

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Instituto de Anatomia Patológica

miRNAs – Conhecimento Actual Aplicado à Medicina

Paulo Roberto Cardoso Ferreira

Endereço: Paulo Ferreira

R. Justiniano F. A. Costa, 227. 5140-079, Carrazeda de Ansiães

e-mail: pauloroberto.xpta@gmail.com

telemóvel: 919182866

2009

Título: miRNAs – Conhecimento Actual Aplicado à Medicina

Resumo: microRNAs são sequências não codificantes de RNA de 17 a 24 nucleótidos. Quando libertado no citoplasma regula negativamente a expressão de RNA mensageiro que tenha sequências parcial ou completamente complementares. Ao alterar a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais, os microRNAs interferem no ciclo celular e estão envolvidos na fisiopatologia de várias doenças. A oncologia é actualmente a área de mais intensa investigação com inúmeros trabalhos que provam a associação dos miRNAs com o desenvolvimento tumoral, expressão clínica e sensibilidade ao tratamento.

O perfil de expressão de microRNAs é determinado de uma forma estandardizada utilizando duas técnicas de análise: microarray e citometria de fluxo “bead based”; fornecendo informações adicionais sobre o tipo histológico e o comportamento celular, o que aumenta a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, ajuda a estabelecer o prognóstico e permite uma melhor decisão terapêutica. Interferir na expressão de microRNAs mostrou-se eficaz no tratamento de neoplasias, porém ainda não existem métodos ou fármacos que possam ser utilizados na prática clínica.

Fez-se um estudo de revisão abrangente sobre os microRNAs e a sua aplicação prática na medicina.

Palavras-chave

MicroRNA, Oncogene, Supressor tumoral, Neoplasia, Diagnóstico, Tratamento, Prognóstico.

Title: miRNAs – Actual knowledge Applied to medicine

Summary: microRNAs are non-coding RNA molecules of 17-24 nucleotides in length. When released in the cytoplasm they downregulate the expression of messenger-RNAs which are fully or partially complementary. By altering the expression of oncogenes or tumor suppressor genes, microRNAs interfere with the cellular cycle and are involved in the physiopathology of several diseases. Nowadays oncology is the main source of interest with innumerous published articles that prove the association between miRNA and tumor development, clinical behavior and chemotherapy sensibility.

Profiling microRNA expression is made using “bead-based” flow cytometry or microarray analysis, the information obtained helps defining the histological type and proliferation pattern, which increases the sensibility and specificity of the diagnosis, more precisely delineates the prognostic and allows better therapeutic decision. Managing the expression of different microRNAs has shown to be efficient treating neoplasms, although there isn't yet any molecule or technique available for treatment purposes in the daily clinical practice.

The objective of this article was to make the review about microRNAs and its actual practical appliance on medicine.

Key-words:

microRNA, Oncogene, Tumor supressor gene, Neoplasm, Diagnosis, Treatment, Prognostic.

INTRODUÇÃO

MicroRNAs (miRNA/miR) são sequências de 17-24 nucleótidos de RNA não codificante que interferem na expressão genica, são transcritos no núcleo pela RNA-Polimerase II formando-se pri-miRNAs (primitivos), depois processados pelas enzimas “Drosha” e “Pasha” (RNase III) em pré-miRNAs e exportados para o citoplasma pela Exportina-5 onde são finalmente processados pela “Dicer” (RNase III) e incorporados ao complexo RISC (RNA Induced-Silencing Complex) que irá inibir a tradução de mRNAs complementares (parcialmente) aos miRNAs envolvidos.

Os miRNAs interferem no ciclo celular funcionando como supressores tumorais e/ou oncogenes [1], correspondem a 1-4% dos genes humanos e regulam, cada um, vários mRNAs e simultaneamente, vários miRNAs regulam o mesmo mRNA, devido ao seu mecanismo de inibição por complementaridade imperfeita, o que faz deles o maior grupo regulador génico conhecido.

A maior parte dos estudos foram feitos em animais, modelos xenograft e linhas celulares padronizadas, porém recentemente a aplicação na clínica destes conhecimentos tem aberto caminho para a utilização desta tecnologia com benefício para os doentes, particularmente oncológicos.

A expressão dos miRNAs está fortemente associada à tumorigénese: sabe-se que a diminuição da expressão de miR-15a e miR-16-1 está envolvida na Leucemia Linfocítica Crónica e relacionada com mau prognóstico no Carcinoma Colo-Rectal e Carcinoma da Mama; a família de miRNAs let-7 sub-expressa em carcinomas do pulmão, induz diminuição da sobrevida pós-cirurgia e aumento da metastização. A supra-regulação de alguns miRNA tem efeitos negativos no prognóstico: o miR-155 no linfoma B de grandes células, traduz fenótipo

agressivo ou, metastização linfática de tumores sólidos, facilitada pelo aumento de miR-10b, miR-373 e miR-520c.

Como alvos terapêuticos, a reposição de miR-148a, miR-34b/c e miR-9, subexpressos nos tumores transfectados, inibiram o crescimento tumoral, formação de metástases e sua mobilidade; a desmetilação de DNA, cuja hipermetilação regulava negativamente a expressão de alguns miRNA, pode reduzir a metastização. Por outro lado, a inibição de alguns miRNAs oncogénicos como miR-155 com RNA antisense, foi eficaz no aumento de diferenciação celular do tumor, diminuindo a agressividade.

O perfil de miRNA é diferente entre tecidos distintos e entre tecidos normais e neoplásicos e será importante para o diagnóstico de neoplasias metastizadas sem tumor primário conhecido, melhor caracterização e prognóstico em neoplasias, tanto na agressividade da metastização como na sensibilidade à quimioterapia dentro do mesmo tipo histológico.

Pretendemos efectuar um estudo de revisão abrangente aos conhecimentos actuais e aplicação prática em Medicina, onde os miRNAs estão claramente entendidos.

DESENVOLVIMENTO TUMORAL e microRNAs

Metodologias de Estudo

O comportamento anormal demonstrado pelas células cancerígenas é o resultado de várias mutações em genes essenciais na regulação do ciclo celular.

A maioria dos tumores tem origem numa única célula precursora, que através de evolução progressiva, se transforma numa célula cancerígena. Assim, é necessário que ocorram inicialmente alterações a nível dos oncogenes e dos genes supressores tumorais com

desregulação do crescimento celular. Todos os tumores têm de alcançar o mesmo nível de desregulação de funções de crescimento, mas os genes envolvidos em cada cascata genica podem ser distintos, e como tal essa heterogeneidade complica o diagnóstico e tratamento. [2]

Assim as alterações génicas podem afectar apenas alguns nucleótidos (mutações pontuais), ou então, toda a estrutura de um cromossoma (translocações, inversões, deleções, duplicações ou aneuploidias) [23] e a detecção de uma neoplasia em estágio precoce versus avançado, determina claramente a terapêutica e prognóstico do doente porque em estágio tardio pode já comprometer funções ou órgãos vitais, tanto por invasão local como por disseminação, que impeçam a aplicação de métodos terapêuticos eficazes e não somente paliativos.

A avaliação citogenética detecta aneuploidias e grandes alterações estruturais cromossómicas, utilizando a FISH ou PCR para sequências conhecidas como relacionadas com a tumorigénese podendo aprofundar a informação sobre o tumor ou diagnosticar um tecido suspeito. Como conhecer os genes que estão mais frequentemente alterados é fulcral para conseguir identificá-los na amostra, através de técnicas de identificação genética.

A Metodologia Aplicada ao tecido para estudo genético é feita de forma rigorosa e standardizada com digestão enzimática dos ácidos nucleicos, seguida de extracção com fenol-clorofórmio e precipitação em etanol. [4] Existem dois métodos de identificação: “microarray” e citometria de fluxo “bead based”, esquematizados na Figura 1. Em qualquer dos casos existem passos que são comuns, 1) marcação do RNA, 2) hibridização DNA-DNA, 3) coloração e 4) leitura dos resultados. Utilizando o “microarray”, 1) o RNA obtido é sujeito à acção de uma transcriptase reversa, guiada por um primer, que produz DNA complementar e amplifica-o, 2) é colocado em contacto com o microarray, o que permite a hibridização destes fragmentos com as sequências colocadas à superfície de vidro do microarray; 3) é lavado o excesso e marcado com um fluorocromo e 4) digitalizada a informação com um

laser. Como a cada “compartimento” do microarray corresponde um determinado oligonuclotídeo, a presença de sinal identifica o DNA em questão, e por complementariedade, o miRNA em estudo. A vantagem desta técnica está em avaliar com facilidade grande número de miRNAs e em paralelo colocar várias amostras em comparação. [5]

A citometria de fluxo “bead-based” descrita por Lu J. et al. [5] principia pela ligação ao miRNA de um adaptador (bead), 1) é então adicionada à solução uma transcriptase reversa e um primer complementar ao “bead”, transcrevendo o DNA complementar ao miRNA; este DNA pode também ser amplificado posteriormente por PCR; 2) hibridização com sondas antisense de oligonucleótidos marcadas com fluorocromos de diferentes cores; 3) a marcação é feita então com streptavidin-phycoerythrin e 4) processada por citometria de fluxo em que

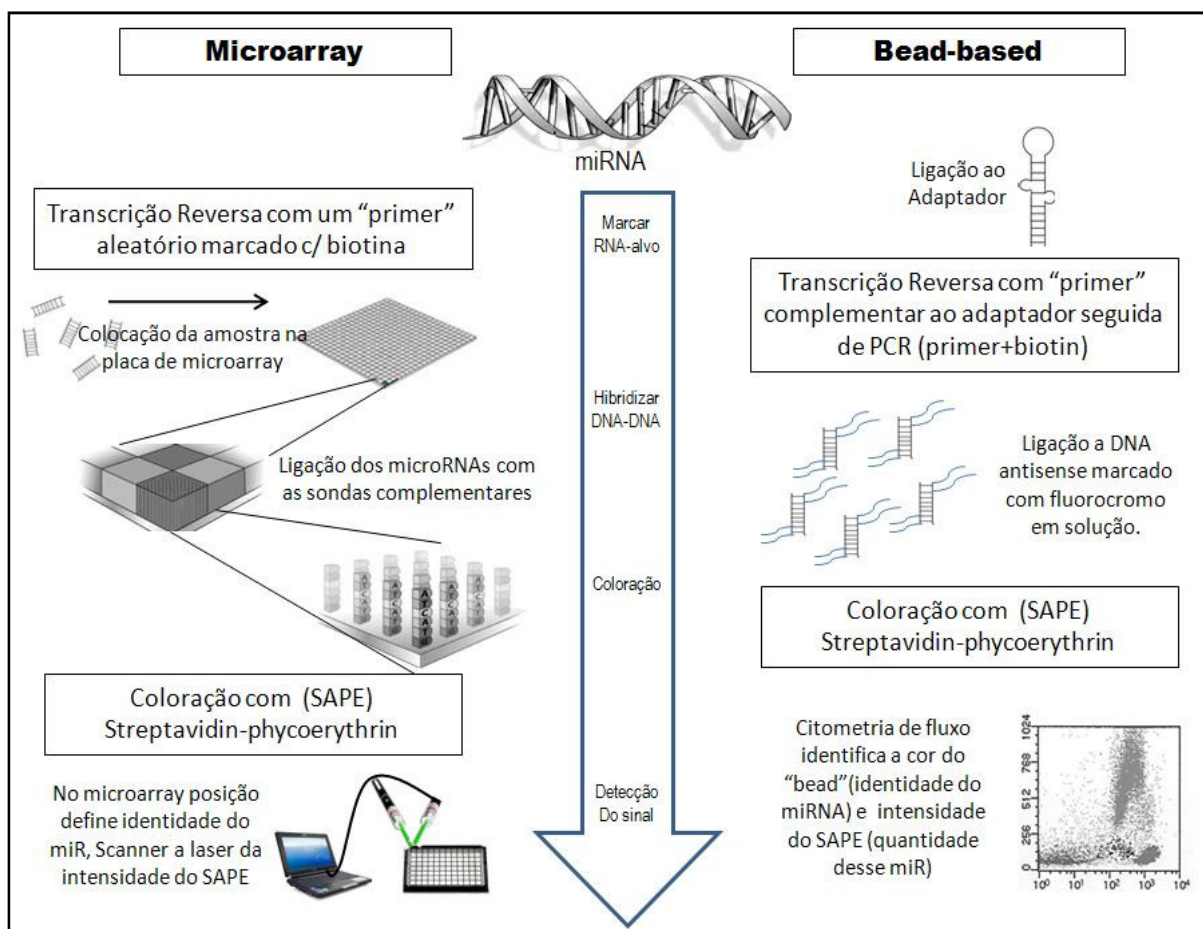


Figura 1 - Os dois métodos de análise mais utilizados na análise de microRNA. A principal vantagem da citometria bead-based é a sua maior especificidade, enquanto que a tecnologia de microarray é mais fácil de executar e permite comparar em paralelo várias amostras. Os dados são obtidos e imediatamente processados informaticamente.

as diferentes intensidades serão medidas pelo computador e sabendo os oligonucleótidos que cada sonda diferente corresponde, obtém-se a informação. A maior vantagem desta técnica reside na sua aplicação em solução e não sobre uma placa de vidro, o que aumenta a sua especificidade. [6]

Evidência Científica

A patogenia do cancro pode ser esclarecida pela pesquisa de genes codificadores de proteínas, já que várias proteínas são conhecidas como factores que determinam a génese tumoral. A identificação recente de milhares de RNAs não codificantes abriu as portas à investigação do seu papel no cancro e mostrou que a sua actuação poderia ser muito mais complexa. Os primeiros miRNAs a serem descobertos foram os genes lin-4 e let-7 de *C. elegans*, importantes na expressão de mRNAs. Na Figura 2 exemplifica-se a sua forma de acção. Quando estes genes são silenciados em determinadas linhas celulares epiteliais, há maior índice mitótico em vez de diferenciação celular. [9] [8] Segundo Bartel et al, os miRNAs regulam a expressão proteica por inibição da tradução ou por degradação do mRNA alvo. A inibição da tradução parece ser um mecanismo muito mais importante em plantas, e apesar de ainda não completamente compreendido, parece envolver a ligação de um miRNA a uma região complementar (ou apenas parcialmente complementar) do mRNA alvo, de modo a bloquear a tradução deste pelo ribossoma, não permitindo a síntese da proteína. Nos animais, o mecanismo mais importante consiste na formação do mi-RISC (sigla em inglês para Complexo Silenciador Induzido por mi-RNA), em que o miRNA é associado a ribonucleases da família argonauta, e identifica mRNAs alvo que são então clivados entre as posições 10 e 12 da sequência do miRNA; esta clivagem faz com que a mensagem se perca mesmo antes de

poder ser incorporada num ribossoma e assim impede a génese da proteína normalmente traduzida por aquele RNA mensageiro.

A Figura 2 ilustra também alguns mecanismos promotores de neoplasia: um aumento na expressão de oncogenes predispõe as células para a proliferação e transformação maligna, enquanto que a expressão de genes supressores tumorais regula o crescimento e induz apoptose. O aumento e diminuição da expressão de oncogenes e genes supressores tumorais pode resultar de rearranjos, duplicações, amplificações genéticas de etiologia conhecida; as

mesmas perturbações alteram a expressão de miRNAs. Devido à acção repressora da expressão dos seus RNAm-alvo, há uma relação de proporcionalidade inversa entre aquela e a expressão do

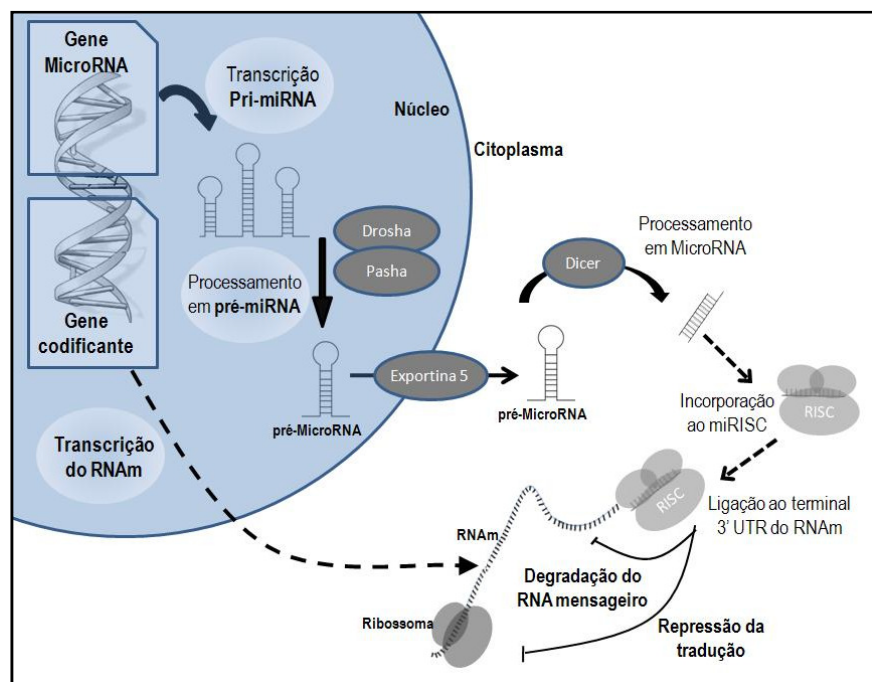


Figura 2 – Transcrição, processamento e mecanismo de acção dos miRNAs

microRNA complementar. São designados miRNAs oncogénicos aqueles que pela sua amplificação reduzem a expressão de genes supressores tumorais. MicroRNAs supressores tumorais são aqueles que quando deletados ou subexpressos permitem o aumento da expressão de oncogenes, e a sua reposição regula o crescimento e/ou induz apoptose em células com índices mitóticos elevados, como demonstrou Lowery et al [9]. Na Figura 3 estão representadas algumas das interferências que podem levar ao desenvolvimento de neoplasias

Os oncogenes ao serem traduzidos promovem a proliferação celular, podem fazê-lo por diversos mecanismos como a síntese de factores de crescimento ou dos seus receptores mediada pelo gene PDGF ou o erb-B, alteração na transdução do sinal como o K-ras e o N-ras, factores que activam outros genes promotores da proliferação celular: c-myc, n-myc e l-myc, ou que alteram outros mecanismos de regulação celular como o BCL-2. [16] Por outro lado genes como o APC, p53, RB, WT1 ou BRCA1 promovem a apoptose sendo considerados supressores tumorais, através da síntese de proteínas nucleares ou citoplasmáticas reguladoras. O papel destes genes está amplamente estudado no âmbito da carcinogénese, e a identificação de mecanismos de controlo da expressão de cada um destes genes indica que aqueles estão também directamente envolvidos na patogenia do cancro.

Volinia et al [1] descreveram um grupo de miRNAs alterados comum a pelo menos três tipos diferentes de tumores; no topo da lista surge o miR-21 que se apresenta supra-regulado nos carcinomas da mama, cólon, pulmão, pâncreas, próstata e estômago, acompanhado de perto pelos miR-17-5p e miR-191 que estão alterados naqueles tumores. Este estudo foi desenhado comparando amostras de tumores com tecidos normais, e estabelece também uma relação forte entre a proliferação neoplásica destes seis tipos tumorais e vários outros mi-RNAs nos quais um padrão de supra-regulação aparecia na análise em diferentes combinações. Chan et al [11] demonstraram também uma relação do miR-21 com o glioblastoma e demonstraram o seu papel como oncogene. Estas evidências experimentais, à luz dos mecanismos conhecidos de funcionamento dos miRNAs, diminuindo a expressão genética, sugere que diminuem a expressão de genes supressores tumorais, que isoladamente ou em cooperação com outras alterações promovem o desenvolvimento tumoral. Foi num outro estudo reconhecida a cooperação do cluster que inclui o miR-17, miR-20 e miR-92 com o c-myc no desenvolvimento e aceleração da disseminação linfática do cancro do pulmão [12]. Existem

também evidências de supra-regulação dos miR-210, miR-213 em associação com o miR-155 no linfoma de grandes células [13], linfoma de Burkitt [14] e vários outros linfomas B [15].

A infra-regulação de mi-RNAs foi também estudada, assumindo que o mecanismo seria a ausência ou diminuição do controle da expressão de oncogenes e Lu et al [5] concluíram que 129 dos 131 miR estudados estavam infra-regulados em mais de dez tumores diferentes biopsados, em comparação com tecidos normais.

Para além da contribuição comprovada na proliferação celular e gênese tumoral, Lujambio et al [16] estudaram a interferência na metastização. Há diversos miRNAs promotores de metástases: miR-10b promove a migração celular e invasão através da inibição da homeobox D10 e portanto alterando a “identidade” do tecido e permitindo o seu desenvolvimento num local diferente do tecido de origem. [17] O miR-373 e miR-520c cooperam na metastização

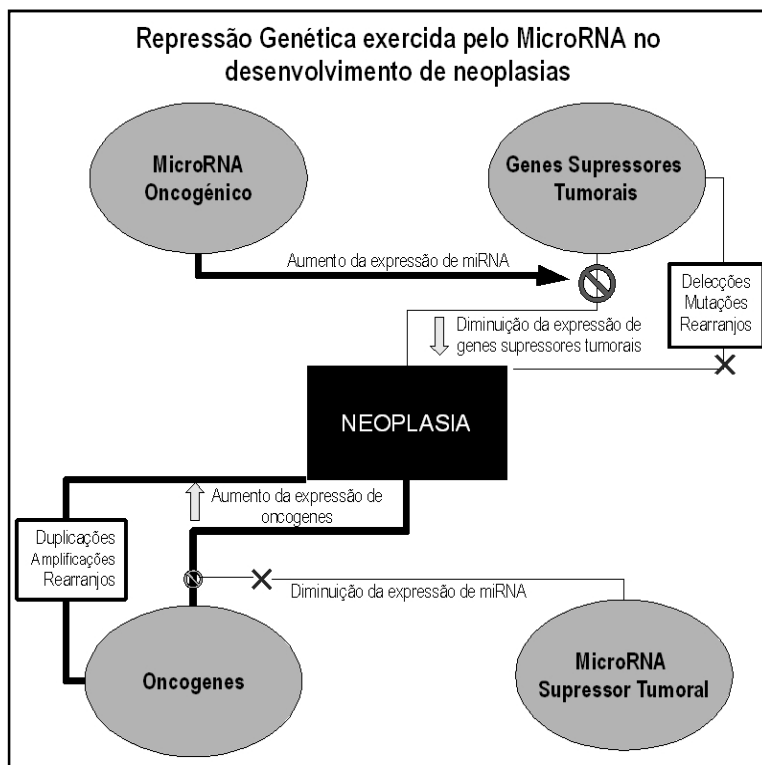


Figura 3 – Os microRNAs reprimem a expressão de RNAm parcialmente complementar, se um miR está subexpresso os genes que regula ficarão hiperexpressos, assim como o oposto é verdade.

regulando negativamente o CD44 [18]. Em oposição, foi demonstrado que determinados microRNAs têm um papel como supressores da metastização, como o miR-126 e o miR-335 que têm como alvo respectivamente os oncogenes SOX4 e Tenascina C [19]. Outras relações já estabelecidas entre miRNAs e genes codificantes já identificados como envolvidos

na tumorigênese incluem os pares miR-let7:Ras oncogene, cluster miR-15a-miR-16-1:BCL-2,

miR-17-92:E2F1 ou o miR-127:BCL6. [1] Estes miRNAs encontram-se hiper-expressos ou hipo-expressos nos cancros de forma inversamente proporcional ao oncogene ou supressor tumoral que regulam negativamente.

Recentemente Gallardo et al [12] publicaram as suas conclusões sobre a família miR-34 (a, b e c) e a sua relação com as neoplasias pulmonares, demonstrando que este microRNA se encontra no caminho da expressão do gene p53, supressor tumoral, que está alterada em praticamente 50% dos tumores conhecidos. Quando o miR-34 tem a sua expressão diminuída há também diminuição da expressão da proteína p53 e as células proliferam e dividem-se descontroladamente, no oposto quando há um aumento do mir-34 as células sofrem apoptose ou comportam-se como senescentes e não se dividem. Quando se repôs o miR-34a em células com knockout deste, a proliferação cessa e as células sofrem apoptose, sugerindo que quando for possível fazer chegar este gene às células neoplásicas in vivo poder-se-ia controlar a evolução do tumor, mas deixa também claro que a mesma terapêutica em células normais causaria apoptose e logo seria prejudicial para o organismo, senão mesmo fatal.

Problemas Experimentais

Grande parte dos estudos divulgados baseiam-se na utilização da informação estudada acerca das funções de proteínas e genes assim como da previsão de genes que putativamente terão a expressão afectada por uma sequência específica de miRNA, mas que ainda não foram estudados ou não foram comprovados in vivo. Actualmente existem diversas bases de dados de micro-RNAs assim como de mRNAs e da relação entre estes assim como da relação da sua expressão com as proteínas transcritas. Há a considerar em primeiro lugar que estas bases de dados são incompletas e baseadas nos dados disponíveis até à data, havendo extensas regiões do genoma cuja função é desconhecida. É necessário salientar, e como referido por Volinia

[1] que alguns miRNA reconhecidos em alguns estudos como oncogênicos, estavam infrarregulados no estudo de Lu et al onde a sub-expressão de miRNAs mostrou ser o principal mecanismo envolvido, o que coloca a questão de como os estudos são desenhados e como são obtidos os resultados. Para responder é necessário compreender que os dados são analisados informaticamente devido, por um lado à complexidade e ao número de sequências de bases possíveis e os seus correspondentes mRNAs alvo, e por outro lado a variação que existe na expressão dos microRNAs entre tecidos normais de diferentes órgãos. Depois de identificadas as sequências de bases e a intensidade do sinal de cada sequência e, assim, a quantidade presente na amostra, são agrupados através de um programa desenhado para o efeito como o GENEPIX PRO, que lê os resultados do micro-array e calcula não apenas todos os miRNAs passíveis de serem formados a partir de uma sequência de bases muito mais longa que o miRNA final, assim como considera a elevada preservação ao longo do tempo dos miRNAs, atribuindo maior probabilidade a determinadas sequências. É necessário nesse cálculo, assumir também que pequenas variações de bases não alteram os alvos de cada microRNA [9], principalmente em mamíferos em que aparentemente pequenas sequências no início 3'UTR conservadas ao longo da evolução tanto nos miRNAs como nos mRNAs que lhes são complementares são suficientes para essa acção de regulação ocorrer. Desta forma pequenas diferenças no método utilizado, como por exemplo calcular “todos” os tecidos normais versus “todos” os tumores trazem resultados diferentes da análise de tumor versus o respectivo tecido originário normal. Há também a considerar que muitos dos cálculos que aumentam ou diminuem a probabilidade de uma determinada sequência ser relevante no estudo, baseiam-se na previsão de genes putativamente alvo, a partir de bases de dados que mais uma vez pela sua extensão, complexidade e terem sido obtidas indutivamente a partir de resultados experimentais, incluem um grau de incerteza e não permitem um cálculo exacto e livre de interferências.

Há uma outra questão de relevo quando se fala em investigação genética: o custo. A análise de miRNA é feita com recurso a máquinas e consumíveis que são extremamente dispendiosos, e que por esse motivo não estão amplamente disponíveis o que limita a experiência científica. A criação de métodos mais económicos e standardizados de análise e o aumento do financiamento externo à investigação seriam enormes passos na investigação destas moléculas ao estender a cada vez mais centros de diagnóstico e tratamento neoplásico e conseqüentemente aumentar o número de amostras analisadas e resultados para comparar, dando credibilidade e apoio às conclusões.

miRNAs e DIAGNÓSTICO

A neoplasia metastática de tumor primário desconhecido é um dos 10 mais frequentes diagnósticos em todo o mundo e constitui 3-5% de todas as neoplasias humanas. [1] [20] O estudo de Lu et al [5] demonstrou que na análise do perfil de microRNA de vários tumores pouco diferenciados e não diagnosticados histologicamente era mais eficiente do que a análise do perfil de mRNA, o que apresenta a vantagem de se poder fazer um diagnóstico mais preciso analisando algumas centenas de miRNAs do que as dezenas de milhar utilizadas no perfil de mRNA. Os perfis de miRNAs variam coerentemente com a diferenciação celular do tumor, essencialmente havendo uma redução da expressão destes à medida que a linha celular se torna mais indiferenciada [21], ou seja, há uma diminuição do controlo da expressão génica ou uma falha nos mecanismos regulatórios que são fortemente guiados pela expressão de miRNAs, permitindo a sobre-expressão preferencial de oncogenes. A detecção no sangue periférico do perfil de miRNA, que é bastante estável não se degradando rapidamente e existindo em concentração suficiente para analisar mesmo sem recurso a PCR, aumenta o potencial de utilização clínica, não apenas pela sua alta especificidade como pelo facto de ser um procedimento muito menos invasivo do que a actual biópsia do tecido tumoral [22].

Além dos tumores sólidos sem localização primária identificada, tem sido extensivamente estudado o papel dos miRNAs nas leucemias, especialmente na Leucemia Linfóide Crônica. [1][23] Pela sua elevada frequência na população, é a leucemia mais comum no Ocidente, tendo um comportamento indolente que pode evoluir para tipos agressivos de linfoma ou leucemia com prognóstico relativamente benigno desde que tratada precocemente, sem evidentes factores de mau prognóstico, nomeadamente sobreexpressão da proteína ZAP70 e ausência de mutações na região variável do gene de cadeia pesada da imunoglobulina (IgVh). Para caracterizar prognóstico foi utilizado um perfil de 13 miRNAs que se mostrou capaz de distinguir os casos, onde infra-regulação do miR-16-1 e do miR-15a se relacionou com bom prognóstico, miRNAs que se encontram em 13q14.3 e que se apresentam como uma deleção já previamente relacionada com o prognóstico. Por outro lado, a infra-regulação do miR-29 está relacionada com mau prognóstico e parece corresponder a sobreexpressão do oncogene TCL1 comprovado como alvo daquele microRNA [24]. Desta forma compreende-se que o estudo dos microRNAs apresenta dois perfis distintos, com bom prognóstico e baixa expressão de miR-15a e miR-16-1 versus o mau prognóstico relacionado com a diminuição do miR-29. Esta distinção no diagnóstico da agressividade da LLC permite instituir um tratamento mais adequado e atempado quando a amostra é sujeita à análise do perfil de miRNA, resultando em vantagem tanto para o doente como para o serviço de saúde.

Há também evidências da relação entre a diferenciação celular do carcinoma hepatocelular e a expressão dos miR-92, miR-20 e miR-18, todos sub-expressos à medida que a diferenciação celular se perde, o que permite através de uma biópsia hepática definir a evolução do tumor e programar a melhor abordagem terapêutica [25][26]. O estudo de perfis de mRNA pode também fornecer importantes informações sobre o estado de desenvolvimento de tumores gástricos ou do cancro da mama, estudados por Takamizawa [27] e Iorio respectivamente

[28]. A Tabela I resume alguns dos estudos acerca da relação entre neoplasias e o envolvimento dos miRNAs na sua fisiopatologia.

A abordagem dos tecidos suspeitos através da análise do perfil de miRNAs pode fornecer importantes informações sobre a origem do tecido tumoral ou auxiliar na definição do tipo celular e grau de diferenciação de um tecido, além de fornecer um método de diagnóstico novo e com potencialidades de diferenciar características que os métodos actuais de diagnóstico não conseguem. A principal questão a resolver é o facto de ainda haver pouca informação disponível e a experiência da sua utilização na clínica ser ainda muito limitada.

PROGNÓSTICO e microRNAs

O cancro é a segunda maior causa de morte no mundo, depois das doenças cardiovasculares, e a OMS prevê que em 2010 será a principal causa devido ao aumento do número de casos. Este panorama faz com que seja necessário diagnosticar precocemente. Visto que vários genes estão estudados como intervenientes na tumorigénese, desregulando o ciclo celular, seja agindo como oncogenes ou como supressores tumorais, e conhecendo a sua sequência de bases, é possível prever que microRNAs estão envolvidos na regulação da sua expressão. Basta para isso computar as hipóteses de complementaridade necessárias para que a clivagem dos RNAm ou a activação do complexo RISC para a degradação dessa mensagem aconteçam.

Apesar da grande diversidade existente de tumores e a sua evolução distinta mesmo dentro do mesmo tipo, é reconhecido que a identificação precoce permite uma abordagem mais eficaz e um tratamento mais efectivo, porém devido à agressividade do tratamento, seja pela intervenção cirúrgica de excisão de massas ou mesmo órgãos ou pela utilização de radio e quimioterapia com efeitos colaterais altamente nefastos, exige uma adaptação do tratamento de modo a manter a relação custo/benefício dentro de limites aceitáveis. Esta relação é principalmente estabelecida pela identificação do prognóstico do tumor em estudo e para

Tipo Tumoral	miRNA	Tipo	Gene envolvido	Descrição	Ref.
Leucemia Linfóide Crônica	miR-15-a miR-16-1	Supressor Tumoral	BCL-2	Subexpresso ou deleção do miRNA Reposição exógena induz apoptose em células de leucemia.	[1]
	miR155	OncomiR	AGTR1	Sobreexpresso na LLC, Linfoma de Burkitt infantil, Linfoma B difuso de grandes células. Indicador de mau prognóstico em neoplasias do pulmão e Linfoma Hodgkin.	[23]
Neoplasias da Mama	miR-21	OncomiR	PTEN, BCL-2, PDCD4	Sobreexpresso nas células neoplásicas. Perfil agressivo do tumor na presença de grandes concentrações. Também envolvido em neoplasias da próstata, cólon e glioblastoma.	[9] [11]
Glioblastoma Primário				Knockout do miR-21 induz apoptose em células de glioblastoma.	
Carcinoma da Tiróide	miR-221, miR-222,	OncomiR	c-KIT	Aumento da expressão no carcinoma papilar da tireoide, proporcional à agressividade do tumor Sobreexpresso na leucemia mielóide aguda.	[13]
	miR-146	OncomiR	CXCR4, NF- -kappaB	Sobreexpresso na neoplasia da mama com alta taxa de metastização. Aumentado na artrite reumatóide, relacionado com o TNF-alfa	
Carcinoma Hepatocelular	miR-92, miR-20, miR-18	OncomiR	PTCH1, c-myc	Diferenciação celular inversamente proporcional à expressão destes miRNAs. Envolvidos no meduloblastoma infantil.	[25]
Neoplasias do Pulmão	let-7	Supressor Tumoral	RAS	Subexpressão relacionado com mau prognóstico e baixa sobrevivência pós operatória.	[29] [12]
	mir-17, miR-20, miR-92	OncomiR	c-myc E2F1	Hiperexpressão promove a metastização e piora o prognóstico	
	miR-34	Supressor Tumoral	p53	Alterado em praticamente 50% das neoplasias. Subexpressão deste miR diminui p53 o que promove a proliferação e divisão celular.	
Neoplasias do Estômago	miR-421	OncomiR	CBX7, RBMXL1	Aumentado no adenocarcinoma do estômago, mais sensível que o doseamento de CEA, <i>knockout</i> promove apoptose das células tumorais.	[30]
Neoplasias do Cólon	miR-143, miR-145	Supressor Tumoral	MAPK7, IRS-1	Hipoexpresso em células de carcinoma colo-rectal, reposição do miR-145 bloqueia a proliferação celular.	[5]
Carcinomas Endócrinos do Pâncreas	miR-375	OncomiR	Sem dados	Promove proliferação de células alfa e beta pancreáticas. Knockout do gene em ratos provoca hiperglicemia associada a diabetes.	[5]

Tabela I – Relação entre alguns microRNAs, os genes que regulam e em que patologias estão envolvidos. Oncomir: MicroRNA oncogénico, cuja sobre expressão causa regulação negativa dos seus alvos, que incluem genes supressores tumorais. miRNA supressor tumoral é aquele que quando está subexpresso ou eliminado permite o crescimento, proliferação e transformação malignas das células. Knockout: deleção ou inativação do gene em laboratório.

informar o doente, por questões éticas e deontológicas. Por outro lado é conhecido que os tumores não têm igual resposta à terapêutica, sendo resistentes ou sensíveis a determinado fármaco utilizado em quimioterapia apesar de histologicamente serem semelhantes, o que sugere que há alterações bioquímicas e genéticas que permitiriam uma escolha mais criteriosa dos fármacos de modo a maximizar a sua eficácia.

Os microRNAs parecem ter um papel determinante no prognóstico neoplásico e a análise desse perfil permite definir o grau de diferenciação do tumor, como no hepatocarcinoma [25] ou na Leucemia Linfóide Crónica [1][21], ou cancro da mama [28]. Johnson et al [29] estudaram a relação entre a diminuição da expressão do miR-let7 e o oncogene RAS no contexto de cancro do pulmão, revelando que existe uma regulação directa deste gene que se encontra sobreexpresso neste tipo de tumores e que está relacionado a mau prognóstico e diminuição da sobrevida após cirurgia supostamente curativa. Neste estudo surgiu também que a supra-regulação do miR-155 se correlacionava com pior prognóstico, e induziu-se que isto diminuiria a expressão de genes pró-apoptóticos, apesar de não terem ainda sido identificados os alvos.

É no prognóstico que mais informação se completa actualmente, à medida que os pacientes a quem o perfil de miR foi analisado nos últimos anos e que informação do curso natural da doença chega agora às mãos dos investigadores indicando a relação entre cada perfil e o prognóstico relativo. Prever o comportamento do tumor é uma clara vantagem na escolha do tratamento e ajuda a complementar a informação que podemos dar ao doente de modo a melhor fazer as suas escolhas.

miRNAs e TRATAMENTO

O potencial que existe no uso de miRNAs com objectivos terapêuticos na doença neoplásica está actualmente a ser explorado e baseia-se no facto de os miRNAs serem agentes de

interacção naturais que regulam o ciclo celular, diferenciação, proliferação e apoptose em células eucarióticas. Pelo menos duas abordagens existem para a utilização dos miRNAs com objectivo terapêutico, a análise de sensibilidade aos citoestáticos que permite um tratamento mais direccionado e eficaz, ou a alteração directa da expressão de miRNAs específicos que modificaria a regulação do ciclo da célula tumoral.

A sensibilidade à quimioterapia é uma das características mais relevantes para a escolha do fármaco a utilizar, foi tendo Meng [32] demonstrado que a eficácia do tratamento do colangiocarcinoma com gemcitabina resulta da variação do perfil de microRNA ao longo da duração dessa terapêutica e por outro lado a sobreexpressão do miR-21 aumenta a sensibilidade do tumor ao fármaco *in vitro*. Alguns alvos conhecidos dos miRNAs são genes com conhecido papel na biologia do cancro, e é nesses alvos que os estudos se têm centrado, a relação let7-RAS, miR-16-BCL2 e miR-21-TPM1-PTEN está bem documentada [33] bem como o conceito da interacção com os miRNAs provocar efeitos na progressão do cancro. Chan et al [11] mostraram que a inibição do miR-21 resultava em um aumento da apoptose em células de glioblastoma humano, e aumentava a sensibilidade ao irinotecano em células MGF7 do cancro da mama, porém esta inibição quando aplicada a células HeLa do cancro do colo do útero estimula o seu crescimento, e na linhagem A549 do cancro de pulmão de não-pequenas células praticamente não tem efeito, expondo de novo o facto de que tecidos diferentes têm um comportamento distinto perante a alteração na expressão do mesmo miRNA. Foram detectadas alterações na sensibilidade aos fármacos quimioterápicos quando eram supra-regulados ou infra-regulados os referidos miRNAs, mesmo alterações de concentração dos miR da ordem de 2 vezes causavam aumentos de sensibilidade a alguns fármacos da mesma ordem de grandeza, o que no sucesso da terapia do cancro é bastante relevante [33].

Manipular a expressão de miRNAs segue um princípio simples. Consiste na introdução de RNA antisense do miR em questão para diminuir a expressão deste, pois ao emparelhar com o original é rapidamente clivado por endonucleases inactivando-o. Para aumentar a expressão de um miR em particular, o método consiste em transfectar a molécula para a célula ou um seu precursor que seria processado na célula para ficar activo. Em qualquer dos casos as dificuldades residem no facto de *in vivo*, seleccionar as células para o qual o agente seria transfectado, ser ainda tecnicamente impossível, e sabendo que os miRNAs têm acções diferentes dependendo do tecido onde exercem efeito, a segurança e eficácia do processo é quase inteiramente desconhecida [33]. Outro problema que se põe é a instabilidade dos miRNAs terapêuticos que, como os naturais, são rapidamente degradados, o que obriga à criação de moléculas mais estáveis como os oligonucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA-modified oligonucleotides) [24] que apresentam maior semi-vida, essencial para obter algum resultado aplicável *in vivo*.

Apesar da maioria dos estudos com este objectivo se centrar na modulação da sensibilidade a fármacos, diversos estudos referidos por Calin e tal [21] têm uma abordagem mais directa, sem a aplicação de fármacos anticancerígenos, em que o simples knock-out de alguns miRNAs ou a sua transfectação altera directamente o curso da proliferação celular, porém os diversos resultados são díspares e vários são contraditórios. Mas fica claro que esta abordagem, pela relativa facilidade de síntese dos miRNAs sense e antisense pelo seu pequeno tamanho, é de entre as actuais formas de controlo directo do ciclo celular, objecto de estudo com potencial de utilização a mais curto prazo que outras abordagens genéticas em investigação [24].

APLICAÇÃO CLÍNICA dos miRNAs

Actualmente a maior área de trabalho em microRNAs é no âmbito da patologia neoplásica, mas como ilustra o Gráfico 1, adaptado de Travi e tal da distribuição de trabalhos conhecidos

sobre miRNAs, outras especialidades estão interessadas na pesquisa de miRNAs, talvez pela sua versatilidade de individualização. [35] Os estudos mais recentes colocam o perfil de miRNAs como um importante marcador tumoral para

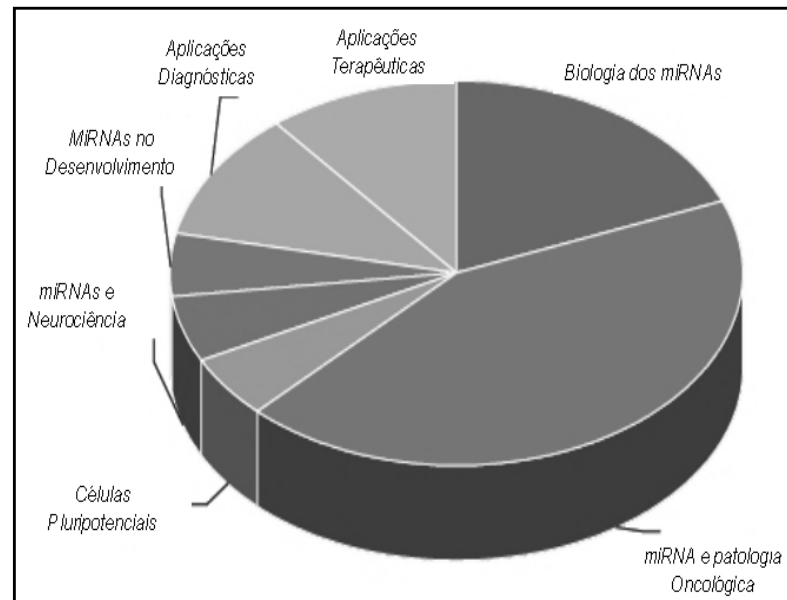


Gráfico 1 – Distribuição de investigadores de MicroRNA por diferentes áreas e subespecializações. Adaptado de Travi E (2008)[32]

neoplasias de pulmão, mama, próstata, cólon e ovário, e constantemente surgem novas informações sobre tumores com assinaturas de miRNAs que os permitem diferenciar de tecidos normais ou de outros tipos histológicos de neoplasias do mesmo tecido[36] A maior parte dos estudos de neoplasias em pacientes é a partir de biópsia do tecido neoplásico, que se submete a RT-PCR para amplificar o genoma da amostra, identificando depois os miRNA em microarray. Recentemente Iodes et al [22] publicaram um estudo onde a análise do soro de sangue periférico em microarray, sem necessidade de amplificação, podia diferenciar amostras de pacientes saudáveis e com neoplasia, assim como podia identificar o tumor de entre os cinco referidos anteriormente. Tornar os métodos de diagnóstico de neoplasia menos invasivos é um objectivo muito procurado, e tal como a pesquisa em sangue periférico é consideravelmente menos invasiva que qualquer biópsia, há investigadores como Park [37] que desenvolveram um método de diagnóstico de neoplasia oral baseada na análise do perfil

de miRNAs na saliva onde há diminuição da expressão de miR-125a e miR-200a nos pacientes com neoplasia.

A análise da assinatura de miRNAs depende essencialmente da capacidade tecnológica para o fazer, e correntemente diversas empresas como a Ambion(r), a Agilent(r) ou a Invitrogen(r) possuem kits para a análise de microRNA humano para venda, que incluem todos os produtos necessários para a análise, desde reagentes e placas de microarray, até software para o processamento dos dados e previsão de genes alvo de cada miRNA identificado. Existem também à disposição do médico bases de dados como a "Quiagen", "miRBase" ou a "NCcode" que permitem não apenas comparar a assinatura da amostra com um perfil conhecido e atribuído a determinada neoplasia assim como também designam genes-alvo teóricos que podem ser utilizados em investigação da relação de um perfil com o desenvolvimento tumoral.

Está documentada a utilização desta tecnologia na clínica no estudo das neoplasias, nomeadamente das que são a maior causa de morte no mundo, Raponi [38] descreve como o perfil de 15 miRNAs, que inclui alguns do cluster miR-17-92, miR-155, miR146b e let-7, tem mais utilidade clínica no estabelecimento do prognóstico do que o estudo do RNA mensageiro para carcinoma espinhocelular do pulmão, sendo que o miR-146b tem aproximadamente 78% de valor preditivo a estratificar o grupo de prognóstico; Gallardo [12] define que a subexpressão de miR-34a em todas as neoplasias de pulmão de não pequenas células é um bom indicador do risco de recidiva após cirurgia; Kan [30] refere que é possível diferenciar a metaplasia gástrica do terço inferior do esófago do carcinoma espinhocelular em que o aumento na expressão de miR-196a é o marcador mais evidente da progressão maligna; o miR-26b está subexpresso no carcinoma hepatocelular e segundo Ji et al [26] a análise mostrou que quanto menor a expressão pior o prognóstico, mas por outro lado, um aumento da sensibilidade à terapêutica com interferão. A neoplasia da mama, que actualmente é

agrupada quanto ao status Her2neu/ErBB2 e ER/Receptor de progesterona com relevância clínica na escolha do tratamento e no prognóstico, pode ser identificada na análise do perfil de miRNA e esta assinatura de miR ainda permite distinguir dentro de cada tipo subclasses moleculares, o que aumenta a especificidade do diagnóstico e cria oportunidades de escolha de alvos terapêuticos[9] A Tabela II resume alguns microRNAs estudados por Lowery et al [9] que interferem na fisiopatologia do cancro da mama e da sua expressão clínica.

A análise de miRNAs tem sido equiparada e poderá superar em especificidade e sensibilidade, as técnicas convencionais de diagnóstico oncológico, sendo actualmente imprescindível na investigação da biopatologia tumoral e complementar a informação que chega ao clínico, melhorando as suas capacidades de decisão.

MiCRNA	Genes-alvo	Alteração da expressão e função
MiR-21	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN	Expressão aumentada, é oncogénico
MiR-10b	Homeobox D10	Diminuída, relacionado com metastização
MiR-27a	ZBTB10	Oncogene no cancro da mama
MiR-206	ER α	Hiperexpresso
MiR-17-5p	AIB1	Supressor tumoral em linhas celulares de cancro da mama.
MiR-125a, miR-125b	ERBB2, ERBB3	Subexpresso, comportam-se como supressores tumorais
Let-7	RAS, HMGA2	Subexpresso em várias neoplasias
MiR-205	HER3	Subexpresso

Tabela II – Relação entre alguns microRNAs e a sua influência na neoplasia da mama.

DISCUSSÃO

O estudo dos microRNAs é uma ciência recente e as primeiras referências à sua existência e importância funcional têm menos de 20 anos: trata-se de manipular o ciclo celular e a expressão génica. O potencial destas moléculas na regulação de células tanto normais como neoplásicas e a sua variabilidade nos sistemas químicos de sinalização celular com sequências de eventos que abrangem os mais diversos mecanismos de controlo do metabolismo celular,

torna a aplicação prática uma verdadeira tarefa herculea e que necessita de tempo e experiência até poder ser levado para a prática diária de diagnóstico e tratamento.

Muitos estudos estão de momento a decorrer, os referidos até aqui envolvem a análise de tecidos humanos, biópsias de tumores diagnosticados por outros métodos em comparação com tecidos identificados como normais, porém muito deste desenvolvimento teórico está a ser realizado em modelos xenograft e em linhagens celulares específicas obtidas de bancos de células. O reconhecimento da interferência de microRNAs no desenvolvimento do cancro exigiu a teorização dos mecanismos que levam a estas alterações: as comuns mutações induzidas por radiações ou por agressão química directa ao DNA como a hipermetilação, ou a outras estruturas da cromatina como as histonas, têm sido implicadas na alteração da expressão e da função dos miRNAs [16], o que no geral encaixa nos factores conhecidos e estudados como promotores de neoplasias. Esta afirmação significa que alterações como microdelecções, translocações ou até aneuploidias podem induzir a tumorigénese não apenas pela alteração das sequências promotoras ou dos próprios genes codificantes, alterando a sua expressão e função, como alterações em genes não codificantes, previamente pouco estudadas, que irão também alterar o comportamento de genes codificantes. Este importante papel das sequências não codificantes abre perspectivas, não tanto no reconhecimento de factores de risco para mutação genética, por serem comuns aos previamente estudados, mas na forma de abordagem ao diagnóstico, prognóstico e mesmo ao tratamento.

A aplicação actual do conhecimento sobre o tema cinge-se ao diagnóstico e prognóstico, do perfil de microRNAs de um tumor, o que permite, além de um diagnóstico mais acurado, uma decisão terapêutica mais informada, nomeadamente nas leucemias linfoides crónicas e neoplasias do pulmão em que pode significar aumento na qualidade de vida do doente, ou mesmo aumento da sobrevida em casos cujo perfil de miRNAs indique desde logo que uma abordagem mais agressiva deve ser seguida.

O conhecimento do perfil de expressão de miRNAs num tumor pode também ajudar na decisão da quimioterapia a ser utilizada por revelar que aquele tipo tumoral tem conhecidamente resistência ou diminuição da eficácia de uma ou mais moléculas, com particular importância na neoplasia da mama, em que agrupar as pacientes segundo o status Her2neu/ErBB2 e ER/Receptor de progesterona está comprovado na decisão terapêutica e que também pode ser conseguido, e com mais especificidade do que com os métodos correntes, pela análise do perfil de miRNA. Outra vertente de extremo interesse é o diagnóstico do tumor primário quando o doente se apresenta com metástases de fonte desconhecida.

Se os métodos menos invasivos de diagnóstico de neoplasias a partir de amostras de sangue periférico ou outros fluidos se mostrarem sensíveis e específicos seriam de facto uma revolução no diagnóstico de neoplasias, dando um novo significado à expressão rastreio oncológico.

Na área do prognóstico, a informação é útil para providenciar ao doente tantos dados quantos possíveis para maximizar a sua capacidade de decisão e de consentimento informado.

Ao nível do tratamento as vantagens são claras, se for possível regular o ciclo celular de um tumor promovendo a apoptose de células tumorais pela simples administração de um fármaco, alteraria definitivamente o tratamento das neoplasias e provavelmente de várias outras doenças, particularmente inflamatórias crónicas e auto-imunes que envolvam desregulação do ciclo celular, assim como diminuiria a invasividade e os efeitos colaterais dos tratamentos actuais. Ainda o facto de intervir directamente na sinalização celular poderia tornar susceptíveis à apoptose as células com alterações de expressão de miRNAs típica de cancro, e pouca interferência ter em células normais que não apresentam ou não têm défice de expressão do microRNA alvo do tratamento[40][41]

É conhecido o facto de os efeitos do mesmo miRNA serem diferentes de tecido para tecido, o que indica que aplicar um tratamento sistémico baseado em miRNAs pode simultaneamente causar a apoptose das células tumorais objectivadas e promover o crescimento e proliferação celular neoplásica de outras células de outro órgão ou tecido.

Actualmente há falta de informação científica porque a maior parte dos estudos foi feita *in vitro* e em linhas celulares com poucos estudos *in vivo* (a maioria destes em modelos xenograft e linhagens celulares padrão) e ainda menor conhecimento da evolução da doença e prognóstico a longo prazo dos doentes a quem os perfis de microRNAs foram investigados aquando do diagnóstico.

CONCLUSÃO

Os microRNAs são intervenientes na regulação do ciclo celular, a sua importância no desenvolvimento de tumores em humanos é inegável e diferenças na sua expressão, alteram o comportamento celular na poliferação, apoptose, metastização e sensibilidade à quimioterapia.

O conhecimento do perfil de miRNAs permite inferir características das células neoplásicas não reconhecidas por outros métodos, precisar o diagnóstico, identificar o tecido de origem de metástases, determinar se o paciente tem determinada neoplasia através de procedimentos pouco invasivos, melhorar a decisão terapêutica e potenciar a eficácia do tratamento, assim como informar melhor o doente sobre o prognóstico.

Utilizar microRNAs antisense para quando a expressão está aumentada ou transfectar miRNAs sub-expressos são formas de utilizar directamente o conhecimento com objectivo terapêutico.

Apesar do enorme potencial e do já extenso conhecimento e dos diversos estudos em curso, é a falta de evidência científica e garantias de efectividade e segurança que mantém uma grande distância entre a bancada do laboratório e a cabeceira do doente.

Referências Bibliográficas

- 1 Volinia S, Calin G, Liu C, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt R, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris C, Croce C. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. PNAS 2006; 103 (7): 2257-2261
- 2 Lima A, Nascimento M. Mutações genéticas e técnicas de diagnóstico no cancro. Tese de mestrado integrado em Medicina. 2008; FMUC.
- 3 Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis. The “seed and soil” hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 2003; 3: 453-458
- 4 Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw M, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward M, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty P, Weber B, Coukos G. miRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. PNAS 2006; 103 (24): 9136-9141
- 5 Lu J, Getz G, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert B, Mak R, Ferrando A, Downing J, Jacks T, Horvitz H, Golub T. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435: 834-838
- 6 Calin G, Croce C. MicroRNA signatures in human cancers. Nature 2006; 11 (6): 857-865
- 7 Bartel D, MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism and function. Cell 2004; 116: 281–297

- 8 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901–906
- 9 Lowery A, Kerin M. MicroRNAs as Prognostic Indicators and Therapeutic Targets: Potential Effect on Breast Cancer Management. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 360-372
- 10 Cerveira N. Oncogenes e supressores tumorais, Serviço online de informação do Serviço de Genética, IPO Porto. 2004
- 11 Chan J, Krichevsky A, Kosik K. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033
- 12 Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades R, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2009; Sep 7 [Epub ahead of print]
- 13 Eis P, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez M, Lund E, Dahlberg. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3627-3632
- 14 Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 167-169
- 15 Kluiver J, Poppema S. MicroRNA-Mediated Down-Regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells: A Potential Pathogenetic Lesion in Hodgkin Lymphomas. *J Pathol* 2005; 207: 243-249
- 16 Lujambio A, Calin G, Villanueva A, Ropero S, Céspedes M, Blanco D, Montuenga L, Rossi S, Nicoloso M, Faller W, Gallagher W, Eccles S, Croce C, Esteller M. A

- microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *PNAS* 2008; 105 (36): 13556-13561
- 17 Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449: 682-688
 - 18 Johnson S, Grosshans H, Shingara J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635–47
 - 19 Tavazoie S, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos P, Gerald W, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451: 147-152
 - 20 Pavlidis N, Fizazib K. Cancer of Unknown Primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 243-250
 - 21 Calin G, Croce C. MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66: 7390-7394
 - 22 Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4(7): e6229
 - 23 Nagy B. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 120: 434–441
 - 24 Kipps T in *Williams hematology* (eds Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, Seligson U) 1163–1194. 2001; McGraw-Hill, New York.
 - 25 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
 - 26 Ji J, Shi J, Budhu A. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* 2009; 361(15): 1437-1447

- 27 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753–3756
- 28 Iorio M, Ferracin M, Liu G. microRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065–7072
- 29 Johnson S, Grosshans H, Shingara J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635–47
- 30 Kan T, Meltzer S. MicroRNAs in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Curr Opin Pharmacol* 2009; Sep 19 [Epub ahead of print]
- 31 Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, Jones D. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 2006; 20: 280–285
- 32 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell J, Jiang J, Schmittgen T, Patel T. Involvement of human microRNAs in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 33 Blower P, Chung J, Verducci J, Lin S, Park J, Dai Z, Liu C, Schmittgen T, Reinhold W, Croce C, Weinstein J, Sadeel W. MicroRNA modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1067-1074
- 34 Krutzfeld J. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomiRNAs”. *Nature* 2005; 438: 685-689
- 35 Travi E, Gray K. Trends in the miRNA marketplace. 2008; Publicado apenas online. http://www.ddw-online.com/enabling_tchnologies
- 36 Jiang Z, Guo J, Xiao B, Miao Y, Huang R, Li D, Zhang Y. Increased expression of miR-421 in human gastric carcinoma and its clinical association. *J Gastroenterol* 2009; Oct 3 [Epub ahead of print]

- 37 Park N, Wong D. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research* 2009; 15 (17) 5473-5477
- 38 Raponi M, Dossey L, Jatkoe T, Wu X, Chen G, Fan H, Beer D. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 2009; 69 (14): 5776-83
- 39 Gupta,G, Massaguee J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* 2006; 127:679:695
- 40 Chiorazzi N, Rai K, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804–815
- 41 He L, Thomson J. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Nature* 2005; 435: 828-833