

Gonçalo Pestana Paiva Rodrigues da Fonseca

Oncologia e miRNAs: do diagnóstico à terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor José Antunes Barata Custódio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Gonçalo Pestana Paiva Rodrigues da Fonseca

Oncologia e miRNAs: do Diagnóstico à Terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Gonçalo Pestana Paiva Rodrigues da Fonseca, estudante do Mestrado Integrado em Ci4ncias Farmac4uticas, com o n 2011169625, declaro assumir toda a responsabilidade pelo contudo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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,  exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

(Gonçalo Pestana Paiva Rodrigues da Fonseca)

AGRADECIMENTOS

Antes de mais, expresso a minha gratidão para com o Professor Doutor José Custódio, pela disponibilidade e por todo o aconselhamento que permitiram a elaboração desta monografia.

À minha família, pelo apoio incondicional sempre prestado ao longo destes anos, o que me permitiu crescer com base nas minhas escolhas e decisões, traçando o meu próprio caminho.

À Cátia, pela presença que passou a ser uma constante na minha vida, por todo o apoio, por nunca me deixar mal e por me ensinar que, quando ser quer de facto algo, não podemos deixar de lutar por isso.

Aos amigos que levo daqui, porque um amigo verdadeiro é um amigo para a vida, aqueles que festejam connosco nos melhores momentos, mas que não estão ausentes nos piores. Sem eles, este percurso teria tido, sem dúvida, muito menos brio.

À Imperial TAFFUC, pelo companheirismo, por me fazer crescer e por me ensinar a cuidar de algo muito maior do que qualquer individualidade. É um orgulho.

Por último, não sendo menos importante, um agradecimento a todos os professores e restantes pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu percurso académico.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	1
MicroRNAs	2
Descrição/Biossíntese.....	2
Papel desempenhado no organismo	4
MicroRNAs EM ONCOLOGIA	5
Biomarcadores de diagnóstico.....	7
Terapêutica	12
PERSPETIVAS FUTURAS	15
CONCLUSÃO	17
BIBLIOGRAFIA	18

ABREVIATURAS

CEA – antígeno carcinoembrionário

CYFRA – fragmento de citoqueratina

DGCR8 – *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DNA – ácido desoxirribonucleico

LNA – ácidos nucleicos bloqueados

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

ncRNA – RNA não codificante

pri-miRNA – miRNA primário

RISC – *RNA-induced silencing complex*

RNA – ácido ribonucleico

RESUMO

Tem aumentado consideravelmente, em todo o mundo, o número de casos de cancro. A comunidade científica tem-se preocupado em desenvolver novas estratégias de combate a esta doença, focando-se na pesquisa de novos alvos terapêuticos e na descoberta de biomarcadores ideais que permitam uma deteção precoce da doença. Os microRNAs (miRNAs), moléculas endógenas, com capacidade de regular a expressão genética, têm sido alvo de inúmeros estudos, desde a sua descoberta em 1993, e têm demonstrado ser potenciais candidatos a satisfazer estes requisitos. Para tirar partido da totalidade do potencial destas moléculas é essencial compreender o seu papel nos processos fisiológicos e as implicações associadas à sua disfunção e desregulação. De facto, a identificação de perfis de expressão que permitem diferenciar as neoplasias malignas, tem merecido destaque pelo seu papel promissor no diagnóstico e prognóstico destas patologias. Para além disso, começam a ser concluídos estudos sobre a segurança e eficácia do seu uso na terapêutica oncológica. Assim, neste trabalho, discutem-se os principais avanços já alcançados nesta área, bem como os maiores desafios que ainda têm de ser ultrapassados.

Palavras-chave: MicroRNAs, Biomarcadores, Diagnóstico, Prognóstico, Terapia, Cancro.

ABSTRACT

Throughout the world, the number of cancer cases has been rising considerably. The scientific community has been concerned in developing new strategies to fight this disease by focusing on the search of new therapeutic targets and on the discovery of ideal biomarkers that allow an early detection of the disease. The miRNA, endogenous molecules that can regulate the genetic expression, have been the subject of innumerable studies since its discovery in 1993 and have been shown as potential candidates to meet these requirements. To take advantage of the full potential of these molecules is essential to understand their role in physiological processes and the implications associated with its dysfunction and deregulation. In fact, the identification of expression profiles to differentiate between malignant neoplasms has been highlighted by its promising role in the diagnosis and prognosis of this pathologies. In addition, studies on the safety and efficacy of their use in cancer therapy are being completed. Thus, this paper discusses the major advances already achieved in this area, as well as the major challenges that still are to be overcome.

Keywords: MicroRNAs, Biomarkers, Diagnosis, Prognosis, Therapy, Cancer.

INTRODUÇÃO

O dogma central da biologia molecular é uma explicação do sentido da informação genética dentro de um organismo biológico, que pode ser resumido ao facto de que “a partir de ácido desoxirribonucleico (DNA) é transcrito ácido ribonucleico (RNA), que, por sua vez, codifica proteínas”. No entanto, no decorrer dos últimos anos, foram descobertos segmentos de DNA que produzem transcrições de RNA que não codificam proteínas. Estes transcritos foram denominados de RNA não codificante (ncRNA) (Berindan-neagoe et al., 2014).

Em 1993 foi descoberta uma nova classe de ncRNAs, denominada atualmente por microRNA. Ao longo do tempo, os RNAs, pertencentes a esta classe, têm sido vistos cada vez mais como potenciais candidatos a biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico, assim como potenciais alvos terapêuticos. São várias as razões que justificam o seu interesse clínico, desde a sua especificidade tecidual, à sua elevada estabilidade e facilidade de deteção, bem como, a possível associação da expressão destas moléculas a diferentes fases de várias patologias (Heneghan et al., 2010).

Têm sido realizados inúmeros estudos, em diversas patologias, que pretendem demonstrar de que forma se pode tirar partido das características únicas destas pequenas moléculas, nomeadamente pela sua utilidade no diagnóstico e na terapêutica. Dentro destas, as neoplasias malignas têm ganho especial importância, uma vez que a sua incidência, a nível mundial, está a aumentar consideravelmente. É necessário maximizar a oferta terapêutica, minimizando os efeitos, laterais e a longo prazo, do respetivo tratamento. Numa época em que começam a surgir novas terapêuticas direcionadas, com moléculas capazes de se ligarem a um alvo terapêutico específico, os miRNAs podem ter um papel promissor.

Desta forma, ao longo deste trabalho, será fornecida uma visão geral sobre o que são miRNAs e qual o papel que podem vir a desempenhar em oncologia como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, bem como qual a sua importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

MicroRNAs

Descrição e Biossíntese

Os miRNA são pequenas moléculas endógenas de ncRNA, constituídas por uma cadeia simples de 19 a 25 nucleótidos. Estas moléculas têm uma função de regulação da expressão genética, através de mecanismos pós-transcrição. Podem estar envolvidas numa ampla variedade de processos biológicos, incluindo o desenvolvimento e diferenciação de órgãos, a proliferação celular e o metabolismo bioenergético. São moléculas bastante estáveis que conseguem suportar condições fisiológicas desfavoráveis como, por exemplo, sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento, armazenamento prolongado e variações extremas de temperatura e pH. Desde que foi descoberto o primeiro miRNA, no nematoda *Caenorhabditis elegans*, já foram identificados mais de 30000 miRNA em 223 espécies diferentes (Cheng, 2015; Chitkara et al., 2015; “miRBase: the microRNA database”, 2014).

De forma a ser possível aproveitar-se todo o potencial terapêutico dos miRNAs é necessário compreender como se processa a sua biogénese e os seus mecanismos de regulação genética (Chitkara et al., 2015).

A biossíntese de miRNA é um processo complexo que envolve várias etapas, como exemplificado na figura 1. Estas moléculas são, muitas vezes, transcritas a partir de *clusters* policistronicos que podem codificar vários miRNAs. Podem também estar codificados em intrões, resultantes, possivelmente, do processamento pós-tradução de outras proteínas. Assim, a grande maioria dos miRNA é transcrita pela RNA polimerase II dependente de DNA (RNAPII) que produz um miRNA primário (pri-miRNA). Este, contém uma região de RNA de dupla cadeia (dsRNA) imperfeito, denominada *stem-loop*, onde se encontram futuros miRNAs maduros. Os pri-miRNAs possuem algumas semelhanças com os RNA mensageiros (mRNAs), apresentando uma estrutura *cap* na terminação 5' e uma cauda poli-adenilada na terminação 3', podendo também possuir intrões (Czech e Hannon, 2013; Lee et al., 2004).

O processamento destes pri-miRNAs é iniciado através da ação de um complexo multiproteico, constituído pela proteína *double strand RNA binding domain*, *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8), e pela enzima RNase III Droscha. Neste complexo, o pri-miRNA é clivado pela enzima referida, dando origem a um precursor de miRNA com 60 a 70 nucleótidos de comprimento (pré-miRNA), que passa para o citoplasma por transporte ativo, através de uma proteína de exportação nuclear, a exportina 5 (Czech e Hannon, 2013).

Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela RNase III Dicer numa dupla cadeia miRNA:miRNA* de cerca de 22 nucleótidos de comprimento com dois potenciais miRNA maduros, sendo um deles incorporado no *RNA-induced silencing complex* (RISC), um complexo multiproteico responsável pela quebra ou bloqueio da transcrição de mRNAs. Pensava-se que apenas a cadeia miRNA seria incorporada no RISC e a cadeia complementar miRNA* seria degradada. No entanto, estudos mais recentes revelaram que a cadeia miRNA* pode também ser funcional, sendo importante na regulação de algumas funções biológicas, apesar destes mecanismos ainda não estarem totalmente esclarecidos. A preferência do RISC sobre uma ou outra cadeia pode ser explicada pela estabilidade termodinâmica da cadeia ou pela afinidade do próprio complexo. O miRNA, uma vez ligado ao RISC, direciona-o para o mRNA-alvo, através da complementaridade de bases, onde irá produzir o seu efeito (Bhayani et al., 2012; Bartel, 2004).

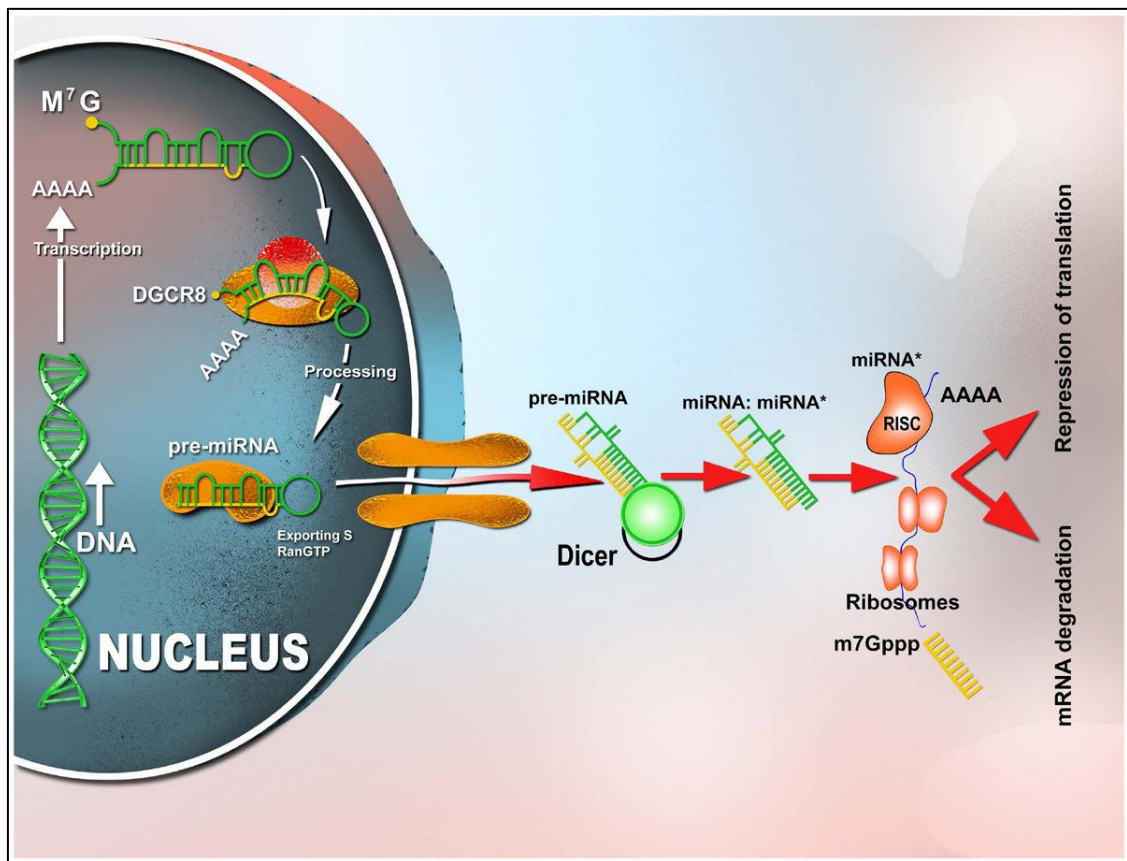


Figura 1¹. Biossíntese de miRNA. Adaptado (Berindan-neagoe et al., 2014).

¹ Legenda da Figura 1: No núcleo, a RNAPII é responsável pela transcrição de pri-miRNA. O processamento deste é iniciado através da ação das proteínas DGCR8 e Drosha, dando origem a pré-miRNA, que passa para o citoplasma por transporte ativo, através da exportina 5. De seguida, é clivado pela Dicer numa dupla cadeia miRNA:miRNA*. Uma destas cadeias é incorporada no RISC, direcionando-o para o mRNA-alvo, onde irá promover a sua degradação ou o bloqueio da sua tradução.

Papel desempenhado no organismo

A função mais estudada e, provavelmente, a melhor compreendida dos miRNAs é a de supressão da expressão genética no citoplasma, estabelecida através da sua ligação à região 3' não traduzível dos mRNAs, os quais são responsáveis pela transferência de informação do DNA até ao local de síntese de proteínas na célula. Isto irá impedir a ligação ribossômica aos mRNAs e, conseqüentemente, a produção proteica. Por outro lado, alguns miRNAs conseguem ainda induzir a degradação de mRNA, diminuindo, deste modo, a possibilidade de este ser traduzido (Bartel, 2004). No fundo, é o nível de complementaridade entre o miRNA e o mRNA-alvo que determina o mecanismo pelo qual a tradução de mRNA em proteínas é bloqueada. Foi demonstrado que uma complementaridade total (ou quase total) leva à degradação do mRNA pelo RISC, enquanto uma complementaridade parcial impede a tradução por impossibilitar a ligação ribossômica ao mRNA (Hutvagner e Zamore, 2002).

Ao longo dos últimos anos foram descobertas novas funções biológicas dos miRNAs. Sabe-se hoje que alguns miRNAs contêm sequências nucleotídicas específicas de localização a nível sub-celular, podendo, por exemplo, ser direcionados para o núcleo e funcionar como promotores da transcrição de genes (Place et al., 2008). Foi demonstrado também que o mesmo tipo de miRNA tem capacidade de regular a expressão genética, não só através do emparelhamento com sequências específicas de mRNA, como já foi explicado, mas também por interação direta com proteínas reguladoras da tradução, conseguindo desta maneira funcionar, simultaneamente, como promotor e inibidor da tradução de diferentes proteínas (Eiring et al., 2010).

Os miRNA podem também desempenhar funções no espaço extracelular. Sendo secretados pelas células através de exosomas, tem sido evidenciado que estes se encontram na maioria, senão mesmo na totalidade, dos fluídos biológicos. Uma vez no espaço extracelular podem exercer diversas funções, mediante a ativação de recetores em diferentes células ou tecidos (Cortez et al., 2012).

MicroRNAs EM ONCOLOGIA

Os miRNAs têm sido intimamente ligados a diversas doenças, uma vez que têm sido identificadas alterações na sua expressão em várias patologias humanas, como por exemplo doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, esquizofrenia e cancro. Neste último caso, têm sido encontradas alterações de expressão bastante significativas e específicas de todos os tipos de tumores humanos analisados, incluindo tumores malignos e benignos (Mendell e Olson, 2013; Calin e Croce, 2006).

Diferentes estudos demonstraram que os miRNAs podem atuar como oncogenes, como por exemplo o miR-21 ou o miR-155, verificando-se um aumento da expressão destes em grande parte dos cancros humanos (Calin e Croce, 2006). No entanto, podem também funcionar como supressores de tumores, como o *cluster* miR-15a/16-1 que se encontra muitas vezes eliminado em casos de leucemia linfocítica crónica (Calin et al., 2002).

Em alguns casos, o mesmo miRNA pode apresentar uma dupla função, atuando como oncogene num determinado tipo de células e supressor de tumor noutra tipo. Por exemplo, o miR-221 tem a expressão aumentada em carcinomas hepáticos, tendo como alvo o mRNA codificante do supressor de tumor PTEN, promovendo, desta forma, o crescimento tumoral (Callegari et al., 2012). De modo semelhante, no cancro colorretal, este miRNA promove a invasão celular e a metastização, ao ligar-se ao mRNA codificante da proteína RECK, que é responsável pela inibição destes processos (Qin e Luo, 2014). No entanto, noutros tipos de tumores, como tumores do estroma gastrointestinal, este miRNA tem a sua expressão diminuída. Assim, os oncogenes c-KIT e ETV1, controlados por este miRNA, irão mais facilmente promover este tipo de cancro, uma vez que, neste caso particular, o miR-221 apresenta uma função de supressor tumoral (Gits et al., 2013).

A desregulação da expressão de miRNAs em células malignas só agora está a começar a ser compreendida, podendo ser induzida através de três mecanismos, que podem atuar independente ou conjuntamente entre si:

- A amplificação ou eliminação frequente de regiões genéticas, em células tumorais, onde se localizam genes codificantes de miRNA;
- A regulação epigenética da expressão de miRNAs por metilação do DNA ou modificação de histonas;
- Anormalidades que possam existir em proteínas ou genes que intervêm na biossíntese de miRNA (Berindan-neagoe et al., 2014).

Os tumores apresentam características essenciais que permitem o seu crescimento e manutenção. Os miRNAs têm capacidade de interagir e regular positiva ou negativamente todas estas características. Na seguinte tabela, está exemplificado como é que um determinado miRNA pode, efetivamente, regular o crescimento tumoral.

Tabela I. Exemplos de miRNAs na regulação de características tumorais.

Características essenciais tumorais	miRNA	Modo de interação	Referência
<i>Autossuficiência de sinais de crescimento</i>	let-7	Tem função de supressão tumoral por impedir a tradução dos oncogenes <i>RAS</i> , uma vez que as proteínas expressas por estes genes funcionam como auto-fatores de crescimento.	(Johnson et al., 2005)
<i>Insensibilidade a sinais anti-crescimento</i>	miR-96 e miR-106b	Estes miRNAs regulam negativamente o fator de transcrição <i>E2F1</i> , ativador do ciclo celular.	(Petrocca et al., 2008)
<i>Evasão à apoptose</i>	miR-34a	O miR-34a regula negativamente a expressão do oncogene <i>MYCN</i> , o qual está associado à evasão à apoptose.	(Wei et al., 2008)
<i>Potencial replicativo ilimitado</i>	miR-29 e miR-30	Estes miRNAs encontram-se expressos em processos de senescência replicativa induzida, reprimindo o oncogene <i>B-Myb</i> . Desta forma, inibe-se a síntese celular de DNA.	(Martinez et al., 2011)
<i>Manutenção da angiogénese</i>	miR-26, miR-107 e miR-210	A hipóxia promove a expressão destes miRNAs, que atuam na angiogénese e também na inibição da apoptose, funcionando como oncogenes.	(Kulshreshtha et al., 2008)
<i>Capacidade de invasão de outros tecidos e metastização</i>	miR-10b	Níveis elevados de miR-10b promovem a invasão e metastização de tumores, interagindo com o fator de transcrição <i>HOXD10</i> , responsável pela manutenção do fenótipo de células epiteliais.	(Ma et al., 2010)
<i>Reprogramação do metabolismo celular</i>	miR-378*	Este miRNA regula a expressão de <i>ERRγ</i> e <i>GABPA</i> , promovendo uma alteração do metabolismo aeróbico para anaeróbico, aumentando a taxa de produção de energia e diminuindo a necessidade de oxigénio.	(Eichner et al., 2010)
<i>Evasão às respostas imunitárias</i>	miR-124	O miR-124 inibe a expressão de <i>STAT3</i> , responsável por um dos mais importantes mecanismos de supressão imunitária dos gliomas. Desta forma, as células tumorais deixam de ter capacidade de evasão ao sistema imunitário.	(Fonslow et al., 2013)

Biomarcadores de diagnóstico

Um biomarcador ideal deve apresentar determinadas características essenciais. Deve exibir um perfil de expressão único para uma determinada patologia, demonstrando uma expressão significativamente aumentada ou diminuída no órgão ou tecido afetado. Para além disso, esta expressão deve permitir a deteção de uma patologia numa fase inicial, ainda precedente ao aparecimento de sintomas, possibilitando assim a sua deteção precoce, bem como a deteção de um estado residual persistente ou de uma recidiva subsequente a um tratamento. Por último, considera-se que um biomarcador tem de ser acessível através de métodos não-invasivos, ter um período de semi-vida longo em amostras clínicas e ser de deteção rápida através de métodos simples, precisos e não dispendiosos. Assim, as características apresentadas pelos miRNAs, acima referidas, fazem com que estas moléculas possam vir a ser excelentes candidatos a biomarcadores de diagnóstico e prognóstico (Cortez et al., 2012; Berindan-neagoe et al., 2014).

De seguida, irão ser apresentados alguns estudos exemplificativos, que apresentaram resultados promissores na descoberta de perfis de expressão de miRNAs que poderão vir a desempenhar um papel importante no diagnóstico e prognóstico de tumores. Irão ser abordados os quatro tipos de cancro com maior incidência a nível mundial, de acordo com o projeto GLOBOCAN. São eles o cancro da mama, o cancro da próstata, o cancro do cólon e do reto e o cancro dos pulmões (Ferlay et al., 2013).

Cancro da mama

Numa fase inicial da doença, esta neoplasia maligna pode ser tratada recorrendo a intervenção cirúrgica, a radioterapia, a protocolos de quimioterapia, à terapêutica hormonal ou a uma combinação destes. Para tal, é necessário que seja realizado um diagnóstico precoce para que estas estratégias terapêuticas apresentem os resultados pretendidos. No entanto, mesmo após alguns anos de remissão, as recidivas deste tipo de cancro são frequentes (Volinia e Croce, 2013).

Não existe, atualmente, um biomarcador não-invasivo suficientemente específico e sensível para a deteção de cancro da mama em fases iniciais. Os miRNAs presentes na circulação podem ser as únicas moléculas com capacidade de fazer um diagnóstico precoce deste tipo de cancro (Kodahl et al., 2014).

Foi efetuado um estudo, que contou com a participação de 466 indivíduos com cancro da mama, revelando um conjunto de 30 mRNAs e 7 miRNAs (miR-103, miR-148b, miR-328,

miR-484, miR-874, miR-93 e miR-1307) capaz de prever a probabilidade de sobrevivência. Desta forma, permite-se que possa ser estabelecido um melhor prognóstico da doença, em tumores de estágio I e II. Este conjunto de moléculas foi posteriormente validado, recorrendo a oito estudos de coorte individuais, englobando o total de 2399 doentes com cancro da mama, demonstrando um desempenho superior na estratificação do risco de mortalidade, comparativamente a testes já rotineiramente utilizados na prática clínica, nomeadamente, o *MammaPrint*² e o *Oncotype DX*³ (Volinia e Croce, 2013).

Na tentativa de descobrir uma expressão característica de miRNAs em casos de cancro da mama, um estudo revelou que os perfis de expressão de miRNAs eram significativamente diferentes em amostras de soro e em amostras de tumor dos mesmos indivíduos, confirmando assim a especificidade tecidual da expressão de miRNAs. Dos 20 miRNAs encontrados com expressão alterada nas amostras tumorais, apenas 7 foram encontrados no soro, o que indica que a secreção destes a partir do tumor primário é efetuada seletivamente. No entanto, destes, foram identificados 4 miRNAs (miR-1, miR-92a, miR-133a e miR-133b) como tendo um maior potencial de diagnóstico, sugerindo que o uso clínico de perfis de expressão de miRNAs é bastante promissor, ainda que seja necessário efetuar mais estudos para validar esta estratégia de diagnóstico não-invasiva nos diferentes subtipos de cancro da mama (Chan et al., 2013).

Um outro estudo efetuou uma análise global da expressão de miRNAs no soro de 48 indivíduos caucasianos com cancro da mama (24 com presença de nódulos linfáticos e 24 sem presença de nódulos linfáticos) e de 24 indivíduos saudáveis com as mesmas idades. Verificou-se um perfil de expressão de miRNAs com a capacidade de diferenciar os dois grupos de estudo, sendo de seguida validado com base em amostras de soro de 60 indivíduos com cancro da mama em fase inicial e de 51 indivíduos saudáveis. Este perfil é composto pela expressão aumentada de miR-15a, miR-18a, miR-107 e miR-425 e a expressão diminuída de miR-133a, miR-139-5p, miR-143, miR-145 e miR-365. No entanto, não foi possível nenhuma associação deste perfil ao tipo ou tamanho do tumor, nem à presença de nódulos linfáticos ou à menopausa (Kodahl et al., 2014).

² O *MammaPrint* é um teste genómico utilizado para prever o risco de recorrência tumoral, num prazo de 10 anos, após o diagnóstico de cancro da mama de estágio I ou II, com ou sem recetores de estrogénio positivos.

³ O *Oncotype DX* é um teste genómico usado para prever o risco de recorrência tumoral em casos de cancro da mama com recetores de estrogénio positivos em fase inicial (estágio I ou II), assim como para prever os benefícios da quimioterapia após remoção cirúrgica de um tumor com estas características. É também utilizado em casos de carcinoma intraductal para prever o risco de recorrência ou de desenvolvimento de um novo cancro invasivo na mesma mama assim como para prever os benefícios da radioterapia após remoção cirúrgica de um tumor com estas características.

Cancro da próstata

Um estudo efetuado para investigar a utilização de miRNAs como biomarcadores no cancro da próstata contou com 78 doentes com cancro da próstata e 28 indivíduos saudáveis como controlo. Através da análise de amostras de soro e plasma, foi evidenciado um perfil de expressão de miRNAs com capacidade de distinção entre os dois grupos de estudo, que incluí a expressão aumentada de miR-107, miR-130b, miR-141, miR-2110, miR-301a, miR-326, miR-331-3p, miR-432, miR-484, miR-574-3p e miR-62*, e a expressão diminuída de miR-181a-2*. Foi também descoberto um perfil de expressão de miRNAs que diferenciou o cancro da próstata localizado, dos casos que apresentavam metástases. Este é caracterizado pela expressão aumentada de miR-582-3p, miR-20a*, miR-375, miR-200b, miR-379, miR-513a-5p, miR-577, miR-23a*, miR-1236, miR-609, miR-17*, miR-619, miR-624*, miR-198 e miR-130b, e a expressão diminuída de miR-572. Este estudo analisou a urina dos participantes, tendo como objetivo a deteção dos níveis de cinco miRNAs, de forma a averiguar se a sua expressão diferenciada também se manifestava neste fluido corporal. A partir desta análise foi revelado que os níveis de miR-107 e de miR-574-3p se encontravam em concentrações significativamente mais elevadas na urina de indivíduos com cancro da próstata, comparativamente ao controlo. Este estudo revelou perfis de expressão importantes para o diagnóstico do cancro da próstata pois, não só se conseguiu identificar casos de cancro, como se conseguiu identificar cancros metastizados. Adicionalmente, comprovou-se a identificação de miRNAs com potencial de diagnóstico na urina, uma amostra biológica que pode ser facilmente recolhida, de forma não invasiva, não lesando o doente, física e psicologicamente (Bryant et al., 2012).

Na pesquisa dos melhores biomarcadores de prognóstico para casos de cancro recorrente ou refratário, após prostatectomia radical, foi efetuado um estudo com 16 doentes (8 que sofreram de recorrência bioquímica rápida e 8 que não sofreram de recorrência bioquímica rápida). Através de análises ao soro dos participantes foram detetados 3 miRNAs com expressão elevada no grupo que viria a sofrer de recorrência bioquímica rápida. Estes resultados foram validados com base num estudo de coorte que integrou 70 doentes com cancro da próstata, dos quais 31 sofreram de recorrência bioquímica rápida e num estudo de coorte com amostras de tecido tumoral. Foi também concluído que a expressão de miR-146b-3p e de miR-194 pode ser associada à progressão da doença e o miR-146b-3p demonstrou um elevado potencial de prognóstico nestes casos. Para além disso, a expressão elevada de miR-194 está associada a metastização do cancro e a sua presença em estados primários relaciona-se com um pior prognóstico (Selth et al., 2013).

Um outro estudo foi realizado com o objetivo de comparar as expressões de miRNAs circulantes entre indivíduos com cancro da próstata, com hiperplasia benigna da próstata e saudáveis. Após a análise do perfil de miRNAs, foi descoberto que o miR-26a consegue diferenciar estes tumores malignos, com uma sensibilidade de 89,2% e uma especificidade de 55,6%. O estudo revelou ainda que a análise conjunta dos níveis miR-26a, miR-32, miR-195 e miR-let7i, presentes no soro, também permite fazer esta distinção, com uma sensibilidade de 78,4% e uma especificidade de 66,7% (Mahn et al., 2011).

Cancro do cólon e do reto

Foi realizado um estudo para caracterizar a expressão de miRNAs contidos em exosomas em doentes com cancro do cólon. Foram efetuados *microarrays* em amostras de soro de 88 doentes com cancro do colon primário e de 11 indivíduos saudáveis. Simultaneamente foi caracterizada a expressão de miRNAs em 5 linhas celulares de cancro do cólon, comparativamente a linhas celulares normais do cólon. Concluiu-se que a expressão dos miRNAs let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223 e miR-23a se encontrava aumentada em doentes com cancro do cólon primário, mesmo em fases iniciais da doença, e que a sua expressão diminuía após remissão. Os mesmos resultados foram obtidos na comparação das linhas celulares (Ogata-Kawata et al., 2014).

Na tentativa de encontrar melhores biomarcadores de diagnóstico do cancro do cólon e do reto, foram analisados vários miRNAs, testando a sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico desta neoplasia maligna, assim como a possibilidade de serem utilizados para caracterizar a progressão da doença. No total foram analisados 10 miRNAs em amostras de soro de 30 indivíduos com cancro do cólon e de 30 indivíduos saudáveis, revelando que a expressão de 6 miRNAs (miR-21, let-7g, miR-31, miR-92a, miR-181b e miR-203) consegue indicar os casos de cancro do colón com uma melhor sensibilidade e especificidade do que biomarcadores já utilizados, nomeadamente o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o antígeno carboidrato 19-9. Estes dados foram posteriormente validados através de amostras independentes de 83 indivíduos com cancro do cólon e de 59 indivíduos saudáveis. Foi demonstrado, então, um perfil de expressão de miRNAs com um maior potencial de diagnóstico do que com biomarcadores atualmente utilizados na clínica (J. Wang et al., 2014).

Um estudo foi realizado com o objetivo de identificar novos biomarcadores de prognóstico e previsão de metastização em doentes com cancro do cólon e do reto. Numa primeira fase foram selecionados miRNAs que demonstrassem alguma conexão com a metastização do tumor. Analisou-se a expressão de 4 miRNAs (miR-200b, miR-200c, miR-

141 e miR-429) em amostras de soro de 12 indivíduos com cancro colorretal de estágio I e IV, verificando-se que o miR-200c revelou ter uma maior associação. Na fase seguinte, estes dados foram validados através da análise de amostras de soro de 182 indivíduos com cancro colorretal e 24 indivíduos saudáveis. Na fase final, foram analisadas 156 amostras de tecido tumoral de 182 indivíduos com cancro colorretal, assim como 20 amostras de tumores primários e as suas correspondentes metástases hepáticas, na tentativa de identificar a origem dos miRNAs circulantes. Este estudo demonstrou que o aumento da expressão de miR-200c está relacionada com a progressão da doença e que pode ser utilizado como biomarcador de previsão de metastização (Toiyama et al., 2014).

Cancro do pulmão

Tem sido demonstrado que, no cancro do pulmão, existem diferenças significativas nos perfis de expressão de miRNAs entre subtipos histológicos, nomeadamente em fases iniciais da doença, e que estes perfis podem ser vistos como um fator preditivo do risco de mortalidade. Assim, esta diferenciação pode ser particularmente útil na elaboração de um adequado prognóstico e de um diagnóstico, permitindo selecionar e direcionar a terapêutica. Um estudo realizado com 290 doentes, 165 com adenocarcinoma e 125 com cancro nas células escamosas dos pulmões, demonstrou que a combinação dos miRNAs let-7b, miR-103, miR-107, miR-181a e miR-191 consegue, efetivamente, distinguir os dois subtipos. Foi também evidenciado que, em fumadores com cancro das células escamosas dos pulmões em estado inicial, um nível de expressão aumentado de miR-25, miR-34c-5p, miR-191, let-7e e miR-34a é preditivo de um menor risco de mortalidade (Landi et al., 2010).

A importância que estas pequenas moléculas podem ter no diagnóstico e prognóstico em casos de cancro recorrente ou refratário foi demonstrada num estudo realizado com 82 doentes, no pré e pós-operatório, bem como em 50 indivíduos saudáveis, que representaram o grupo controlo. Pretendeu-se verificar quais as diferenças de expressão de miRNAs em doentes com cancro do pulmão, antes de realizarem a cirurgia para remoção do tumor e 10 dias após a mesma. Através da análise de amostras de soro por reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa (qRT-PCR) concluiu-se que a expressão de quatro miRNAs (miR-21, miR-205, miR-30d e miR-24) estava aumentada, comparativamente aos indivíduos saudáveis, sendo por isso um potencial biomarcador de diagnóstico precoce. Para além disso, as maiores expressões de miR-21 e de miR-30d no pré-operatório foram relacionadas com uma maior mortalidade. Concluiu-se também que, após a cirurgia, a expressão de miR-21 e de miR-24 diminuiu significativamente, evidenciando

que os níveis destes miRNAs podem ser utilizados na detecção precoce de cancro recorrente ou refratário (Le et al., 2012).

Num outro estudo foi investigada, através de *microarrays*, a expressão de 160 miRNAs em 20 amostras de efusão pleural (10 amostras de efusão pleural benigna e 10 de efusão pleural maligna associada a adenocarcinoma). Esta análise demonstrou que a expressão de miR-198 estava significativamente reduzida em casos de efusão maligna, comparativamente aos de efusão benigna. Os dados foram confirmados através da análise por qRT-PCR em 87 amostras de efusão pleural (42 amostras de efusão pleural benigna e 45 de efusão pleural maligna associada a adenocarcinoma). De referir ainda que este miRNA apresentou um potencial de diagnóstico semelhante ao CEA e superior ao fragmento de citoqueratina (CYFRA), ambos biomarcadores tumorais frequentemente utilizados na prática clínica. Quando utilizadas em conjunto, estas três moléculas (miR-198, CEA e CYFRA), permitem diagnosticar casos de efusão pleural maligna associada a adenocarcinoma com uma sensibilidade de 89,2% e uma especificidade de 85,0%, sugerindo que o miR-198, presente neste fluido, pode ter um papel importante no diagnóstico deste tipo de cancro (Han et al., 2013).

Terapêutica

Os miRNAs, como já foi referido, podem ser divididos em dois grupos consoante os mRNA-alvo: os supressores tumorais e os oncogénicos. Ambos os grupos possuem um grande potencial terapêutico, ao bloquear a função do mRNA, pelo que podem representar uma opção válida no tratamento de neoplasias malignas num futuro próximo.

A utilização de miRNAs em oncologia baseia-se essencialmente em duas abordagens. A primeira está diretamente relacionada com o silenciamento da atividade de um ou vários miRNAs oncogénicos, o que é conseguido através do uso de antagonistas, como os anti-miRNAs sintéticos ou os ácidos nucleicos bloqueados (LNA). A título exemplificativo, pode referir-se o uso de pequenos oligonucleótidos antisense que apresentam sequências complementares aos miRNAs maduros. Além disso, os próprios mRNA-alvo dos miRNAs, cuja expressão se encontre aumentada, podem ser utilizados com a mesma finalidade. A segunda abordagem relaciona-se com o aumento da expressão de miRNAs que têm função de supressão tumoral. Neste caso, têm-se os fragmentos sintéticos que imitam o miRNA, denominados por *miRNA-mimics* que são moléculas de dupla cadeia idênticas a miRNAs

endógenos. Estas moléculas de síntese podem contribuir para a reprogramação das células tumorais ao serem incorporados no RISC. Adicionalmente, esta abordagem pode também ser alcançada através da utilização de plasmídeos de DNA codificante de miRNAs, numa tentativa de reativar a sua biossíntese (Wang et al., 2015; Berindan-neagoe et al., 2014).

Com o objetivo de recuperar a expressão de proteínas supressoras de tumores ou de inibir a expressão de oncogenes, a melhor estratégia a aplicar envolverá o silenciamento de miRNAs que se encontrem sobre-expressos ou a restauração dos níveis de miRNAs que se encontrem com a expressão diminuída, respetivamente. Comparativamente a outras terapias de silenciamento de genes, os miRNAs apresentam duas grandes vantagens. Primeiro, são moléculas endógenas, o que faz com que não sejam rejeitadas pelo próprio organismo, segundo, apresentam a capacidade de interagir com múltiplos genes responsáveis pelo crescimento ou manutenção tumoral, promovendo assim uma resposta a vários níveis. Simultaneamente, diminui-se a probabilidade de resistência à terapia, uma vez que seriam necessárias várias mutações ao nível de múltiplos genes para tal acontecer (Berindan-neagoe et al., 2014).

Para uma terapia com miRNAs ser eficaz é necessário que estes sejam efetivamente entregues às células-alvo. Esta eficácia depende largamente da capacidade do vetor em garantir a estabilidade dos miRNAs na corrente sanguínea e em se acumular no tecido ou órgão-alvo, sem causar efeitos secundários. De facto, as estratégias de vetorização possuem um papel de extrema importância na abordagem a novas terapêuticas. Foram estudados vetores virais, tendo-se obtido alguns resultados positivos, embora, pelas suas características intrínsecas, possam desencadear uma resposta imune, ou ser um risco para a integridade dos cromossomas do doente. Vetores não-virais também já foram estudados, incluindo partículas inorgânicas, lipossomas, *cell-penetrating peptides*, polímeros catiónicos e nanogéis poliméricos. As partículas inorgânicas são muitas vezes retidas nos endossomas, impossibilitando a libertação dos *miRNA-mimics* no citoplasma. Quanto aos restantes métodos referidos, estes não demonstram a estabilidade necessária de modo a garantir a eficácia terapêutica. No sentido de ultrapassar estes obstáculos, foi desenvolvido um novo vetor, baseado na nanoencapsulação. Os *miRNA-mimics* são encapsulados dentro de um polímero através de polimerização *in situ*, formando nanocápsulas uniformes, onde a estabilidade dos *miRNA-mimics* é mantida. Para direcionar este vetor para os alvos pretendidos o polímero pode ser modificado com diferentes moléculas como, por exemplo, anticorpos ou aptâmeros com especificidade para recetores expressos nas células tumorais. Assim, as nanocápsulas são

especificamente entregues e, uma vez no interior das células-alvo, libertam o seu conteúdo, permitindo que os *miRNA-mimics* exerçam a função terapêutica pretendida (Liu et al., 2015).

No desenvolvimento de novos fármacos, pode-se salientar dois medicamentos experimentais que estão a ser testados em ensaios clínicos de fase I, o MRX34 e o MRG-106. O primeiro é composto por um *miRNA-mimic* do miR-34 e o segundo é composto por um oligonucleótido baseado em LNA, que inibe a ação do miR-155 (Mirna Therapeutics, Inc., 2016; Miragen Therapeutics, Inc., 2016).

PERSPETIVAS FUTURAS

Ainda que existam inúmeras evidências na literatura do potencial dos miRNAs no diagnóstico e terapêutica, persistem algumas questões que necessitam de ser completamente esclarecidas. Por exemplo, muito pouco se sabe quanto à relação dose-resposta, sendo esta tão imprescindível para maximizar a eficácia e reduzir problemas de toxicidade. Por outro lado, a maior parte da informação disponível sobre terapias com miRNAs foi obtida através da utilização de modelos animais imunocompetentes, pelo que é necessário que se efetuem estudos de fases clínicas a fim de averiguar se estas terapias inovadoras permitem alcançar resultados positivos em doentes humanos. Para que se possa explorar totalmente o potencial destas moléculas, é necessário compreender todas as suas funções a nível celular, assim como os efeitos a longo prazo decorrentes da sua utilização (Chitkara et al., 2015).

Tendo já sido efetuados diversos estudos sobre as diferenças de perfis de expressão de miRNA entre doentes com neoplasias malignas e indivíduos saudáveis, conhece-se hoje vários perfis que poderão vir a desempenhar um papel importante na prática clínica. No entanto, também se reconhece que não existe reprodutibilidade total entre os estudos efetuados, levando a crer que estes perfis possam estar alterados entre diferentes etnias. Desta forma, há necessidade de realizar estudos multicêntricos, de maneira a recolher amostras representativas do maior número de populações possível. Só assim é possível garantir que os perfis obtidos possam ser associados à situação específica que se pretende diagnosticar (Berindan-neagoe et al., 2014).

A comunidade científica tem depositado uma grande esperança no papel que os miRNAs podem vir a desempenhar na terapia oncológica. O medicamento experimental Miravirsen[®], cujo alvo terapêutico é o miR-122, tem demonstrado resultados bastante positivos no tratamento de infeção por vírus da hepatite C. Embora não esteja diretamente relacionado, pode ser considerado como uma abordagem terapêutica que pode ser transposta para a oncologia. Nesta área terapêutica em particular, pensa-se que a administração associada de miRNA-*mimics* e anti-miRNAs com combinações de quimioterapia já existentes, poderá ser potencialmente vantajosa, tendo como principais objetivos restabelecer os miRNAs supressores de tumores, silenciar os miRNA oncogénicos e diminuir a possibilidade de resistência do tumor ao regime quimioterapêutico escolhido (Yu e Cho, 2015).

No que diz respeito à vetorização, espera-se que, nos próximos anos, se encontrem novas estratégias que apresentem uma menor toxicidade para o organismo e uma maior especificidade tecidual. Desta forma, conseguir-se-á diminuir potenciais reações adversas e

maximizar a eficácia terapêutica através de um tratamento localizado. Por outro lado, um grande obstáculo na entrega localizada de miRNAs prende-se com a falta de permeabilidade que estes apresentam em algumas barreiras corporais como, por exemplo, a barreira hematoencefálica. Pensa-se que num futuro próximo uma nova estratégia de vetorização poderá contribuir para ultrapassar este problema, possibilitando, por exemplo, a utilização de miRNAs na terapia localizada de cancros cerebrais (Wang et al., 2015).

CONCLUSÃO

Nos últimos anos, houve um desenvolvimento intenso em torno do potencial dos miRNAs, fornecendo informações sobre qual o seu impacto na regulação da expressão genética e em processos patológicos. Apesar de já existirem alguns resultados positivos, ainda é necessário proceder a mais estudos na tentativa de melhor compreender o potencial destas moléculas, criando bases sólidas para o futuro.

Existe neste momento conhecimento de diversos perfis de expressão de miRNA com bastante potencial para serem utilizados como biomarcadores, tanto de diagnóstico como de prognóstico, assim como começam a ser concluídos estudos sobre a segurança e eficácia do uso desta classe em terapias oncológicas.

No que diz respeito à vetorização, ainda existem bastantes problemas a ultrapassar, quer na estabilidade reduzida dos *miRNA-mimics*, quer na ineficácia da entrega ao alvo pretendido. Já foram utilizados diversos vetores, com obtenção de alguns resultados positivos, embora ainda apresentem algumas falhas que impossibilitam o aproveitamento de todo o potencial que os miRNAs oferecem.

Mesmo não existindo ainda provas concretas sobre o seu uso, os recentes avanços no conhecimento e na compreensão desta classe de RNAs permitem olhar para estes como uma das maiores promessas a integrar na prática clínica.

BIBLIOGRAFIA

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297.

Berindan-neagoe, I., Monroig, P., Pasculli, B., Calin, G. A. (2015). MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2014, 64(5), 311–336.

Bhayani, M. K., Calin, G. A., Lai, S. Y. (2012). Functional relevance of miRNA* sequences in human disease. *Mut Res*, 731(1–2), 14–9.

Bryant, R. J., Pawlowski, T., Catto, J. W. F., Marsden, G., Vessella, R. L., Rhees, B., Kuslich, C., Visakorpi, T., Hamdy, F. C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*, 106(4), 768–774.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Alder, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, 99(24), 15524–15529.

Calin, G. A., Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11), 857–866.

Callegari, E., Elamin, B. K., Giannone, F., Milazzo, M., Altavilla, G., Fornari, F., Giacomelli, L., D'Abundo, L., Ferracin, M., Bassi, C., Zagatti, B., Corrà, F., Miotto, E., Lupini, L., Bolondi, L., Gramantieri, L., Croce, C. M., Sabbioni, S., Negrini, M. (2012). Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model. *Hepatology*, 56(3), 1025–1033.

Chan, M., Liaw, C. S., Ji, S. M., Tan, H. H., Wong, C. Y., Thike, A. A., Tan, P. H., Ho, G. H, Lee, A. S. G. (2013). Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res*, 19(16), 4477–4487.

Cheng, G. (2015). Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 75–93.

Chitkara, D., Mittal, A., Mahato, R. I. (2015). MiRNAs in pancreatic cancer: Therapeutic potential, delivery challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 34–52.

Cortez, M. A., Bueso-ramos, C., Ferdin, J., Lopez-berestein, G., Anil, K., Calin, G. A. (2012). MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(8), 467–477.

Czech, B., Hannon, G. J. (2013). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes Benjamin. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(1), 19–31.

Eichner, L. J., Perry, M. C., Dufour, C. R., Bertos, N., Park, M., St-Pierre, J., Giguere, V. (2010). MiR-378* mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR α Transcriptional pathway. *Cell Metab*, 12(4), 352–361.

Eiring, A. M., Harb, J. G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J. J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C. J., Becker, H., Chandler, J. C., Andino, R., Cortes, J., Hokland, P., Huettner, C. S., Bhatia, R., Roy, D. C., Liebhaber, S. A., Caligiuri, M. A., Marcucci, G., Garzon, R., Croce, C. M., Calin, G. A., Perrotti, D. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell*, 140(5), 652–665.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: Int Agency Res Cancer. [Internet]. [Acedido a 13 de setembro de 2016]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>

Fonslow, B. R., Stein, B. D., Webb, K. J., Xu, T., Choi, J., Kyu, S., Iii, J. R. Y. (2013). miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma. *Cancer Res*, 10(1), 54–56.

Gits, C. M. M., van Kuijk, P. F., Jonkers, M. B. E., Boersma, A. W. M., van Ijcken, W. F., Wozniak, A., Sciot, R., Rutkowski, P., Schoffski, P., Taguchi, T., Mathijssen, R. H. J., Verweij, J., Sleijfer, S., Debiec-Rychter, M., Wiemer, E. A. C. (2013). MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. *Br J Cancer*, 109(6), 1625–1635.

Han, H. S., Yun, J., Lim, S. N., Han, J. H., Lee, K. H., Kim, S. T., Kang, M. H., Son, S. M., Lee, Y. M., Yun, S. J., Kim, W. J., Lee, O. J. (2013). Downregulation of cell-free miR-198 as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion. *Int J Cancer*, 133(3), 645–652.

Heneghan, H. M., Miller, N., Kerin, M. J. (2010). MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 10(5), 543–550.

Hutvagner, G., Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589), 2056–2060.

Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635–647.

Kodahl, A. R., Lyng, M. B., Binder, H., Cold, S., Gravgaard, K., Knoop, A. S., Ditzel, H. J. (2014). Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. *Mol Oncol*, 8(5), 874–883.

Kulshreshtha, R., Davuluri, R. V., Calin, G. a., Ivan, M. (2008). A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Diff*, 15(4), 667–671.

Landi, M. T., Zhao, Y., Rotunno, M., Koshiol, J., Liu, H., Bergen, A. W., Rubagotti, M., Goldstein, A. M., Linnoila, I., Marincola, F. M., Tucker, M. A., Bertazzi, P. A., Pesatori, A. C., Caporaso, N. E., McShane, L. M., Wang, E. (2010). MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res*, 16(2), 430–441.

Le, H. B., Zhu, W. Y., Chen, D. D., He, J. Y., Huang, Y. Y., Liu, X. G., Zhang, Y. K. (2012). Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients. *Med Oncol*, 29(5), 3190–3197.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20), 4051–4060.

Liu, C., Wen, J., Meng, Y., Zhang, K., Zhu, J., Ren, Y., Qian, X., Yuan, X., Lu, Y., Kang, C. (2015). Efficient delivery of therapeutic miRNA nanocapsules for tumor suppression. *Adv Mater*, 27(2), 292–297.

Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Teruya-Feldstein, J., Bell, G. W., Weinberg, R. A. (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*, 28(4), 341–347.

Mahn, R., Heukamp, L. C., Rogenhofer, S., Von Ruecker, A., Muller, S. C., Ellinger, J. (2011). Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*, 77(5), 1265.e9-1265.e16.

Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L. L., Steitz, J. a, Dimairo, D. (2011). miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *PNAS*, 108(2), 522–527.

Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2013). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172–1187.

Miragen Therapeutics Inc. (2016). Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Study of MRG-106 in Patients With Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL), MF Subtype [Internet]. [Acedido a 13 de setembro de 2016] Disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02580552?term=mir-155&rank=4>

miRBase: the microRNA database (2014) [Internet]. [Acedido a 12 de setembro de 2016] Disponível em <http://www.mirbase.org/>

Mirna Therapeutics Inc. (2016). A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposomal Injection [Internet]. [Acedido a 13 de setembro de 2016] Disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971?term=mirna+therapeutics&rank=115>

Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., Gunji, T., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Watanabe, M., Nakagama, H., Yokota, J., Kohno, T., Tsuchiya, N. (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*, 9(4), e92921.

Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M. R., Shah, M. H., Nicoloso, M. S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C. G., Negrini, M., Cavazzini, L., Volinia, S., Alder, H., Ruco, L. P., Baldassare, G., Croce, C. M., Vecchione, A. (2008). E2F1-Regulated MicroRNAs Impair TGF β -Dependent Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Gastric Cancer. *Cancer Cell*, 13(3), 272–286.

Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J., Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *PNAS*, 105(5), 1608–1613.

Qin, J., Luo, M. (2014). MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. *FEBS Lett*, 588(1), 99–104.

Selth, L. A., Townley, S. L., Bert, A. G., Stricker, P. D., Sutherland, P. D., Horvath, L. G., Goodall, G. J., Butler, L. M., Tilley, W. D. (2013). Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. *Br J Cancer*, 109(3), 641–650.

Toiyama, Y., Hur, K., Tanaka, K., Inoue, Y., Kusunoki, M., Boland, C. R., Goel, A. (2014). Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*, 259(4), 735–743.

Volinia, S., Croce, C. M. (2013). Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *PNAS*, 110(18), 7413–7417.

Wang, H., Jiang, Y., Peng, H., Chen, Y., Zhu, P., Huang, Y. (2015). Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors. *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 142–160.

Wang, J., Huang, S. K., Zhao, M., Yang, M., Zhong, J. L., Gu, Y. Y., Peng, H., Che, Y. Q., Huang, C. Z. (2014). Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One*, 9(4), e87451.

Wei, J. S., Song, Y. K., Durinck, S., Chen, Q., Chi, A. T., Tsang, P., Zhang, Q., Thiele, C. J., Slack, A., Shoet, J., Slack, A. (2008). The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene*, 27(39), 5204–5213.

Yu, H. W., & Cho, W. C. (2015). The emerging role of miRNAs in combined cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2598(December), 1–3.