

José Miguel Carvalho Gomes

Microambientes tumorais: Repopulação tumoral e Hipoxia

Visão global, estratégias terapêuticas e perspectivas futuras

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

José Miguel Carvalho Gomes

Microambientes tumorais: Repopulação tumoral e Hipoxia

Visão global, estratégias terapêuticas e perspectivas futuras

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, José Miguel Carvalho Gomes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010145154, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo 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, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(José Miguel Carvalho Gomes)

O Tutor da Monografia

(Professor Doutor João Nuno Moreira)

O Aluno

(José Miguel Carvalho Gomes)

Agradecimentos...

Agora que este fantástico percurso chega ao fim, deixo o meu mais sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, pela disponibilidade e por toda a ajuda prestada.

Aos meus pais, irmão e restante família, pela presença constante, pela educação e por todos os valores que me transmitiram.

À Daniela, pelo sorriso que me traz alegria, pelo apoio incansável que me dá força, pela paciência e por ser a voz da razão quando é necessário.

Aos amigos, aos “de sempre”, porque a cada regresso a casa nunca senti que estivesse estado longe, e aos “para sempre”, porque ganhei uma segunda família em Coimbra.

À Imperial TAFFUC, porque entre acordes, conquistas e boémias ajudaram a construir das mais belas memórias que levo na bagagem.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo conhecimento, pelas histórias, e pelo orgulho de ser estudante desta casa.

A Coimbra, porque recebeu mais um puto sozinho que vinha de longe e deixa partir mais um homem, de coração cheio por ter conhecido os encantos desta cidade.

Para terminar, quero dedicar todo este meu percurso de 5 anos ao meu Avô Zé e ao meu Avô António, porque apesar de não estarem cá no culminar deste caminho, estiveram presentes no momento mais importante, o momento de criar referências. E se as tenho, vocês são duas das mais importantes, que nunca vou esquecer, em todas as minhas conquistas.

Índice

Lista de abreviaturas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1- Introdução	1
2- Repopulação tumoral	2
2.1 - Células estaminais tumorais	3
2.2 - Regulação dos tumores através de miRNAs	4
2.2.1 - Caracterização de alguns miRNAs envolvidos.....	5
2.2.2 - Estratégias terapêuticas exploradas	7
2.3 - Perspetivas futuras.....	9
3- Desenvolvimento tumoral em zonas de hipoxia	9
3.1 - Alterações celulares em zonas de hipoxia	10
3.2 - Regulação do desenvolvimento tumoral por vias de sinalização moleculares	11
3.2.1 - A via do fator de transcrição induzido por hipoxia (<i>HIF-1 pathway</i>)	11
3.2.2 - Factos importantes sobre o papel do HIF-1	14
3.2.3 - Direcionamento da terapia para o HIF-1	15
3.2.4 - Regulação do HIF-1 através de miRNAs.....	16
3.3 - Terapias direcionadas a zonas de hipoxia	16
3.3.1 - Pró-fármacos ativados por hipoxia	16
3.4 - Perspetivas futuras.....	17
4- Conclusão	18
5- Bibliografia	

Lista de abreviaturas

ABC – ATP *Binding Cassete*

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides

ARNT – Recetor nuclear translocador de aril-hidrocarbonetos

ATP – Adenosina tri-fosfato

CSC – Células estaminais tumorais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EMT – Transição epitélio-mesenquimal

HIF – Fator de transcrição induzido por hipoxia

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HRE – Elemento de resposta à hipoxia

miRNA – MicroRNA

mRNA – RNA mensageiro

PDK – Cinase da piruvato desidrogenase

RNA – Ácido ribonucleico

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VHL – Proteína supressora tumoral Von-Hippel Lindau

Resumo

Atualmente, o cancro é uma doença com uma incidência global enorme e em que os seus doentes apresentam uma taxa de sobrevivência bastante reduzida, uma vez que a origem da maior parte dos tumores sólidos é ainda desconhecida e o desenvolvimento tumoral ocorre através de mecanismos muito complexos que ainda não são completamente percebidos.

A investigação científica nesta área tem evoluído a um ritmo vertiginoso nos últimos anos, e sabe-se agora que não só alterações genéticas condicionam o desenvolvimento tumoral, mas que o microambiente em que o tumor está inserido é muitas vezes responsável pelo desenvolvimento de fenótipos tumorais agressivos que apresentam resistência às terapêuticas oncológicas convencionais.

Neste trabalho são abordadas duas formas de resistência à terapêutica oncológica criadas pelo microambiente em que o tumor se desenvolve, as principais características de cada um deles, bem como as terapêuticas exploradas até ao momento e as perspectivas de futuro para solucionar esta problemática.

A repopulação tumoral é uma das formas de resistência descrita, sendo dada relevância à teoria das Células Estaminais Tumorais e à sua regulação por MicroRNAs, estudados atualmente como uma possível estratégia terapêutica.

Outro caso preocupante de resistência aos tratamentos oncológicos surge quando o tumor se desenvolve em zonas de hipoxia, criando um fenótipo tumoral agressivo que é regulado por várias vias de sinalização molecular. De entre estas, a melhor estudada é a via do fator de transcrição induzido por hipoxia, suscitando entre a comunidade científica muito interesse, uma vez que levanta inúmeras oportunidades terapêuticas para desenvolver futuramente. Também neste microambiente já foi demonstrado o envolvimento de MicroRNAs no processo de regulação tumoral, embora a sua caracterização esteja um pouco mais atrasada quando comparados aos reguladores das Células Estaminais Tumorais.

Apesar dos grandes avanços científicos nesta área, muito ainda há por descobrir, e o caminho é longo até se descobrir uma terapêutica eficaz e segura para os mais diversos tipos tumorais. No entanto, em face do grande impacto socioeconómico, prevê-se que o conhecimento oncológico continue a sua evolução em ritmo acelerado durante os próximos anos.

Palavras-Chave: Cancro, Resistência, Microambiente, Células Estaminais Tumorais, Hipoxia, MicroRNAs, HIF

Abstract

Nowadays, cancer is a disease with a large overall incidence and cancer patients show a significantly reduced survival rate since the origin of most solid tumors is still unknown and tumor growth occurs through very complex mechanisms which are not yet fully understood.

Scientific research in this area has evolved at a breakneck pace in recent years and now, it is known that not only genetic alterations affect tumor growth but that the microenvironment in which the tumor develops is often responsible for the arising of an aggressive tumor phenotype that exhibits resistance to conventional cancer therapies.

This work presents two types of resistance to cancer therapy created by the microenvironment in which the tumor grows. The main characteristics of each type, some of the therapeutic strategies explored so far, as well as future prospects for solving this problem are also presented.

One type of resistance described is the tumor repopulation. In this chapter some considerations about Tumor Stem Cells theory and their regulation by MicroRNAs, are addressed since they are currently an important matter of study as a potential therapeutic strategy.

Another type of resistance to cancer treatments appears when the tumor develops in areas of hypoxia, creating an aggressive tumor phenotype that is regulated by a diversity of molecular signaling pathways. Of these molecular signaling pathways, the best studied is the hypoxia inducible factor pathway, that is raising a lot of interest among the scientific community since it allows many therapeutic opportunities to be developed in the near future. Besides that, the involvement of MicroRNAs in tumor regulation process has also been shown in this microenvironment, although the characterization of the MicroRNA involved is slightly delayed when compared to the ones that regulate Tumor Stem Cells.

Despite the great scientific advances in this area, much remains to be discovered, and the road is long to discover an effective and safe therapy for the different tumor types. However, the social and economic impact is huge, so the cancer knowledge is expected to continue its progress at an accelerated pace over the coming years.

Keywords: Cancer, Resistance, Microenvironment, Cancer Stem Cells, Hypoxia, MicroRNAs, HIF

I- Introdução

Com o aumento da esperança média de vida das populações o cancro ganhou uma grande incidência mundial, que tem vindo a crescer rapidamente nos últimos anos, atingindo qualquer região do planeta bem como qualquer nível socioeconómico. Atualmente, esta doença é responsável por uma em cada sete mortes no mundo (rácio superior ao do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose e malária juntos), sendo estimado que neste momento surjam 15 milhões de novos casos por ano, que este número chegue aos 19 milhões em 2025 e aos 24 milhões de novos casos por ano em 2035 (Coleman, 2015)(American Cancer Society, 2015).

A incidência global da doença associada ao facto do fenómeno tumoral ser ainda um “mundo por descobrir” faz com que a oncologia seja uma área fascinante para a comunidade científica, assim como um mercado muito apetecível para as grandes companhias farmacêuticas que investem biliões de dólares na investigação de fármacos oncológicos. No entanto, apesar dos grandes avanços que têm sido feitos na área, a origem celular da maior parte dos tumores sólidos é desconhecida (Visvader e Lindeman, 2008). Contudo, esta origem, desde cedo foi associada a diversas alterações genéticas que estão de alguma forma relacionadas com a inibição de genes supressores tumorais ou com a ativação de oncogenes (Weinberg, 1994).

Sabe-se hoje que para além desta aquisição de mutações genéticas, também as interações entre as próprias células tumorais bem como o microambiente em que as mesmas estão inseridas tem uma grande influência no desenvolvimento do tumor (Visvader e Lindeman, 2008) (Cairns, Harris e Mak, 2011). Todos estes fatores fazem com que exista uma grande heterogeneidade celular entre tumores mas também entre células pertencentes ao mesmo tumor, sendo assim compreensível o aparecimento de um elevado número de resistências à radioterapia e à quimioterapia, que são os tratamentos de eleição em oncologia (Visvader e Lindeman, 2008) (Kim e Tannock, 2005).

Este trabalho tem como objetivo abordar alguns mecanismos de resistência associados ao microambiente tumoral, nomeadamente o fenómeno de repopulação tumoral e o desenvolvimento de tumores em zonas de hipoxia. Pretende também salientar a importância do microambiente no desenvolvimento de tumores com um fenótipo mais agressivo. Além disso, serão analisadas algumas das alternativas terapêuticas exploradas até ao momento, bem como perspectivas futuras para a evolução da terapêutica oncológica em tumores cujo desenvolvimento foi influenciado por estas condições. Isto porque atualmente, este tipo de tumores representam uma grande ameaça à saúde pública, devido à falta de

compreensão da totalidade deste fenómeno e de sucesso nas terapêuticas exploradas que se traduz numa baixa taxa de sobrevivência dos doentes.

2- Repopulação tumoral

A radioterapia e a quimioterapia, os tratamentos mais utilizados em doentes oncológicos, são aplicados em doses múltiplas, que são espaçadas para permitir a recuperação dos tecidos normais entre tratamentos (Kim e Tannock, 2005). As células precursoras na medula óssea são sensíveis aos fármacos anticancerígenos conduzindo a um decréscimo de leucócitos no sangue cerca de 10 a 14 dias após a terapêutica, deixando o doente suscetível a várias infeções. Esta diminuição da contagem de leucócitos estimula a divisão das células estaminais fazendo com que o sangue seja normalmente repopulado com leucócitos maduros num período de três semanas, correspondendo este espaço temporal ao intervalo normal entre tratamentos de quimioterapia (Kurtova, 2014). No entanto, as células tumorais que sobreviveram também proliferam durante os intervalos de tratamento, e este processo de repopulação é uma importante causa de falta de sucesso na terapêutica (Kim e Tannock, 2005).

No seio da comunidade científica foram criadas hipóteses que permitem descrever o desenvolvimento tumoral. Dentro destas hipóteses são dois os principais modelos que apresentam algum consenso. Um dos modelos utilizados é conhecido como modelo da evolução clonal e afirma que qualquer célula tumoral pode iniciar a formação do tumor. De acordo com este modelo, uma célula torna-se tumorigénica e maligna através da aquisição de mutações cumulativas, de entre as quais se destacam algumas consideradas essenciais para a célula iniciar a formação do tumor, sendo elas, o desenvolvimento de um potencial proliferativo ilimitado, a independência de sinais de crescimento, a evasão de sinais apoptóticos e anti-crescimento e a capacidade para metastizar e induzir a angiogénese (Chhabra e Saini, 2014) (Hanahan e Weinberg, 2000).

O segundo modelo descrito para explicar esta heterogeneidade das células tumorais é o modelo das Células Estaminais Tumorais (CSC) (Visvader e Lindeman, 2008), sendo estas primeiramente descobertas em células tumorais da mama no ano de 2003 (Liu e Tang, 2012). Segundo este modelo, os tumores sólidos contêm uma subpopulação de células com características estaminais, tal como nos tecidos do individuo adulto (Danquah, Zhang e Mahato, 2011).

Com o avançar da investigação oncológica, a relevância clínica das CSC foi fortalecida através da evidência de que estas células são resistentes à radioterapia e à quimioterapia e que são muito provavelmente as responsáveis pela metástase tumoral (Yu, Z. *et al.*, 2013).

Sendo assim, este modelo gerou uma maior aceitação e interesse, e conseqüentemente será esta a hipótese que irá ser aprofundada neste trabalho.

2.1 - Células estaminais tumorais

As CSC partilham muitas das características das células estaminais normais, como a quiescência, a resistência a fármacos e a toxinas através da expressão de vários transportadores ABC (ATP binding-cassete), a capacidade de reparação do DNA, a resistência à apoptose e a expressão de marcadores de superfície celular específicos (Dean, Fojo e Bates, 2005) (Takahashi, Miyazaki e Ochiya, 2014).

A origem exata das células estaminais tumorais pode variar, podendo ter origem em células estaminais normais que acumularam alterações oncogénicas ao longo do tempo, ou numa célula diferenciada que desenvolve a capacidade de autorrenovação contínua enquanto adquire outras propriedades de uma célula estaminal (Dean *et al.*, 2005).

A expressão de níveis elevados de transportadores ABC específicos é uma característica muito interessante das CSC. Os dois genes que codificam transportadores ABC mais estudados são o ABCB1 e o ABCG2. Estes genes em conjunto com o ABCC1, representam os três principais genes que conferem resistência a fármacos que foram identificados nas células tumorais (Dean *et al.*, 2005). Os transportadores codificados por estes genes através da utilização de ATP realizam ativamente o efluxo de fármacos das células, para desta forma as proteger de agentes citotóxicos (Dean *et al.*, 2005).

Para melhor perceber a influência destes genes foram realizados estudos em murganhos deficientes no gene ABCG2, ABCB1 ou ABCC1. Os resultados destes estudos mostraram que estes ratos são férteis, viáveis e têm compartimentos de células estaminais normais. Sendo assim, a partir destes dados, é possível concluir que nenhum destes genes é necessário para o crescimento e manutenção das células estaminais. No entanto, estes ratos são mais sensíveis aos efeitos de fármacos citotóxicos, sendo este resultado consistente com o papel dos transportadores em proteger a célula das toxinas. Esta propriedade é muito importante no isolamento e análise destas células, uma vez que a maioria das células acumula os marcadores fluorescentes Hoechst 33342 e rodamina 123, porém nas células estaminais estes compostos sofrem efluxo por parte do ABCG2 e ABCB1, respetivamente (Dean *et al.*, 2005).

Com o intuito de ultrapassar a resistência aos fármacos causada pelos transportadores ABC foram desenvolvidos inibidores do ABCB1 de primeira e, posteriormente, de segunda geração. Estes inibidores falharam nos ensaios clínicos, em

alguns casos por interação farmacocinética com o agente citotóxico e em outros casos pensa-se que a falha se deva a presença de transportadores adicionais, tais como o ABCCI e o ABCG2, que não eram alvos do inibidor. Esta segunda justificação ganhou ainda mais força, uma vez que a maioria dos estudos realizados sugere que as células estaminais expressam em maior quantidade o ABCG2 do que o ABCBI (Dean *et al.*, 2005).

Apesar do insucesso nos ensaios clínicos estes estudos com os transportadores ABC abriram no entanto um leque de novas oportunidades terapêuticas como:

- Inibidores do ABCG2;
- Anticorpos anti-ABCG2;
- Inibidores das células estaminais (através da inibição de recetores de superfície celular específicos e/ou de moléculas essenciais à sinalização envolvida nos processos de autorrenovação e de sobrevivência das células estaminais);
- Imunoterapia (através da utilização do próprio sistema imunitário do doente para destruição das células tumorais) (Dean *et al.*, 2005).

Porém, apesar destas novas oportunidades descortinadas, confirmando-se as relações propostas anteriormente entre as células estaminais normais e tumorais, a inevitável conclusão a retirar é que a utilização das terapias citotóxicas sistémicas habitualmente utilizadas/desenvolvidas padecem de uma elevada falta de especificidade, uma vez que as terapias que destroem as células tumorais irão também destruir as células normais. Uma terapia bem-sucedida só poderá ser alcançada através de uma completa diferenciação das células estaminais normais das células tumorais, ou através da exploração da hipotética janela de vulnerabilidade que existe quando a célula estaminal tumoral regressa transitoriamente ao ciclo celular (Donnenberg e Donnenberg, 2005). Foi então necessário aprofundar o conhecimento sobre a regulação dos tumores para que assim se pudessem explorar novas alternativas.

2.2 - Regulação dos tumores através de miRNAs

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos fragmentos de RNA não codificantes (entre 21 a 25 nucleótidos de comprimento), que induzem a degradação do RNA alvo ou impedem a sua tradução através de uma ligação imperfeita à sua região 3' não traduzida. Um único miRNA pode ter como alvo dezenas de RNAs e um único RNA pode ser regulado por vários miRNAs (Liu e Tang, 2012) (Takahashi *et al.*, 2014).

Cada vez mais são atribuídos aos miRNAs funções de grande e variável importância no organismo humano, sendo uma delas o papel na regulação ao nível molecular das células

estaminais normais durante o seu desenvolvimento. Dadas as semelhanças, já abordadas entre as células estaminais normais e as CSC, foi provado que também as CSC são reguladas por uma rede de miRNAs, sendo a expressão de miRNAs semelhante entre as células estaminais embrionárias e as CSC. Por exemplo, o miRNA Let-7 não se encontra presente nas células estaminais embrionárias e está, também, muitas vezes ausente em cânceres como o da mama, do pulmão e do ovário (Liu e Tang, 2012).

Há muitas oportunidades terapêuticas a explorar de forma a utilizar os miRNAs para inibir as propriedades das CSC. Podem ser utilizados para inibir a proliferação, para retirar a sua capacidade invasiva (essencial na sua ação metastática), para induzir a apoptose, para induzir a diferenciação terminal das CSC levando à perda da sua capacidade estaminal ou para as tornar suscetíveis à quimioterapia (Chhabra e Saini, 2014). Estas oportunidades terapêuticas diferem consoante o miRNA que se pretende atingir, pelo que existe hoje uma grande preocupação em caracterizar os miRNAs envolvidos na regulação do tumor.

2.2.1 - Caracterização de alguns miRNAs envolvidos

Um dos miRNAs mais estudados pela sua influência na regulação tumoral é o let-7. Estudos do perfil de expressão deste miRNA revelaram que este tinha baixa expressão nas CSC da mama (foram as primeiras a ser descobertas, e conseqüentemente são as melhor caracterizadas, inclusive quanto à expressão de miRNAs). Baseado nestes estudos, foi revelado o papel do let-7 na regulação das propriedades estaminais, ou seja, o seu papel na autorrenovação e na diferenciação celular. A sobreexpressão do let-7 mediada por lentivírus em murganhos inibiu a proliferação celular, a formação do tumor e a metástase enquanto antagonizar o let-7 com a utilização de oligonucleótidos *antisense* aumentou a propagação *in-vitro* de células tumorais não estaminais (Liu e Tang, 2012) (Yu, F. *et al.*, 2007). No entanto, outros estudos revelaram que o let-7 não é o único miRNA a regular as CSC da mama, uma vez que a sobreexpressão isolada do let-7 não é suficiente para bloquear completamente a formação e/ou progressão do tumor. Posteriormente, foi identificado o miR-30, outro miRNA que tem uma expressão reduzida em CSC da mama e apresenta capacidade de controlo sobre as propriedades estaminais das mesmas. A sobreexpressão do miR-30 nas CSC da mama não só diminuiu a sua capacidade de autorrenovação como também aumentou a apoptose nestas células. De seguida, foi testado o efeito da sobreexpressão simultânea de ambos os miRNAs, verificando-se uma maior inibição da autorrenovação das CSC do que a obtida pela introdução de qualquer um dos dois isoladamente. Estes dados

sugerem que a regulação das propriedades das CSC deve ocorrer pela ação concomitante de múltiplos e distintos miRNAs (Liu e Tang, 2012).

Como foi possível comprovar, vários miRNAs têm influência na regulação do desenvolvimento tumoral, e como tal, outros miRNAs têm merecido especial atenção da comunidade científica. Uma das famílias de miRNAs que tem sido mais estudada é a família do miR-34, que curiosamente tem um comportamento semelhante à família let-7 durante o desenvolvimento das células estaminais normais, mas também no desenvolvimento das CSC, como é possível visualizar na Figura 1.

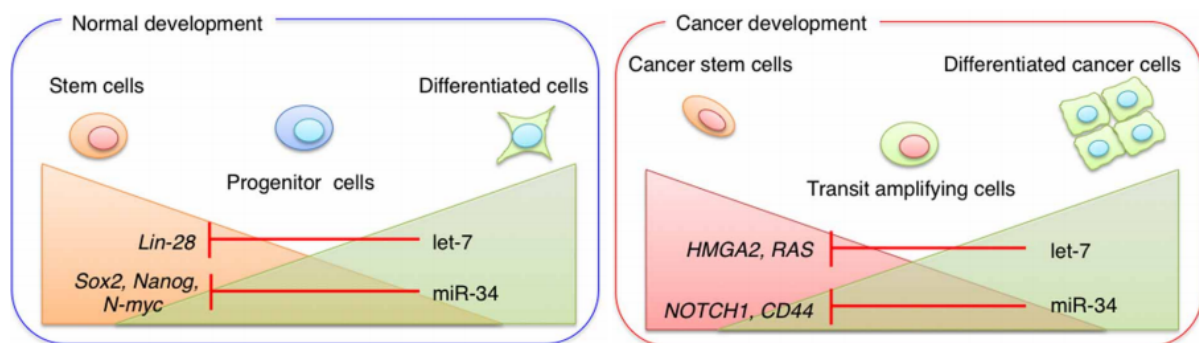


Figura 1: miRNAs em células estaminais e em células estaminais tumorais. Os miRNAs específicos das células estaminais desempenham papéis muito importantes na iniciação e desenvolvimento tumoral. Durante o desenvolvimento normal, os níveis de expressão de membros da família miR-34 e let-7 aumentam durante a diferenciação, o mesmo acontece durante o desenvolvimento tumoral, onde as propriedades das CSC são reguladas pelo equilíbrio entre a expressão de miRNAs e a expressão dos seus genes-alvo (adaptado de Takahashi *et al.*, 2014).

Além das famílias já referidas, outros miRNAs merecem destaque devido à sua regulação de importantes funções. Exemplo disso são o miR-200 e o miR-205, relatados por vários grupos como reguladores da transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo considerado crítico na cascata metastática. Estas famílias encontram-se com uma expressão significativamente reduzida no cancro da mama metastático (Liu e Tang, 2012).

A sobreexpressão do miR-200 evita a EMT regulando negativamente a expressão de ativadores do EMT, conhecidos como ZEB1 e ZEB2. Curiosamente, o ZEB1 e o ZEB2 também reprimem a expressão do miR-200 ligando-se às suas regiões promotoras, levando a uma forte ativação do EMT. Estas descobertas estabelecem uma relação de duplo feedback negativo entre o ZEB1/ZEB2 e o miR-200 que juntos regulam um importante processo biológico do desenvolvimento do tumor e da metástase do cancro (Liu e Tang, 2012).

Outros tipos de tumores foram estudados, de forma a confirmar que todos eles são regulados por miRNAs, podendo concluir-se que estes exercem um papel abrangente no desenvolvimento tumoral, através da regulação das CSC que, por sua vez, estão envolvidas em vários passos da tumorigénese, desde a iniciação e manutenção do tumor, à metástase e à resistência à terapêutica. De seguida, é apresentada a Tabela I com alguns dos principais

Microambientes tumorais: Repopulação tumoral e Hipoxia
Visão global, estratégias terapêuticas e perspectivas futuras

miRNAs descobertos até à data, e com as principais características da sua ação, consoante o tipo de tumor em que são encontrados.

Tabela 1: Alguns dos miRNAs descobertos, o tipo de cancro onde foram encontrados, bem como a sua expressão e função nessas células tumorais (Chhabra e Saini, 2014) (Takahashi *et al.*, 2014).

miRNA	Tipo de tumor	Expressão nas CSC	Função
miR-93	Mama (basal)	Reduzida	Inibe a proliferação e a metástase
	Mama (luminal)	Aumentada	Aumenta a proliferação
	Cólon	Reduzida	Inibe a proliferação
Família miR-200	Ovário	Reduzida	Inibe a migração e a invasão
	Mama	Reduzida	Inibe a EMT, inibe a autorrenovação, inibe a formação da mamosfera
miR-199a	Ovário	Reduzida	Reduz o crescimento tumoral, reduz a invasão, aumenta a expressão de genes com propriedades estaminais e aumenta a quimiosensibilidade
miR-199a-3p	Hepático	Reduzida	Inibe a proliferação e a invasão
miR-199a-2	Ovário	Reduzida	Induz a apoptose e aumenta a quimiosensibilidade
miR-199b-5p	Cérebro	---	Redução da fração de células CD133 ⁺
miR-34	Glioma	Reduzida	Induz diferenciação
	Próstata	Reduzida	Inibe a metástase e a proliferação
	Pancreático	Reduzida	Inibe a formação da esfera tumoral
	Cólon	---	Supressão da divisão celular assimétrica
Let-7	Hepático	Aumentada	Aumenta a quimioresistência
	Mama	Reduzida	Reduz a formação da mamosfera, inibe a diferenciação, inibe a autorrenovação
miR-22	Leucemia	---	Promoção da autorrenovação
	Mama	---	Suprime a expressão da família miR-200

2.2.2 - Estratégias terapêuticas exploradas

O conhecimento sobre o fenómeno da repopulação tumoral tem sofrido uma evolução vertiginosa nos últimos anos, porém este está longe de ser compreendido. Apesar disso, as várias peças do “puzzle” vão-se encaixando, e com elas surgem oportunidades terapêuticas que poderão ser exploradas no futuro.

Uma promissora aproximação terapêutica em estudo prende-se com a utilização de produtos naturais não-tóxicos capazes de reprimir as propriedades das CSC através da regulação da expressão de miRNAs. Exemplo disto é o resveratrol, molécula que atualmente é muito consumida como suplemento alimentar, que está presente em produtos como o vinho tinto, e que exerce a sua ação anti-mutagénica e anti-tumoral através do aumento da função de alguns miRNAs (Takahashi *et al.*, 2014) (Hagiwara *et al.*, 2012).

Outras estratégias estudadas consistem na distribuição de miRNAs nas células ou na utilização de inibidores de miRNAs. Muitos grupos de trabalho demonstraram que os miRNA são secretados através de exossomas. Porém, alguns marcadores de superfície das CSC, como o CD44 e o CD133, também são expressos nas células estaminais normais, o que pode trazer complicações para o desenvolvimento desta terapia. No entanto, este problema pode ser ultrapassado pelo desenvolvimento de lipossomas ou nanopartículas conjugados com anticorpos contra polissacarídeos específicos permitindo assim a entrega seletiva dos miRNAs supressores de CSC ou outras pequenas moléculas (Takahashi *et al.*, 2014).

Atualmente, e com base nestes estudos a empresa *miRNATherapeutics* está a trabalhar em miRNAs para aplicar na terapêutica oncológica. O seu miR-34 (MRX34) iniciou o desenvolvimento clínico em 2013 e trata-se de um miR-34 sintético encapsulado num lipossoma, para ser utilizado em doentes com cancro do fígado ou com tumores sólidos com envolvimento do fígado. Neste momento mais 14 miRNAs estão a ser estudados pela empresa, que no seu sítio da internet apresenta já alguns dos miRNAs que está a desenvolver, bem como a fase em que se encontram do seu desenvolvimento clínico, como se pode ver na figura 2 (Chhabra e Saini, 2014) (*Mirna Therapeutics*, [s.d.]).

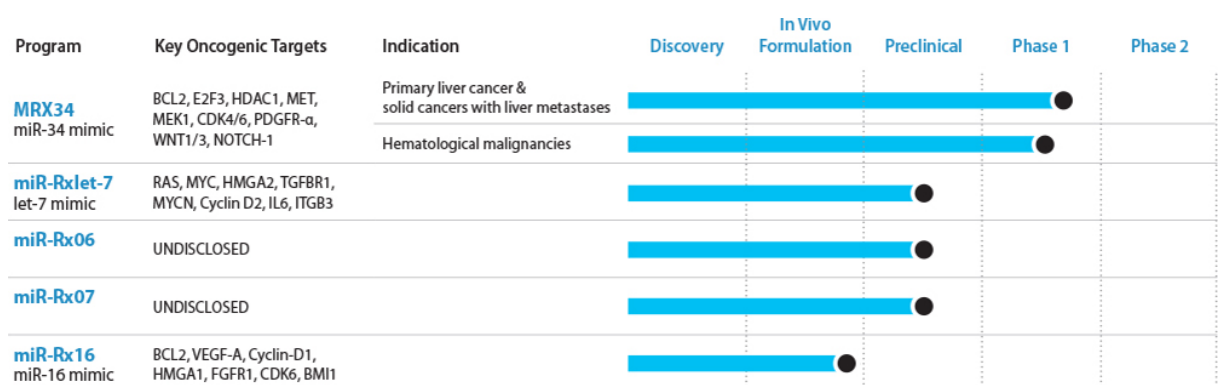


Figura 2: Pipeline da empresa *miRNATherapeutics*. A imagem mostra-nos o estado do desenvolvimento dos 5 principais miRNAs sintéticos, que se encontram em fase de ensaios clínicos e que estão a ser desenvolvidos pela empresa *miRNA therapeutics* (*Mirna Therapeutics*, [s.d.]).

2.3 - Perspetivas futuras

Com o avançar da caracterização dos miRNAs envolvidos na regulação do desenvolvimento tumoral muitas são as estratégias que podem ser exploradas na terapêutica oncológica, no entanto, a quantidade de miRNAs envolvida neste processo pode constituir um entrave, uma vez que a completa erradicação das CSC por esta via pressuporia a manipulação de vários miRNAs (Liu e Tang, 2012). Além disso, estudos envolvendo vários indivíduos demonstraram que as CSC variam de doente para doente, o que implica que uma eventual estratégia clínica utilizando as CSC no futuro deva ter em conta as diferenças entre os vários doentes (Yu, Z. *et al.*, 2013).

Apesar destas contrariedades, é de prever que a compreensão do fenómeno da repopulação tumoral continue a evoluir a um bom ritmo, até à sua compreensão total, e aí muitas mais estratégias terapêuticas surgirão para auxiliar no combate a esta doença.

3- Desenvolvimento tumoral em zonas de hipoxia

O microambiente tumoral pode proporcionar diferentes condições que levam a diferentes desenvolvimentos tumorais. Além da repopulação tumoral, muitas outras características têm sido estudadas pois criam diferentes fenótipos tumorais com diferentes formas de resistência à terapêutica. A vascularização anormal ou o consumo de oxigénio pela atividade metabólica aumentada em algumas zonas tumorais levam à criação de um microambiente perturbado, onde existe uma grande heterogeneidade de oxigenação, pH, concentrações de glucose e de muitos outros metabolitos. Esta é a grande diferença verificada entre as células normais e tumorais, apesar de muitos mecanismos moleculares que regulam a alteração do metabolismo celular com o objetivo de suportar a divisão celular serem comuns a ambos os tipos celulares (Cairns *et al.*, 2011) (Visvader e Lindeman, 2008) (Maynard e Ohh, 2007). Estes microambientes privados de oxigénio e nutrientes refugiam, muitas vezes, células de crescimento lento e metabolicamente comprometidas que mostram resistência aos agentes citotóxicos normais (uma vez que estes atuam sobretudo nos processos de replicação e de divisão celular) e repopulam os tumores no final da terapêutica, apresentando também alterações fenotípicas quando comparadas a células em regiões mais vascularizadas (Zhang *et al.*, 2014).

A resistência à radioterapia é outra das características de microambientes em zona de hipoxia, uma vez que a terapêutica com radiação necessita dos radicais livres do oxigénio para destruir as células alvo, tendo sido esta resistência que desencadeou o interesse crescente pelo estudo deste tipo de tumores (Harris, 2002). No entanto, e apesar das suas consequências para a resistência à terapêutica, a natureza e a importância desta restrição

metabólica no cancro foi, durante anos, frequentemente mascarada pela utilização de condições de cultura em tecidos em que o oxigénio e os nutrientes estão sempre em excesso (Cairns *et al.*, 2011).

3.1 - Alterações celulares em zonas de hipoxia

No momento em que o interesse da comunidade científica por este microambiente aumentou foi demonstrado que as células passam por uma variedade de respostas biológicas quando colocadas sob condições de hipoxia, incluindo a ativação de vias de sinalização que regulam a proliferação, a angiogénese e a apoptose. Embora a hipoxia seja tóxica para as células normais e para as células tumorais, as células tumorais sofrem alterações genéticas e adaptativas que lhes permitem sobreviver e até proliferar nestes ambientes, sendo que os tumores nestas condições apresentam baixas taxas de sobrevivência para o doente e aumento da sua capacidade de metástase (Harris, 2002).

Alguns dos processos determinantes do fenótipo metabólico tumoral podem ser analisados na Figura 3, sendo que uma das alterações mais significativas que ocorre nas células hipoxias é a passagem do metabolismo aeróbio para anaeróbio, ou seja, o ATP (essencial para o processo de divisão celular) deixa de ser preferencialmente obtido por oxidação fosforilativa para ser gerado através do processo de glicólise (Harris, 2002) (Cairns *et al.*, 2011). Esta alteração é conhecida como efeito de Warburg e é o fenótipo metabólico melhor caracterizado nas células tumorais (Cairns *et al.*, 2011) (Vaitheesvaran *et al.*, 2015).

A glicólise pode ser um processo mais rápido que o processo de oxidação fosforilativa, porém é muito menos eficiente em termos de moléculas de ATP geradas por moléculas de glucose consumidas (2 moléculas de ATP geradas por molécula de glucose, contrariamente às cerca de 32 geradas através da respiração aeróbia) (Cairns *et al.*, 2011) (Lindsay, 1997). Esta alteração implica que as células tumorais implementem uma taxa anormalmente elevada de captação de glucose para irem de encontro às suas necessidades energéticas. Esta elevada taxa de captação de glucose tem-se revelado útil para a deteção tumoral e sua monitorização (Cairns *et al.*, 2011).

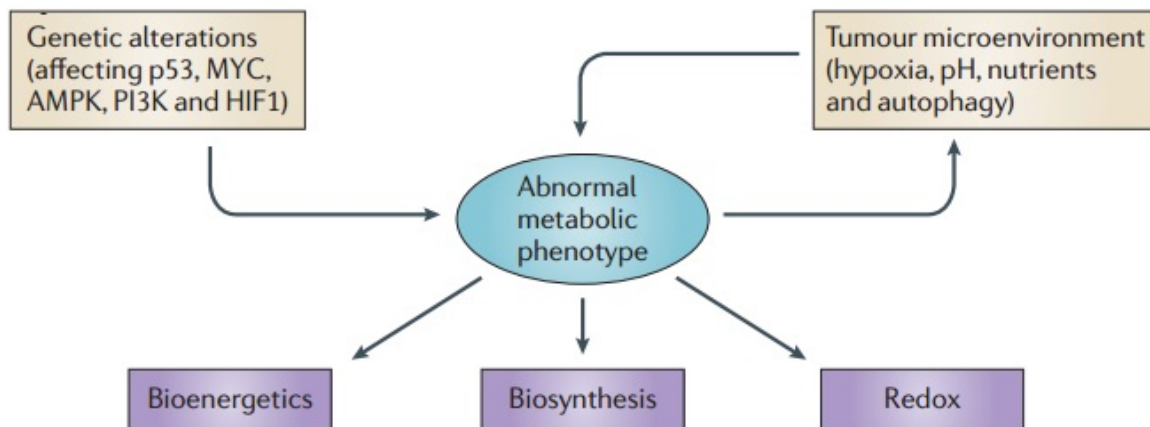


Figura 3: Processos determinantes do fenótipo metabólico tumoral. O fenótipo metabólico das células tumorais é controlado por alterações genéticas intrínsecas e respostas externas ao microambiente tumoral. Estas adaptações otimizam o metabolismo das células tumorais para proliferarem fornecendo níveis elevados de energia na forma de ATP, capacidade de biosíntese e manutenção do equilíbrio redox (Cairns *et al.*, 2011).

3.2 - Regulação do desenvolvimento tumoral por vias de sinalização moleculares

3.2.1- A via do fator de transcrição induzido por hipoxia (*HIF-1 pathway*)

As células tumorais adaptam-se ao seu microambiente através de dois meios importantes: reprogramando o seu metabolismo de forma a gerarem ATP na ausência de oxigénio e estimulando a angiogénese para aumentar a distribuição de oxigénio. Estas respostas são principalmente mediadas ao nível transcripcional por uma via através da qual as células reagem aos baixos níveis de oxigénio, a via do fator de transcrição induzido por hipoxia (HIF) (Melillo e Semenza, 2006) (Maynard e Ohh, 2007).

Os HIF são fatores de transcrição heterodiméricos constituídos por uma subunidade α sensível ao oxigénio (HIF- α) e uma subunidade β (HIF- β), também conhecida como ARNT (receptor nuclear translocador de aril-hidrocarbonetos), que facilita a distribuição de oxigénio e a adaptação à privação de oxigénio através da regulação de genes que controlam a captação de glucose, o metabolismo, a angiogénese, a eritropoiese, a proliferação celular e a apoptose (Maynard e Ohh, 2007) (Nagaraju *et al.*, 2015) (Li *et al.*, 2015). Até ao momento foram caracterizados três HIF, o HIF-1, o HIF-2 e o HIF-3. Muitos estudos associaram a expressão de HIF-1 α com a progressão tumoral, sendo que em alguns tipos de cancro foi demonstrado que um aumento do nível de HIF-1 α intracelular conduz a um mau prognóstico e resistência à terapêutica. A maioria dos genes-alvo do HIF-1 são, no entanto, expressos de uma forma específica consoante o tipo de células onde se encontram, e como tal, o HIF-1 sozinho não consegue originar esta expressão de genes. Assim, consoante o tipo celular e a presença ou ausência de alterações genéticas é distinta a relação entre fatores pró e anti-

apoptóticos, determinando um aumento ou um decréscimo, respetivamente, na taxa de sobrevivência dos doentes (Semenza, 2003) (Harris, 2002) (Nagaraju *et al.*, 2015).

São agora conhecidos muitos mecanismos de ativação da via HIF-1, porém, a hipoxia é o mecanismo de ativação em tumores que se encontra melhor caracterizado, como se pode observar na figura 4 (Maynard e Ohh, 2007). Na ausência de oxigénio, o HIF-1 liga-se a elementos de resposta à hipoxia (HREs), ativando a expressão de numerosos genes de resposta à hipoxia, como por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é um fator de crescimento pro-angiogénico (Harris, 2002). Uma vez ativa, esta via promove o efeito de Warburg através de uma amplificação da transcrição de genes codificadores de transportadores de glucose e da maioria das enzimas glicolíticas, aumentando a capacidade da célula para realizar o processo de glicólise. Além disso, o HIF-1 ativa a cinase do piruvato desidrogenase (PDK) que inativa o complexo piruvato desidrogenase mitocondrial reduzindo consequentemente a taxa de fosforilação oxidativa. Na presença de oxigénio, o HIF-1 α está ligado à proteína supressora tumoral Von-Hippel Lindau (VHL). Esta interação leva à ubiquitinação do HIF-1 α e ao seu direcionamento para o proteossoma, conduzindo à sua degradação. Mutações no VHL previnem esta ubiquitinação, enquanto os inibidores do proteossoma impedem a eliminação, estando ambos associados a uma acumulação do HIF-1 α e ativação contínua dos genes de resposta à hipoxia (Harris, 2002) (Cairns *et al.*, 2011) (Maynard e Ohh, 2007).

Microambientes tumorais: Repopulação tumoral e Hipoxia
Visão global, estratégias terapêuticas e perspectivas futuras

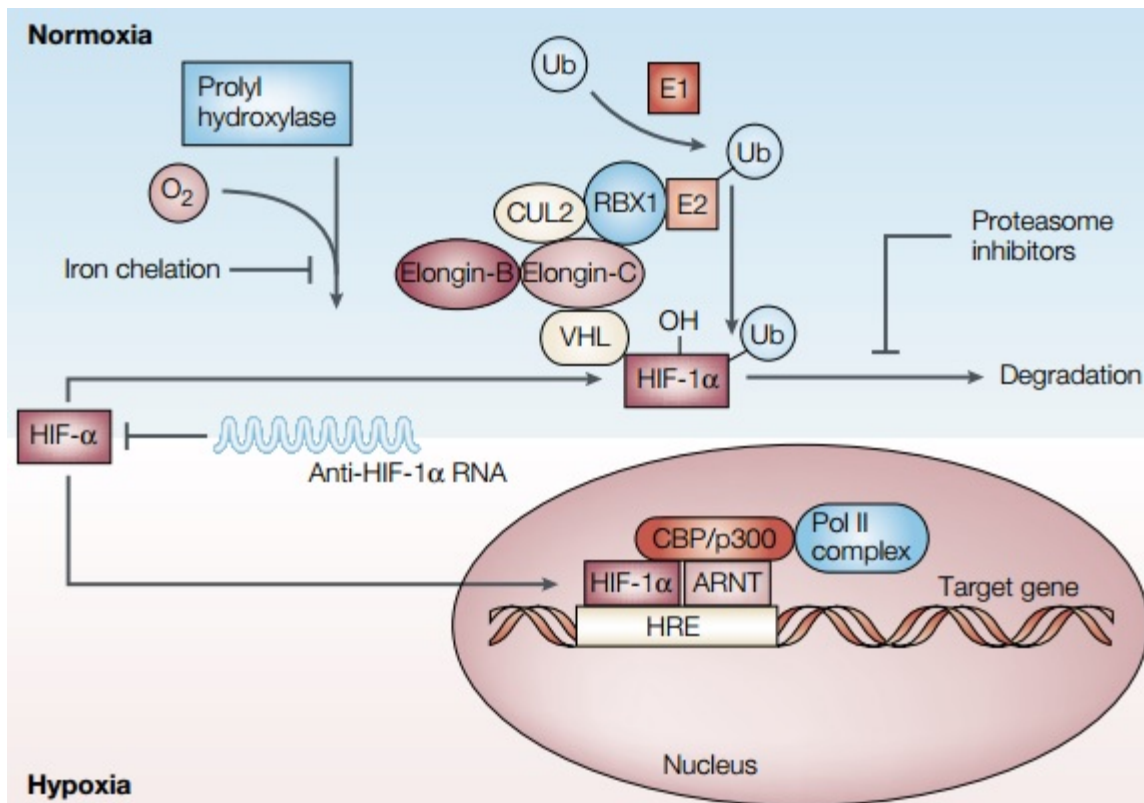


Figura 4: A via HIF-1. Na presença de oxigénio, a prolil-hidroxilase modifica o HIF-1 α permitindo que este interaja com o VHL que em conjunto com uma enzima ativadora da ubiquitina (E1) medeia a ubiquitinação do HIF-1 α . Esta ubiquitinação direciona o HIF-1 α para os proteossomas onde será degradado. Na ausência de oxigénio, a prolil-hidroxilase não consegue modificar o HIF-1 α e a proteína mantém-se estável. O HIF-1 α estável dirige-se para o núcleo onde interage com co-fatores que permitem a ligação aos HRE ativando a transcrição dos genes-alvo (Harris, 2002).

Em suma, podemos dizer que o HIF-1 é um mensageiro que é enviado para o núcleo de forma a ativar respostas transcricionais à hipoxia, sendo que na Figura 5 são expostas algumas das consequências da atividade deste mensageiro, e na Figura 6 é transmitida uma visão geral da regulação pelo HIF-1 (Semenza, 2003).

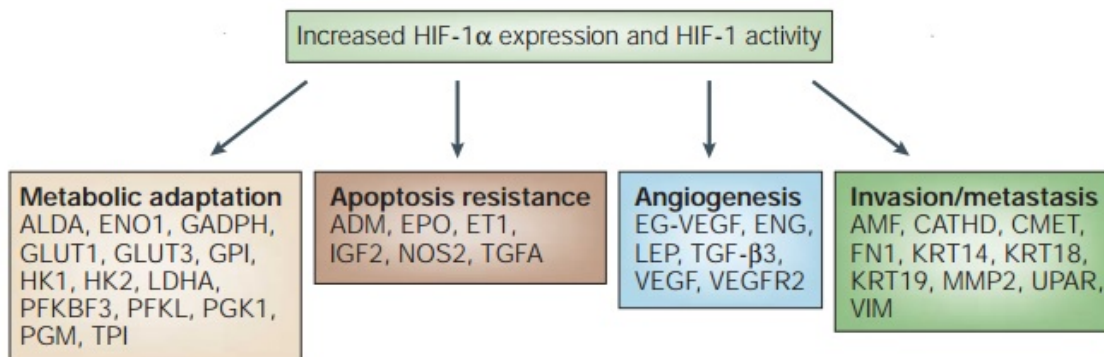


Figura 5: Consequências da atividade do HIF-1 nas células tumorais. A elevada atividade do HIF-1 conduz à expressão de genes que estão envolvidos em muitos aspetos da progressão tumoral, incluindo a adaptação metabólica, a resistência à apoptose, a angiogénese e a metástase (Semenza, 2003).

O HIF-1 foi o primeiro dos HIF a ser bem estudado, sendo encontrado em 13 tipos de cancros humanos, entre os quais o do pulmão, da próstata, do pâncreas, da mama e

cérebro (Maynard e Ohh, 2007) (Nagaraju *et al.*, 2015). Já o HIF-2, que apresenta muitas semelhanças com o HIF-1, quer estruturalmente quer no mecanismo de ação, no entanto, a sua expressão é restrita a um alguns tipos de células, como, por exemplo, células endoteliais, cardiomiócitos e hepatócitos (Maynard e Ohh, 2007) (Wiesener *et al.*, 2003). Por sua vez, o HIF-3 desempenha um papel de regulação, afetando a expressão de genes através da competição com o HIF-1 e o HIF-2 na ligação aos HRE (Yang *et al.*, 2015).

Podemos então concluir que para sobreviver sob condições de hipoxia os tumores tiram partido de uma variedade de sinais promotores de crescimento induzidos pela hipoxia e modificam os eventos sinalizadores de inibição do crescimento. Em qualquer população de células tumorais, diferentes aspetos destas vias são afetados, sobrevivendo e proliferando a subpopulação de células que obtém um perfil ótimo (Harris, 2002).

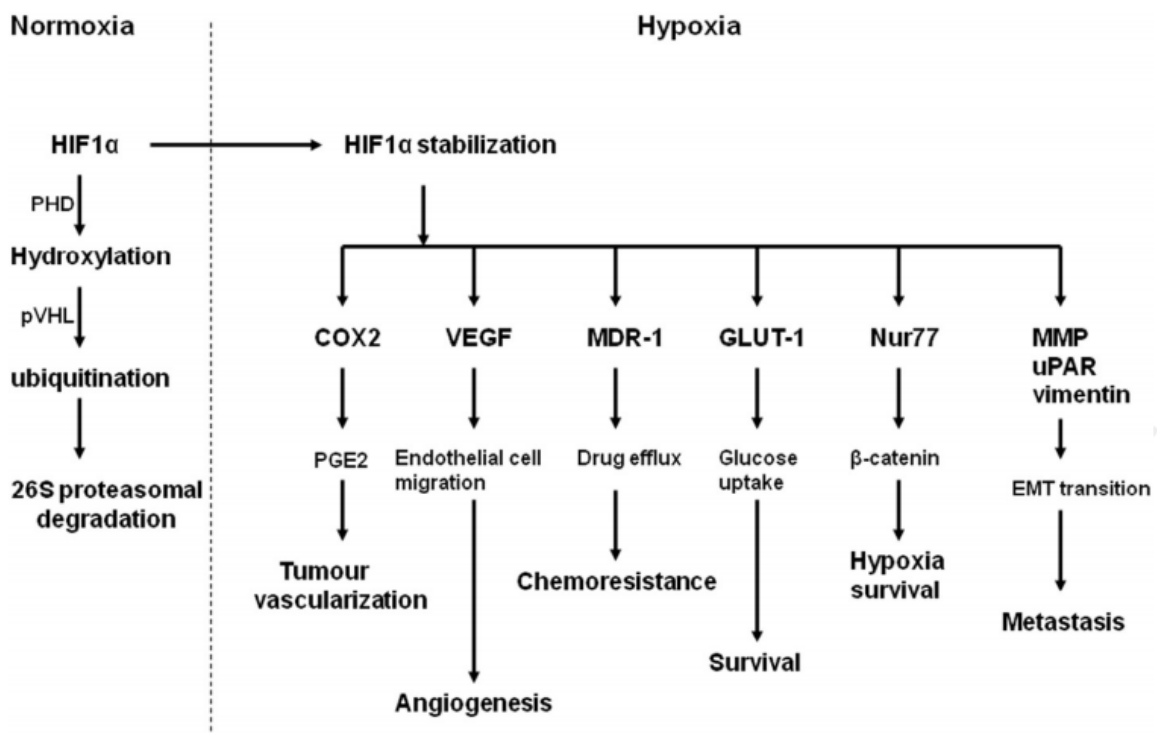


Figura 6: Visão geral da regulação do HIF-1α em condições de hipoxia e normoxia. Em condições de normoxia, o HIF-1α é hidroxilado e degradado. Em condições de hipoxia, o HIF-1α é estabilizado e é o responsável pela expressão de genes que medeiam a progressão tumoral (Nagaraju *et al.*, 2015).

3.2.2 - Factos importantes sobre o papel do HIF-1

Tal como referido anteriormente, o HIF-1 tem um papel importante no desenvolvimento tumoral. Além disso, muitos outros estudos demonstraram a importância da sua regulação, quer nas células tumorais, quer nas células do indivíduo saudável. De seguida, são apresentados alguns resultados provenientes desses estudos:

- O HIF-1 α desempenha um papel importante na expressão de marcadores de células estaminais como o CD44 e o OCT4 (Nagaraju *et al.*, 2015);
- Além da sua ativação sobre condições de hipoxia, o HIF-1 também pode ser ativado em condições normais, como por exemplo, através de vias de sinalização oncogénicas (Cairns *et al.*, 2011) (Li *et al.*, 2015) (Maynard e Ohh, 2007);
- Em alguns estudos, que utilizaram embriões de ratos, o HIF-1 α , ou o seu homólogo HIF-2 α , encontravam-se ausentes, acabando estes por morrer no útero. Ficou assim demonstrado que o HIF tem um papel necessário na embriogénese normal (Harris, 2002);
- O HIF-1 também parece desempenhar um papel na inflamação e na imunidade, uma vez que é necessário para a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo o óxido nítrico e o fator de necrose tumoral- α (Melillo e Semenza, 2006);
- O HIF-1 é regulado negativamente pelo supressor tumoral Von-Hippel Lindau (VHL), sendo que assim a deleção deste ou a indução farmacológica do HIF-1 α foi associado a uma maior produção de fatores de defesa nas células mieloides e a uma maior capacidade bactericida. Estes resultados indicam que estratégias para aumentar a expressão do HIF-1 α podem aumentar a imunidade inata (Melillo e Semenza, 2006).

3.2.3 - Direcionamento da terapia para o HIF-1

A influência do HIF-1 na progressão tumoral levou a que este fosse considerado um alvo preferencial para eventuais terapêuticas oncológicas e, por isso, várias foram as hipóteses estudadas.

Foi descoberto que moléculas pequenas como o ganetespib, vargateg e afatinib, bem como análogos da curcumina afetam a expressão do HIF-1 α ao nível do mRNA e das proteínas. Também a molécula acriflavina foi estudada, pela sua prevenção da dimerização do HIF-1 α (Nagaraju *et al.*, 2015).

A atividade do HIF-1 α pode também ser controlada pela regulação negativa das proteínas induzidas pela sua expressão, como o COX2, o VEGF, entre outros (Nagaraju *et al.*, 2015). Por exemplo, a inibição da COX2 pode ser conseguida através da utilização de AINEs (anti-inflamatórios não esteroides), mais propriamente de inibidores seletivos da COX2, como o Celecoxib. A utilização deste fármaco demonstrou ter efeitos anti-tumorais *in vivo*, através da inibição da COX2 e conseqüente controlo da atividade do HIF-1 α (Nagaraju *et al.*, 2015). No entanto, e apesar da quantidade de estratégias estudadas nenhum

destes inibidores do HIF-1 α foi suficientemente específico ou eficiente para completar os ensaios clínicos (Nagaraju *et al.*, 2015).

Apesar do insucesso, novas estratégias terapêuticas continuaram a ser desenvolvidas, com o objetivo de bloquear o próprio HIF-1 ou as proteínas que interagem com ele (Harris, 2002). As estratégias utilizadas estão relacionadas com:

- Sistemas de ativação de pró-fármacos;
- Terapia génica com o uso de vetores que incorporam genes pró-apoptóticos ou anti-proliferação seletivamente direcionados para células tumorais em condições de hipoxia;
- Utilização de bactérias anaeróbias para entrega dos genes especificamente em células presentes em zonas de hipoxia (Harris, 2002).

Além destas estratégias, sabe-se que os macrófagos são também atraídos para áreas de hipoxia, residindo neles a hipótese de desenvolvimento de mais uma estratégia para direcionar genes terapêuticos para zonas de hipoxia (Harris, 2002) (Labiano, Palazon e Melero, 2015).

3.2.4 - Regulação do HIF-1 através de miRNAs

Além das CSC também o HIF-1 α é regulado através de miRNAs. Neste caso, a hipoxia é responsável por gerar certos miRNAs que modulam a estabilidade e expressão do HIF-1 α . É atualmente conhecido que o miR-424, miR200b e o miR-429 aumentam a estabilidade do HIF-1 α , enquanto o miR-199a e o miR22 diminuem a sua expressão, no entanto, este fenómeno ainda não foi muito explorado pela comunidade científica (Nagaraju *et al.*, 2015) (Yamakuchi *et al.*, 2011).

3.3 - Terapias direcionadas a zonas de hipoxia

3.3.1 - Pró-fármacos ativados por hipoxia

Uma estratégia que permite explorar a hipoxia para fins terapêuticos passa por induzir toxicidade específica das zonas tumorais utilizando pró-fármacos que são apenas ativados em condições de hipoxia (Harris, 2002). Um dos fármacos desenvolvidos neste sentido foi o fármaco VLX600, cuja atividade anti-tumoral está associada com uma redução da respiração mitocondrial, que leva a uma catástrofe bioenergética seguida de morte da célula tumoral. Estas descobertas revelam que as células tumorais em microambientes metabolicamente comprometidos têm uma maior dificuldade em responder a uma diminuição da função mitocondrial (Zhang *et al.*, 2014).

3.4 - Perspetivas futuras

Foram conduzidas análises bioinformáticas detalhadas que demonstraram que mutações relacionadas com o desenvolvimento de cancro afetam dezenas de vias de sinalização essenciais e de processos responsáveis pela tumorigénese. Estas descobertas levantam algumas questões sobre a utilidade do direcionamento da terapêutica para apenas algumas moléculas sinalizadoras individualmente, mostrando que talvez não seja uma estratégia terapêutica prática. No entanto, torna-se claro que muitas destas vias de sinalização atuam de forma a adaptar o metabolismo das células tumorais para apoiar a sua sobrevivência e crescimento (Cairns *et al.*, 2011).

Também o desenvolvimento de pró-fármacos e outros inibidores moleculares não tem conhecido um final feliz. No entanto, muitas outras estratégias começam agora a ser postas em prática, como por exemplo estratégias destinadas a inibir vários pontos do processo de glicólise, que como já vimos é o meio preferencial de obtenção energética das células tumorais, e mesmo que muitas destas estratégias sejam um insucesso, todas elas acrescentarão algo ao conhecimento deste fenómeno, e só assim se poderá elaborar uma terapêutica consistente no futuro (Cairns *et al.*, 2011).

4- Conclusão

O conhecimento do fenómeno tumoral tem sido revolucionado ao longo dos últimos anos. A ciência não para, e não se demorou muito a perceber que o cancro não tinha apenas origem em alterações genéticas, mas também era influenciado pelo microambiente em que se inseria, bem como por todas as moléculas que estavam envolvidas na sua regulação.

Nos diferentes microambientes tumorais são frequentemente gerados fenótipos agressivos que apresentam resistência aos tratamentos convencionais, pondo em causa inúmeras vidas em todo o mundo. Este facto preocupante levou a um estudo mais intensivo para se tentar perceber o porquê destas resistências e como é possível solucioná-las. Apesar disto, este é um fenómeno muito complexo, e para já a solução ainda não foi encontrada.

O avanço recente na biotecnologia molecular permitiu, no entanto, descobrir e caracterizar inúmeras vias de sinalização molecular e também miRNAs, que desempenham um papel importantíssimo na regulação celular. Talvez a chave passe por perceber exatamente o papel de cada um deles, para que com a exata sobreexpressão de uns e deleção de outros se possa eliminar o tumor, sem que para isso se interfira com as células normais do organismo.

Por enquanto, além da exploração das vias de sinalização molecular e dos miRNAs, muitas outras estratégias estão a ser postas em prática, e a cada terapêutica falhada, mais avança o conhecimento desta doença, e este conhecimento não vai parar de crescer, até a doença ser completamente compreendida, porque esta é uma área que vale milhões, não só milhões de dólares investidos na sua investigação e investidos em terapêutica, mas também milhões de vidas, as dos que lutam todos os dias contra esta doença e as dos que procuram todos os dias compreendê-la.

5- Bibliografia

AMERICAN CANCER SOCIETY - Cancer Facts & Figures 2015. 2015).

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. - Regulation of cancer cell metabolism. **Nature reviews. Cancer.** 11:2 (2011) 85–95.

CHHABRA, R.; SAINI, N. - microRNAs in cancer stem cells: current status and future directions. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.** 2014) 8395–8405.

COLEMAN, N. - MO-FG-BRB-03: Addressing the Cancer Challenge: International Cancer Experts Corps. **Medical physics.** 42:6 (2015) 3564.

DANQUAH, M. K.; ZHANG, X. A.; MAHATO, R. I. - Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 63:8 (2011) 623–639.

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. - Tumour stem cells and drug resistance. **Nature reviews. Cancer.** 5:4 (2005) 275–84.

DONNENBERG, V. S.; DONNENBERG, A. D. - Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. **Journal of clinical pharmacology.** 45:8 (2005) 872–877.

HAGIWARA, K. *et al.* - Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. **Scientific Reports.** 2:2012) 1–9.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. - The Hallmarks of Cancer. **Cell.** 100:1 (2000) 57–70.

HARRIS, A. L. - Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nature reviews. Cancer.** 2:1 (2002) 38–47.

KIM, J. J.; TANNOCK, I. F. - Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. **Nature reviews. Cancer.** 5:7 (2005) 516–25.

KURTOVA, A. - Resistance through repopulation. 2014) 1–2.

LABIANO, S.; PALAZON, A.; MELERO, I. - Immune Response Regulation in the Tumor Microenvironment by Hypoxia. **Seminars in Oncology.** 42:3 (2015) 378–386.

LI, S. *et al.* - Down-regulating HIF-1 α by lentivirus-mediated shRNA for therapy of triple negative breast cancer. **Cancer Biology & Therapy.** 16:6 (2015) 866–875.

LINDSAY, J. G. - **Color atlas of biochemistry.** ISBN 1588902471.

LIU, C.; TANG, D. G. - NIH Public Access. **Changes.** 29:6 (2012) 997–1003.

MAYNARD, M. A.; OHH, M. - The role of hypoxia-inducible factors in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 64:16 (2007) 2170–2180.

MELILLO, G.; SEMENZA, G. L. - Meeting report: Exploiting the tumor microenvironment for therapeutics. **Cancer Research**. 66:9 (2006) 4558–4560.

Mirna Therapeutics - [Em linha] [Consult. 26 jul. 2015]. Disponível em WWW:URL:<http://mirnatherapeutics.com/>.

NAGARAJU, G. P. *et al.* - Hypoxia inducible factor-1 α : Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis. **Cancer Letters**. 2015) 1–8.

SEMENZA, G. L. - Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**. 3:10 (2003) 721–732.

TAKAHASHI, R.-U.; MIYAZAKI, H.; OCHIYA, T. - The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. **Frontiers in genetics**. 4:January (2014) 295.

VAITHEESVARAN, B. *et al.* - The Warburg effect: a balance of flux analysis. **Metabolomics**. 11:4 (2015) 787–796.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. - Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews. Cancer**. 8:10 (2008) 755–68.

WEINBERG, R. - Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **CA - A Cancer Journal for Clinicians**. 1994).

WIESENER, M. S. *et al.* - Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 17:2 (2003) 271–3.

YAMAKUCHI, M. *et al.* - MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. **PLoS ONE**. 6:5 (2011) 2–9.

YANG, S.-L. *et al.* - Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). **Molecular medicine reports**. 12:2 (2015) 2411–6.

YU, F. *et al.* - let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. **Cell**. 131:6 (2007) 1109–1123.

YU, Z. *et al.* - NIH Public Access. 44:12 (2013) 2144–2151.

ZHANG, X. *et al.* - Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. **Nature communications**. 5:2014) 3295.