



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

MicroRNAs em Oncologia: Potencialidades no Cancro Pancreático

Joana Raquel Pires Mata

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Bruno Figueiredo Gonçalves

Coorientador: Prof. Doutor Miguel Castelo Branco

Covilhã, maio de 2018

Dedicatória

Aos meus três pilares:

Aos meus pais, por proporcionarem a realização de um sonho;

Ao meu irmão, por iluminar constantemente a minha jornada.

Agradecimentos

Ao Dr. Bruno Gonçalves e ao Prof. Doutor Miguel Castelo Branco pela orientação, disponibilidade e amabilidade no decorrer da elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, que me incentivam sempre a lutar pelos meus objetivos. Ao meu irmão, pela alegria contagiante e inabalável. Aos três, pelo amor incondicional.

A toda a minha família, pela confiança que depositam em mim.

Aos Amigos da cidade neve, que tornaram a Covilhã a minha segunda casa, que em todos os momentos estiveram do meu lado. E àqueles que, apesar da distância, nunca deixaram de demonstrar uma verdadeira amizade e compreensão.

Ao Márcio, pela paciência diária, todo o carinho e apoio.

Resumo

As neoplasias malignas são, na atualidade, um verdadeiro problema de saúde pública correspondendo à segunda causa de morte a nível mundial. A carga global do cancro está a aumentar rapidamente e perspectiva-se que continue a aumentar. O cancro pancreático, embora não sendo dos cancros mais incidentes (posicionando-se no 11º lugar a nível mundial) corresponde, mundialmente, à sétima causa de morte por cancro, em ambos os sexos. Verifica-se uma elevada mortalidade nos pacientes diagnosticados com esta patologia, números esses que espelham praticamente os números dos casos de incidência do mesmo, refletindo a sua natureza letal.

O aumento da incidência do cancro traz continuamente novos desafios e a necessidade de desenvolver biomarcadores que possibilitem a identificação precoce, a monitorização, terapêutica e prognóstico das neoplasias malignas. Os microRNAs são pequenas sequências não-codificantes de RNA cuja função assenta na regulação da expressão génica. Dada a sua importante função, não surpreende que a sua desregulação esteja implicada em diversos processos patológicos, nomeadamente o cancro. Estas pequenas sequências têm vindo a ser investigadas, apontando para uma função promissora como biomarcadores. No que se refere ao cancro pancreático, já vários estudos identificaram microRNAs circulantes derivados do tumor que se encontram sobre ou sub regulados, caracterizando-os como biomarcadores, nomeadamente de diagnóstico e prognóstico, sendo que alguns dos identificados incluem microRNA-21, microRNA-210, microRNA-155. Considerando a elevada taxa de metastização do cancro pancreático, a identificação de microRNAs (microRNA 10b, 21, entre outros) motiva a sua utilização como potenciais biomarcadores que refletem a propensão de metástase. Todos estes achados representam possíveis novos biomarcadores com potencial de definir a mais adequada intervenção terapêutica nestes doentes.

Com o presente trabalho pretende-se efetuar uma revisão das potencialidades dos microRNAs e a sua utilização como biomarcadores no cancro pancreático.

Palavras-chave:

MicroRNA; biomarcadores circulantes; cancro pancreático

Abstract

Malignant neoplasms are a worldwide threat to public health, being the second cause of death. The overall burden of cancer is rising fast and it is expected to continue to increase in the coming decades. Pancreatic cancer, although not the most prevalent cancer, being only the 11th most widespread worldwide, it is the seventh cause of death by cancer, for both genders. Patients diagnosed with pancreatic cancer have a high mortality rate, roughly the same number of diagnosed cases, hence its lethal nature.

The increase in cancer incidence worldwide fosters new challenges and the need to develop technologies to help fight this burden. Among them, biomarkers that can help an early identification of cancer, monitorization, therapy, and aid in prognostics are promising future solutions. MicroRNAs are small non-coding sequences of RNA that regulate gene expression. Given their important function, it is known that their deregulation is involved in various pathologic processes, namely cancer. These small molecules have been extensively researched as biomarkers. On pancreatic cancer, tumour circulating miRNA's have been identified, usually over or underregulated, and have been characterized as diagnostic or prognostic biomarkers, namely miRNA-21, miRNA-210 and miRNA-155 which are some of the identified sequences in pancreatic cancer. This type of cancer has a high metastization rate, and the identification of miRNA's like 10b, 21 and others, which are related to metastization phenomena, strengthens research on miRNA's to further understand the evolution and behaviour of pancreatic cancer, and ultimately to be used as a therapeutic agent.

This work intends to be a review of the potential applications of microRNAs and their putative use as biomarkers in pancreatic cancer

Keywords

MicroRNA; circulating biomarkers; pancreatic cancer

Índice

Resumo	IV
Abstract.....	V
Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	VIII
Lista de acrónimos.....	IX
1. Introdução	1
2. Cancro como flagelo mundial.....	3
2.1 Particularidades do cancro pancreático.....	3
3. MicroRNA - Biogénese e Mecanismos de Ação	7
3.1 Biogénese	7
3.2 Mecanismos de ação	7
4. As aplicações dos miRNA na Oncologia	10
4.1 Papel do miRNA na fisiopatologia do cancro	10
4.2 Aplicações clínicas do miRNA	11
5. Potencialidades dos miRNAs no cancro pancreático.....	13
5.1 Estudos sobre miRNA realizados em cancro pancreático.....	13
5.2 Aplicações dos miRNAs no cancro pancreático.....	14
6. Perspetivas futuras	16
7. Conclusão	17
Bibliografia	18

Lista de figuras

Figura 1 - Incidência e mortalidade, no mundo, do cancro pancreático em homens e mulheres, estandardizado para a população mundial de referência, para 10.000 pessoas-ano	4
Figura 2 - Sintomatologia do cancro pancreático por localização do tumor.	6
Figura 3 - Biogénese e mecanismo de ação dos miRNAs	8
Figura 4 - Desregulação dos miRNAs e suas consequências nas células	10
Figura 5 - Aplicações dos miRNAs na clínica do cancro.	12
Figura 6 - MicroRNAs no cancro pancreático e suas aplicações.....	15

Lista de tabelas

Tabela 1 - Fatores de risco para cancro pancreático.....5

Lista de acrónimos

mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MiR	microRNA
MiRNA	microRNA
OncomiR	microRNA oncogénico
Pré-miRNA	microRNA precursor
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
Ran-GTP	<i>RAs-related Nuclear protein with bound guanosine triphosphate</i> (proteína nuclear RAs-relacionada ligada com guanosina trifosfato)
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i> (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RNase	Ribonuclease

1. Introdução

As neoplasias malignas são, na atualidade, um verdadeiro problema de saúde pública a nível mundial, correspondendo à segunda causa de morte (1). Verifica-se que a carga global do cancro está a aumentar rapidamente e estima-se que esta aumente em média cerca de 50% até ao ano de 2020. Indubitavelmente, têm sido feitos progressos ao longo dos anos para contrariar esta tendência, incluindo estratégias de prevenção, novos meios de diagnóstico e métodos de tratamento. Ainda assim, o aumento da incidência do cancro traz continuamente novos desafios que procuram aprimorar as estratégias de diagnóstico, tratamentos e monitorização mais eficazes, e melhoria no prognóstico (2,3).

Tem-se constatado que as grandes dificuldades com que os profissionais de saúde se deparam consistem na deteção já tardia do cancro; quando diagnosticado, a dificuldade na monitorização da progressão do mesmo e, ainda, a resistência ao tratamento devido a heterogeneidade tumoral, constituem problemas *major* (4-6).

O caso específico do cancro pancreático, ainda que não seja dos cancros mais incidentes, reflete a dificuldade que os profissionais de saúde têm em detetar, tratar e monitorizar a doença: um dos cancros mais fatais, onde a sua incidência corresponde aproximadamente à taxa de mortalidade, sendo premente o desenvolvimento de marcadores de diagnóstico, monitorização e de resposta às atuais terapêuticas bem como do surgimento de novas terapêuticas (7,8).

A necessidade de desenvolver biomarcadores que identifiquem o cancro num estágio inicial, que sejam eficazes na monitorização da progressão de doença, na predição de resposta ao tratamento e no prognóstico da doença é essencial. Existem algumas características necessárias a um biomarcador para que este seja competente na utilidade clínica: a sua biodisponibilidade - tanto em termos quantitativos como em termos de acessibilidade -, estabilidade, capacidade de distinguir entre diferentes tipos de doenças e, ainda, ser fidedigno quando medido, ou seja, a medição efetuada não seja influenciada por outros fatores e, portanto, ter uma elevada sensibilidade e especificidade (4,9,10). Atualmente, os mais utilizados na prática clínica são principalmente proteínas, que ainda que possibilitem diagnosticar, monitorizar e deduzir um prognóstico da neoplasia maligna, são marcadores que carecem de elevada sensibilidade e especificidade (9).

Tem-se assistido a um esforço intenso para desenvolver novos biomarcadores. A evolução na área da genética, nomeadamente nos equipamentos de análise de genoma, tem permitido o grande crescimento de conhecimento e de descoberta de novos biomarcadores (11).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas sequências não-codificantes de RNA, detetados inicialmente em 1993 na espécie *Caenorhabditis elegans* (12). Rapidamente foram identificados genes homólogos em mais espécies, incluindo humanos, e conhecida a sua função: regular a expressão génica e, conseqüentemente, uma variedade de processos celulares (que se estendem desde a proliferação à morte celular) (13,14). MiRNAs têm, desde então, atraído diversas linhas de investigação e estudos. A par do seu papel preponderante na

regulação genética, sabe-se que estes não estão apenas presentes nas células mas também na circulação, apresentando características essenciais a um bom biomarcador: uma elevada estabilidade no plasma e também quando armazenados, níveis de miRNAs na circulação associados a diferentes doenças e estádios das mesmas e, ainda, facilidade da sua mensuração (por diferentes métodos) cuja medição é sensível (9,15). Ainda, a importância dos miRNAs estende-se ao facto da expressão e função destes se encontrarem alteradas em células cancerígenas, sublinhando assim a sua relevância como biomarcadores de interesse (16).

À luz do acima descrito, constata-se a progressiva evolução e inovação na área da medicina. Assim sendo, segue-se uma visão geral das neoplasias malignas, particularizando o cancro pancreático, uma abordagem geral aos miRNAs, incluindo o seu papel nas doenças oncológicas e as suas potencialidades no caso específico do cancro pancreático.

2. Cancro como flagelo mundial

Todos os anos, são diagnosticados cerca de 12 milhões de cancros no mundo, sendo que existem 7 milhões de mortes anuais relacionadas com esta doença, e, estima-se que 25 milhões de pessoas vivem diariamente com algum tipo de cancro diagnosticado (3). O cancro é, sem surpresa, a segunda causa de morte em todo o mundo, com 8.8 milhões de mortes, só em 2016, totalizando uma em cada 6 mortes. Em 2015, os tumores malignos corresponderam a 24,5% dos óbitos, sendo apenas ultrapassados pelas doenças do aparelho circulatório (17).

O aparecimento de cancro varia de acordo com a genética, idade, sexo, localização no globo e estilo de vida, sendo que os cancros mais comuns em homens são de pulmão e próstata, enquanto que nas mulheres, é o da mama (3).

O cancro caracteriza-se pela transformação de células normais em células tumorais num processo com várias fases, desde lesões pré-cancerosas até tumores malignos, células com um fenótipo derivado da desregulação de vários genes codificadores de proteínas (18). O desenvolvimento de cancros deriva dos fatores genéticos individuais e de 3 fatores externos, nomeadamente carcinogéneos físicos (luz ultravioleta), carcinogéneos químicos (asbestos, tabaco, aflatoxina e arsénio), e ainda carcinogéneos biológicos (infecções virais, bacterianas e parasitas) (19).

Os fatores de risco associados ao aparecimento de cancro são a falta de exercício físico, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e dietas desequilibradas. Além destes, infeções crónicas também potenciam o desenvolvimento de cancros, sendo os mais problemáticos, a infeção por *Helicobacter pylori*, vírus do Papiloma Humano, vírus da Hepatite B e C, e o vírus de Epstein-Barr (19).

2.1 Particularidades do cancro pancreático

O cancro pancreático, embora não sendo dos cancros mais incidentes (posicionando-se no 11º lugar a nível mundial) corresponde, mundialmente, à sétima causa de morte por cancro, em ambos os sexos (20). Na Europa, em 2014, foi responsável por 6% do total das mortes por cancro, correspondendo à quarta causa de morte (21). No caso específico de Portugal, tumores malignos correspondem à segunda causa de morte sendo que, em 2015, as neoplasias malignas do pâncreas foram responsáveis por 5,34% dos óbitos por tumores malignos (17).

Diagnosticado maioritariamente entre os 60 e os 80 anos, é raro o seu aparecimento antes dos 45 anos; contudo, após os 30 anos, o risco aumenta exponencialmente com a idade (22,23). A incidência no sexo masculino encontra-se mais elevada do que no sexo feminino, constatando-se que é 30% mais comum nos homens (22). Em 2012, a prevalência dos tumores malignos do pâncreas em Portugal está em concordância com o acima descrito, constatando-se uma prevalência superior no sexo masculino (5,8% vs 4,7% no sexo feminino) (24). A mortalidade do cancro pancreático aumenta, em ambos os sexos, com a idade, verificando-se que 90% das

mortes registadas ocorrem após os 55 anos (20) correlacionando-se assim com a idade na qual é maioritariamente diagnosticado. A neoplasia maligna do pâncreas caracteriza-se por fortes diferenças a nível geográfico tal como se pode reconhecer na Figura 1; consegue-se ainda aferir visualmente uma incidência superior no sexo masculino e, também, o elevado rácio mortalidade/incidência (98%), segundo dados respeitantes ao GLOBOCAN 2012 (7,20).

O cancro pancreático apresenta vários subtipos, contudo o adenocarcinoma ductal pancreático constitui mais de 90% dos tumores (25) que, em mais de metade dos pacientes diagnosticados, se apresentam como doença localmente avançada ou metastizada (26).

O adenocarcinoma ductal pancreático desenvolve-se ao longo de vários anos surgindo a partir de uma série de mutações genéticas e de lesões precursoras pré-malignas sendo o oncogene k-ras o mais bem caracterizado encontrando-se mutado em mais de 90% dos doentes. Em

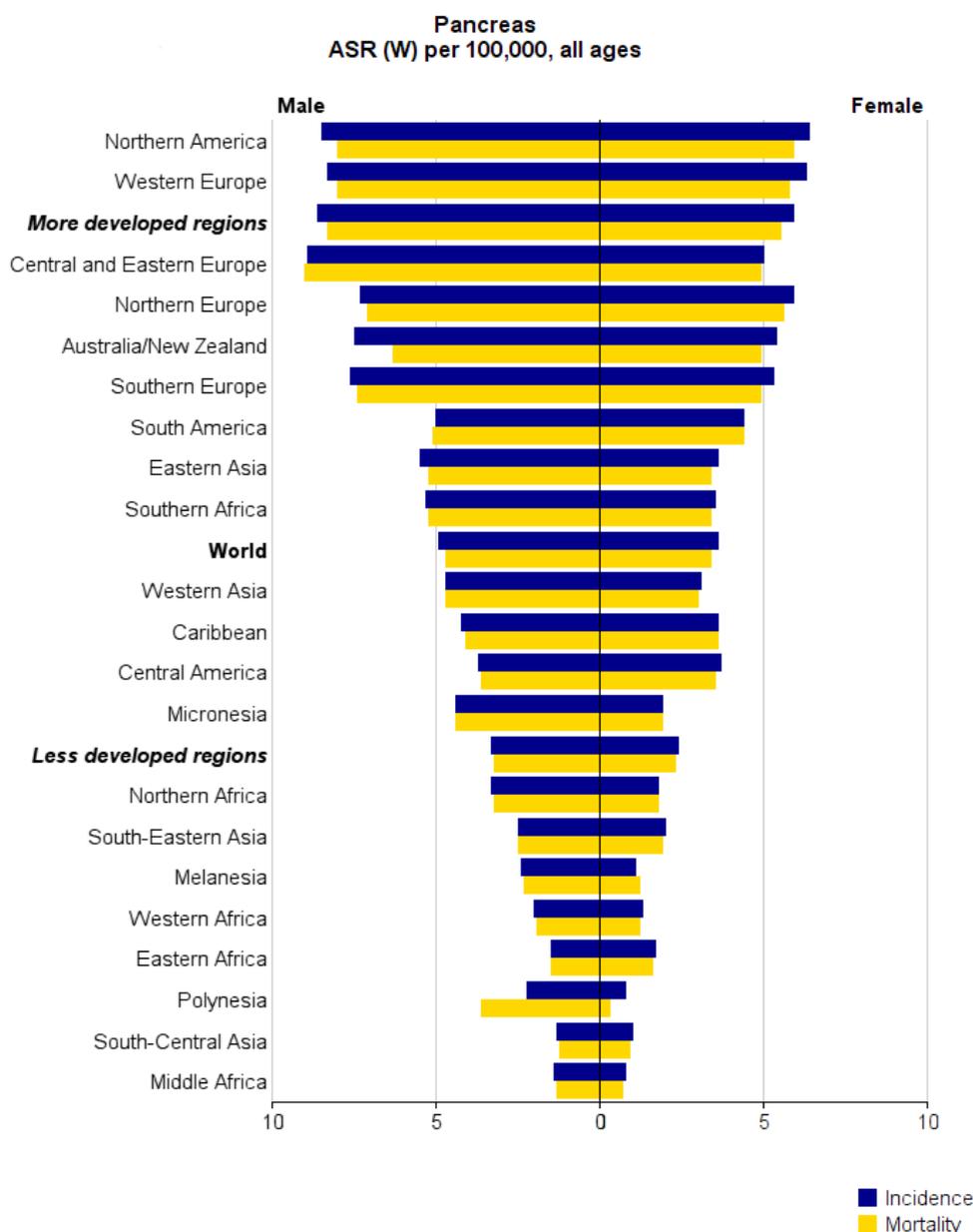


Figura 1 - Incidência e mortalidade, no mundo, do cancro pancreático em homens e mulheres, estandardizado para a população mundial de referência, para 10.000 pessoas-ano (segundo dados do GLOBOCAN 2012) (7)

relação a genes supressores tumorais, as mutações do TP53 encontram-se implicadas em mais de 75%. (8,23)

Como já referido, o cancro pancreático é uma patologia com forte relação com a idade mais avançada, associando-se ainda à acumulação de mutações esporádicas: em mais de 80% dos casos (22). Contudo, verifica-se uma importante tendência para o desenvolvimento desta entidade em doentes com mutações germinativas específicas, apresentando-se uma importante associação familiar (8). Fatores de risco ambientais/modificáveis também já foram identificados sendo que o tabaco representa o principal e mais importante destes (22) (Tabela 1).

Tabela 1 - Fatores de risco para cancro pancreático (baseado em Midha S, Chawla S, Garg PK [22])

Fatores de risco	
Do hospedeiro / Não modificáveis	Ambientais / Modificáveis
Idade;	Obesidade;
Género;	Dieta;
Etnia;	Álcool;
Grupo sanguíneo;	Tabaco;
Fatores genéticos (mutações hereditárias e mutações adquiridas);	Infeções
Pancreatite crónica;	
Antidiabéticos	

Embora tenha uma incidência inferior a muitos outros tipos de neoplasias malignas, o cancro do pâncreas, devido ao seu diagnóstico tardio aquando da sua apresentação, aliado a outros fatores como ausência de manifestações clínicas, apresentação com manifestações inespecíficas, metastização precoce, baixa resposta ao tratamento com agentes citotóxicos, entre outros, encerra um prognóstico muito reservado (26).

A apresentação clínica é relativamente pobre: o cancro pancreático desenvolve-se com poucos sintomas, que variam de acordo com a localização do tumor. Os tumores peri-ampulares apresentam-se com icterícia obstrutiva num estágio mais inicial, enquanto que tumores do corpo e da cauda se apresentam assintomáticos até um estágio tardio, fazendo

com que seja diagnosticado mais tarde e com um prognóstico mais reservado (23). No que toca a lesões na região direita do pâncreas (nomeadamente cabeça, istmo e processo unciforme), cerca de 75% dos doentes apresentam-se com icterícia, devido a obstrução do ducto biliar comum, o que pode ser acompanhado também de esteatorreia e pancreatite aguda. Sintomas inespecíficos como perda de peso, dor abdominal e náuseas apresentam-se em 50%, 40% e 10% casos, respetivamente, sendo que, em cerca de 10% dos doentes, há ainda surgimento de diabetes *mellitus* de início recente. (8) Nos tumores do corpo ou cauda do pâncreas, os sintomas inespecíficos são os mais comuns, nomeadamente com náuseas, perda de peso e distensão abdominal à apresentação. A dor pode estar presente no epigastro com irradiação para a região lombar, o que constitui habitualmente um sinal de mau prognóstico devido a compressão nervosa local. Finalmente, em cerca de metade dos doentes, verifica-se também o aparecimento recente de diabetes *mellitus*, sendo que no caso de apresentação com diabetes de longa evolução, encontra-se associado a um pior prognóstico (Figura 2) (8,23).

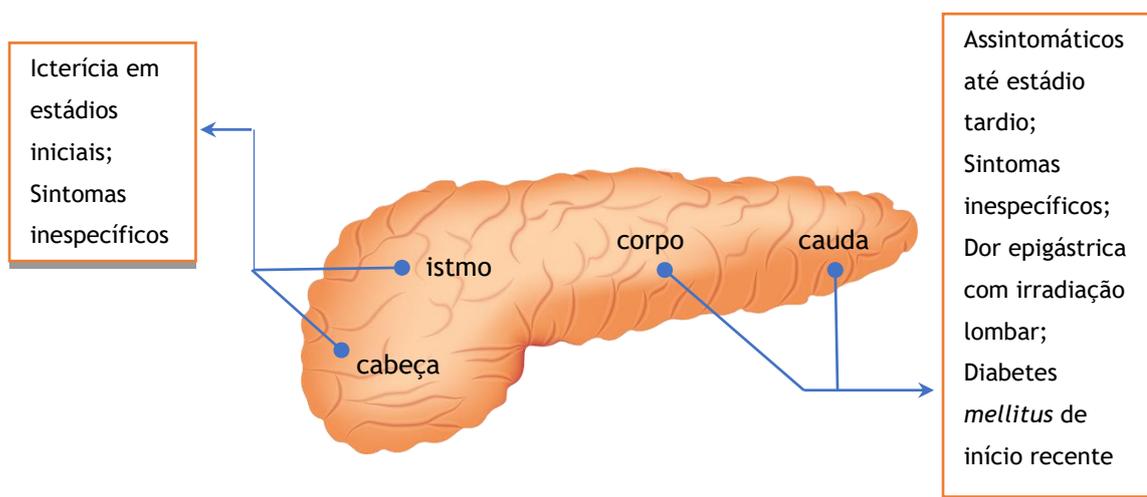


Figura 2 - Sintomatologia do cancro pancreático por localização do tumor.

A resseção cirúrgica continua a ser o tratamento que proporciona maior sobrevida e é considerada atualmente como a única estratégia terapêutica curativa (embora não seja possível na maioria das situações detetadas), oferecida a doentes com doença considerada ressecável. Contudo, devido ao diagnóstico tardio e doença em estado avançado (doença metastática em cerca de metade dos doentes diagnosticados), a terapêutica é, na maior parte dos casos, limitada a agentes quimioterápicos e/ou radiação e tratamento sintomático e de suporte (8,23).

Para diminuir a taxa de mortalidade associada a este diagnóstico é necessário, sem dúvida, uma deteção precoce e, ainda, otimizar tratamentos.

3. MicroRNA - Biogénese e Mecanismos de Ação

3.1 Biogénese

Os microRNAs são pequenas sequências não-codificantes de RNA de 19 a 25 nucleótidos que regulam a expressão génica, intervindo em diversos processos celulares através do seu emparelhamento, mais ou menos específico, com moléculas de mRNA-alvo inibindo a tradução de mRNA ou induzindo a sua degradação (27).

Os genes codificadores de miRNAs são bem preservados do ponto de vista evolutivo que podem ser encontrados em várias espécies (28). A maior parte deles são transcritos pela RNA polimerase II, dentro do núcleo, dando origem a transcritos longos, denominados miRNAs primários. Estes sofrem clivagem intranuclear pelo complexo RNase III Drosha associada a DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) originando miRNAs precursores (pré-miRNAs) que são transportados para o citoplasma pela proteína Exportina5 (que utiliza como co-fator Ran-GTP) através da membrana nuclear. Já no citoplasma, os pré-miRNAs são clivados pelo complexo RNase III Dicer originando uma molécula de miRNA de cadeia dupla (a qual contém o miRNA maduro). A cadeia de miRNA madura é incorporada no RISC (complexo fundamental para a função do miRNA), guiando-o no sentido do reconhecimento do alvo, RNA mensageiro (mRNA), que contém sequências complementares (mRNA alvo). Consequentemente, leva à regulação da expressão génica onde pode ocorrer ou inibição da translação (caso o grau de complementaridade de bases emparelhadas com o miRNA seja limitado) ou, então, indução da degradação do mRNA, no caso do grau de complementaridade de bases emparelhadas seja extenso (27,29).

Não só foram detetados miRNAs dentro das células como foram também detetados em vários fluidos biológicos, incluindo o soro, sendo denominados de miRNAs circulantes. Verificou-se que estas moléculas não se encontram associadas a fragmentos ou morte celulares, mas existindo de forma estável e protegidos na circulação, através de microvesículas, exossomas, corpos apoptóticos ou ligados a proteínas como a Argonauta 2 e Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) (9,28). Os miRNAs circulantes atuam nas células recetoras da mesma forma que os miRNAs celulares, através do mesmo mecanismo de ação que estes (9).

3.2 Mecanismos de ação

Tal como descrito anteriormente, os miRNAs ligam-se a moléculas de mRNA alvo, pelo que atuam ao nível pós-transcricional na regulação de genes, atuando em diversos processos que incluem proliferação, diferenciação e apoptose (13).

Dependendo da complementaridade da região 5' do miRNA com a região 3' não traduzida do mRNA alvo, assim o miRNA exercerá função diferente. Na maioria dos casos, as duas

sequências não são totalmente complementares, levando à repressão da tradução quando o miRNA se liga à zona da região 3' não traduzida do mRNA. No caso de as sequências serem perfeitamente complementares, é induzida a clivagem do mRNA alvo pela proteína Argonauta do complexo RISC, através da ativação da via do RNA interferência. Embora o mais comum seja, como já referido, uma regulação negativa da expressão génica, foram já identificados alguns miRNAs que promovem a expressão de certos genes, favorecendo a tradução do mRNA (9,10,13).

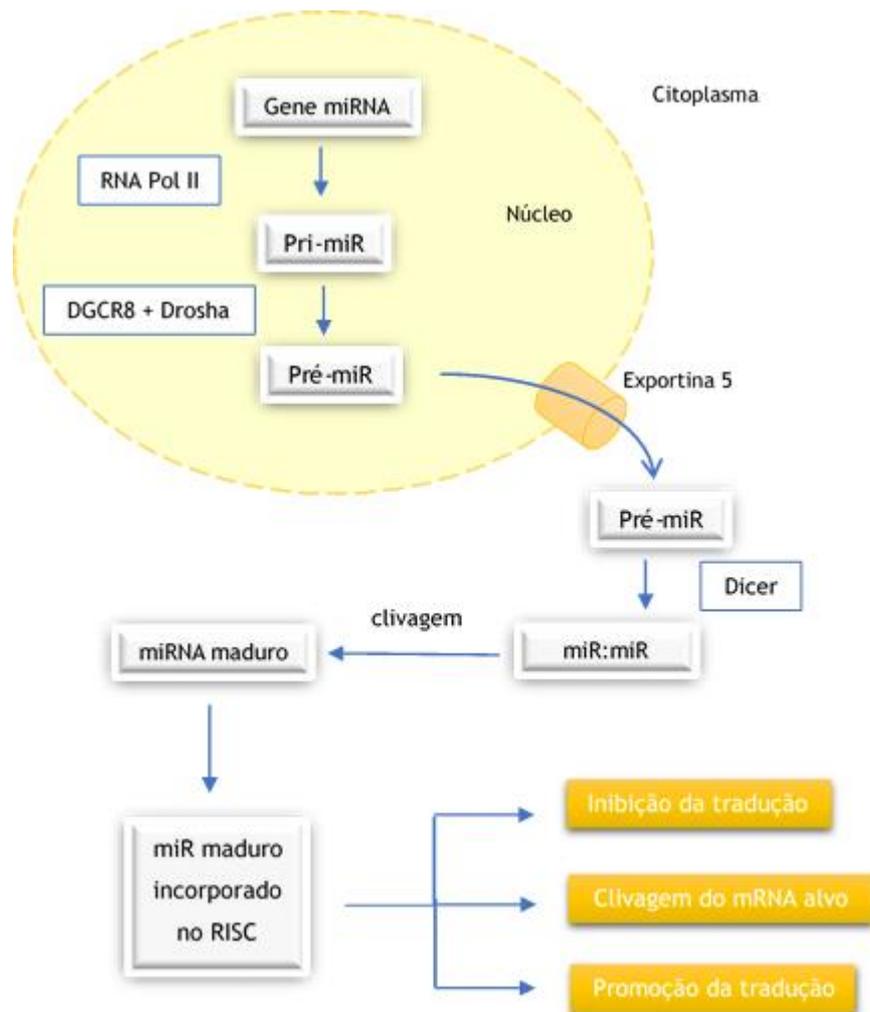


Figura 3 - Biogénese e mecanismo de ação dos miRNAs

(Adaptado de: Iorio M V., Croce CM [31])

miR - microRNA; pré-miR - miRNA precursor; miR:miR - cadeia dupla de miRNA; pri-miR - miRNA primário; RNA pol II - RNA polimerase II

De notar que um mRNA específico pode ser regulado por diferentes miRNAs, sendo que estes apresentam um efeito, normalmente, sinérgico; por outro lado, um único miRNA pode ter como alvo vários mRNA tratando-se de uma ação pleiotrópica (28). Estima-se que 30 a 60% dos genes codificadores de proteínas sejam regulados por estas estruturas não-codificantes (28).

4. As aplicações dos miRNA na Oncologia

4.1 Papel do miRNA na fisiopatologia do cancro

Considerando a intricada biogénese dos miRNAs e o mecanismo de ação clássico do miRNA (reconhecimento do mRNA alvo através de emparelhamento de bases), não surpreende que alterações nessas vias levem à desregulação dos miRNAs. A expressão destes pode ser desregulada por uma variedade de processos: não apenas a nível da transcrição dos componentes que se encontram envolvidos na biogénese do miRNA mas também a nível génico (29). São incluídos na instabilidade genómica, mutações e polimorfismos de nucleótido único, rearranjos de cromossomas e alterações na metilação que, conseqüentemente, podem alterar a biogénese dos miRNAs ou então alterar sequências-alvo de reconhecimento do miRNA levando, então, à sua desregulação (28) (figura 4).

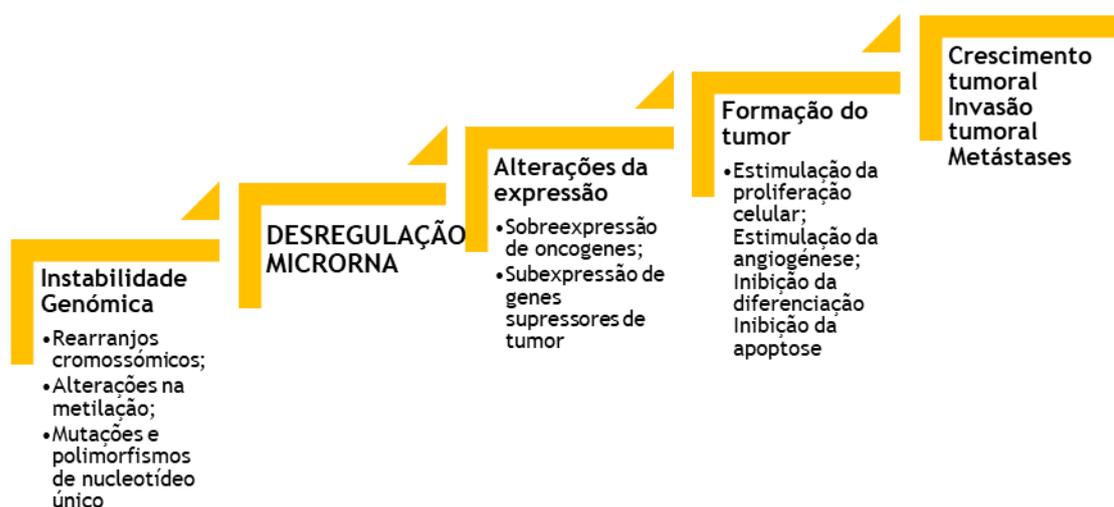


Figura 4 - Desregulação dos miRNAs e suas conseqüências nas células (Adaptado de: Perge P, Nagy Z, Igaz I, Igaz P. [28] e Iorio M V., Croce CM [31])

Tendo em conta os efeitos dos miRNAs na biologia celular é natural que, quando desregulados tenham implicação em várias patologias incluindo a oncogénese.

Foi demonstrado que vários miRNAs nos tumores se encontram sub ou sobre expressos quando comparada a sua atividade em tecidos normais. Utilizando a dicotomia clássica de oncogene-supressor de tumor, os miRNAs são classificados como oncogénicos (oncomiR) e supressores de tumor consoante estão sobre ou sub expressos, respetivamente (30). MiRNAs envolvidos na regulação negativa de genes supressores de tumores podem estar sobre expressos (oncomiR) no cancro levando conseqüentemente à inibição dos genes de supressores de tumores. Por outro lado, miRNAs envolvidos na coibição de oncogenes encontram-se em níveis reduzidos pelo que resulta num aumento da tradução dos oncogenes (31). Contudo, de notar ainda que um miRNA pode ter uma função de supressor tumoral num tecido e oncogénico num outro, sendo que esta característica pode implicar uma limitação no desenvolvimento de terapêuticas baseadas em miRNA dada a especificidade tecidual (28).

Esta função oncogénica e repressora leva a que o miRNA tenha um papel ativo e relevante nas características básicas das células cancerígenas, observando-se autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a fatores anti crescimento, potencial replicativo ilimitado, capacidade de evasão da apoptose, manutenção da angiogénese e capacidade de metastização, fazendo com que haja uma estimulação da proliferação celular e uma repressão da diferenciação e apoptose levando à sua evasão, predispondo então à formação e crescimento tumoral (28,31,32).

4.2 Aplicações clínicas do miRNA

O papel preponderante dos miRNAs na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo o cancro, tornaram estas sequências não codificantes de RNA objeto de elevado interesse de estudo como potenciais biomarcadores.

Um biomarcador é, por definição, “qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser medido no corpo ou seus produtos e influencia ou prediz a incidência de resultado ou doença” (33). A par da função notável dos miRNAs, a sua elevada estabilidade nos fluídos corporais, a disponibilidade de técnicas de medição dos mesmos, a sua conservação nas espécies e ainda a correlação da sua concentração com estados patológicos, contribui para o elevado interesse em estudá-los para os tornar biomarcadores confiáveis (4,5). Existem inúmeros estudos que revelam as múltiplas aplicabilidades dos miRNAs como biomarcadores: seja de diagnóstico, aferindo quais os indivíduos saudáveis e com doença (mesmo numa fase precoce de doença); diferenciar tumores benignos de malignos; identificar a origem da neoplasia maligna e discriminar entre diferentes subtipos de cancro; determinar o prognóstico; predizer e monitorizar a resposta à terapêutica e, ainda, predizer a possível ocorrência de remissão, recorrência e de metástases (9,29,31) (figura 5). Não obstante, a ação pleiotrópica dos miRNAs é atrativa para utilizá-los como ferramentas terapêuticas e/ou como alvos terapêuticos, dada a capacidade de regulação de diferentes processos biológicos celulares (31).



Figura 5 - Aplicações dos miRNAs na clínica do cancro.

Contudo, estas potenciais aplicações apresentam algumas limitações na atualidade, que devem de ser consideradas. Em diversos estudos tem sido verificada uma falta de consistência na utilização dos miRNAs que pode derivar, por exemplo, de diferentes formas de preparação, seleção e análise da amostra a estudar, do desenho do estudo bem como, da interferência de outros fatores que afetam as medições dos miRNAs (como o sexo e a idade) para além do modo de manuseamento da amostra. Assim, para serem utilizados como biomarcadores confiáveis clinicamente, quer seja como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico ou preditivos, são necessários mais estudos de forma a validá-los e conferir uma maior sensibilidade e eficiência aos métodos de deteção, bem como a sua reprodutibilidade. De igual modo, a standardização das metodologias utilizadas constitui um fator essencial para a sua validação. No que se refere aos miRNAs como alvos e/ou ferramentas terapêuticas, é necessário ter em conta que ainda é preciso estabelecer formas eficientes e específicas de atuar nos miRNAs, de forma sistémica, e fazê-los alcançar os órgãos (sobretudo os menos acessíveis). Não obstante, a existência de miRNAs em circulação acarreta a questão de possíveis efeitos adversos provenientes de atuação sistémica que poderão apenas ser aparentes em ensaios clínicos. Ainda, o facto de os miRNAs participarem em diversos processos biológicos torna necessário um estudo também aprofundado para utilização destes como preditores e monitorização da resposta terapêutica uma vez que a participação dos miRNAs nos diversos eventos celulares pode influenciar a resposta à terapêutica (4,31,34). Em resumo, é necessário estabelecer procedimentos standardizados e estudos independentes e de larga escala que validem os miRNAs, tanto como biomarcadores, como também alvos e ferramentas terapêuticas da prática clínica.

5. Potencialidades dos miRNAs no cancro pancreático

5.1 Estudos sobre miRNA realizados em cancro pancreático

Os miRNA têm sido bastante investigados na medicina oncológica, sendo que as neoplasias pancreáticas malignas não são exceção, sobretudo pela ausência de sintomatologia até fases tardias. Uma breve pesquisa pelos repositórios científicos indica que há muita informação relacionada com a utilização de miRNA no cancro pancreático. Na “Pubmed”, repositório médico dos Estados Unidos da América, uma pesquisa pelos termos “miRNA + pancreatic cancer” (miRNA + cancro pancreático), devolve 1343 publicações, sendo que o maior crescimento em número de publicações se verifica em 2009, provavelmente associado à descoberta do fenómeno do miRNA circulante aliado à sua estabilidade, tornando-os excelentes candidatos como biomarcadores. Desde então, regista-se o aumento exponencial, com cerca de 231 em 2015 e 235 em 2017, ano com maior número. Outro repositório científico importante, a “ScienceDirect”, que permite uma diferenciação rápida das publicações, apresenta um número muito maior de artigos de interesse, mais de 5000. Desses, cerca de 1600 são publicações de investigação clínica, 1300 de revisão e cerca de 500 são capítulos de livros. É também, em 2017 que se verifica um maior volume de publicações indexadas neste repositório, traduzindo um crescente interesse por parte da comunidade académica.

No que concerne aos ensaios clínicos em curso, há bastantes ensaios relacionados com o cancro pancreático nos principais portais, nomeadamente o “*clinicaltrials.gov*” (portal que indexa estudos das mais diversas doenças, mantido pela Biblioteca Nacional de Medicina e o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América), o “*centerwatch.com*” (empresa privada Norte Americana que indexa todos os ensaios clínicos no mundo, relacionados ou não com cancro), o “*cancer.gov*” (portal do cancro Norte Americano), o “*clinicaltrialsregister.eu*” (equivalente para estudos conduzidos na União Europeia) e, ainda, “*cancerresearchuk.org*” (o homólogo inglês do “*cancer.gov*”). Pesquisando por cancro pancreático, existem cerca de 2138, 527, 263, 316 e 20 resultados, entre estudos terminados, em curso, em recrutamento de voluntários, e a iniciar em breve, respetivamente. Pesquisando por “miRNA”, os resultados são bastante inferiores e apenas nos quatro primeiros portais (517, 13, 17 e 36 resultados, respetivamente), revelando a importância que estes marcadores começam a ter na oncologia. Contudo, uma pesquisa por “*miRNA + pancreatic cancer*” devolve ainda uma menor quantidade de resultados - apenas 5 no “*clinicaltrials.gov*” -, sendo que em 4 destes já se encontram a recrutar participantes.

5.2 Aplicações dos miRNAs no cancro pancreático

O adenocarcinoma ductal pancreático, o subtipo mais comum do cancro pancreático, é uma doença bastante heterogénea, onde mutações somáticas e da linha germinativa contribuem para o desenvolvimento e progressão deste. Estas mutações contribuem para a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e desregulação de vias sinalizadoras (23).

Alterações da expressão dos miRNAs são comuns nas neoplasias humanas, incluindo o pancreático, alterações estas que têm papel ativo nas células cancerígenas.

Perfis de expressão de miRNAs já foram retratados como tendo a capacidade de intervir no diagnóstico diferencial entre tumor maligno e pancreatite crónica e, ainda, no diagnóstico de cancro pancreático (vs tecido pancreático normal) (35). Entre doentes com cancro pancreático e controlos, os níveis de let-7d permitiram fazer a sua distinção e, não obstante, foram associados os seus níveis reduzidos a piores prognósticos (36). No que toca à deteção do cancro pancreático em estádios iniciais, verificou-se que miRNAs como 21 e 192 (ambos sobre expressos já na fase cancerígena) também se encontram com expressão aumentada nas lesões pré-cancerígenas das neoplasias intraepiteliais pancreáticas com mutações do oncogene k-ras (37).

A investigação no adenocarcinoma ductal pancreático revela que alterações na expressão dos miRNAs correlacionam-se com características deste tipo de neoplasia nomeadamente mau prognóstico (como miR-17-p, miR-21), resistência ao tratamento (como miR-21, miR-205), capacidade de invasão (miR-21), metástase (miR-10b, miR-218) e, ainda, à transição epitélio mesenquimal (miR-200-c, let-7). Estes são exemplos na qual a expressão dos miRNA se encontra diminuída. Assim, a estratégia terapêutica nestes casos passa por incrementar os níveis dos miRNAs que funcionam como supressores tumorais e que se encontram sub expressos de modo a que a função normal destes esteja restabelecida (ou seja, dificultar e suprimir a progressão de vias oncogénicas). miR-21, miR-155, miR-210, representam alguns que também se podem encontrar, por outro lado, sobre expressos e funcionam como oncomiRs associando-se, portanto, ao desenvolvimento e progressão do cancro. A terapia de inibição destes consiste em administrar oligonucleótidos anti-miRNA cuja finalidade é degradar os miRNAs que se encontram sobre expressos ou, caso não seja possível a sua degradação, prevenir que estes se associem ao mRNA alvo e, assim, seja impedida a sua translação (38).

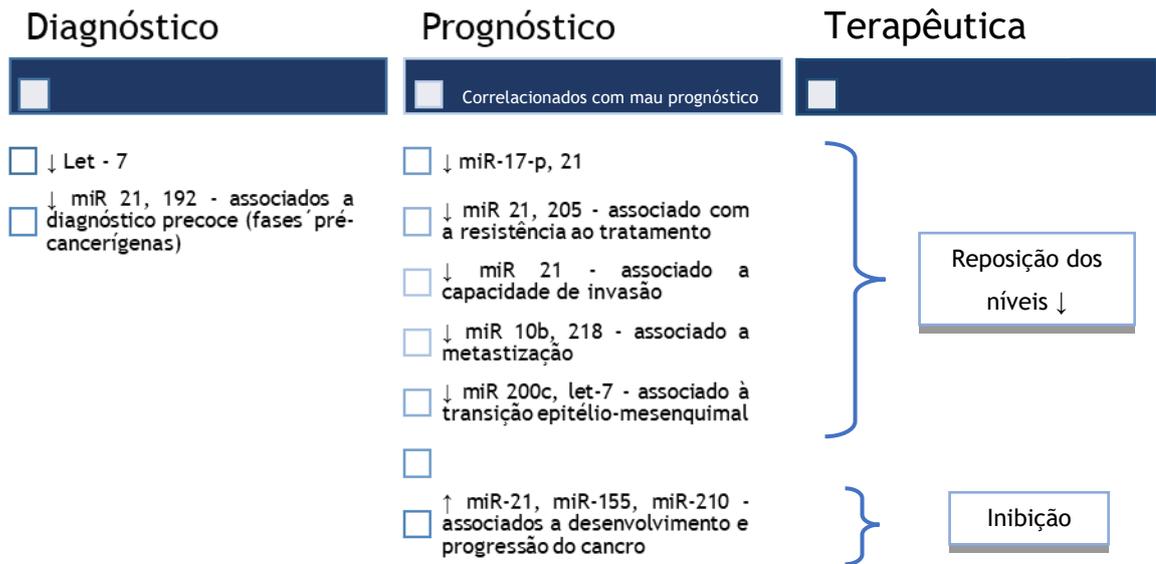


Figura 6 - MicroRNAs no cancro pancreático e suas aplicações

6. Perspetivas futuras

As particularidades do cancro pancreático prendem-se, como explanado previamente, com a dificuldade na sua deteção em fases iniciais, sendo este um dos fatores determinantes da sobrevida dos doentes. Em teoria, um diagnóstico precoce poderá traduzir-se numa resseção tumoral, relacionando-se com um melhor prognóstico para esta patologia oncológica.

Até à data, o papel supressor e oncológico dos miRNAs estão bem descritos, existindo vários estudos clínicos que descrevem os mecanismos destes marcadores. Considerando as oportunidades do miRNA em aplicações oncológicas, existem perspetivas bastante elevadas de que sejam, num futuro breve, usados em larga escala (35,38).

Um passo para essa utilização mais ampla, poderá basear-se na sua utilização como marcador de diagnóstico. Assim, será iniciado no ano de 2018 um estudo clínico da Universidade de Fudan na China, onde será pesquisado miRNA-25 em doentes com adenocarcinoma ductal pancreático, pois é esse um dos miRNAs mais específicos em cancros pancreáticos. Pretende-se com este estudo desenvolver um *kit* de deteção rápida por PCR-fluorescência (Polimerase Chain Reaction), desse miRNA de forma a rápida e facilmente se poder fazer um diagnóstico ou rastreio (39). A utilização de miRNA no tratamento de patologias já está em fases finais de testes, ainda que não em casos oncológicos. O miravirsen, é um miRNA *antisense* do miRNA humano e acabou os ensaios de fase 2 para o tratamento do vírus da hepática C (40).

Ainda que haja resultados promissores na utilização de miRNA como tratamento de patologias oncológicas do pâncreas, este tipo de tecnologia ainda não se encontra devidamente desenvolvida, pois existem dificuldades na estabilização e transmissão dos semelhantes de miRNA, mas também na estabilidade e ligação dos oligonucleótidos *antisense* (38). Outros desafios importantes prendem-se com os aumentos e otimização de doses de modelos animais para humanos, com vista à maximização da eficácia e redução da toxicidade.

No que toca à utilização de miRNAs como biomarcadores é importante ter em consideração que, apesar dos diversos estudos que têm sido realizados, há bastantes incoerências entre eles pelo que será benéfico que se estabeleça protocolos standardizados (desde a recolha da amostra, análise da mesma e normalização dos dados obtidos) de modo a posteriormente se conseguir, de forma fiável, conceber um perfil de diagnóstico através dos miRNAs (4,41).

Especificamente, no caso da deteção de cancros pancreáticos, é esperado que dentro de poucos anos, miRNA como o miRNA-21, 196, 217, 10b e 155, constantemente sobre expressos em adenocarcinomas ductais, sejam regularmente pesquisados na população, permitindo um diagnóstico e tratamento precoces (35).

7. Conclusão

O cancro caracteriza-se pela transformação de células normais em células tumorais, num fenótipo de divisão descontrolada e que deriva da desregulação de vários genes e, portanto, de uma desregulação de vários miRNAs que regulam diversos genes.

Tem-se assistido a um aumento explosivo, na última década, da investigação nos miRNAs. Envolvidos em praticamente todos os processos biológicos da célula, estes têm-se revelado como preponderantes na regulação da expressão génica.

O vislumbre de ter estas sequências não-codificantes a serem utilizados na prática clínica acarreta consigo uma mudança de paradigma onde, no caso específico do cancro pancreático, poderá possibilitar a rotura da estreita relação deste diagnóstico com elevada mortalidade. A redução da mortalidade associada a esta doença e outras patologias oncológicas através da possibilidade da realização de um diagnóstico precoce, poderá melhorar o prognóstico. Analogamente, a sua utilização como biomarcadores poderá ter um papel relevante na predição de ocorrência de metástases e outras complicações, associando-se ainda a sua potencial utilização como alvos das terapêuticas anti tumorais.

O progresso nesta área é inegável, contudo, ainda é necessária mais investigação para que os miRNAs integrem a prática clínica tanto do cancro pancreático como de outras neoplasias malignas. Entretanto, os resultados promissores derivados das investigações realizadas até então proporcionam a esperança de uma batalha vitoriosa na luta contra o cancro.

Bibliografia

1. Manuscript A. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1(Janeiro 2014):505-27.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(1):16-27. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
3. Popat K, McQueen K, Feeley TW. The global burden of cancer. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2013;27(4):399-408. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpa.2013.10.010>
4. He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim TK, et al. Current state of circulating microRNAs as cancer biomarkers. *Clin Chem.* 2015;61(9):1138-55.
5. Khoury S, Tran N. Circulating microRNAs: potential biomarkers for common malignancies. *Biomark Med.* 2015;9(2):131-51.
6. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016;14:211-22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.05.004>
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer. 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
8. Yabar CS, Winter JM. Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(3):429-45. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2016.04.003>
9. Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):38. Disponível em: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-31-38>
10. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer.* 2012;3(1):432-48.
11. Enroth S, Johansson Å, Enroth SB, Gyllensten U. Strong effects of genetic and lifestyle factors on biomarker variation and use of personalized cutoffs. *Nat Commun.* 2014;5.
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. the *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75: 843-85:843-54.
13. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.
14. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
15. Colin C. Pritchard, Evan Kroh, Brent Woo¹, Jason D. Arroyo KJD, Melanie M. Miyaji, Jonathan F. Tait and MT. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res.* 2014;5(3):492-7.

16. Kisseljov FL. MicroRNAs and cancer. *Mol Biol.* 2014;48(2):197-206. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1134/S0026893314020083>
17. Estatística IN de. Causas de Morte 2015. 2017;1-8. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=277099566&PUBLICACOESmodo=2
18. Iorio M V., Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(6):1126-33.
19. World Health Organization. Cancer. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
20. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9694-705.
21. Eurostat. World Cancer Day: 1 in 4 deaths caused by cancer in the EU. Disponível em: <http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20170203-1?inheritRedirect=true>
22. Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* 2016;381(1):269-77. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.022>
23. Sanabria Mateos R, Conlon KC. Pancreatic cancer. *Surg.* 2016;34(6):282-91. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931916000892>
24. Carrilho MJ, Craveiro M de L. A situação demográfica recente em Portugal. *Rev Estud Demográficos.* 54:57-107.
25. Singh D, Upadhyay G, Srivastava RK, Shankar S. Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2015;1856(1):13-27. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X15000359>
26. Chiaravalli M, Reni M, O'Reilly EM. Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev.* 2017;60:32-43. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.007>
27. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11(7):537-61. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=11&issue=7&spage=537>
28. Perge P, Nagy Z, Igaz I, Igaz P. Suggested roles for microRNA in tumors. *Biomol Concepts.* 2015;6(2):149-55.
29. Cheng G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:75-93. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.001>
30. Igaz I, Igaz P. Tumor surveillance by circulating microRNAs: A hypothesis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(21):4081-7.

31. Iorio M V., Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012;4(3):143-59.
32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
33. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm#1.0>
34. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.* 2014;20(8):460-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
35. Humeau M, Torrisani JÔ, Cordelier P. MiRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. *Clin Biochem.* 2013;46(10-11):933-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.019>
36. Suzuki R, Asama H, Waragai Y, Takagi T, Hikichi T, Sugimoto M, et al. Fibrosis-related miRNAs as serum biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(4):4451-60. Disponível em: www.impactjournals.com/oncotarget
37. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(28):8527-40.
38. Chitkara D, Mittal A, Mahato RI. MiRNAs in pancreatic cancer: Therapeutic potential, delivery challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:34-52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.006>
39. Yu X-J. A Clinical Validation Study on the Efficacy of MicroRNA-25 Level Detection in Assisting the Diagnosis of Pancreatic Cancer. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03432624?cond=mirna+pancreatic+cancer>
40. Hoffmann-La Roche; Santaris Pharma A/S. Long-Term Extension to a Phase 2, Open-Label, Clinical Trial of Miravirsen Sodium in Null Responders to Pegylated-Interferon Alpha Plus Ribavirin in Subjects With Chronic Hepatitis C (CHC) Virus Genotype 1 Infection. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02031133>
41. Kirschner MB, Zandwijk N van, Reid G. Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Front Genet.* 2013;4(April):1-5. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00056/abstract>