vivo*. Assim, é necessário aumentar o tempo de semi-vida para que o tratamento seja efectivo. Esta questão poderá ser ultrapassada melhorando a estabilidade das próprias moléculas ou protegendo-as contra ambientes desfavoráveis. Outro problema que se encontra ainda por resolver é a necessidade de assegurar a entrega específica e a retenção dos miRNAs nos tecidos tumorais. Como por vezes uma molécula de miRNA pode actuar em diversas moléculas de mRNAs, os efeitos fora do alvo pretendido são prováveis e substanciais. Uma possível estratégia para ultrapassar esta limitação é o uso de nanopartículas dirigidas. (Fig. 9) O direccionamento destes veículos pode ser passivo (quando o direccionamento é devido, por exemplo, ao tamanho das nanopartículas e a propriedades da vasculatura tumoral) ou activo (quando se conjugam diferentes compostos com as nanopartículas de forma a aumentar a afinidade para os tumores). <sup>(6),(25)</sup>

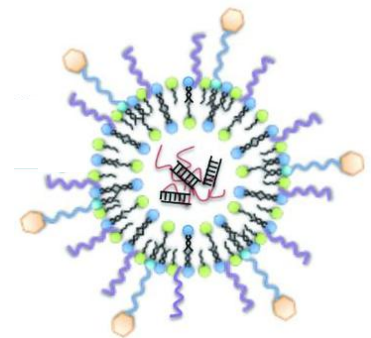


Fig. 9 – Exemplo de nanopartícula para entrega dirigida de miRNAs (Retirado de HUANG, X; et al. - **Targeted delivery of microRNA-29b by transferrin-conjugated anionic lipopolyplex nanoparticles: a novel therapeutic strategy in acute myeloid leukemia.** Clinical Cancer Research. 19 (2013) 2355-2367)

As estratégias nanobiotecnológicas encontram-se apenas no início mas são consideradas muito promissoras. Com o desenvolvimento desta área, acredita-se que os miRNAs venham a ser uma ferramenta valiosa na intervenção terapêutica destes doentes. <sup>(26)</sup>

## 4. Base de dados dos microRNAs (miRBase)

A partir de 2001 a investigação na área dos miRNAs aumentou significativamente, levando a novos conhecimentos e, consequentemente, a novas publicações. (Fig. 10) Deste modo, surgiu a

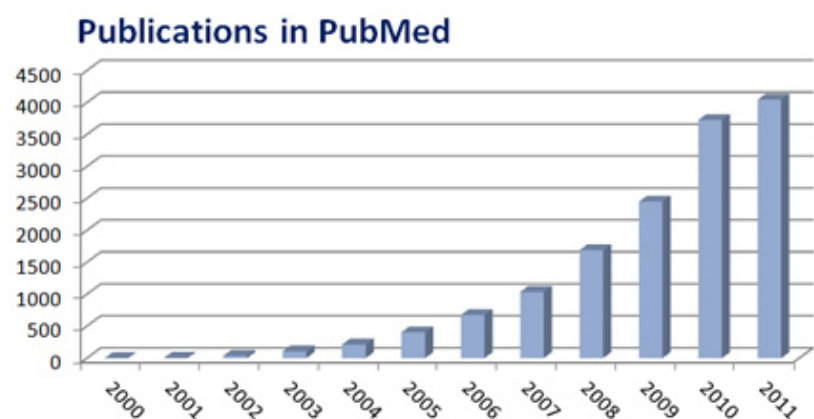


Fig. 10 – Número de publicações de miRNAs na PubMed ao longo dos anos. (Retirado de <http://www.interna-technologies.com/technology.php>) [Acedido a 02 de Setembro de 2013]

necessidade de organizar toda a informação adquirida, de modo a que pudesse ser facilmente consultada. Assim, em Dezembro de 2002, foi lançada a primeira versão da base de dados de miRNAs (miRBase). A actualização mais recente foi realizada em Junho deste ano e conta com 24521 registos. <sup>(27)</sup> Esta plataforma é então uma base de dados *online* para miRNAs onde são colocadas diversas informações, como a nomenclatura, dados da sequência e a previsão dos alvos. <sup>(28)</sup> Os objectivos principais desta plataforma são o fornecimento de um esquema de nomenclatura consistente, a existência de um local onde se encontram todas as sequências de miRNAs conhecidas (facilitando o acesso à informação), a provisão de informações que suportem a evidência das previsões dos alvos do miRNA em questão, e o fornecimento de informações adicionais acerca de cada sequência de miRNA (tal como a referência às publicações em que é mencionada). <sup>(29)</sup>

Com o rápido crescimento desta área foi então necessário adoptar um esquema de nomenclatura usado por todos de igual forma. Com efeito, quando se pretende registar uma nova molécula de miRNA é necessário ter em conta a seguinte nomenclatura: são utilizadas 3 a 4 letras como prefixos para definir a espécie e “miR” (se for uma sequência madura) ou “mir” (se for uma sequência precursora). Quando existem miRNAs maduros que diferem apenas numa ou em duas posições são atribuídas letras aos sufixos, como por exemplo mmu-miR-10a e mmu-miR-10b (mmu – *Mus musculus*). É ainda de salientar que os esquemas de nomenclatura para vírus e plantas são um pouco diferentes, mas não serão abordados nesta monografia.

No momento do registo de uma cadeia madura de um miRNA, este é logo pensado como um produto que regula diversos alvos. Assim, recorre-se a diversas técnicas de forma a prever esses alvos (sequências dos mRNAs). Essa informação também é colocada na base de dados.

Esta base de dados é então muito importante porque permite uma rede global de conhecimentos acerca dos miRNAs. <sup>(28)</sup>

Na figura 11 está representado o registo do hsa-mir-25 (hsa – *Homo sapiens*). <sup>(30)</sup>

Stem-loop sequence MI0000082

Accession	MI0000082												
ID	hsa-mir-25												
Symbol	<a href="#">HGNC:MIRN25</a>												
Description	Homo sapiens miR-25 stem-loop												
Stem-loop	<pre> a ug ag g uu g u -- ac ggcc g uug aggc gagac g gcaau gcu gg g                                     c ccgg c gac ucug cucug c cguaa cgg cc u c gu ag g uu a - gu cg </pre> <p><a href="#">Get sequence</a></p>												
Genome context	<p><a href="#">7:99335834-99335917 [-]</a> <a href="#">ENST00000343023</a>; intron 8;  <a href="#">ENST00000341047</a>; intron 21; NP_877577.1  <a href="#">ENST00000303887</a>; intron 36; MCM7  <a href="#">ENST00000362082</a>; intron 54; NP_877577.1</p>												
Database links	EMBL <a href="#">A1421746</a> HGNC <a href="#">31609</a>												
Related entries	<table border="0"> <tr> <td><a href="#">mmu-mir-25</a></td> <td><a href="#">rno-mir-25</a></td> <td><a href="#">dre-mir-25</a></td> <td><a href="#">ggo-mir-25</a></td> <td><a href="#">ppa-mir-25</a></td> <td><a href="#">ppy-mir-25</a></td> </tr> <tr> <td><a href="#">ptr-mir-25</a></td> <td><a href="#">mml-mir-25</a></td> <td><a href="#">lla-mir-25</a></td> <td><a href="#">mne-mir-25</a></td> <td><a href="#">fru-mir-25</a></td> <td><a href="#">trt-mir-25</a></td> </tr> </table> <p><a href="#">Show details</a></p>	<a href="#">mmu-mir-25</a>	<a href="#">rno-mir-25</a>	<a href="#">dre-mir-25</a>	<a href="#">ggo-mir-25</a>	<a href="#">ppa-mir-25</a>	<a href="#">ppy-mir-25</a>	<a href="#">ptr-mir-25</a>	<a href="#">mml-mir-25</a>	<a href="#">lla-mir-25</a>	<a href="#">mne-mir-25</a>	<a href="#">fru-mir-25</a>	<a href="#">trt-mir-25</a>
<a href="#">mmu-mir-25</a>	<a href="#">rno-mir-25</a>	<a href="#">dre-mir-25</a>	<a href="#">ggo-mir-25</a>	<a href="#">ppa-mir-25</a>	<a href="#">ppy-mir-25</a>								
<a href="#">ptr-mir-25</a>	<a href="#">mml-mir-25</a>	<a href="#">lla-mir-25</a>	<a href="#">mne-mir-25</a>	<a href="#">fru-mir-25</a>	<a href="#">trt-mir-25</a>								

Mature sequence MIMAT0000081

Accession	MIMAT0000081
ID	hsa-miR-25
Sequence	52 - <a href="#">cauugcacuugucucggucuga</a> - 73 <a href="#">Get sequence</a>
Evidence	experimental; cloned [1-2], Northern [1]
Predicted targets	MIRBASE <a href="#">hsa-miR-25</a> PICTAR-VERT <a href="#">hsa-miR-25</a> TARGETSCAN <a href="#">miR-25/32/92/367</a>

References

- "[Identification of novel genes coding for small expressed RNAs](#)"  
1 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T  
Science 294:853-858(2001).
- "[Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells](#)"  
2 Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T  
Biochem Biophys Res Commun 322:403-410(2004).

Fig. 11 – Registro de uma molécula precursora de miRNA (hsa-mir-25) na miRBase. (Retirado de GRIFFITHS-JONES, S. et al. – **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature**. Nucleic Acids Research. 34 (2006), 140 – 144)

## 5. MicroRNAs e o mercado farmacêutico

Como os miRNAs são moléculas com um enorme potencial para as doenças oncológicas, diversas empresas estão a investir muitos dos seus recursos nestas.

Algumas empresas desenvolveram serviços de forma a apoiar os investigadores no desenvolvimento de novos conhecimentos. A empresa LC Sciences, por exemplo, é capaz de

sequenciar e apresentar o perfil de todos os miRNAs descobertos. <sup>(31)</sup> A Origene é outra empresa que desenvolveu ferramentas para apoiar os investigadores nas diversas etapas do projecto, desde a detecção do miRNA até à identificação dos seus alvos. <sup>(32)</sup>

Existem outras empresas que tentam descobrir e validar miRNAs como biomarcadores, como é o caso do Comprehensive Biomarker Center (CBC). Nesta empresa analisam-se biomarcadores a partir de amostras sanguíneas de doenças malignas e, em colaboração com centros de pesquisa clínica e hospitais, descobriram e validaram a presença de miRNAs em diversos tipos de cancro. <sup>(33)</sup>

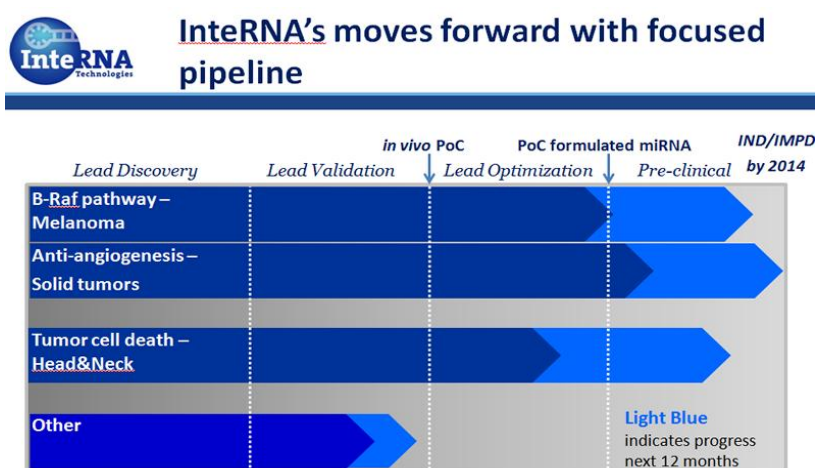


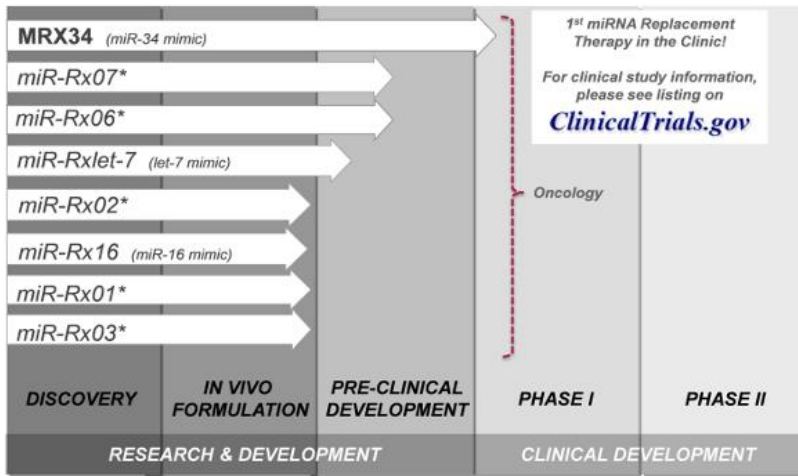
Fig. 12 – Pipeline da empresa inteRNA Technologies. (Retirado de <http://www.interna-technologies.com/products.php>) [Acedido a 27 de Agosto de 2013]

Existem ainda outras empresas que estão mais interessadas na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para doentes oncológicos com base nos miRNAs. A inteRNA Technologies é exemplo destas empresas. (Fig. 12) Alguns dos produtos, nomeadamente moléculas

que são complementares a alguns miRNAs humanos, estão a ser testados e têm sido alcançados bons resultados. <sup>(34)</sup> No programa de desenvolvimento de novas moléculas anti-angiogénese, por exemplo, as moléculas testadas nesta empresa demonstraram uma significativa supressão tumoral em modelos animais. No início deste mês, esta empresa em colaboração com a SomantiX (indústria biotecnológica) obteve uma bolsa para desenvolver nanopartículas com miRNAs anti-angiogénicos revestidas com anticorpos específicos para a vascularização de tumores das células renais. <sup>(35)</sup> A miRNA Therapeutics, Inc. é também uma empresa biofarmacêutica com o objectivo de descobrir novas terapias oncológicas tendo como base os miRNAs, tanto para tumores sólidos como hematológicos. Esta empresa apresentou este ano a sua primeira candidatura a uma “Investigational New Drug” (IND) para o composto MRX34, que está a ser testado num ensaio clínico de fase I em doentes com cancro primário de fígado irressecável e em doentes com tumores metastáticos com envolvimento hepático. <sup>(36)</sup> MRX34 é uma formulação lipídica (lipossomas) carregada com moléculas que mimetizam o miRNA-34, cujos níveis se encontram reduzidos em muitos dos tumores humanos. Em níveis normais, esta molécula é responsável por inibir o crescimento tumoral, uma vez que reprime

diversos oncogenes, tal como o BCL2. Até agora os estudos realizados com este produto foram bastante promissores. Quando testado em modelos (murganhos) de carcinoma hepatocelular, este produto apresentou melhores resultados que o Sorafenib, inibidor de

múltiplas cinases aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de doentes com carcinoma hepatocelular. <sup>(36)</sup> Outros produtos estão também a ser desenvolvidos por esta empresa, como se pode confirmar pelo seu pipeline. <sup>(37)</sup> (Fig. 13) A Regulus Therapeutics é outra empresa a desenvolver-se



\* miRNA mimics undisclosed

Fig. 13 - Pipeline da empresa miRNA Therapeutics. (Retirado de [http://www.mirnatherapeutics.com/\\_\\_\\_Pipeline/Pipeline.aspx](http://www.mirnatherapeutics.com/___Pipeline/Pipeline.aspx)) [Acedido a 27 de Agosto de 2013]

nesta área. A nível da oncologia está focada no carcinoma hepatocelular e no glioblastoma. Alguns dos produtos estão a ser desenvolvidos em colaboração com outras empresas como é o caso da Sanofi e da AstraZeneca. <sup>(38)</sup> (Fig. 14)

Initial <i>micro</i> RNA Development Programs		
<i>micro</i> RNA Target	anti-miR Program	Commercial Rights
miR-122	RG-101 for Hepatitis C Virus Infection*	REGULUS THERAPEUTICS™
miR-221	Hepatocellular Carcinoma	REGULUS THERAPEUTICS™
miR-10b	Glioblastoma	REGULUS THERAPEUTICS™
miR-21	Hepatocellular Carcinoma	SANOFI
miR-21	Kidney Fibrosis	SANOFI
miR-33	Atherosclerosis	AstraZeneca

\*Commercial rights for miR-122 target licensed to GSK, other than RG-101

Fig. 14 – Pipeline da empresa Regulus Therapeutics. (Retirado de <http://www.regulusrx.com/therapeutic-areas/#Oncology>) [Acedido a 27 de Agosto de 2013]

## Conclusão

---

Os miRNAs são, sem dúvida, moléculas muito promissoras para as doenças oncológicas uma vez que têm potencial para ser utilizados como biomarcadores e como alvos das terapêuticas anti-tumorais.

Estas moléculas permitirão diminuir a mortalidade associada a estas doenças e melhorar a qualidade de vida dos doentes, através da possibilidade de fazer um diagnóstico precoce, um prognóstico correcto e de adaptar a terapêutica a cada doente.

Apesar de durante estes últimos anos ter havido um grande progresso nesta área, ainda é necessário muito trabalho e investigação para que os miRNAs integrem a prática clínica. Ainda assim, os resultados até agora obtidos permitem ter esperança que um dia se alcançará uma grande vitória, vencer a luta contra o cancro.



## Bibliografia

---

- (1) WARK, P. A.; PETO, J. – **Cancer Epidemiology**. In: KILLEWO, J.; HEGGENHOUGEN, H. K.; QUAH, S. R.. *Epidemiology and Demography in Public Health*. San Diego: Elsevier Inc., 2010. ISBN: 978-0-12-382200-0, 278
- (2) Liga portuguesa contra o cancro – **O que fazemos – Educação para a Saúde**. [Acedido a 16 de Agosto de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=50>
- (3) LOWERY, A. J. et al. – **MicroRNAs as Prognostic Indicators and Therapeutic Targets: Potential Effect on Breast Cancer Management**. *Clinical Cancer Research*. 14 (2008), 360-365
- (4) ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. – **MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers**. *Mutation Research*. 717 (2011), 1-8
- (5) LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. – **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14**. *Cell*. 75, 5 (1993), 843-854
- (6) KONG, Y. et al. – **microRNAs in cancer management**. *The Lancet Oncology*. 13 (2012), 249-258
- (7) HENEGHAN, H. M.; MILLER, N.; KERIN, M. J. – **MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer**. *Current Opinion in Pharmacology*. 10 (2010), 543-550
- (8) IORIO, M. V.; CROCE, C.M. – **microRNA involvement in human cancer**. *Carcinogenesis*. 33 (2012), 1126-1133
- (9) FILHO, J. C. M. R.; KIMURA, E. T. – **MicroRNAs: Nova classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer**. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 50 (2006), 1102-1107
- (10) MA, R.; JIANG, T.; KANG, X. – **Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application**. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 31 (2012), 1-9
- (11) SOON, P.; KIARIS, H. – **MicroRNAs in the tumor microenvironment: Big role for small players**. *Endocrine-related cancer*. 20 (2013), 257-267

- (12) SONDA, N., et al. – **miR-142-3p Prevents Macrophage Differentiation during Cancer-Induced Myelopoiesis.** *Immunity.* 38 (2013), 1236-1249
- (13) ZEN, K.; ZHANG, C. – **Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Biomarkers to Diagnose and Monitor Human Cancers.** *Medicinal Research Reviews.* 32 (2012), 326-348
- (14) CHEN, X. et al. – **Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.** *Cell Research.* 18 (2008), 997-1006
- (15) RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. – **Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility.** *Nature Biotechnology.* 24 (2006), 971-983
- (16) CHIM, S. S. C., et al. – **Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma.** *Clinical Chemistry.* 54 (2008), 482-490
- (17) LAWRIE, C. H. et al. – **Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *British journal of haematology.* 141 (2008), 672-675
- (18) HUANG, Z. et al. – **Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer.** *International Journal of Cancer.* 127 (2009), 118 – 126
- (19) PARK, N. J. et al. – **Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection.** *Clinical cancer research.* 15 (2009), 5473-5477
- (20) LU, J. et al. – **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature.* 4 (2005), 834-838
- (21) SOURVINOU, I. S.; MARKOU, A.; LIANIDOU, E. S. – **Quantification of Circulating miRNAs in Plasma: Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their Isolation and Stability.** *The journal of molecular diagnostics.* 13 (2013), 1525-1578
- (22) NANA-SINKAM, S. P.; CROCE, C. M. – **MicroRNAs as therapeutic targets in cancer.** *Translational Research.* 157 (2011), 216-225
- (23) MIZOGUCHI, M. et al. – **Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma.** *Frontiers in oncology.* 3 (2013), 1-6

- (24) HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. – **The hallmarks of cancer**. Cell. 100 (2000), 57-70
- (25) LIU, Z.; SALL, A.; YANG, D. – **MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool**. International Journal of Molecular Sciences. 9 (2008), 978-999
- (26) WEIRAUCH, U. et al. – **Polymer-Based Delivery of RNA-Based Therapeutics in Ovarian Cancer**. In: MALEK, A. and TCHERNITSA, O.. Ovarian Cancer: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2013. ISBN: 978-1-62703-546-0, 443-465
- (27) **miRBase: the microRNA database** [Acedido a 02 de Setembro de 2013]. Disponível na internet: <http://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>
- (28) GRIFFITHS-JONES, S. et al. – **miRBase: tools for microRNA genomics**. Nucleic Acids Research. 36 (2008), 154-158
- (29) KOZOMARA, A., GRIFFITHS-JONES, S. – **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data**. Nucleic Acids Research. 39 (2011), 152-157
- (30) GRIFFITHS-JONES, S. et al. – **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature**. Nucleic Acids Research. 34 (2006), 140-144
- (31) <http://www.lcsciences.com/applications/transcriptomics/mirna-profiling/mirna-sequencing/> [Acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (32) <http://www.origene.com/miRNA/> [Acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (33) <http://www.cbioic.com/en/application-areas/cancer/microrna-biomarker/#overview> [Acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (34) <http://www.interna-technologies.com/products.php> [Acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (35) <http://www.interna-technologies.com/documenten/Nieuwsitem17.pdf> [Acedido a 10 de Setembro de 2013]
- (36) [http://www.mirnatherapeutics.com/\\_\\_\\_Pipeline/Pipeline\\_MRX34.aspx](http://www.mirnatherapeutics.com/___Pipeline/Pipeline_MRX34.aspx) [Acedido a 4 de Setembro de 2013]
- (37) [http://www.mirnatherapeutics.com/\\_\\_\\_Pipeline/Pipeline.aspx](http://www.mirnatherapeutics.com/___Pipeline/Pipeline.aspx) [Acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (38) <http://www.regulusrx.com/therapeutic-areas/#Oncology> [Acedido a 27 de Agosto de 2013]