



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM CARCINOMA
HEPATOCELULAR**

Ian Barroso dos Santos

BELÉM - PA
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM CARCINOMA HEPATOCELULAR

Autor: Ian Barroso dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samia Demachki

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM- PA
2014

Ian Barroso dos Santos
Análise da expressão de miRNAs em carcinoma hepatocelular

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Oncologia e Ciências
Médicas do Núcleo de Pesquisas em
Oncologia da Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Medicina I

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Samia Demachki (orientadora)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos (orientador)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Lizomar de Jesus Maués Pereira Moia (suplente)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a
Edilson Moura Barroso (in memoriam). Parece que estou vendo aquele olhar
ímpar, brilhando de entusiasmo e orgulho por mais esta etapa concluída.
Obrigado meu avô por ter me colocado neste caminho...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ilumina a cada dia me dando coragem e resignação para perseguir as metas traçadas nesta jornada.

A minha amada filha Hanna, que pela sua simples existência, me estimula a evoluir, tornando-me um ser humano melhor.

A minha querida esposa Aldine, pelo estímulo e compreensão permanentes.

Aos meus familiares, em especial minha mãe Graça, pelo carinho e torcida constante, sempre ajudando da forma que lhe é possível.

Aos queridos pacientes, que contribuíram para a realização desta pesquisa.

A minha orientadora Samia Demachki, que, por sua competência e compromisso, contribuiu de forma decisiva na realização deste projeto.

Ao meu querido primo e orientador Ney Pereira Carneiro dos Santos, que caminhou ao meu lado durante todas as etapas deste projeto, fazendo com que o mesmo se concretizasse.

Aos grandes mestres Paulo Assumpção e Geraldo Ishak, pelos exemplos que norteiam minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Aos colaboradores Ana Anaisse, Aline Cruz, Amanda Vidal, Antônio Modesto, Igor Hamoy e Manoel Soares, sem os quais jamais teria conseguido concluir esta pesquisa.

As colegas de profissão Lizomar Moia, Simone Conde, Ivanete Amaral e Esther Miranda, pela contribuição.

A Vinícius Moraes e Tauana Kato, pela ajuda determinante na fase final deste projeto.

RESUMO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular corresponde à neoplasia maligna primária mais comum do fígado e ao quinto tumor sólido mais frequente no mundo. Altamente letal, permanece como um grave problema de saúde pública em virtude das dificuldades no diagnóstico precoce e na elaboração de medidas terapêuticas efetivas. Estudos recentes no ramo da biologia molecular sugerem que o perfil de miRNAs no carcinoma hepatocelular pode influir consideravelmente na identificação de fatores de riscos associados a oncogenes ou genes supressores. Objetivou-se avaliar a expressão de *miRNA 135b*, *miRNA 181a-5p* e *miRNA 181a-3p* em amostras de Carcinoma Hepatocelular e de Hepatite C Crônica e correlacioná-las de maneira a buscar prováveis biomarcadores relacionados ao mecanismo de carcinogênese. A investigação foi feita em seis pacientes com carcinoma hepatocelular e vinte e quatro casos de Hepatite C Crônica, procedentes do Pará, Norte do Brasil. Todas as amostras de Carcinoma Hepatocelular foram submetidas à microdissecação, para posterior extração do RNA. Para a extração do RNA total e do microRNA foi utilizado o kit *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen), quantificados pelo equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) para concentração padrão final de 5ng/μL. Em seguida cDNA foi obtido, utilizando-se *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). As análises estatísticas foram realizadas nos softwares SPSS 17.0, usando o teste de Mann-Whitney, considerando como significantes valores de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram diferenças significativas dos níveis de expressão do *miR181a-3p* e do *miR181a-5p* no carcinoma hepatocelular (médias 3,94 e 17,9, respectivamente) em relação à hepatite C crônica (médias de 1,18 e 1,8, respectivamente) com P valor de 0,005 e 0,003. Nesse estudo, observou-se que os *miRNAs 181a-3p* e *181a-5p*, especialmente o *181a-5p*, foram significativamente mais expressos nas amostras de carcinoma hepatocelular, quando comparados ao tecido hepático não tumoral com hepatite C crônica. Portanto, os microRNAs possuem características interessantes que os favorecem como possíveis marcadores biológicos no rastreamento de tumores para diagnóstico precoce e terapias alvo selecionadas.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular; hepatite C crônica; *miR-135b*; *miR-181a-3p*; *miR-181a-5p*.

ABSTRACT

EXPRESSION ANALYSIS OF miRNAs IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Hepatocellular carcinoma represents the most common primary malignancy of the liver and the fifth most common solid tumor worldwide. Highly lethal, remains a serious public health problem because of difficulties in early diagnosis and the development of effective therapeutic measures. Recent in the field of molecular biology studies suggest that define the profile of miRNAs in hepatocellular carcinoma may considerably influence the identification of risk factors associated with oncogenes and suppressor genes. The objective is to evaluate the expression of *miRNA 135b*, *miRNA 181a-5p* and *miRNA 181a-3p* in samples of Hepatocellular Carcinoma and Chronic Hepatitis C and correlate them so likely to seek biomarkers related to the mechanism of carcinogenesis. The research was done in six patients with hepatocellular carcinoma and twenty four cases of Chronic Hepatitis C, Para, northen Brazil. All samples Hepatocellular carcinoma underwent microdissection for subsequent RNA extraction. For the extraction of total RNA and microRNA All=Prep the DNA / RNA FFPE kit (quiagem), quantified by the *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) for final concentration of 5ng/μL standard equipment was used. The cDNA was obtained using *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Statistical analyzes were performed in softwares SPSS 17.0, using the Mann-Whitney test, with significat differences in the expression levels of the *miR181a-3p* and *miR 181a-5p* in hepatocellular carcinoma (average 3.94 and 17.9, respectively) compared with chronic hepatitis C (average 1.18 to 1.8, respectively) with P-value of 0.005 and 0.003. In this study, it was observed that *miRNAs 181a-3p* and *181a-5p*, especially the *181a-5p* way were significantly more highly expressed in hepatocellular carcinoma samples when compared to non-tumor liver tissue with chronic hepatitis C. Therefore, microRNAs have interesting characteristics that favor them as possible in biological screening for early diagnosis of tumors and targeted therapies selected markers.

Keywords: chronic hepatitis C; hepatocellular carcinoma; *miR-135b*; *miR-181a-3p*; *miR-181a-5p*.

FIGURAS

Figura 1. Estrutura do MicroRNA.....	26
Figura 2. Pareamento entre mRNA e microRNA	26
Figura 3. Representação esquemática da biogênese e do mecanismo de pareamento da molécula de microRNA.....	28
Figura 4. <i>Box plot</i> de comparação entre níveis de expressão do <i>miR-135b</i> no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica	50
Figura 5. <i>Box plot</i> de comparação entre níveis de expressão do <i>miR-181a-3p</i> no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica	51
Figura 6. <i>Fold Change</i> de <i>miR-181a-3p</i> expresso em hepatite C crônica ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de hepatite C crônica/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média carcinoma hepatocelular).....	52
Figura 7. <i>Fold Change</i> de <i>miR-181a-3p</i> expresso em carcinoma. hepatocelular ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de carcinoma hepatocelular/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média hepatite C crônica)	52
Figura 8. <i>Box plot</i> de comparação entre níveis de expressão do <i>miR-181a-5p</i> no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica	53
Figura 9. <i>Fold Change</i> de <i>miR-181a-5p</i> expresso em hepatite C crônica ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de hepatite C crônica/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média carcinoma hepatocelular).....	54
Figura 10. <i>Fold Change</i> de <i>miR-181a-5p</i> expresso em carcinoma hepatocelular ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de carcinoma hepatocelular/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média de hepatite C crônica).	54

TABELAS

Tabela 1. Classificação TNM para Carcinoma Hepatocelular - Tumor primário (T)..	16
Tabela 2. Classificação TNM para Carcinoma Hepatocelular- Metástase em linfonodos regionais(N)	17
Tabela 3. Classificação TNM para Carcinoma Hepatocelular – Metástase à distância (M)	17
Tabela 4. Estágios ou Grupos Prognósticos para Carcinoma Hepatocelular	17
Tabela 5. Sistema de Estadiamento BCLC para CHC	18
Tabela 6. Score de <i>Child-Pugh</i> para predição de Reserva Funcional Hepática	18
Tabela 7. Avaliação de <i>Performance Status Test</i> pela Organização Mundial de Saúde.....	18
Tabela 8. Resumo dos microRNAs significativamente hiperexpressos no Carcinoma Hepatocelular induzido pelo vírus da hepatite C	30
Tabela 9. Resumo de microRNAs significativamente hipoexpressos no Carcinoma Hepatocelular induzidos pelo vírus da hepatite C	32
Tabela 10. Frequência de mutação de genes supressores de tumor e oncogenes no Carcinoma Hepatocelular	34
Tabela 11. miRNAs de expressão alterada em Carcinoma Hepatocelular e suas características	37
Tabela 12. Perfil dos pacientes portadores de Carcinoma Hepatocelular	49
Tabela 13. Características histopatológicas do Carcinoma Hepatocelular	49

LISTA DE SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BCLC	<i>Barcelona Clinic of the Liver Cancer</i>
cDNA	DNA complementar sintetizado a partir de um RNA mensageiro
CHC	Carcinoma hepatocelular
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GIST	Tumor Estromal Gastrointestinal
HBV	Vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno do vírus da hepatite B relacionado a replicação viral
HBsAg	Antígeno Austrália de superfície do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
iRNA	RNA de interferência
miRNA	MicroRNA
miRnoma	Conjunto de todas entidades de miRNAs expressas
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificante
oncomiR	microRNA oncogênico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pré-miRNA	Molécula precursora de microRNA
pri-miRNA	microRNA primário
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido ribonucléico
siRNA	Sub-tipo de RNA de interferência
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Sistema de estadiamento tumoral
TS-miR	microRNA supressor de tumor
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Carcinoma hepatocelular	12
1.2 Genética e Câncer	23
1.2.1 EPIGENÉTICA	24
1.2.2 microRNA	25
1.2.3 microRNA E HEPATITE C CRÔNICA	29
1.2.4 microRNA E CARCINOMA HEPATOCELULAR	34
1.2.5 microRNAs: 181a E 135b	38
2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE DA PESQUISA	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivo Específicos.....	44
4 METODOLOGIA	45
4.1 Tipo de estudo	45
4.2 População de estudo	45
4.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45
4.4 Local de estudo.....	45
4.5 Extração de DNA e RNA	46
4.6 Seleção do microRNA	46
4.6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS microRNAs (miRNAs) INVESTIGADOS <i>IN SILICO</i> .	46
4.6.2 QUANTIFICAÇÃO	47
4.6.3 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA	47
4.6.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	47
4.7 Análise Estatística.....	48
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES	60
8 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma Hepatocelular

Até meados da década de 70, acreditava-se que o carcinoma hepatocelular (CHC) era doença rara, mais comumente estudada por patologistas e epidemiologistas. Com o avanço significativo nos métodos diagnósticos e o progresso no entendimento dos fatores etiológicos envolvidos, este tema passou a interessar a comunidade médica como um todo (COELHO, 2006).

Sabemos hoje, que a incidência de CHC é estimada entre 500 mil a 1 milhão de casos por ano, sendo talvez o quinto tumor mais frequente no mundo entre os homens e o nono entre as mulheres. Tal fato explica-se pela melhora nos cuidados médicos das doenças hepáticas – que permite uma maior sobrevivência dos pacientes cirróticos – e pelo crescente aumento nos casos de infecções pelo vírus da hepatite C (FEIG; BERGER; FUHRMAN, 2006).

Esta incidência, entretanto, não é uniformemente distribuída no mundo, ocorrendo com maior frequência nas regiões onde as hepatites virais são endêmicas. O carcinoma hepatocelular é muito mais comum em regiões subdesenvolvidas como algumas localidades na África (onde o tumor chega a ser o mais frequente no homem) e no sudeste asiático, principalmente em Taiwan, Moçambique e sudeste da China, com incidência estimada de 150 casos para cada 100 mil pessoas por ano (TOWNSEND et al. 2005).

Na Ásia e África, a alta incidência se deve a infecção crônica pelo vírus B, sendo a China responsável por metade dos casos novos de CHC no mundo. No Japão a maioria dos casos esta relacionada à infecção pelo vírus C ou à co-infecção pelos vírus B e C. Nos Estados Unidos e Europa, a infecção viral representa 40% dos casos, estando a maioria dos CHCs relacionadas à cirrose alcoólica e à esteato-hepatite. Na Ásia e Espanha, tem se observado uma redução nas taxas de incidência, provavelmente efeito da vacinação contra hepatite B. No Brasil, segundo dados do INCA, o carcinoma hepatocelular não figura entre os dez cânceres mais incidentes (COIMBRA et al. 2013).

Com relação ao gênero, existe clara predominância nos homens, variando de 8:1 nos países com alta prevalência de carcinoma hepatocelular a 2:1 naqueles com baixa prevalência. A maior prevalência de hepatopatias crônicas, de infecção pelo vírus B, maior exposição às toxinas ambientais e o maior consumo de etanol, bem como fatores hormonais, podem justificar esta diferença a favor do gênero masculino (TOWNSEND et al. 2005).

Na maioria dos países, a incidência aumenta com o avançar da idade devido à duração das hepatopatias causadoras do carcinoma. É descrito, por exemplo, que após o diagnóstico de cirrose por vírus da hepatite C, o risco no desenvolvimento de CHC aumenta de 3 a 8% a cada ano, com idade variando entre 55 a 65 anos ao diagnóstico. Já naqueles países de alta incidência – como em países da África e sudeste asiático –, o CHC pode se desenvolver em idades mais jovens em virtude do papel endêmico da hepatite B e sua transmissão vertical (COELHO, 2006; BRUIX et al. 2001).

A associação do CHC à cirrose está bem estabelecida, fazendo-se presente em até 80% dos casos. Independentemente do fator etiológico, é condição pré-neoplásica por tornar os hepatócitos mais susceptíveis à ação dos carcinógenos. Porém, não há dúvidas de que o fator etiológico envolvido é de grande importância, visto que o desenvolvimento tumoral é muito mais comum nas cirroses de origem viral e na hemocromatose do que nas cirroses biliar primária, da doença de Wilson dentre outras (LLOVET et al. 2000).

Além da cirrose, existem outros fatores ou cofatores implicados na hepatocarcinogênese, podendo agir isoladamente ou em conjunto. Os principais são representados pela infecção crônica com vírus da hepatite B e C, uso abusivo e continuado de etanol, substâncias químicas como nitritos, hidrocarbonetos e bifenil policlorados, dieta rica em aflatoxinas, desordens metabólicas como hemocromatose, doença de Wilson, tyrosinemia hereditária, deficiência de alfa-1 antitripsina e deficiência de glicogênio tipo I, síndrome de Budd-Chiari, polipose adenomatosa familiar dentre outras (FEIG; BERGER; FUHRMAN, 2006).

Em termos mundiais, a hepatite B corresponde ao principal fator etiológico do CHC, ao qual está associada em 50% das vezes. Isto se justifica, pois tal infecção é endêmica nos países africanos e do sudeste asiático, onde é maior a incidência deste tumor. É observada também a maior prevalência de HBsAg(+) em pacientes portadores de CHC, bem como em mães de pacientes portadores de CHC,

indicando que a transmissão vertical tem importante papel no desenvolvimento do tumor (COELHO, 2006).

A integração do DNA do vírus B no genoma do paciente é considerada um importante fator diretamente relacionado à hepatocarcinogênese, pois, tal integração pode induzir alterações e instabilidades no DNA do hospedeiro, induzindo ou facilitando o desenvolvimento tumoral. Da mesma forma, a produção de necrose, inflamação e cirrose provenientes da infecção corroboram indiretamente com a patogênese do CHC (MARRERO et al. 2003).

A presença no estudo sorológico do HBeAg(+) está relacionada a maior risco no desenvolvimento do CHC – da mesma forma que a presença da superinfecção dos vírus B e Delta –, existindo também sinergismo na hepatocarcinogênese entre vírus B e álcool e vírus B e C (MARRERO et al. 2003).

A participação etiológica do vírus C no CHC é universal e crescente no mundo inteiro, sendo superada apenas pelo vírus B. Nos países desenvolvidos, entretanto, corresponde ao principal fator etiológico do CHC (HUSSAIN et al. 2001).

Os mecanismos da hepatocarcinogênese causada pelo vírus são ainda discutíveis, mas se sabe que o vírus C não se integra ao genoma do hospedeiro, mais parecendo exercer uma ação indireta, com injúria continuada aos hepatócitos. Em virtude deste mecanismo, o intervalo entre a infecção pelo vírus C e o aparecimento do tumor é longo, sendo incomum o relato de CHC relacionado ao vírus C em crianças e muito mais comum a presença frequente de cirrose associada (>90%) (HUSSAIN et al. 2001).

Os subtipos patológicos descritos para o carcinoma hepatocelular são o nodular, geralmente envolto por cápsula e bem delimitado, o formador de massa e o difuso (mal delimitado). Esta classificação é de pouca importância na determinação do tratamento e prognóstico desta neoplasia (COIMBRA et al. 2013).

Um subtipo histológico do CHC que merece destaque corresponde ao carcinoma fibrolamelar. Esta variante rara do CHC acomete principalmente adolescentes e jovens, sendo mais comuns no sexo feminino. É considerado o principal tumor hepático primário em jovens e não apresenta elevação dos níveis séricos de alfa-fetoproteína. Radiologicamente apresentam-se como grandes massas circunscritas, ressecáveis em 50-80% das vezes, mesmo que ressecções extensas sejam necessárias, dado o parênquima hepático residual normal dos pacientes, geralmente sem cirrose (COIMBRA et al. 2013).

Com relação à via de disseminação, o CHC tende a progredir diretamente para o lúmen vascular. É rara a extensão por contiguidade para o diafragma ou cavidade peritoneal a partir da cápsula de Glisson. Logo, os locais mais comumente afetados por tal disseminação são: o sistema portal, acometendo outros segmentos hepáticos; e os linfonodos peripancreáticos e para-aórticos. A disseminação hematogênica para os pulmões consiste no próximo evento mais frequente, com invasões menos comuns de adrenais, ossos e cérebro. Porém, como o CHC é um tumor de evolução rápida, a maioria dos pacientes evolui ao óbito antes de desenvolver metástases à distância, principalmente quando ocorre cirrose associada (FEIG; BERGER; FUHRMAN, 2006).

O conhecimento da história natural da evolução do CHC tem importância na avaliação da eficiência das diferentes estratégias terapêuticas, uma vez que o prognóstico destes pacientes se encontra, em grande parte, influenciado pelo momento da realização do diagnóstico (LLOVET, 2000).

Em princípio, geralmente são tumores assintomáticos, descobertos durante exames de rotina em pacientes sabidamente cirróticos. Naqueles sintomáticos, existe um amplo espectro de manifestações clínicas que dependerá principalmente da extensão da neoplasia e do grau de comprometimento da função hepática subjacente. São sintomas frequentes: hepatomegalia, dor abdominal, fadiga, perda de peso, icterícia e ascite, dentre outros geralmente de evolução progressiva. Porém, complicações agudas – como hemoperitônio por sangramento espontâneo do tumor – também podem revelar a lesão em uma minoria dos pacientes (HUSSAIN et al. 2001).

Em termos de exames complementares, os testes de função hepática não têm valor diagnóstico no CHC, visto que a maioria dos pacientes se apresenta com alterações decorrentes da hepatopatia de base. Sua importância se revela em estratificar os pacientes quanto ao risco e benefício do tratamento proposto e ao prognóstico. É fundamental a pesquisa sorológica de infecção pelos vírus B e C quando se suspeita de CHC (TOWNSEND et al. 2005).

O diagnóstico pode ser complementado com a dosagem de marcadores tumorais. Apesar de ser o principal marcador biológico do CHC, a alfa-fetoproteína apresenta baixa sensibilidade, pois mais de 50% dos carcinomas hepatocelulares apresentam níveis normais deste marcador, principalmente quando se trata de tumores iniciais. Além disso, um pequeno aumento da alfa-fetoproteína é encontrado

em outras afecções hepáticas, reduzindo sua especificidade. Apenas 30% dos portadores de CHC apresentam níveis superiores a 100 ng/mL. Níveis superiores a 400 ng/ml associado a surgimento de nódulos detectados por métodos de imagem em pacientes cirróticos não faz mais parte dos critérios diagnósticos não invasivos do CHC (COIMBRA et al. 2013).

Quanto aos exames de imagem, a ultrassonografia é o primeiro a ser utilizado por permitir boa acurácia em mãos experientes. No entanto, não é desprezível o número de falsos-negativos devido à forma tumoral infiltrante e isoecogênica – principalmente nas lesões menores que 3 cm, em decorrência da dificuldade na distinção dos nódulos de degeneração displásicos comuns no fígado cirrótico. A utilização do doppler associado, pode acrescentar sensibilidade ao método (BEFELER et al. 2002).

A tomografia computadorizada helicoidal com análise contrastada apresenta melhor acurácia que a ultrassonografia, podendo visualizar lesões despercebidas pelo exame ecográfico. É muito útil também na classificação e estadiamento pelo sistema TNM da AJCC/UICC (Tabelas 1, 2 e 3), na caracterização dos grupos prognósticos (Tabela 4) e na elaboração do planejamento terapêutico. A ressonância nuclear magnética é útil por dispor de uma variedade de fluidos de contraste em estudos contínuos e dinâmicos. Neste exame, o CHC é melhor detectado nas sequências em T2 com um aumento na densidade heterogênea após injeção do meio de contraste, sendo hiperintenso em T2 e de sinal variável em T1. (COIMBRA et al. 2013).

Tabela1 - Classificação de Sistema de estadiamento tumoral (TNM) para Carcinoma Hepatocelular - Tumor primário (T)

Tumor Primário(T)	
Tx	Não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor solitário sem invasão vascular
T2	Tumor solitário com invasão vascular ou múltiplos tumores, nenhum >5cm
T3a	Múltiplos tumores > 5 cm
T3b	Tumor solitário ou múltiplos tumores de qualquer tamanho, envolvendo ramo principal da veia porta ou veia hepática
T4	Invasão direta de órgãos adjacentes (exceto vesícula biliar) ou perfuração do peritônio visceral

Fonte: American Joint Committee On Cancer (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC) (2010)

Tabela 2 - Classificação TNM para Carcinoma Hepatocelular - Metástase em linfonodos regionais (N)

Metástases Linfonodo Regional(N)	
Nx	Status linfonodal não pode ser acessado
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Presença de metástases linfonodais

Fonte: AJCC / UICC (2010)

Tabela 3 - Classificação TNM para Carcinoma Hepatocelular- Metástase à distância (M)

Metástase à distância(M)	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Fonte: AJCC / UICC (2010)

Tabela 4 - Estágios ou Grupos Prognósticos para Carcinoma Hepatocelular

Estágios ou Grupos Prognósticos	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
IIIA	T3a N0 M0
IIIB	T3b N0 M0
IIIC	T4 N0 M0
IVA	Qualquer T N1 M0
IVB	Qualquer T Qualquer N M1

Fonte: AJCC / UICC (2010)

Exames invasivos como arteriografia, atualmente são muito mais utilizados nos casos que exigem intervenção pré-operatória ou tratamento paliativo, em razão dos avanços no conhecimento da anatomia hepática e da melhoria dos métodos não invasivos de imagem (BEFELER et al. 2002).

O diagnóstico do CHC é determinado por critérios não invasivos de imagens ou por patologia. O diagnóstico patológico é baseado nas recomendações do painel de consenso internacional de imunocoloração para *GPC3*, *HSP70* e glutamina sintetase e ou perfis de expressão gênica (*GPC3*, *LYVE1* e survivina) são recomendados para diferenciar nódulos displásicos de alto grau de CHC em fase inicial. Coloração adicional pode ser adicionada para detectar células progenitoras (*k19* e *EpCAM*) ou avaliar neovascularização (*CD34*) (LLOVET et al. 2012).

Os critérios não invasivos diagnósticos só podem ser aplicados em pacientes cirróticos e são baseados em técnicas de imagens obtidas por tomografia computadorizada com contraste venoso, com aquisição de imagens em quatro fases, idealmente em aparelhos com multidetectores ou ressonância magnética com contraste dinâmico. A identificação do CHC baseia-se na presença de

características típicas como hipervascularização na fase arterial com lavagem (*washout*) nas fases portal e de equilíbrio. Embora apenas uma técnica de imagem ser necessária para diagnóstico em nódulos maiores que 1cm de diâmetro, uma abordagem mais conservadora com duas técnicas é recomendada nos casos de definições sub-ótimas. O papel da ultrassonografia com contraste e angiografia é controverso. PET-scan não é preciso para diagnóstico precoce do CHC (LLOVET et al. 2012).

Os sistemas de estadiamento em CHC devem definir prognóstico e direcionar tratamento. Devido a natureza do CHC, as principais variáveis de prognóstico incluem o estágio tumoral, função hepática e *performance status* dos pacientes. O sistema de estadiamento *Barcelona Clinic of the Liver Cancer* (BCLC) é recomendado para definição de tratamento e previsão prognóstica, podendo ser aplicado à maioria dos pacientes com CHC. Outros sistemas de estadiamento aplicados isoladamente ou em combinação com BCLC (Tabela 5, 6 e 7) não são recomendados na prática clínica (LLOVET et al. 2012).

Tabela 5 – Sistema de Estadiamento BCLC para CHC

Estadio	Volume Tumoral	Performance Status	Função Hepática
Muito precoce	Nódulo único < 2cm	0	Child-Pugh A
Precoce	1 nódulo < 5cm ou 3 nódulos ≤ 3cm	0	Child-Pugh A
Intermediário	Multinodular, M0	0	Child-Pugh A-B
Avançado	Invasão portal, N1, M1	1-2	Child-Pugh A-B
Terminal	-	3-4	Child-Pugh C

Fonte: Coimbra et al. (2013)

Tabela 6 – Score de *Child-Pugh* para predição de Reserva Funcional Hepática

Critério	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina (mg/dl)	1.0 – 1.9	2.0 – 3.0	> 3.0
Tempo de protrombina (INR)	< 1.7	1.7 – 2.3	> 2.3
Albumina (g/dl)	>3.5	2.8 – 3.4	< 2.8
Ascite	Ausente	Leve	Moderada a severa
Encefalopatia	Ausente	Grau 1-2	Grau 3-4

Fonte: Coimbra et al. (2013)

Tabela 7 – Avaliação de *Performance Status Test* pela Organização Mundial de Saúde

PS	Definição
0	Sem evidência clínica de doença. Paciente desenvolve suas atividades sem limitações
1	Paciente sintomático, porém ainda com capacidade de trabalhar e realizar suas atividades diárias
2	Paciente não pode trabalhar, mas consegue ter autonomia. Esta restrito ao leito < 50% do tempo diurno

3	Paciente requer atenção considerável e frequente assistência médica. Permanece > 50% do tempo diurno restrito ao leito
4	Incapacitação grave. Paciente acamado

Fonte: Coimbra et al. (2013)

O prognóstico do CHC é determinado tanto pelo estágio tumoral no momento do diagnóstico quanto pela gravidade da hepatopatia de base. Desta forma, o tratamento terá caráter de cura quando os CHCs forem pouco numerosos e de pequeno tamanho (BRUIX et al. 2001).

Por ordem de eficácia, os diferentes tratamentos com intenção curativa são o transplante hepático, as ressecções hepáticas e as terapias ablativas ou de destruição local (como radiofrequência, crioterapia e alcoolização). Nos pacientes sem condições de cura, a quimioembolização arterial hepática demonstrou eficácia paliativa na estabilização da doença de alguns pacientes. Os tratamentos com quimioterapia sistêmica ainda não demonstraram um real benefício (VARELA et al. 2003).

O transplante hepático é considerado o melhor tratamento do CHC em pacientes cirróticos, por tratar tanto o tumor quanto sua causa de base. No entanto, só pode ser realizado na ausência de doença extra-hepática e de acordo com determinados critérios de elegibilidade (VARELA et al. 2003).

É descrito que, em 20% dos diagnósticos de CHCs pequenos e pouco numerosos, a sobrevivência de pacientes transplantados foi equivalente a daqueles cirróticos sem CHC. Entretanto, lesões volumosas e multinodulares sempre demonstraram uma alta taxa de recidiva no fígado transplantado (FUSTER et al. 2005; WUDEL; CHAPMAN JUNIOR, 2003).

No intuito de otimizar o tratamento do CHC pelo transplante hepático, critérios estabelecidos por Bismuth em 1993, e modificados por Mazzaferro em 1996 (critérios de Milão), foram utilizados para determinar quais pacientes seriam mais beneficiados por esta modalidade terapêutica, concordando que a indicação de transplante deva ocorrer quando existirem no máximo 3 lesões com até 3 cm de diâmetro ou lesão única com até 5 cm de diâmetro no parênquima hepático (LLOVET et al. 2000; WUDEL; CHAPMAN JUNIOR, 2003; SAWADA et al. 2007).

Além da contra-indicação do transplante nos pacientes não enquadrados nos critérios citados, são também exemplos de contra-indicações os pacientes

portadores de trombose venosa portal, doença extra-hepática e replicação viral no caso de vírus B. A idade de 65 anos é utilizada, pela maioria das equipes, como limite ao transplante, também se fazendo necessário: uma favorável condição psíquica e de inserção social que permita o adequado uso de imunossuppressores; abstinência alcoólica há pelo menos seis meses (cirrose alcoólica); e acompanhamento regular por parte dos pacientes (COELHO et al. 2006; LLOVET et al. 2000; WUDEL;CHAPMAN JUNIOR, 2003; SAWADA et al. 2007).

Um grande obstáculo a esta modalidade terapêutica é a utilização de doador cadáver, o que dificulta a obtenção de enxertos necessários para a maioria dos pacientes necessitados. Durante o período de espera em lista, sabe-se que o risco de progressão tumoral é estimado em até 4% ao ano. Já com relação a doadores vivos – que favoreceriam esta modalidade de tratamento –, existem restrições, visto que a cirurgia está associada a 0,5% de mortalidade entre os doadores e até 20% de morbidade mesmo em centros especializados (BLUM, 2005; WUDEL;CHAPMAN JUNIOR, 2003).

Sendo assim, o transplante hepático é considerado como opção de tratamento de primeira linha para doentes enquadrados nos critérios de Milão, não sendo candidatos a ressecções hepáticas devido parênquima hepático residual inadequado para atender as necessidades fisiológicas e metabólicas. As taxas de mortalidade e morbidade aceitáveis encontram-se na faixa de 3% e até 10% respectivamente (LLOVET et al. 2012).

A expansão dos critérios de Milão para trasplantes de pacientes com lesões maiores de 5 cm, únicas e sem detecção de invasão microvascular têm sido cogitada, porém, necessita validação prospectiva (LLOVET et al. 2012).

O uso de tratamento neo-adjuvante pode ser considerado para terapia loco-regional, se a lista de espera para transplante exceder seis meses, devido aos dados de custo / eficácia e as boas taxas de resposta tumoral, embora o impacto sobre o resultado a longo prazo seja incerto (LLOVET et al. 2012).

Na sequência, as hepatectomias, que por muito foram o único tratamento com perspectiva de cura do CHC, apresentam alta morbidade com acréscimo em dez vezes na mortalidade dos pacientes cirróticos portadores de hipertensão portal. Além disso, o fígado remanescente continua propenso ao desenvolvimento de novos CHCs ou a recidivas locais (BLUM,2005; KAIBORI et al. 2007).

As ressecções hepáticas com princípios oncológicos devem abranger ao menos os segmentos portais onde as lesões estiverem localizadas, com margens adequadas. Porém, ressecções mais econômicas, e por vezes não regradas, são necessárias em virtude da cirrose subjacente que exige a máxima preservação possível de parênquima hepático (VARELA et al. 2003).

Nos grandes centros especializados em cirurgias hepáticas, a mortalidade das ressecções em pacientes cirróticos é da ordem de 5-10%, enquanto a morbidade chega a 25% em detrimento da descompensação edemato-ascítica, das infecções, hemorragia e insuficiência hepática. Para estimar tais riscos, existem os fatores pré-operatórios mensurados e classificados por *Child* (Tabela 6) e a presença de sinais ou sintomas de hipertensão portal, onde pacientes classificados como *Child* B ou C, ou portadores de varizes esofageanas, são praticamente excluídos desta modalidade terapêutica (COELHO, 2006; BRUIX et al. 2001).

As taxas de ressecabilidade em pacientes cirróticos são inferiores a 20-25%, e a sobrevida global em cinco anos varia de 30-50%, com sobrevida livre de doença de apenas 30% (WUDEL; CHAPMAN JUNIOR, 2003; LLOVET et al. 2000).

Em resumo, a ressecção é opção de primeira linha para pacientes com tumores solitários e função hepática bem preservada, definida pela classificação de Child-Pugh como A, sem hipertensão portal (gradiente de pressão venosa \leq 10mmHg) e contagem de plaquetas \geq 100.000, sendo as ressecções do tipo anatômicas as recomendadas. Indicações adicionais para pacientes com tumores multifocais, devem atender aos critérios de Milão, e, para os casos de hipertensão portal leve inadequados ao transplante, comparações prospectivas com modalidades ablativas locais devem ser realizadas (LLOVET et al. 2012).

As taxas de mortalidade peri-operatória aceitáveis para esta modalidade terapêutica encontram-se na ordem de 2-3% e o uso de tratamento neo-adjuvante e ou adjuvante não comprovou melhora na sobrevida dos pacientes submetidos a hepatectomias por CHC. Como principal complicação das ressecções, temos as recidivas tumorais no parênquima residual, devendo os pacientes, serem reestadiados de acordo com sistema BCLC para definição de retratamento (LLOVET et al. 2012).

As terapias de destruição local são menos eficazes no controle tumoral em relação às ressecções cirúrgicas. A alcoolização com etanol a 95% provoca dano tumoral por gerar necrose de coagulação. Pode ser realizada por punção percutânea

sob anestesia local e sedação. Porém, só é efetiva nas lesões menores que 3 cm, sendo necessário, na maioria das vezes, mais de uma sessão de aplicações (HUSSAIN et al. 2001; LLOVET et al. 2000).

O método de radiofrequência que utiliza agulhas com eletrodos específicos é uma técnica utilizada com auxílio de exames de imagem como ultrassonografia ou tomografia computadorizada, gerando destruição local das lesões pelo calor. Pode também ser utilizada durante procedimentos videolaparoscópicos ou durante laparotomias. Em tese, são eficazes em lesões menores de 5 cm de diâmetro, localizadas à distância dos grandes pedículos vasculares (HUSSAIN et al. 2001; LLOVET et al. 2000).

A destruição tumoral por meio de congelação, conhecida como crioterapia, utiliza temperaturas muito baixas para causar dano celular nos tumores. Da mesma forma que a radiofrequência, a crioterapia possui baixas taxas de complicações e suas principais contra-indicações são aquelas que se aplicam a qualquer procedimento de punção, como os distúrbios de coagulação e presença de ascite (LLOVET et al. 2000).

As recomendações para uso de ablação local por radiofrequência ou injeção percutânea de etanol, são para aqueles pacientes estadiados como BCLC precoces, não candidatos a cirurgia. A radiofrequência é recomendada como principal terapia ablativa devido a um controle significativamente melhor da doença. A injeção com etanol deve ser usada nos casos em que a radiofrequência não é tecnicamente viável (10-15%). Ambas as técnicas podem alcançar respostas completas em tumores < 2 cm em mais de 90% dos casos com bons resultados a longo prazo. A crioablação para uso clínico ainda encontra-se sob investigação (LLOVET et al. 2012).

A embolização intra-arterial, que utiliza lipiodol e substâncias citotóxicas como adriamicina e cisplatina, possui efeito isquêmico local além de aumentar a concentração das drogas no leito tumoral. É considerado o único tratamento paliativo capaz de estabilizar as lesões em alguns pacientes (BRUIX et al. 2001; LLOVET et al. 2000; BROWN et al. 2006).

A quimioembolização é recomendada para pacientes estadiados como BCLC intermediários, multinodulares, assintomáticos, sem invasão vascular ou disseminação extra-hepática. O uso de partículas com diluição de fármacos mostrou taxas de respostas semelhantes aos das partículas com gelfoam – lipiodol

associados com menos efeitos adversos sistêmicos. Esta modalidade deve ser desencorajada em pacientes com doença hepática descompensada, disfunção hepática avançada, invasão vascular macroscópica ou doença extra-hepática (LLOVET et al. 2012).

O tratamento sistêmico com drogas citotóxicas, tamoxifeno, acetato de megestrol, antiandrógenos, interferon-alfa e análogos da somatostatina, apresentaram resultados desanimadores até o momento, seja pela limitação clínica dos pacientes hepatopatas, seja pela refratariedade tumoral à quimioterapia (HUSSAIN et al. 2001; BRUIX et al. 2001; LLOVET et al. 2000).

O *Sorafenib* é considerado a terapia sistêmica padrão para o CHC. Esta indicado nos pacientes com função hepática preservada (Child-Pugh A) e com tumores avançados pelo estadiamento BCLC ou nas progressões após terapias loco-regionais. Não existe biomarcadores clínicos ou moleculares disponíveis para identificar os melhores candidatos ao tratamento com *Sorafenib*, nem tratamento de segunda linha aos intolerantes a esta modalidade ou ausência da mesma (LLOVET et al. 2012).

Em circunstâncias específicas, a radioterapia pode ser usada paliativamente para alívio de dor em pacientes com metástases ósseas. Para os pacientes estadiados como BCLC terminais, apenas cuidados paliativos incluindo controle algico, suporte nutricional e apoio psicológico devem ser oferecidos (LLOVET et al. 2012).

Infelizmente, os CHCs são frequentemente diagnosticados em fase avançada, quando o tratamento é incapaz de modificar a história natural da doença. Portanto, avanços recentes no ramo da biologia molecular têm ocorrido com o objetivo de identificar novos modelos de oncogenes e genes supressores, novas vias na carcinogênese do CHC e suas alterações, visando a identificação de marcadores biológicos diagnósticos e proporcionando um tratamento direcionado de maior eficácia (BRUIX et al. 2001).

1.2 Genética e Câncer

Dos cerca de 22.000 genes que compõem o genoma humano, apenas algumas centenas foram implicadas na patogenia do câncer. De maneira simplificada, essas centenas de genes podem ser divididas em três grupos funcionais: os oncogenes, os genes supressores de tumores e os genes de reparo do DNA (FRIDMAN; TAINSKY, 2008).

Atualmente, sabe-se que o câncer resulta de alterações nos mecanismos epigenéticos e genéticos, grande parte delas de caráter somático. Na maioria dos casos, essas alterações são consequências da exposição a agentes ou fatores carcinogênicos conhecidos ou desconhecidos. Com o passar do tempo, algumas das alterações podem ser reparadas, mas, se o estímulo persiste, ocorre acúmulo das alterações e transformação celular para o chamado fenótipo neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Portanto, o câncer é uma doença genética e epigenética desencadeada por alterações em genes específicos do controle celular, associados a fatores ambientais e a outras anormalidades concernentes a fatores de crescimento, fatores angiogênicos e hormonais (WEINBERG, 2006).

O mau funcionamento destes genes resulta de eventos mutacionais somáticos cumulativos, revelados por alterações moleculares, bioquímicas e celulares que conferem capacidades adquiridas e vantagens proliferativas (CROCE, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Estas características orquestram o papel governamental na transformação de células normais em tumorais devido à autossuficiência quanto ao sinal de crescimento, insensibilidade aos fatores inibitórios, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune, invasão celular e metástase, demonstrando o quão complexa é a doença neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A progressão tumoral também é marcada por alterações epigenéticas e genéticas adicionais, ocorrendo a chamada progressão clonal, ou seja, a formação de clones celulares cada vez mais diferenciados da primeira célula transformada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2.1 EPIGENÉTICA

A epigenética, em sua definição, refere-se ao estudo das mudanças herdáveis na expressão gênica, sem ocorrência de alterações na sequência primária de DNA. Muitas dessas mudanças herdáveis são estabelecidas durante a diferenciação celular e se estabilizam principalmente através dos múltiplos ciclos de divisão celular, permitindo que as células tenham características distintas, mesmo tendo as mesmas informações genéticas (IACOBUZIO-DONAHUE et al. 2009; SHARMA et al. 2010).

Este padrão de expressão herdável é mediado por modificações epigenéticas, que se dividem em quatro principais categorias: (i) metilação do DNA; (ii) alterações covalente e não covalente na estrutura das histonas; (iii) acetilação das histonas; (iv) RNAs de interferência, não codificados, como microRNAs ou miRNAs (SHARMA et al. 2010). As mudanças na estrutura da cromatina ocorrem em sua unidade básica, que se denomina nucleossomo, formado por 146 pares de bases de DNA que envolvem um octâmero de histonas (duas cópias das proteínas H2A, H2B, H3 e H4). Estas histonas possuem uma cauda rica em lisina, que se sobressai e está sujeita a modificações pós-transcricionais, como acetilação, citrulinação, fosforilação, ubiquitinação, metilação, sumoilação e ribosilação de adenosina difosfato, além da incorporação de histonas variantes e remodelamento de nucleossomos. Estas modificações atuam em conjunto para controlar a conformação da cromatina, da qual atuam na dinâmica da estrutura local, regulando a acessibilidade e o nível de compactação durante os principais processos celulares, como replicação do DNA, expressão gênica, segregação dos cromossomos durante a mitose, inativação do cromossomo X e reparo do DNA (JENUWEIN; ALLIS, 2001; SHARMA et al. 2010).

1.2.2 microRNA

Dentro do núcleo dos eucariotos, por muito tempo se considerou que a mensagem era transcrita do DNA para o RNA mensageiro, sendo traduzida no citoplasma pelos ribossomos (HE et al. 2007). No entanto, apenas uma pequena parte (2%) dos transcritos é codificador de proteínas, sendo o restante representado por transcritos não-codificantes de proteínas na célula eucariota – RNA não codificante (ncRNAs) (MATTICK, 2003).

A descoberta de um controle associado ao papel catalítico do RNA, descrito há 20 anos por Szymanski; Erdmann; Barciszewski (2003), reconfigurou um novo e convincente conceito às moléculas de RNA como participantes ativos na regulação, catálise e controle de muitas reações que definem processos fundamentais celulares, papéis que, anteriormente, eram reservados às proteínas (TAFT et al. 2010).

Inicialmente foram descritas duas categorias de RNAs pequenos implicadas na regulação da expressão gênica, definidos assim como RNAs de interferência (iRNA): (I) os miRNAs, como reguladores endogênicos dos genes; e os (II) sub-tipos de RNA de interferência (siRNAs) como defensores da integridade do genoma em resposta a invasão celular por ácidos nucleicos virais, transgênicos e de transposons (MEISTER et al. 2004). Atualmente, são conhecidas muitas moléculas de RNAs pequenas que exercem a função de controle do mecanismo de regulação gênica, assim como os que controlam estas pequenas moléculas (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 2010).

Os miRNAs (Figuras 1 e 2) são uma nova classe de RNAs endógenos unifilamentares que não codificam proteínas (ncRNA). Apresentam cerca de 18-25 nucleotídeos de tamanho, sendo capazes de degradar RNA mensageiro (mRNA) alvo e/ou reprimir a sua tradução (KIM; NAM, 2006).



Figura 1 - Estrutura do microRNA. Fonte: Lee et al. (2004)

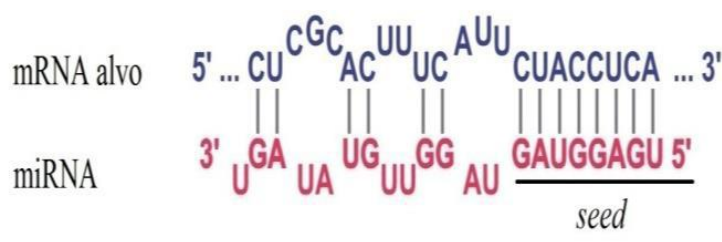


Figura 2 - Pareamento entre mRNA e microRNA. Fonte: Ribeiro-dos-Santos et al.(2010)

Os miRNAs estão distribuídos por todo genoma (KIM; NAM, 2006). Eventualmente estão alojados em *clusters*, sendo transcritos como genes policistrônicos sob controle transcricional de unidades promotoras compartilhadas ou individuais, acarretando semelhantes padrões de expressão (KIM; NAM, 2006).

Estas pequenas sequências de RNA não-codificantes se ligam à região não transcrita, 3' do RNA mensageiro (mRNA). Essa ligação entre o miRNA e o mRNA ocasiona um controle por regulação negativa pós-transcricional – definido como catalítico –, por inibição ou degradação do mRNA alvo, dependendo do grau de complementariedade no pareamento das bases (DOENCH; SHARP, 2004).

A biogênese de miRNAs caracteriza-se como um complexo e coordenado processo de múltiplos passos ainda não totalmente esclarecido, composto pela associação de diferentes grupos de enzimas e proteínas, ocorridos no núcleo e no citoplasma celular. Essa biogênese envolve etapas importantes, começando pela ação da RNA polimerase II, que transcreve o microRNA primário (pri-miRNA) a partir da molécula de DNA. Na segunda etapa, o pri-miRNA é catalisado pela RNase III endonuclease, chamada de *DROSHA*. Sob a ação da *DROSHA*, o pri-miRNA é processado em uma molécula precursora de miRNA (pré-miRNA) e contém cerca de 70 nucleotídeos. Esta etapa é conjuntamente executada pelas proteínas *dsRBD* e *DGCR8*, as quais asseguram a transformação do pri-miRNA em pré-miRNA. Posteriormente, o pré-miRNA migra do núcleo para o citoplasma ligado a *Exportin5*, onde então uma outra RNase III endonuclease, chamada *Dicer*, interage com o pré-miRNA, culminando com a formação de uma molécula de miRNA *duplex* com cerca de 22 nucleotídeos. Esta etapa também é assistida por diferentes proteínas *dsRBD*. O produto final de todas as etapas anteriores é o miRNA maduro, o qual, mediado por uma família de proteínas denominadas de *Argonautas*, originarão um complexo efetor: o *RNA-induced silencing complex* (RISC). O miRNA é incorporado ao RISC, o qual reconhecerá o(s) mRNA(s) alvo(s) para pareamento com desestabilização ou inibição do transcrito (GREENE et al. 2008).

Há dois mecanismos regulatórios pós-transcricionais distintos, apontados por ensaios sobre o mRNA alvo: clivando-o ou reprimindo-o traducionalmente. A ocorrência por um ou outro mecanismo, dependerá da interação molecular entre a extremidade 5'UTR do regulador e a extremidade 3'UTR do regulado. A interação é determinada quando a sequência chamada *seed* (2-8 nucleotídeos iniciais da

extremidade 5'UTR do miRNA) reconhece e pareia-se com mRNA alvo. Assim, observa-se que o pareamento perfeito entre as bases desencadeia a clivagem ou degradação do RNA mensageiro, enquanto o pareamento imperfeito ocasiona o silenciamento traducional (KIM; NAM, 2006) (Figura3).

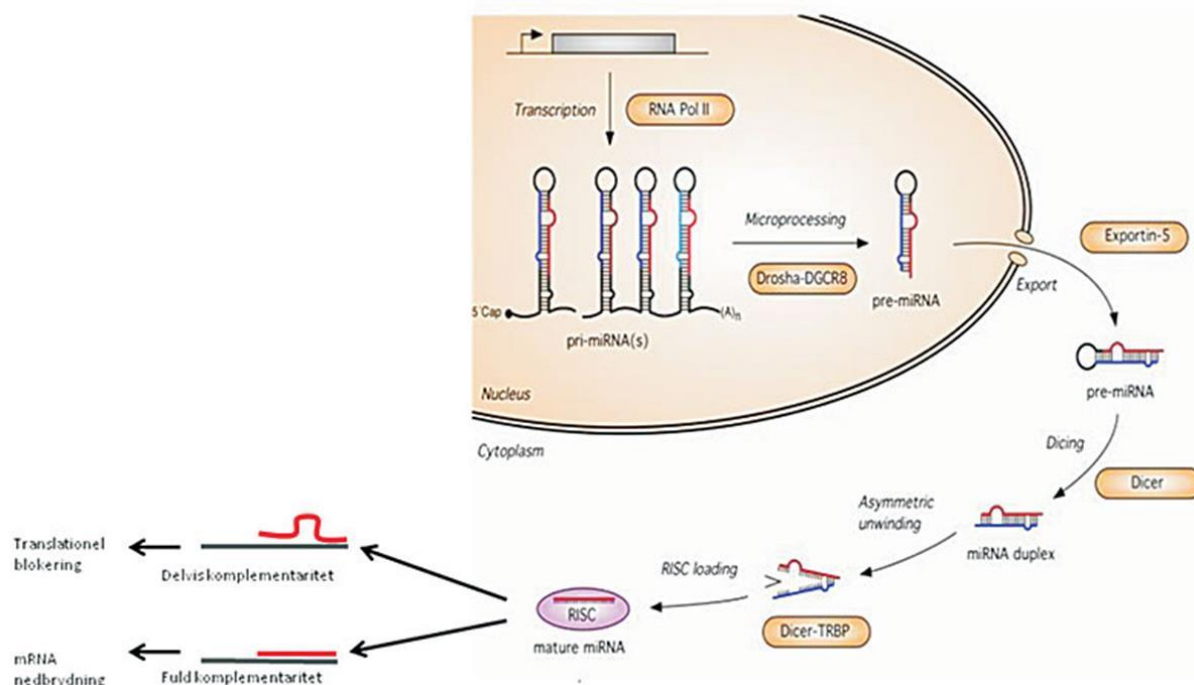


Figura 3 - Representação esquemática da biogênese e do mecanismo de pareamento da molécula de microRNA. Fonte: Sassen (2007)

Cada miRNA tem potencial para atingir um grande número de genes (em média de 500 para cada família de miRNA). Por outro lado, cerca de 60% dos mRNAs apresentam uma ou mais sequências evolutivamente conservadas que estão previstas para interagir com miRNAs. As análises de bioinformática prevêm que a região 3'UTR de um único gene é frequentemente alvo de vários miRNAs diferentes. Muitas dessas análises foram validadas experimentalmente, sugerindo a cooperação dos miRNAs para regulação da expressão gênica (KIM; NAM, 2006).

Os miRNAs apresentam papel importante na sustentabilidade regulatória de funções celulares. Logo, as alterações em seus níveis de expressão determinam alterações de função com desregulação do desenvolvimento, invasão e metástases tumorais (KIM; NAM, 2006).

Em seu processamento, os miRNAs dependem de múltiplas proteínas, tanto para sua biogênese como para sua função de regulação negativa pós-transcricional. Aberrações em qualquer dessas proteínas podem afetar a regulação gênica mediada pelos miRNAs. O reconhecimento dos miRNAs na tumorigênese despertou interesse na quantificação de miRNAs em amostras biológicas. O primeiro estudo do perfil de expressão do miRNA identificou 217 miRNAs em 334 amostras de tecidos tumorais e normais, permitindo a classificação do câncer por linhagens desenvolvidas e *status* de diferenciação mais apurado que o método baseado em mRNA (KIM; NAM, 2006).

A importância do mecanismo de regulação catalítica dos miRNAs na carcinogênese foi enfatizada pelo fato de que 50% de todos os miRNAs estudados até agora estão posicionados ou localizados em áreas denominadas de *fragile sites*, regiões do genoma onde ocorre a maioria das alterações gênicas do câncer (AQELAN; CALIN; CROCE, 2010).

Já Volinia et al. (2006) analisaram miRNAs por *microarray* em 540 amostras – sendo 363 tumores sólidos e 177 tecidos normais –, revelando o papel complexo de miRNAs envolvidos na tumorigênese por meio de uma assinatura molecular de expressão, tendo sido encontrados 36 miRNAs hiperexpressos e 21 hipoexpressos. Outros estudos posteriores associados à análise ampla do perfil do genoma de diferentes tumores sugeriram função de miRNAs como oncogenes (oncomiR), ou supressores de tumor (TS-miR) durante o desenvolvimento e progressão tumoral. Os chamados “oncomiRs” apresentam expressão aumentada em tumores, favorecendo o seu desenvolvimento ao reprimirem os genes supressores tumorais. Alternativamente, os TS-miRs estão reprimidos em tumores, permitindo o desenvolvimento tumoral (KIM; NAM, 2006).

Sendo assim, alguns miRNAs podem funcionar como supressores tumorais, e dessa forma a elevação de seus níveis torna-se indicador de bom prognóstico. Já outros miRNAs são promotores de carcinogênese, o que faz com que a expressão elevada de seus níveis esteja associada a estádios avançados de câncer (AQELAN; CALIN; CROCE, 2010).

1.2.3 microRNA E HEPATITE C CRÔNICA

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas do carcinoma hepatocelular e a prevalência desta neoplasia associada ao HCV vem aumentando no mundo inteiro. Portanto, é de particular importância a necessidade de identificar marcadores potenciais no rastreamento e diagnóstico precoce do carcinoma hepatocelular entre os indivíduos de alto risco com hepatite C crônica, assim como a necessidade de identificar moléculas alvo para prevenção e tratamento do carcinoma hepatocelular associado ao HCV (HOU; BONKOVSKY, 2013).

Pequenos RNAs não codificantes – principalmente microRNAs e longos RNAs não codificantes com tamanho superior a 200 nucleotídeos – são susceptíveis de desempenhar papéis importantes numa variedade de processos biológicos, incluindo o desenvolvimento e progressão do carcinoma hepatocelular. Para a maior parte deles, mecanismos de ação subjacentes permanecem desconhecidos. Nos últimos anos, com o avanço dos *microarray* de alta resolução e aplicação de técnicas de sequenciamento de última geração, um número significativo de RNAs não-codificantes (ncRNAs) associados com carcinoma hepatocelular, particularmente causados pela infecção pelo HCV, foram encontrados com expressão diferenciada nestes tumores. Nas Tabelas 8 e 9 estão resumidos os miRNAs mais relacionados no carcinoma hepatocelular induzido pelo HCV (HOU; BONKOVSKY, 2013).

Tabela 8 – Resumo dos microRNAs significativamente hiperexpressos no Carcinoma Hepatocelular induzido pelo vírus da hepatite C

ncRNAs	Locus gênico	Nível diferencial de expressão	Relevância clínica
miRNAs do fígado			
miR-1269	4q13.2	15,7 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-224	Xq28	10,7 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV

		infecção por HBV (n =4)], P<0,05	
miR-452	Xq28	10.1 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-224-3p	Xq28	8.1 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-221	Xp11.3	3.7 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-122	18q21.31	>2 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =43) em comparação a fígados normais (n =3); infecção por HCV associada a nódulos displásicos (n =9) fígados normais (n =3), P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-100	11q24.1	>2 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =43) em comparação a fígados normais (n =3); infecção por HCV associada a nódulos displásicos (n =9) fígados normais (n =3), P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miR-10a	17q21.32	>2 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n =43) em comparação a fígados normais (n =3); infecção por HCV associada a nódulos displásicos (n =9) fígados normais (n =3), P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzida por HCV
miRNAs na urina			
miR-625	14q23.3	> 3 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n=32) em comparação com amostras de urina normal (n=12), P<0.05	Marcador potencial para diagnóstico precoce do CHC entre os pacientes com infecção por HCV de alto risco

miR-532	Xp11.23	> 3 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n=32) em comparação com amostras de urina normal (n=12), P<0.05	Marcador potencial para diagnóstico precoce do CHC entre os pacientes com infecção por HCV de alto risco
miR-618	12q21.31	> 3 vezes maior em CHC associado à infecção por HCV (n=32) em comparação com amostras de urina normal (n=12), P<0.05	Marcador potencial para diagnóstico precoce do CHC entre os pacientes com infecção por HCV de alto risco

Fonte: Adaptado de Hou; Bonkovsky (2013)

Tabela 9 – Resumo dos microRNAs significativamente hipoexpressos no Carcinoma Hepatocelular induzido pelo vírus da hepatite C

ncRNAs	Locus gênico	Nível diferencial de expressão	Relevância clínica
miRNAs do fígado			
miR-199a-5p	19q13.3	7.2 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-199a-3p	19q13.3	6.9 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-199b-3p	19q13.3	6.2 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-214	1q24.3	5.5 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV

		infecção por HBV (n =4)], P<0,05	
miR-198	19p13.3	5 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n=43) em comparação com fígados normais (n=3), P<0.01; HCV associado a nódulos displásicos (n=9) em comparação com fígados normais (n=3), P<0.01	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-139-3p	11q13.4	4.6 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação com fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-139-5p	11q13.4	4.4 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao VHC (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-424-3p	Xq26.3	3.9 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-125a-5p	19q13	3.7 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-130a	11q12.1	2.9 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =9) em comparação a fígados normais (n =12) e a outras doenças do fígado [cirrose associada ao HCV (n =10), insuficiência hepática associada à infecção por HBV (n =4)], P<0,05	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV
miR-145	5q32	>2 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n=43) em comparação com fígados normais (n=3); HCV associado a nódulos displásicos	Molécula alvo com potencial terapêutico para prevenir CHC induzido por HCV

miRNAs da urina		(n=9) em comparação com fígados normais (n=3), P<0,05	
miR-516-5p	19q13.42	> 3 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n = 32) em comparação com amostras de urina normais (n=12), P <0.05	Marcador potencial para diagnóstico precoce do CHC entre os pacientes com infecção por HCV de alto risco
miR-650	22q11.22	> 3 vezes menor em CHC associado à infecção por HCV (n =32) em comparação com amostras de urina normais (n=12), P<0,05	Marcador potencial para diagnóstico precoce do CHC entre os pacientes com infecção por HCV de alto risco

Fonte: Adaptado de Hou; Bonkovsky (2013)

1.2.4 microRNA E CARCINOMA HEPATOCELULAR

Nos últimos vinte anos, vários estudos foram realizados para sequenciamento do genoma de portadores de carcinoma hepatocelular, com identificação de genes frequentemente mutados, como o gene supressor tumoral *TP53* e o *CTNNB1*, além de outros raramente mutados, tais quais *RB1*, *IGF2R*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *KRAS2* e *PTEN* (Tabela 10). Estas alterações são comuns a diversos tipos de tumores. Apenas um pequeno número de mutações genéticas foi identificado pela primeira vez em tumores hepáticos, sendo aquelas encontradas nos adenomas hepáticos as mais representativas (MALENSTEIN et al. 2011).

Tabela 10 - Frequência de mutação de genes supressores de tumor e oncogenes no carcinoma hepatocelular

Gene	Nome completo	Função	Taxa de mutação emHCC(%)
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	Supressor de tumor	>50
<i>CTNNB1</i>	Beta-catecin1	Oncogene	20-40
<i>AXIN1</i>	Axin 1	Oncogene	9
<i>PIK3CA</i>	Phosphoinostide-3-kinase-catalitic, alpha polypeptide	Oncogene	0-35
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1	Supressor de tumor	0-14

<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A(p16)	Supressor de tumor	6-30
<i>IGF2R</i>	Insulin-like grown factor 2 receptor	Supressor de tumor	18
<i>KRAS2</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Oncogene	<2
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog	Supressor de tumor	3

Fonte: Adaptado de Malenstein et al. (2011)

A mutação mais comumente encontrada é a do *TP53*, que o conduz à inativação. Tal mutação é observada em até 50% dos casos de carcinomas hepatocelulares. É um fenômeno raro encontrar uma associação entre a exposição às aflatoxinas B1 e uma mutação pontual no códon 249 deste gene (MALENSTEIN et al. 2011).

Mutações responsáveis pela ativação da via *Wnt- β -catenina* foram encontradas entre 20-40% dos casos de carcinomas hepatocelulares, demonstrando que a *β -catenina* é o oncogene encontrado mais frequentemente ativado nas mutações dos pacientes portadores de CHC. Esta via desempenha um papel fundamental em fenômenos fisiológicos do fígado, como a especificação da linhagem celular, diferenciação, renovação de células-tronco, proliferação e adesão celular e regeneração hepática (IMBEAUD; LADEIRO; ROSSI, 2010).

Para identificação de novos oncogenes e genes supressores, bem como novas vias alteradas na hepatocarcinogênese, diferentes abordagens baseadas no estudo molecular dos tumores hepáticos de seres humanos foram traçadas. Dentre estas abordagens, a análise do perfil de transcrições gênicas relacionadas em sub-grupos de carcinomas hepatocelulares e a identificação do perfil de microRNAs existentes nos tumores hepáticos (IMBEAUD; LADEIRO; ROSSI, 2010).

Em humanos, os *miRNomas* preditos são de 1426 microRNAs diferentes que representam 1-2% do genoma humano (31-62 Mb), e onde 30% dos mRNA são alvos de regulação por estas entidades (GRIFFITHS-JONES, 2010). Um mesmo microRNA pode parear com vários mRNA alvos, da mesma forma que um mRNA pode ser alvo de alguns microRNAs. A característica principal incide na observação

de uma expressão variada dos microRNAs em células e tecidos, de acordo com o estágio diferencial celular e estresse (XIE et al. 2010; YAO et al. 2009). Isso indica que são moléculas reguladoras centrais nos mecanismos de oncogênese, diferenciação, carcinogênese e mesmo de resposta imunológica (NAVARRO et al. 2010; WEIDHAAS, 2010; ZIMMERMAN; WU, 2011).

Nos últimos anos, muitos trabalhos focaram na descrição dos microRNAs expressos em tecidos e células em diferentes condições, como por exemplo durante a carcinogênese. Os resultados foram muito promissores e demonstraram que o perfil de expressão de microRNAs é conservado e específico a uma condição determinada – por exemplo, cada tipo de tumor apresenta um perfil de expressão de microRNAs conservado como uma assinatura (LU et al. 2005).

Os microRNAs se apresentam, conseqüentemente, como ótimos marcadores na detecção e monitoração do desenvolvimento de tumores, pois possuem muitas características interessantes que podem considerá-los como biomarcadores: 1) **especificidade**: o perfil de expressão é muito conservado numa condição ou estágio específico; 2) **sensibilidade**: as variações de expressão de microRNAs são elevadas e as técnicas de biologia molecular permitem uma dosagem precisa, resultando em uma detecção de alta sensibilidade; 3) **facilidade de implementação**: em humanos foram identificados 1426 microRNAs, quantidade bem inferior aos mRNA transcritos ou de proteínas, por isso a dosagem do painel completo de microRNAs é facilmente acessível; 4) **robustez**: os microRNAs são mais resistentes à degradação que os mRNAs e a detecção pode ser feita em amostras de biópsia fresca, congelada, mas também fixadas; 5) **não invasivos**: foi demonstrado que os microRNAs são encontrados no sistema sanguíneo e o perfil de expressão de alguns microRNAs tem correlação com o tipo, a origem e o estágio do(s) tumor(es) no organismo; 6) **personalizados**: os microRNAs podem ajudar também na personalização da identificação e dos tratamentos, pois já foram detectadas posições de polimorfismos nas sequências de microRNAs, ligados às populações ou indivíduos (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 2012).

Os microRNAs regulam negativamente a expressão de muitos genes alvos no pós-transcricional e/ou níveis de tradução e desempenham um papel crítico na iniciação e progressão do carcinoma hepatocelular. Os recentes avanços na pesquisa do carcinoma hepatocelular revelam que miRNAs regulam a expressão de vários oncogenes e genes supressores de tumor. Isto, por conseguinte, contribui

para a modulação de diversos processos biológicos, incluindo a proliferação celular, apoptose, transição epitelial mesenquimal e metástases (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013).

Análogo aos genes codificadores de proteínas, mecanismos epigenéticos como hipermetilações e modificações de histonas também regulam a expressão dos microRNAs no carcinoma hepatocelular (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013; JUNG et al. 2011; ZHANG et al. 2012).

Os microRNAs desempenham um papel essencial nos processos biológicos básicos, tais como diferenciação celular, proliferação, apoptose, migração e invasão. Os perfis de expressão de microRNAs são diferentes entre os tecidos normais e os derivados de tumores, bem como entre os derivados de tumores distintos. Genes codificadores de proteínas do ciclo celular, apoptose e metástase são alvos diretos dos microRNAs no carcinoma hepatocelular (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013; LIU et al. 2012).

Estudos com *microarray* identificaram um considerável número de microRNAs, que são regulados quer para mais, quer para menos nos carcinomas hepatocelulares (Tabela 11). A regulação para menos – ou *down-regulation* de subconjuntos de microRNAs – é um achado comum no CHC, o que indica que alguns deles devem atuar como supressores tumorais. A restauração da regulação destes microRNAs leva ao bloqueio do ciclo celular, aumento da apoptose e redução da angiogênese de tumores e das metástases através da inibição da migração celular e invasão. Contrariamente, os microRNAs que, no CHC, são regulados para mais, ou *Up-regulation*, atingem potencialmente muitos genes supressores tumorais. A supressão de oncomiRs ajuda a restaurar a expressão dos genes supressores iniciando a apoptose e inibindo a proliferação celular, a angiogênese e as metástases no CHC (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013).

Tabela 11 – miRNAs de expressão alterada em carcinoma hepatocelular e suas características

miRNAs	Alvos	Características
<i>Down-regulated</i>		
<i>miR-1</i>	<i>ET1</i>	Proliferação
<i>miRs-7a,-7b,-7c,-7d,-7f-1</i>	<i>Caspase-3, HMGA2, C-myc, Bcl-xl</i>	Proliferação, apoptose
<i>miR-101</i>	<i>Mcl-1, SOX-9, EZH2, EED, DNMT3A</i>	Proliferação, apoptose

<i>miRs-122</i>	<i>Bcl-w,ADAM-1,Wnt-1</i>	Angiogenese, apoptose, metástase
<i>miR- 125a,-125b</i>	<i>MMP11,SIRT7,VEGF-A, LIN28B2,Bcl-2,Mcl-1,Bcl-w</i>	Angiogenese, apoptose, metástase, proliferação
<i>miR-139</i>	<i>c-Fos,Rho-kinase-2</i>	Metástase
<i>miR-145</i>	<i>IRS1-2,OCT4</i>	Via do fator de crescimento semelhante a insulina,tumorigenicidade semelhante à célula tronco
<i>miR-195</i>	<i>CDK6,E2F3,cyclinD1</i>	Proliferação, apoptose, tumorigenicidade
<i>miR-199a-3p,-199-5p</i>	<i>c-Met, mTOR ,PAK4,DDR1, caveolin-2</i>	Proliferação, autofagia, metástase
<i>miRs-214</i>	<i>HDGF,catenin</i>	Proliferação, angiogenese, metástase
Up-regulated		
<i>miR-10a</i>	<i>EphA4,CADM1</i>	EMT, metástase
<i>miR-21</i>	<i>Pten,Rhob,PDCD4</i>	Resistencia a drogas, metástase
<i>miR-221</i>	<i>Bmf,DDIT4,Arnt,CDKN1B/p27, CDKN1C/p57,</i>	Angiogenese, apoptose, proliferação
<i>miR-224</i>	<i>Yin Yang 1/ Raf-1 kinase, NFkB pathways,apoptosis inhibitor-5</i>	Proliferação, apoptose, metástase

Fonte: Adaptado de Khare; Zhang; Ibdah (2013)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no microRNA e seus alvos têm sido associados com o risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Devido à rigorosa exigência de reconhecimento pelo microRNA da região de ligação no mRNA para sua transcrição gênica, é bastante concebível que os SNPs tivessem implicações funcionais na regulação pós-transcricional de genes alvos. Um SNP poderia enfraquecer microRNA alvo ou criar uma sequência para o microRNA que não fora previamente associada àquelas fornecidas pelos mRNAs (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013).

Os microRNAs controlam a expressão de muitos genes alvos no carcinoma hepatocelular. Traçar um perfil de microRNAs nestas neoplasias poderá revelar mecanismos moleculares de patogênese e descobertas na detecção e tratamento precoces destes tumores (KHARE; ZHANG; IBDAH, 2013).

1.2.5 microRNAs: 181a E 135b

Com o objetivo de identificar um biomarcador que pudesse melhorar o desempenho da alfa-fetoproteína no rastreamento precoce do carcinoma hepatocelular em pacientes cirróticos, Shanget al. (2012) encontraram elevados níveis plasmáticos de osteopontina em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular quando comparados com pacientes hepatopatas sem carcinoma. Diante disto, concluíram que a osteopontina se mostrou mais sensível no diagnóstico de carcinoma hepatocelular que a alfa-fetoproteína.

A osteopontina consiste em uma glicoproteína fosforilada, hidrófila, que existe naturalmente no meio extracelular de todo corpo e estimula uma complexa cascata de sinalização, através da ligação à αV -integrinas e a receptores *CD44*. Tem sido associada à invasão tumoral, progressão ou metástase em diversos tipos de câncer (SHANG et al. 2012).

Níveis sanguíneos elevados de osteopontina estão documentados em diversas neoplasias como câncer de próstata, mama, cabeça, pescoço, dentre outras. Entretanto, condições clínicas como sepse, doenças renais e cardiovasculares também elevam este marcador. A identificação da variante “c” da osteopontina, gerada por mecanismo de “*splicing* alternativo”, parece ter elucidado esta aparente falta de especificidade. (SIVAKUMAR; DEVARAJ, 2014).

Vale destacar que, em humanos, já havia sido descrita a existência de duas variantes de ligação da osteopontina com deleção do *exon 4* – referida como osteopontina-c – ou do *exon 5* – referida como osteopontina-b –, e a normal – que se refere como osteopontina-a. O “*splicing* alternativo” ocorre numa região da molécula que está a montante do domínio de ligação da integrina central e o carbono terminal, o domínio de ligação ao *CD44*. Surpreendentemente, a osteopontina-c tem sido encontrada elevada em praticamente todos os tipos de células neoplásicas. Este foi o ponto vital em considerá-la para subseqüentes análises na procura de biomarcadores prognósticos e para futuras abordagens na prevenção e tratamento do câncer (SIVAKUMAR; DEVARAJ, 2014).

A análise da estrutura terciária da osteopontina-c demonstrou que a seqüência *RSK* da mesma fica exposta à trombina, sendo facilmente clivada em fragmentos *N*-terminais e *C*-terminais, o que favoreceria migração celular e metástase. Além do mais, a ausência da seqüência *PDPSQKQ* na molécula da osteopontina-c impede sua polimerização pela enzima transglutaminase-2, favorecendo metástases. Por outro lado, a osteopontina-a, por seu comprimento

completo sem perda de sequências, é polimerizada pela transglutaminase-2, desfavorecendo mecanismos de adesão celular e metástases (SIVAKUMAR; DEVARAJ, 2014).

No carcinoma hepatocelular, a presença de níveis elevados desta proteína tem sido considerada como potencial biomarcador prognóstico. Assim, sua hiperexpressão mostra-se intimamente correlacionada com metástases intra-hepáticas e sua hipoexpressão relacionada com a supressão de crescimento celular do carcinoma hepatocelular via indução de apoptose (SHANG et al. 2012).

Alguns microRNAs podem ser responsáveis por uma expressão variada da osteopontina, interrompendo o seu processo traducional após ligação ao mRNA nas regiões 3' não traduzidas (UTRs). Bhattacharya et al. (2010) usando análise de *microarray*, identificaram microRNAs de interesse na regulação da expressão da osteopontina, concluindo que o *miRNA 181a* diminuiu a expressão desta glicoproteína em linhagens de células de carcinoma hepatocelular.

Dependendo da origem dos tecidos, os miRs da família 181 funcionam tanto como oncogenes quanto como supressores tumorais. Sua hiperexpressão foi observada em câncer de mama, cólon e pâncreas e sua hipoexpressão em gliomas e leucemia linfocítica crônica. No carcinoma hepatocelular, a expressão aberrante dos *miR-181* tem sido documentada, demonstrando um importante papel dos mesmos na hepatocarcinogênese (SONG; PARK; RYU, 2013).

Darnet et al. (*no prelo*), estudaram o *miRnome* em quatro tipos histológicos de câncer gástrico, selecionando os miRNAs que exibiam diferenças estatisticamente significativas nos seus perfis de expressão entre os tecidos gástricos tumorais vs sadios. Neste, foram observadas mudanças nos perfis de expressão entre ocorrência de câncer gástrico com os *miR-29c* (baixa expressão no tecido neoplásico) e *135b* (alta expressão no tecido neoplásico), colocando-os como potenciais biomarcadores para o adenocarcinoma gástrico.

Utilizando diferentes tumores, Wang et al. (2012) demonstrou hiperexpressão de *miRNA-135b* nos tecidos gástricos e maiores níveis de expressão em câncer colorretal quando comparada ao tecido saudável. Da mesma forma, a hiperexpressão deste miRNA foi observada no plasma de pacientes portadores de câncer colorretal, reforçando seu papel como possível biomarcador (NG et al. 2009). Foi ainda associada com a regulação de genes frequentemente mutados nestes tumores, como *TGFRB2*, *DAPK1*, *APC* e *HIC* (VALERI et al. 2013).

O *miR-135b* também foi implicado como regulador para o gene *c-KIT* estreitamente associado com o desenvolvimento de tumores estromais gastrointestinais (GISTs) (MARTIN et al. 2005).

No câncer de pulmão não pequenas células, o *miR 135b* apresentou elevada expressão, associada com maior capacidade invasiva e migratória de células neoplásicas *in vitro*, bem como de promoção de metástases *in vivo*, enquanto sua inibição molecular específica foi capaz de suprimir invasão de células neoplásicas, crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases em modelos animais experimentais (LIN et al. 2013). Arigoniet al. (2013) relacionaram o *miR 135b* através dos alvos moleculares *MID1* e *MTCH2*, como coordenador relevante da progressão tumoral no câncer de mama. Níveis de expressão elevados do *miR 135b* também foram observados em tecidos de osteossarcomas quando comparados às amostras de osteoblastos humanos normais, sugerindo papel na tumorigênese mesenquimal deste miRNA (LULLA et al. 2011).

Níveis elevados de *miRNA135b* foram encontrados em uma variedade de neoplasias, incluindo câncer de mama, pulmão não pequenas células, próstata, bexiga, e colón, sendo sua hiperexpressão relacionada a maior capacidade tumorigênica, e seu antagonismo relacionado à redução do número de nódulos metastáticos em modelos animais. Pesquisadores demonstraram que o *miR 135b* suprime os principais componentes da via *Hipona* – uma via serino-treoninaquinase estudada extensivamente na *Drosophilamelanogaster*, que desempenha um papel importante no crescimento desordenado, na regulação da divisão celular e na apoptose. Clinicamente, a desregulação desta via parece estar relacionada à carcinogênese nos colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares (KHATRI et al. 2013).

2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE DA PESQUISA

O carcinoma hepatocelular corresponde à neoplasia maligna primária mais comum do fígado. É o quinto tumor sólido mais frequente no mundo, apresentando alta letalidade, com taxa de incidência aproximadamente igual à taxa de mortalidade por ano, representando a terceira principal causa de morte relacionada com câncer (JEMAL et al. 2009; BOSCH et al. 2004). Entretanto, no Brasil e na região Norte, provavelmente há sub notificação de casos diagnosticados, visto que não consta entre os dez mais frequentes em ambos os sexos, nas estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2014).

A grande maioria destes tumores associa-se a uma cirrose subjacente (70-90%) ou a outra hepatopatia de base. Seus principais fatores de risco conhecidos são as infecções pelos vírus da hepatite C (HCV), da hepatite B (HBV), cirrose alcoólica, aflatoxinas e outras desordens metabólicas como hemocromatose (COELHO, 2006; HUSSAIN, 2001).

Infelizmente, terapias com intenção curativa como transplantes hepáticos, ressecções cirúrgicas e terapias ablativas locais não são viáveis na maioria dos pacientes, em virtude da dificuldade do diagnóstico precoce e das comorbidades limitantes associadas aos pacientes (BLUM, 2005).

Considerando-se que o quadro clínico dos portadores de carcinoma hepatocelular se confunde com o da própria doença de base, e que os exames de imagem e a alfa-fetoproteína – único marcador tumoral de significado clínico comprovado – possuem baixa sensibilidade para tumores menores, entende-se a necessidade do desenvolvimento de alternativas diagnósticas que contribuam para a melhoria do controle e prognóstico desta doença (COELHO, 2006).

Traçar o perfil molecular do carcinoma hepatocelular consiste em uma promissora ferramenta para predição de prognóstico, bem como individualização de tratamento (HUANG et al. 2011; MALENSTEIN, et al. 2011). A definição do genoma, incluindo o perfil de miRNAs em CHC, pode influir consideravelmente na identificação de oncogenes ou genes supressores para o desenvolvimento da doença, contribuindo para avanços em termos do desenvolvimento de marcadores de diagnóstico precoce e de terapias alvo selecionadas (IMBEAUD; LADEIRO; ROSSI, 2010; MALENSTEIN et al. 2011).

Os microRNAs possuem características interessantes que os favorecem como possíveis marcadores biológicos no rastreamento de tumores e seguimento de pacientes oncológicos. Possuem um perfil de expressão conservado em uma determinada condição clínica ou estágio, tornando-os específicos. Podem ser quantificados precisamente pelas técnicas atuais de biologia molecular, de acordo as variações de expressão, resultando em uma detecção de alta sensibilidade. Os microRNAs implicam, ainda, maior acessibilidade, visto que seu número total (para dosagem de um painel completo) é bem inferior quando comparado aos mRNAs e/ou proteínas. São mais resistentes à degradação e sua detecção pode ser realizada tanto em amostras teciduais frescas, quanto nas congeladas e nas fixadas. Ademais, os microRNAs podem ser obtidos por métodos pouco invasivos, já que são encontrados no sangue, possibilitando a individualização do diagnóstico e/ou tratamento (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de miRNAs em amostras de carcinoma hepatocelular e de hepatite C crônica de pacientes oriundos da Amazônia Oriental Brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as expressões dos *miRNA 135b*, *miRNA 181a-5p* e *miRNA 181a-3p* em amostras de carcinoma hepatocelular e de tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica.
- Correlacionar as medidas de expressão dos *miRNA 135b*, *miRNA 181a-5p* e *181a-3p* entre as amostras de carcinoma hepatocelular e de hepatite C crônica de maneira a buscar prováveis bioindicadores de hepatocarcinogênese.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal.

4.2 População de estudo

Pacientes do Estado do Pará, Região Norte do Brasil, Amazônia Oriental, procedentes da cidade de Belém ou de outros municípios do Estado. Assim, foram incluídos seis pacientes submetidos à ressecção segmentar do fígado para tratamento de carcinoma hepatocelular e vinte e quatro pacientes portadores de hepatite C crônica, atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto e Santa Casa de Misericórdia do Pará.

As informações clínicas foram obtidas a partir dos respectivos prontuários dos pacientes.

4.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Todos os pacientes e/ou familiares foram informados acerca do desenvolvimento, objetivos e relevância da pesquisa, sendo incluídos no projeto somente após assinatura do TCLE, redigido segundo normas da resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

4.4 Local de estudo

A pesquisa foi realizada no Hospital Universitário João de Barros Barreto, no Laboratório de Imuno-Histoquímica e Patologia Molecular (Faculdade de Medicina-Instituto de Ciências da Saúde) e no Núcleo de Pesquisas em Oncologia, todos da Universidade Federal do Pará.

4.5 Extração de DNA e RNA

Todas as amostras de carcinoma hepatocelular foram submetidas à microdissecção para posterior extração do RNA. Para a extração do RNA total e do microRNA foi utilizado o kit “*AllPrep DNA/RNA FFPE Kit*” (Qiagen), conforme protocolo do fabricante.

4.6 Seleção do microRNA

4.6.1 IDENTIFICAÇÃO DOS microRNAs (miRNAs) INVESTIGADOS *IN SILICO*

Estão disponíveis, no momento, algoritmos com métodos diferentes de comparação para a predição de genes alvos para miRNAs. A seleção dos miRNAs estudados foi baseada em dados públicos, a partir de parâmetros de bioinformática. Foi desenvolvido um sistema *web*, em linguagem Java, que consulta informações a respeito dos miRNAs e seus genes alvos, com base em três importantes bancos de dados públicos, o *TargetScan* (<http://www.targetscan.org>), *PiTa* (<http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/>) e o *MicroRNA.org* (<http://www.microrna.org/>). Além da consulta de alvos simultâneos nos bancos de dados previamente citados, o sistema também associa esses resultados obtidos às doenças que estão vinculadas aos respectivos genes alvos dos miRNAs em questão. Para tanto, foi utilizado o banco de dados público *GeneticAssociationDatabase* (<http://www.geneticassociationdb.nih.gov/>).

Essa abordagem de congruências de resultados de diferentes bancos de dados e filtragem por categorias de doenças facilita a compreensão do efeito dos miRNAs em diferentes doenças e, conseqüentemente, permite uma melhor compreensão das rotas metabólicas que eles regulam. Esta ferramenta é uma grande facilitadora das análises com miRNAs e foi desenvolvida pelo Laboratório de Genética Humana e Médica (setor de Bioinformática) (DUSTAN et al. 2013, não publicado).

4.6.2 QUANTIFICAÇÃO

As concentrações de miRNA foram determinadas pelo equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) para concentração padrão final de 5ng/μL.

4.6.3 REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA

Por meio desta técnica, a partir do RNA, foi obtido o DNA complementar (cDNA) já específico à região de interesse, utilizando-se um *primer* de miRNA. Foi utilizado o kit “*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription*” (AppliedBiosystems), segundo o protocolo do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C para o uso.

4.6.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Após a reação de transcriptase reversa, os cDNAs foram submetidos à reação de amplificação por qPCR para análise dos miRNAs, utilizando-se o kit “*TaqMan® Universal Master MixII*” (Life Technologies, Foster City, CA), segundo o protocolo da fabricante.

Todas as reações foram feitas em triplicata. Na mesma reação, transcreveu-se um pequeno RNA sintético (*RNU24*) que foi utilizado como endógeno, a fim de favorecer uma quantificação relativa e um NTC (reação sem amostra, para avaliar possíveis contaminações).

A análise dos resultados foi realizada por quantificação relativa, mediante o método *Threshold Cycle* (CT) comparativo.

4.7 Análise estatística

A metodologia do Δ CT foi utilizada para análise dos dados. O CT é o ponto limiar para quantificação da expressão do gene do miRNA, o qual foi definido como fração de números de ciclos em que a fluorescência passou do limite fixo estabelecido. Essa metodologia consiste no cálculo inicial das médias e do desvio padrão dos valores de CTs obtidos nas triplicatas de cada amostra (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Inicialmente, o CT de cada amostra foi determinado, e, posteriormente, obteve-se uma média entre as triplicatas com seu respectivo desvio padrão. Cada amostra foi normalizada a partir da subtração do CT médio do seu correspondente, menos CT médio do controle endógeno ($nCT = CT \text{ amostra} - CT \text{ endógeno}$). Em seguida, calculou-se $2^{-\Delta CT}$ e o respectivo *Fold Change* entre as amostras teciduais de carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Para os três miRNAs, foi realizado o *Fold Change*, dividindo o carcinoma hepatocelular pelas médias do $2^{-\Delta CT}$ da hepatite C crônica, evitando a perda de amostras.

Foi aplicada a análise de variância não paramétrica de Mann-Whitney.

Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. O teste estatístico, bem como os gráficos, foi realizado pelo *software* SPSS versão 17.0.

5 RESULTADOS

Os pacientes com carcinoma hepatocelular apresentaram idade superior a 60 anos ao diagnóstico, estando quatro deles na faixa etária de 70-79 anos e quatro pacientes do gênero masculino(66,7%), conforme apresentado na Tabela12.

Tabela 12 - Perfil dos pacientes portadores de Carcinoma Hepatocelular

Variável	Número	Frequência (%)
<i>Distribuição etária</i>		
< 50 anos	0	0
50-59 anos	0	0
60-69 anos	2	33,3%
70-79 anos	4	66,7%
<i>Gênero</i>		
Masculino	4	66,7%
Feminino	2	33,3%

Fonte: Protocolo de pesquisa

Com relação às características histopatológicas do carcinoma hepatocelular, 100% das amostras foram do tipo trabecular, grau II e sem invasão vascular e de via biliar. A maioria (66,7%) foi de tumor acima de 5 cm, unifocal, sem necrose e com margens cirúrgicas livres. Um terço dos casos apresentava cirrose hepática associada. No que refere ao estadiamento dos pacientes, a maioria apresentou estadiamento pT1 e apenas um caso apresentou pT2 (Tabela 13).

Tabela 13 - Características histopatológicas do Carcinoma Hepatocelular

Variável	Número	Frequência (%)
<i>Tamanho</i>		
< 3 cm	1	16,7%
3-5 cm	1	16,7%
> 5 cm	4	66,7%
<i>Focalidade</i>		
Unifocal	4	66,7%
Multifocal	2	33,3%
<i>Tipo</i>		
Trabecular	6	100%
Fibrolamelar	0	0
<i>Grau</i>		
I	0	0
II	6	100%
III	0	0

IV	0	0
Invasão de via biliar		
Sim	0	0
Não	6	100%
Invasão vascular		
Sim	0	0
Não	6	100%
Necrose		
Sim	2	33,3%
Não	4	66,7%
Cirrose		
Sim	2	33,3%
Não	2	33,3%
Indeterminada	2	33,3%
Margens		
Livres	4	66,7%
Comprometidas	2	33,3%
pT		
pT1	5	83,3%
pT2	1	16,6%

Fonte: Protocolo de pesquisa

A Figura 4 ilustra um *Box plot* de comparação dos níveis de expressão do *miR135b* entre carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Os dados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, sendo as médias obtidas para carcinoma hepatocelular de 0,625 e para hepatite C crônica de 1,04 (P valor = 0.975).

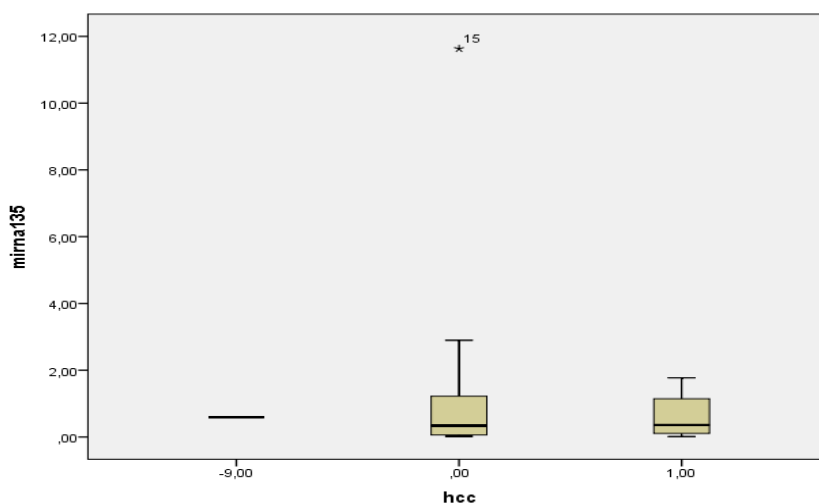


Figura 4 – *Box plot* de comparação entre níveis de expressão do *miR-135b* no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Fonte:Protocolo de pesquisa

A Figura 5 ilustra um *Box plot* de comparação dos níveis de expressão do *miR181a-3p* entre carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Os dados apontam diferenças significativas entre os grupos de pacientes, sendo as médias obtidas para carcinoma hepatocelular de 3,94 e para hepatite C crônica de 1,18 (P valor=0,005).

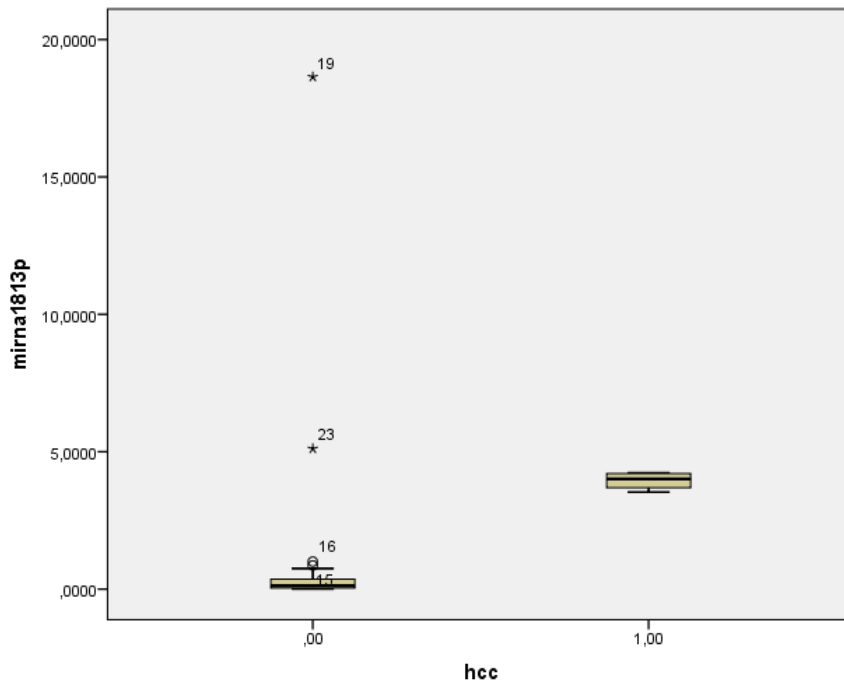


Figura 5 - *Box plot* de comparação entre níveis de expressão do *miR-181a-3p* no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Fonte:Protocolo de pesquisa

A análise, com *Fold Change*, das diferenças entre $2^{-\Delta CT}$ do *miR-181a-3p* da hepatite C crônica (Figura 6) e $2^{-\Delta CT}$ da média de carcinoma hepatocelular apresentou, para cada amostra, valores inferiores a um – com exceção dos pacientes 19 e 23, que apresentaram alta expressão.

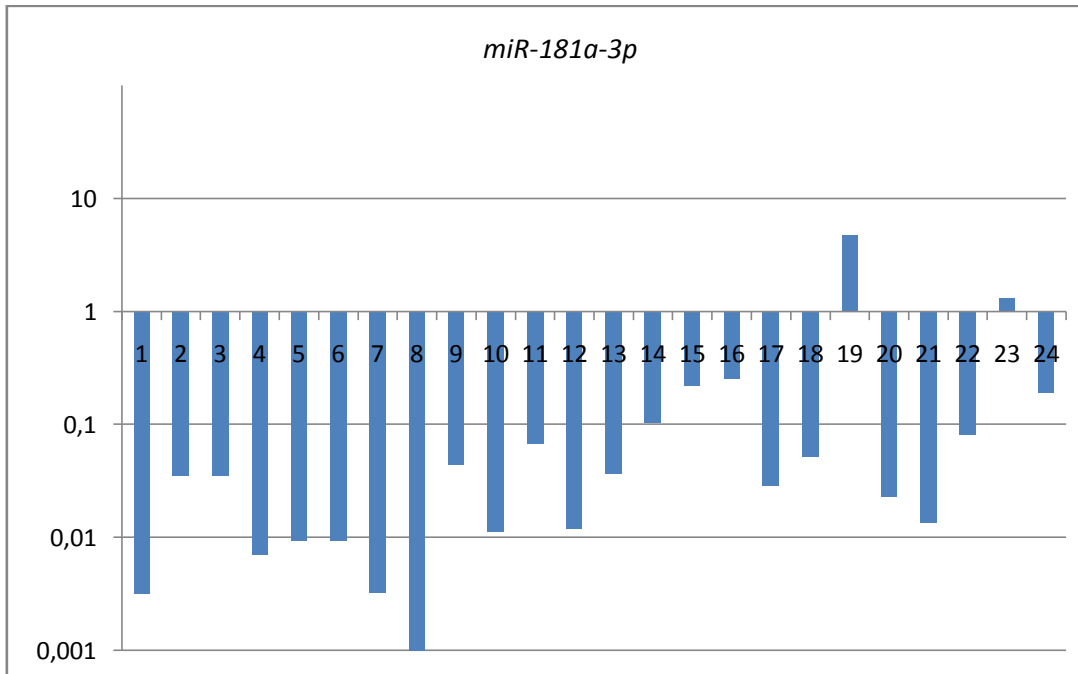


Figura 6 – *Fold Change* de *miR-181a-3p* expresso em hepatite C crônica ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de hepatite C crônica/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média carcinoma hepatocelular). Fonte: Protocolo de pesquisa

A análise, com *Fold Change*, das diferenças entre $2^{-\Delta\text{CT}}$ do *miR-181a-3p* do carcinoma hepatocelular (Figura 7) e $2^{-\Delta\text{CT}}$ da média de hepatite C crônica apresentou, para cada amostra, valores superiores a um.

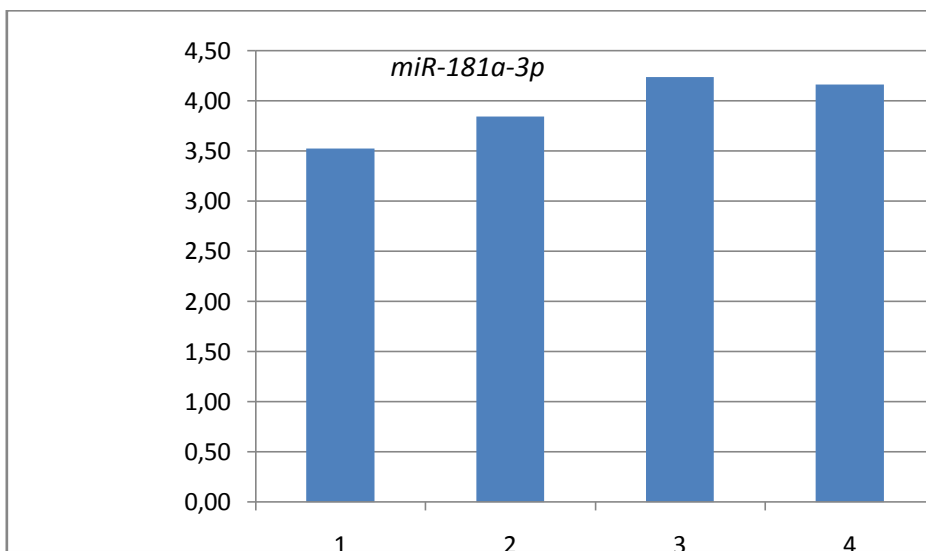


Figura 7 – *Fold Change* de *miR-181a-3p* expresso em carcinoma hepatocelular ($2^{-\Delta\text{CT}}$ de carcinoma hepatocelular/ $2^{-\Delta\text{CT}}$ média hepatite C crônica). Fonte: Protocolo de pesquisa

A figura 8 ilustra um *Box plot* de comparação dos níveis de expressão do *miR181a-5p* entre carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Os dados apontam diferenças significativas entre os grupos de pacientes, sendo as médias obtidas para carcinoma hepatocelular de 17,9 e para hepatite C crônica de 1,8 (P valor= 0,003).

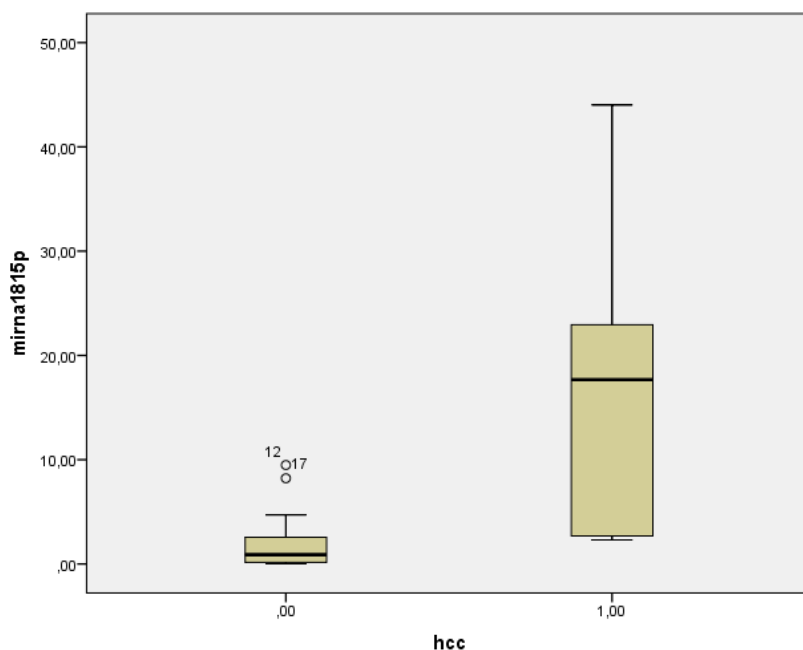


Figura 8 - *Box plot* de comparação entre níveis de expressão do *miR-181a-5p* no carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica. Fonte: Protocolo de pesquisa

A análise, com *Fold Change*, das diferenças entre $2^{-\Delta CT}$ do *miR-181a-5p* (Figura 9) de hepatite C crônica e $2^{-\Delta CT}$ da média de carcinoma hepatocelular, apresentou valores, para cada amostra, inferiores a um.

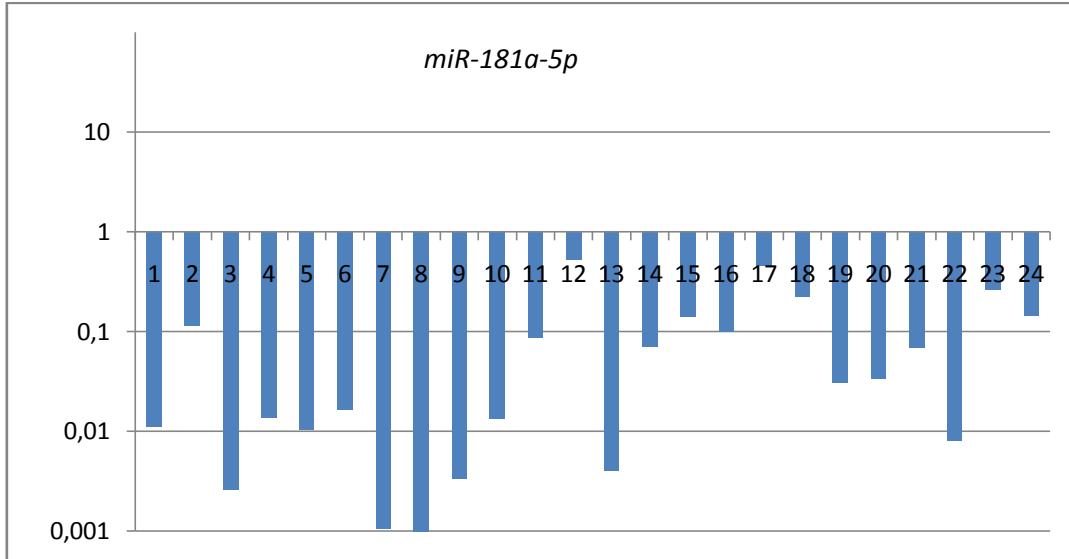


Figura 9 – *Fold Change* de *miR-181a-5p* expresso em hepatite C crônica ($2-\Delta\text{CT}$ de hepatite C crônica/ $2-\Delta\text{CT}$ média carcinoma hepatocelular). Fonte: Protocolo de pesquisa

A análise, com *Fold Change*, das diferenças entre $2-\Delta\text{CT}$ do *miR-181a-5p* do carcinoma hepatocelular (Figura 10) e $2-\Delta\text{CT}$ da média de hepatite C crônica, apresentou valores, para cada amostra, superiores a um.

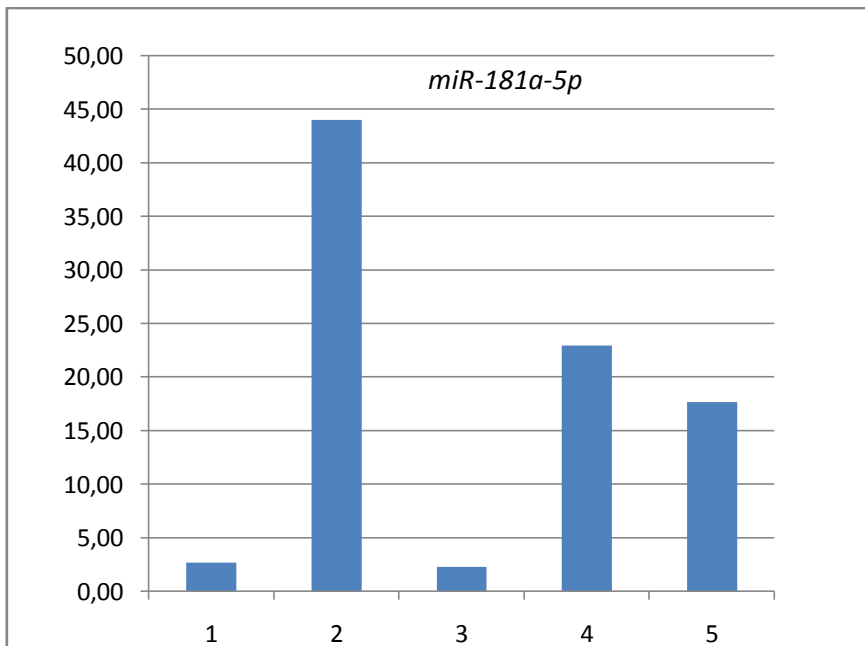


Figura 10 – *Fold Change* de *miR-181a-5p* expresso em carcinoma hepatocelular ($2-\Delta\text{CT}$ de carcinoma hepatocelular/ $2-\Delta\text{CT}$ média de hepatite C crônica). Fonte: Protocolo de pesquisa

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas as expressões dos *miRNAs 181a-3p*, *181a-5p* e *135b* em amostras de carcinoma hepatocelular e de fígados com hepatite C crônica. Posteriormente, foram correlacionadas as medidas de expressão dos respectivos *miRNAs* entre as amostras.

Os *miRs* da família 181 funcionam tanto como *oncomiRs*, quanto como supressores tumorais, dependendo da origem dos tecidos onde se encontram, dos genes alvos e vias alteradas e de polimorfismos associados. Sua hiperexpressão é descrita em neoplasias malignas de mama, colón e pâncreas, e sua hipoexpressão observada em glioma e leucemia linfocítica crônica (SONG; PARK; RYU, 2013).

Evidências recentes mostram que polimorfismos genéticos em sítios de ligação de *miRNAs* podem alterar a força de ligação do *miRNA* e sua regulação pós-transcricional. Linet al. (2013) demonstraram que o *miR-181* e seu gene alvo *MTMR3* desempenham importante papel na carcinogênese gástrica. Além disso, os polimorfismos relacionados aos *miRNAs*, especialmente aqueles presentes nos seus respectivos sítios de ligação, constituem uma nova fonte de suscetibilidade ao câncer humano.

Parikhet al. (2013) demonstraram que o *miR-181* promove transição epitelial-mesenquimal via repressão de seu alvo funcional *Smad7*, com sinalização do *TGFβ* na via de carcinogênese do tumor seroso papilífero ovariano de alto grau. Sua expressão esteve associada com menor tempo de sobrevida livre de doença e com pior prognóstico em pacientes com câncer de ovário. Além disso, a expressão ectópica do *miR-181a* resultou em um aumento da sobrevivência celular, migração, invasão, resistência a drogas e disseminação tumoral.

O desenvolvimento de metástases em pacientes portadores de melanoma uveal, seguidos no estudo de Achberger et al. (2014) esteve associado com mudanças na regulação imune tumoral e na expressão plasmática de *microRNAs* reguladores, como o *miR 181a*.

Liu M. et al. (2013) aventaram que o *miR-181a* via gene alvo *TWIST1* pode desempenhar um importante papel no controle da quimiorresistência à cisplatina,

com estímulo à transição epitelial-mesenquimal celular e aumento do potencial metastático de carcinoma espinocelular de língua.

Os resultados de estudo realizado por Jianwei et al. (2013) mostraram que o *miR-181a* foi hiperexpresso em células de osteossarcoma quando comparado com células osteoblásticas de tecido humano. Isto sugere que o *miR-181a* possa facilitar a proliferação e invasão celular e suprimir a apoptose de células de osteossarcoma, podendo se tornar um alvo no tratamento desta neoplasia.

As análises *in vitro* de Nishimura et al. (2012) revelaram que a hiperexpressão do *miR-181a* reprimiu a expressão do gene supressor (*PTEN*) localizado no cromossomo 10 no mRNA. Estes achados indicam que a expressão deste miRNA possa ser considerada um novo fator prognóstico independente para pacientes portadores de carcinoma colorretal.

Os pesquisadores Zhang et al. (2012) apontaram o gene *KLF6* como alvo direto do *miR-181a*, fazendo deste miRNA um provável oncomir na carcinogênese gástrica.

Asquith et al. (2013) observaram que o consumo crônico de etanol modifica significativamente tanto a imunidade celular, quanto a periférica, podendo esta desregulação ser mediada por alterações na expressão de miRNAs, como o *181a*.

Em contraposição, segundo Pichler et al. (2013), a baixa expressão do *miR-181a* esteve significativamente associada com pior diferenciação celular no carcinoma colorretal. Estes autores demonstraram redução da sobrevida em pacientes com baixa expressão do referido microRNA. Neste presente estudo, a baixa expressão de *miR-181a* foi também associada a pior *status performance* dos pacientes portadores de carcinoma colorretal, *KRAS* selvagem tratados com inibidores da *EGFR*.

Segundo pesquisa de He et al. (2007), o *miR-181a* inibiu a expressão dos genes *MAP2K1*, *MAPK1* via *Snai2* no carcinoma adenoide cístico de glândula salivar, reduzindo seu potencial metastático.

O *miR-181a* pode funcionar como um supressor do carcinoma de células escamosas da cavidade oral, tendo como alvo o oncogene *KRAS*. Desta forma, Shin et al. (2011) concordam que o mesmo deva ser considerado como alvo para aplicação terapêutica.

A detecção do *miR-181a* pode direcionar o tratamento quimioterápico neoadjuvante em câncer de mama pouco invasivo, porque o *miR181a* aumenta

apoptose induzida pela adriamicina através da supressão da expressão de *Bcl-2*, por formar emparelhamento de bases imperfeito com a extremidade 3'UTR deste gene, de modo que uma relação inversa entre este miRNA e *Bcl-2* em nível celular foi observada por Zhu et al. (2013).

Xie et al. (2013) fornecem evidências do efeito anti-inflamatório do *miR-181a*, que é mediado, ao menos em parte, pela *dow-regulation* da *IL1A* em ratos e em monócitos/macrófagos humanos.

A hiperexpressão de *miR-181a* bloqueia a ativação da via de sinalização *TGFβ* e causa a regulação negativa dos genes alvos *TGFβR1* e *TGFβRAP1* no mRNA e em suas respectivas expressões de proteínas. Liu et al. (2012) demonstraram que o *miR-181a* consiste em um importante regulador endógeno de proliferação celular com propriedades imunossupressoras das células mesenquimais primitivas.

O *miR181* reduziu a expressão da osteopontina em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular após ligação ao mRNA respectivo. Segundo Bhattacharya et al. (2010), este mecanismo pode interferir em características metastáticas do carcinoma hepatocelular. Isto ocorre porque a regulação da osteopontina pelo *miR181a* proporciona um novo mecanismo de supressão de metástases em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular, já que esta proteína estimula uma cascata de sinalização através da sua ligação à *αV-integrinas* e a receptores *CD44*, culminando com o aumento da capacidade de infiltração tumoral, progressão de doença e disseminação metastática. A subsequente investigação desta via e potencial de manipulação de expressão da osteopontina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para os carcinomas hepatocelulares mais agressivos que expressem esta proteína.

Se considerados os resultados publicados por Shang et al. (2012), no que concerne a maior sensibilidade da osteopontina no diagnóstico de carcinoma hepatocelular em relação a alfa-fetoproteína, pode-se entender que o *miR-181a* exerce efeito supressor na neoplasia maligna mais frequente do fígado. Entretanto, nas publicações até o presente, a hiperexpressão do *miR-181a* no carcinoma hepatocelular tem sido mais frequente que sua hipoexpressão. Isto poderia conferir ao *miR-181a* tanto um papel oncogênico – por uma via alterada ou polimorfismo em sítio de ligação ao mRNA ainda desconhecidos – quanto de supressor – tendo como racional sua elevação por mecanismo de *feed-back* negativo molecular, na tentativa

de interromper a progressão e disseminação tumoral estimulada pelo oncogene da osteopontina.

Nesse estudo, observou-se que os *miRNAs* *181a-3p* e *181a-5p*, especialmente o *miR 181a-5p*, foram significativamente mais expressos nas amostras de carcinoma hepatocelular, o que corrobora os achados de Song, Park e Ryu (2013), que conferiram à família de *miR-181a* um papel crítico na hepatocarcinogênese induzida pela via *MAPK/5-phosphatase*, e de Wang et al. (2012), que, aos miRs desta família, conferiram função de ativadores de células progenitoras hepáticas, promovendo hepatocarcinogênese ao suprimir a tradução dos genes *CDX2*, *GATA6*, *NLK* e *TIMP3*.

A escolha do *miR-135b* para análise de expressão nos tecidos de carcinoma hepatocelular neste estudo justificou-se pelos achados de Darnet et al. (no prelo), que, após análise do *miRnoma* no câncer gástrico, realizada pelo Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, encontraram uma hiperexpressão deste miRNA nos tecidos neoplásicos, inferindo-o como potencial biomarcador para o adenocarcinoma gástrico. Além do que, pesquisadores demonstraram que o *miR-135b* suprime os principais componentes da via *hipona*, uma via serino-treoninaquinase que parece estar desregulada na carcinogênese dos colangiocarcinomas e carcinomas hepatocelulares (KHATRI et al., 2013).

Níveis de *miR-135b* estão elevados em uma variedade de tumores, incluindo câncer de mama, pulmão não pequenas células, próstata e cólon. Estudo de Khatri et al. (2013), com análise de *microarray* e PCR reversa quantitativa, demonstrou hiperexpressão significativamente maior em linhagens de câncer de pulmão não pequenas células altamente invasivos, quando comparadas a linhagens menos invasivas.

Arigoni et al. (2013) identificaram o *miR-135b* e seus genes alvos *MID1* e *MTCH2* como coordenadores relevantes da progressão do câncer de mama.

Lin et al. (2013), concluíram que o *miR-135b* correspondeu a um oncomiR hiperexpresso e potencial alvo terapêutico para o câncer de pulmão não pequenas células.

Nagel et al. (2008) descobriram um mecanismo de controle da expressão do gene *APC* mediado por *miR-135a*, *miR-135b* e via *Wnt*, sugerindo sua contribuição na patogênese do câncer colorretal.

O *miR-135b* também pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal e, particularmente, pode estar correlacionado com o grau de malignidade desta neoplasia, de acordo com observações de Xu (2012).

Em estudo realizado por Munding et al. (2012), observou-se que o *miR-135b* foi candidato a biomarcador de adenocarcinoma ductal do pâncreas por estar altamente expresso em tecidos tumorais quando comparados com controles.

Segundo Lulla et al. (2011), o *miR-135b* foi significativamente hiperexpresso nos tecidos de osteossarcoma quando comparado a sua expressão em osteoblastos, já tendo sido demonstrado seu papel na diferenciação osteoblástica associada à mineralização óssea anormal.

Diferentes expressões de miRNAs no carcinoma de células escamosas da pele foram observadas por Sand et al. (2012), em especial do *miR-135b*, o qual, hiperexpresso, pode desempenhar um importante papel na patogênese destas neoplasias.

Como se percebe nas publicações supracitadas, o *miR-135b* tem sido implicado como oncomiR, hiperexpresso em diversas neoplasias. No carcinoma hepatocelular, entretanto, não existe até o momento nenhum estudo que divulgue sua maior expressão quando comparado ao tecido hepático não neoplásico. Este estudo não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do *miR-135b* em carcinoma hepatocelular, em relação ao tecido hepático com hepatite C crônica. Isto se explica tanto por não existir, realmente, relação deste miRNA com a hepatocarcinogênese, quanto pelo fato de que a agressão crônica aos hepatócitos, motivada pela infecção do vírus C, pode alterar de forma equivalente a expressão deste microRNA no tecido hepático, desfavorecendo sua condição de grupo controle.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se que os *miRNAs* *181a-3p* e *181a-5p*, especialmente o *miR 181a-5p*, foram significativamente mais expressos nas amostras de carcinoma hepatocelular, quando comparados ao tecido hepático não tumoral com hepatite C crônica.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a expressão do *miR-135b* em carcinoma hepatocelular em relação ao tecido hepático com hepatite C crônica.

A análise de expressão dos *miR-181a-3p* e *miR-181a-5p* no carcinoma hepatocelular, demonstrou que estes *miRNAs* têm potencial para uso clínico como biomarcadores em pacientes de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, como nos hepatopatas crônicos em seguimento.

8 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Visando contribuir com sugestões que possam futuramente aprofundar o conhecimento desenvolvido neste estudo, nos cabe ressaltar as limitações encontradas e as soluções propostas.

Considerando nossa pequena amostragem (24 pacientes portadores de hepatite C crônica e 6 pacientes portadores de carcinoma hepatocelular), sugerimos continuidade da análise para aumento da casuística e consolidação dos resultados.

Em relação ao miRNAs estudados, nos limitamos aos *miRs 181a-3p*, *181a-5p* e *135b* por questões financeiras, já que as sondas de miRNAs são de alto custo. A avaliação de um perfil mais abrangente de miRNAs no CHC objetivando definir o *miRnome* desta neoplasia poderia ser realizada mediante recursos obtidos por bolsas de incentivo a pesquisa fornecidas pelo governo federal ou instituições privadas parceiras ao Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará.

No que concerne ao nosso grupo comparativo não neoplásico (pacientes portadores de hepatite C crônica), cabe ressaltar não ser um grupo ideal para este fim, no momento em que a agressão crônica aos hepatócitos motivada pelo vírus C pode alterar de forma equivalente a expressão dos miRNAs, proporcionando um viés comparativo capaz de anular determinados achados de hiper / hipoexpressão. Entretanto, existe uma enorme dificuldade para aquisição de material referente a tecido hepático sadio por questões éticas, já que os procedimentos de biópsias hepáticas não são isentos de complicações, e, de um modo geral, estão indicados em pacientes portadores de algum tipo de hepatopatia.

Como perspectiva, citamos a análise dos polimorfismos de nucleotídeos únicos e dos mecanismos de *splicing* alternativos envolvidos nos genes alvos dos miRs estudados, como possíveis contribuidores para hepatocarcinogênese, a realização de estudos prospectivos em pacientes cirróticos, com dosagem simultânea de osteopontina sérica e miRNAs incriminados como possíveis marcadores, e, finalmente, estudos prospectivos que possam testá-los como alvos moleculares no CHC.

REFERÊNCIAS

ACHBERGER, S. et al. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. **Molecular Immunology**, v.58, p.182–186, 2014.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Cancer Staging Manual**. 7th ed. New York: Springer, 2010. p. 457- 464.

AQELAN, R.I.; CALIN, G.A.; CROCE, C.M. mir-15a and mir-16-1 in câncer: discovery, function and future perspectives. **Cell Death Differ**, v. 17, p. 215-220, 2010.

ARIGONI, M. et al. *hsa-miR-135b* coordinates progression of ErbB2-driven mammary carcinomas through suppression of MID1 and MTCH2. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 6, p. 2058–2070, 2013.

ASQUITH, M. et al. Chronic ethanol consumption modulates growth factor release, mucosal cytokine production, and microRNA expression in non human primates. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v**, n.*, p. 1–14, 2013.

BEFELER, A.S. et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1609-1619, 2002.

BHATTACHARYA, S.D. et al. Micro-RNA-181a regulates osteopontin-dependent metastatic function in hepatocellular cancer cell lines. **Surgery**, v. 148, p.291-297, 2010.

BLUM, H.E. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, p. 7391-7400, 2005.

BOSCH, F.X. et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v.127, S5-S16, 2004.

_____. Management of Hepatocellular Carcinoma. **AASLD Practice Guideline. Hepatology**, v. 42, n.5, p. 1208-1236, 2005.

BROWN, D.B. et al. Society of Interventional Radiology Position Statement on Chemoembolization of Hepatic Malignancies. **Journal of Vascular Intervention Radiology**, v.17, p. 217-223, 2006.

BRUIX, J. et al. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. **Journal of Hepatology**, v. 35, p. 421-430, 2001.

COELHO, J.C.U. **Aparelho digestivo: clínica e cirurgia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 1502-1536.

COIMBRA F.J.F. et al. **Câncer do Aparelho Digestivo Alto**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 83-105.

CROCE, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v. 10, p. 704–714, 2009.

DARNET, S. et al. Mirnome Reveals miRNAs with the potential to identify the occurrence of Gastric Cancer. **BMC Medical Genomics**, 2014. *No prelo*.

DOENCH, J.G; SHARP P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes Dev.**, v. 18, p. 504-511, 2004.

FEIG, B.W.; BERGER, D.H.; FUHRMAN, G.M. **The M. D. Anderson Surgical Oncology Handbook**. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 325-338.

FRIDMAN, A.L; TAINSKY, M.A. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. **Oncogene**, v. 46, p. 5975-5987, 2008.

FUSTER, J. et al. Liver transplantation in hepatocellular carcinoma – Review. **Transplant International**, v.18, p. 278-282, 2005.

GREENE, K. L. et al. Molecular Basis of Prostate Cancer. In: MENDELSON J. et al. (Org.). **The Molecular Basis of Cancer**. Philadelphia: Elsevier, 2008.

GRIFFITHS-JONES, S. Mirbase: microRNA sequence and annotation. **Current protocols in bioinformatics**. Local: Editora. 2010. Chapter 12, p. (Unit 12) 19 11-10.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, 2011.

HE, F. et al. Dynamic cumulative activity of transcription factors as a mechanism of quantitative gene regulation. **Genome Biology**, v.8, E.9, p. 2007.

HOU, W.; BONKOVSKY, H. L. Non-coding RNAs in hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma: dysregulation and implications for early detection, diagnosis and therapy. **World J Gastroenterol**, v.19, p. 7836-7845, 2013.

HUANG, S. et al. The role of microRNAs in liver cancer progression. **British Journal of Cancer**, v. 104, p. 235-240, 2011.

HUSSAIN, S.A. et al. Hepatocellular carcinoma – Review. **Annals of Oncology**, v.12, p. 161-172, 2001.

IACOBUZIO-DONAHUE, C.A. et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. **J ClinOncol**, v. 27, n. 10, 2009.

IMBEAUD, S.; LADEIRO, Y.; ROSSI, J. Z. Identification of Novel Oncogenes and Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. **Seminars in Liver Disease**, v.30, p. 75-83, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa de Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin**, v.59, p. 225-49, 2009.

JIANWEI, Z. et al. MicroRNA 181a improves proliferation and invasion, suppresses apoptosis of osteosarcoma cell. **Tumor Biol**, v.34, p. 3331–3337, 2013.

JUNG, C.J, et al. Epigenetic modulation of miR-122 facilitates human embryonic stem cell self-renewal and hepatocellular carcinoma proliferation. **Plos One**, v.6, p. e27740, 2011.

KAIBORI, M. et al. A review of prognostic factors in patients with recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma. **The American Journal of Surgery**, v.193, p. 431-437, 2007.

KHARE, S.; ZHANG, Q.; IBDAH, J.A. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: Role of microRNA. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19.i33. 5439, 2013.

KHATRI, R. et al. MicroRNA-135b and its circuitry networks as potential therapeutic targets in colon cancer. **Frontiers in Oncology**, 2013.

KIM, V.N.; NAM, J.W. Genomics of microRNA. **Trends Genet**, v. 22, n. 3, 2006.

LEE, Y. et al. MiRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **Embo Journal**, v.23, n.20, p. 4051-4060, 2004.

LIN, C.W. et al. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. **Nature Communications**, v. 4, n. 1877, p. 1-14, 2013.

LIU, L. et al. MicroRNA-181a Regulates Local Immune Balance by Inhibiting Proliferation and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v.30, p. 1756–1770, 2012.

LIU, M. et al. miR-181a–Twist1 pathway in the chemoresistance of tongue squamous cell carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, p. 364–370, 2013.

LLOVET, J.M. et al. Nonsurgical Treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Liver Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 11-15, 2000.

_____. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 599-641, 2012.

LU, J. et al. microRNA expression profiles classify human cancers. **In Nature**, v. 435, p. 834-838, 2005.

LULLA R. R. et al. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Osteosarcoma. **Sarcoma**, 2011.

MALENSTEIN, H. et al. Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. **European Journal of Cancer**, v. 47.p. 1789-1797, 2011.

MARRERO, J.A. et al. Hepatocellular carcinoma. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 19, p. 243-249, 2003.

MARTÍN, J. et al. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). **J Clin Oncol**, v.23, p. 6190–6198, 2005.

MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **Bioessays**, v. 25, p. 930-939, 2003.

MEISTER, G. et al. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, p. 343-349, 2004.

MUNDING, J.B. et al. Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. **International Journal of Cancer**, v.131, p. 86–95, 2012.

NAGEL, R. et al. Regulation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene by the miR-135 Family in Colorectal Cancer. **Cancer Research**, v.68, p. 5795-5802, 2008.

NAVARRO, A. et al . MicroRNAs in Human Embryonic and Cancer Stem Cells. **Yonsei Med J**, v. 51, p. 622-632, 2010.

NG, E.K. et al. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients: a potential marker for colorectal cancer screening. **Gut**, v. 58, p.1375–1381, 2009.

NISHIMURA, J. et al. microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer. **Oncology Reports**, v.28, p. 2221-2226, 2012.

PARIKH, A. et al. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial–mesenchymal transition. **Nature Communications**, v. 5, p. 2977, 2013.

PICHLER, M. et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor. **JCP Online First**, 2013.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K; CRUZ, A. M. P.; DARNET, S. Deep Sequencing of MicroRNAs in Cancer: Expression Profiling and Its Applications. In: MALLICK, B.

Regulatory RNAs. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, chapter 21, p. 523-546.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. et al. Ultra-Deep Sequencing Reveals the microRNA Expression Pattern of the Human Stomach. **Plos One**, 2010.

SAND, M. et al. Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell Carcinoma. **Journal of Dermatological Science**, v. 68, p. 119–126, 2012.

SASSEN, S.; MISKA, E.A.; CALDAS, C. MicroRNA—implications for câncer. **Virchows Arch**, v. 452, p.1–10, 2008.

SAWADA, T. et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. **Digestive Surgery**, v. 24, p. 126-130, 2007.

SIVAKUMAR, S; DEVARAJ, S.N. Tertiary structure prediction and identification of druggable pocket in the cancer biomarker – Osteopontin-c. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.13, p., 2014.

SHANG, S. et al. Identification of Osteopontin as a Novel Marker for Early Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 55, p. 483-490, 2012.

SHARMA, V. et al. The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 928-936, 2010.

SHIN, K.H. et al. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by down regulating K-ras. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, p. 896–902, 2011.

SONG, M.K.; PARK, Y.K.; RYU, J.C. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated up regulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, p. 130-139, 2013.

SZYMANSKI, M.; ERDMANN, V.A.; BARCISZEWSKI, J. Noncoding regulatory RNAs database. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 429–431, 2003.

TAFT, R.J. et al. Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, p. 1030-1034, 2010.

TOWNSEND, C.M. et al. **Tratado de cirurgia: a base biológica da prática cirúrgica moderna.** 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1548-1553.

VALERI, N. et al. microRNA-135b promotes cancer progression acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **The Lancet**, v. 381, p. S17, 2013.

VARELA, M. et. al. Treatment of hepatocellular carcinoma: is there an optimal strategy? **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 99-104, 2003.

VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **PNAS**, v.103, n. 7, p. 2257–2261, 2006.

WANG M, Gu.et al. Circulating miR-17-5p and miR-20a: Molecular markers for gastric cancer. **Mol Med Report**, v.5, p.1514-1520, 2012.

WEIBERG, R. et al. **The Biology of Cancer**. London: Garland Science, 2006.

WEIDHAAS, J. Using microRNAs: using microRNAs to understand cancer biology. **Lancet Oncol**, v.11, n.2, p. 106-107, 2010.

WUDEL, L.J.; CHAPMAN JUNIOR, W.C. Indications and limitations of liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v.12, p. 77-90, 2003.

XIE, L. et al. microRNAs: novel biomarkers for gastrointestinal carcinomas. **Mol Cell Biochem**, v.341, p.291-299, 2010.

XIE, W. et al. miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. **Plos One**, v.8, p. 58639, 2013.

XU, X.M. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. **Oncology Letters**, v .4, p.339-345, 2012.

YAO, Y. et al. MicroRNA Profiling of Human Gastric Cancer. **Molecular Medecine Reports**, 2: p. 963-970, 2009.

ZHANG, X. et al. MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. **Tumor Biol**, v.33, p.1589–1597, 2012.

ZHU, Y. et al. The Function Role of miR-181a in Chemosensitivity to Adriamycin by Targeting Bcl-2 in Low-Invasive Breast Cancer Cells. **Cell Physiol Biochem**, v.32, p.1225-1237, 2013.

ZIMMERMAN, A.L.; WU, S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. **Cancer Lett**, v.300, p.10-19, 2011.