EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

RNA NÃO CODIFICANTES E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Trabalho submetido por

Inês Alexandra Coelho Parreira

para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

novembro de 2024

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

RNA NÃO CODIFICANTES E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Trabalho submetido por

Inês Alexandra Coelho Parreira

para a obtenção do grau de **Mestre** em Análises Clínicas

Trabalho orientado por

Profª Doutora Alexandra Maia e Silva

novembro de 2024

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, Profª Drª Alexandra Maia e Silva por toda a disponibilidade que sempre demonstrou, e pelos conhecimentos transmitidos.

À coordenadora do Mestrado em Análises Clínica, Profª Drª Guilhermina Moutinho pelo excelente trabalho ao longo destes dois anos, por toda a disponibilidade e paciência.

Agradeço por fim à minha família e a todos os que fizeram parte dos últimos dois anos, em especial ao meu pai, por ter investido no meu percurso académico e por nunca me deixar desistir.

Resumo

Existem dois tipos de RNA classificados de acordo com a sua capacidade de codificação, o RNA com capacidade de codificar proteínas e o RNA sem capacidade de codificar, sendo estes últimos conhecidos como RNA não codificantes (ncRNA) (Paulo *et al.*2013). O ncRNA era inicialmente visto como lixo transcricional por pertencer a uma classe de moléculas que não eram traduzidas em proteínas, porém, já foram realizados diversos estudos que comprovam a sua importância a nível biológico (Riella 2019). Esta classe de moléculas tem vindo a ser cada vez mais estudada dado o seu potencial na deteção, desenvolvimento e tratamento de alterações fisiológicas (Loganathan e Doss 2023). O RNA não codificante pode ser dividido de acordo com o seu tamanho em ncRNA curtos (sncRNA), os quais contêm 200 nucleótidos ou menos, e os ncRNA longos (lncRNA), que contêm mais de 200 nucleótidos de comprimento. Dentro da categoria dos sncRNA existem ainda os microRNA (miRNA), pequenos RNA de interferência (siRNA) e piwi-interacting RNA (piRNA) (Toden *et al.*2021). Expressões alteradas de ncRNA são encontradas inúmeras vezes associadas a doenças humanas como o cancro da mama, doenças autoimunes, Alzheimer entre outras e por este motivo acredita-se no seu potencial como biomarcadores e na contribuição do desenvolvimento de fármacos tendo como alvo os ncRNAs (Matsui e Corey 2017).

Apesar de já existirem diversos ncRNA a serem estudados como potenciais alvos terapêuticos ainda existem alguns obstáculos a superar, nomeadamente a biodisponibilidade e distribuição sistémica, uma vez que alguns ncRNA são degradados rapidamente pelas nucleases, eliminados pelos rins ou apresentam tendência para se acumularem em determinados tecidos, fatores que dificultam a chegada aos alvos pretendidos (Zhang *et al* .2021).

Palavras-chave: ncRNA, miRNA, lncRNA, cancro, terapêutica

Abstract

There are two types of RNA classifications according to their encoding capacity, RNA that encodes for proteins and RNA without coding capacity, the latter being known as non-coding RNA (ncRNA) (Paulo *et al.*2013). Initially, ncRNA were seen as transcriptional trash for belonging to a class of molecules that were not translated into proteins; however, several studies have already proven their importance at a biological level (Riella 2019). This class of molecules has been increasingly studied due to the believe in their importance in the detection, development and treatment of physiological changes (Loganathan e Doss 2023). Non-coding RNA can be divided, according to their size, in short ncRNA (sncRNA), which are normally 200 nucleotides or less, and long ncRNA (lncRNA), which are longer than 200 nucleotides. Within the sncRNA category there are also microRNA (miRNA), small interfering RNAs (siRNA) and piwi-interacting RNA (piRNA) (Toden *et al.*2021). Altered expressions of ncRNAs are discovered countless times in relation to human diseases such as breast cancer, autoimmune diseases, Alzheimer's, among others, and for this reason, many believe in their potential as biomarkers and the development of drugs targeting ncRNAs (Matsui and Corey 2017).

Although there are already several ncRNAs being studied as potential therapeutic targets, there are still some obstacles to overcome such as bioavailability and systemic distribution, since some ncRNAs are quickly degraded by nucleases, eliminated by the kidneys or tend to accumulate in certain tissues, factors that make it difficult to reach the intended targets (Zhang *et al.* 2021).

Key-words: ncRNA, miRNA, lncRNA, cancer, therapeutic

Índice

Agradecimentos 1

Resumo 3

Abstract 4

Índice 5

Índice de figuras 6

Índice de tabelas 7

Lista de abreviaturas 8

1. Introdução 9

2. Classes de RNA não codificante 12

2.1 RNA não codificantes longos 13

2.2 RNA não codificantes curtos 15

2.2.1 Micro RNA (miRNA) 17

2.2.2 Piwi-interacting RNA (piRNA) 20

2.2.3 Pequenos RNA de interferência (siRNA) 22

3. Influência do RNA não codificante em doenças humanas 24

3.1 miRNA 26

3.2 lncRNA 31

3.3 snRNA e snoRNA 36

3.4 circRNA 37

4. Terapêutica baseada em ncRNA 39

4.1 Terapêutica baseada em miRNA 40

4.2 Terapêutica baseada em lncRNA 44

4.3 Terapêutica baseada em siRNA 44

5. Desafios e perspetivas futuras 49

6. Conclusão 51

Índice de figuras

Figura 1. Linha temporal das descobertas relacionadas com o DNA e RNA..... 10
Figura 2. Diferentes classes de RNA e as principais classes de RNA não codificante .. 12
Figura 3. Estrutura e classificação dos RNA não codificantes curtos 16
Figura 4. Biogénese do micro RNA. 17
Figura 5. Diferentes métodos de alterar a atividade do miRNA. 20
Figura 6. Visão geral das rotas utilizadas para atingir o miRNA nas células 42
Figura 7. Modificações de oligoncleótidos..... 46
Figura 8. Principais características do fármaco Givosiran 48

Índice de tabelas

Tabela 1. Resumo dos principais RNA não codificantes. 23
Tabela 2. lncRNA relacionados com doenças humanas raras 35
Tabela 3. Algumas das terapêuticas de miRNA em ensaios clínicos..... 43

Lista de abreviaturas

ASO - Oligonucleótidos *Antisense*

circRNA - RNA circular

CRISPR - *Clusters Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*

DNA - ácido desoxirribonucleico

lncRNA - RNA não codificantes longos

miRNA - micro RNA

MRE - Elementos de resposta do miRNA

mRNA - RNA mensageiro

ncRNA – RNA não codificante

NSCLC - *Non-small-cell Lung Cancer*

piRNA – *piwi-interacting* RNA

RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

rRNA - RNA ribossomal

siRNA - *small interfering* RNA

snoRNA - *small nucleolar* RNA

snRNA - *Small nuclear* RNA

TE - Elementos transponíveis

tRNA - RNA de transferência

UTR - *Untranslated regions*

1. Introdução

Inicialmente acreditava-se que a única função do RNA nas células era servir como molde para a síntese de proteínas, porém veio a provar-se o contrário ao longo das últimas décadas. O DNA não codificante do genoma humano foi considerado "lixo" durante muitos anos, até os projetos FANTOM e ENCODE virem revolucionar e elucidar o conhecimento sobre o genoma humano. Foi revelado que cerca de 80% do nosso genoma é biologicamente ativo e transcrito em RNA enquanto apenas 2% é transcrito em mRNA que codifica proteínas (Kara, Calin e Ozpolat 2022). As regiões não codificantes são agora aceites como elementos regulatórios fundamentais, com papéis importantes na regulação da progressão do cancro, provando também a sua importância para o prognóstico e possíveis alvos terapêuticos (de Magalhães 2017).

Os primeiros RNA não codificantes foram descobertos em 1993, em *Caenorhabditis elegans* e desde então graças aos avanços tecnológicos já foram identificados centenas de ncRNA em muitos organismos (Chen *et al.* 2020). Os ncRNA podem ser divididos em duas categorias de acordo com o seu tamanho: ncRNA curtos (sncRNA) – com comprimento inferior ou igual a 200 nucleótidos - e os ncRNA longos (lncRNA) cujo comprimento é superior a 200 nucleótidos. Existem ainda alguns ncRNA cujo tamanho varia podendo pertencer a ambas as classes simultaneamente como os *promoter-associated transcripts* (PAT), *enhancer* RNA (eRNA) e os RNA circulares (circRNA). Dentro da categoria dos sncRNA existem ainda subclasses de acordo com as funções, como é o caso dos microRNA (miRNA), pequenos RNA de interferência (siRNA) e os piwi-interacting RNA (piRNA) (Toden *et al..2021*).

Na figura 1 pode observar-se uma linha temporal das principais descobertas relacionadas com o DNA e RNA, desde 1939 até ao ano de 2008.

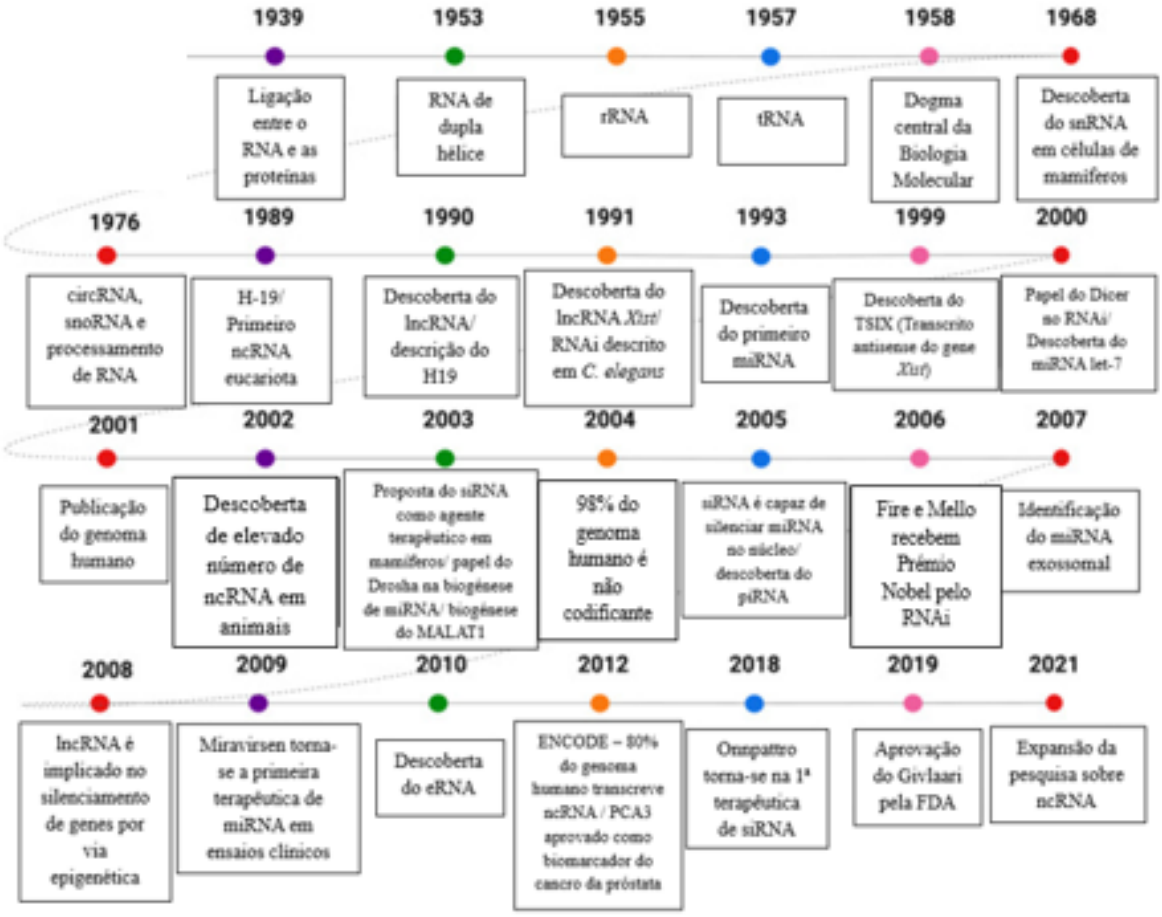

Figura 1. Linha temporal das descobertas relacionadas com o DNA e RNA (Adaptado de Loganathan e Doss 2023)

Dada a importância do desenvolvimento de terapias alvo para doenças como o cancro e doenças neurodegenerativas, e por se saber que os ncRNA afetam a expressão génica, nomeadamente oncogenes e genes supressores de tumor, faz com que sejam alvo de estudos no desenvolvimento de fármacos (Loganathan e Doss 2023; Slaby, Laga e Sedlacek 2017).

O cancro caracteriza-se por ser uma doença onde a proliferação celular se encontra descontrolada, ocorrendo metastização e perda da capacidade de apoptose das células (Slack e Chinnaiyan 2019). A perda da capacidade de apoptose que consequentemente leva à proliferação descontrolada pode ter origem em várias alterações genéticas tais como mutações, amplificações, deleções e translocações, ou epigenéticas (hipo ou hipermetilação) e é caracterizado pela desregulação das vias e sinalização celular envolvidos em processos como a proliferação celular, a sobrevivência ou morte celular, diferenciação, metabolismo energético, estabilidade genómica e reparação do DNA. O cancro pode ainda ser causado pela herança de genes mutados como o BRCA1. A heterogeneidade de causas para o cancro é uma das principais razões para as terapias contra o cancro falharem (Kara, Calin e Ozpolat 2022).

Na última década foram iniciados cerca de 20 ensaios clínicos com fármacos de miRNA e siRNA e mais recentemente algumas das terapias baseadas nos miRNA avançaram para a fase II dos ensaios clínicos. O TargomiR (terapia baseada em moléculas que mimetizam o miR-16) para mesotelioma, o Cobomarsen (anti-miR-155) para leucemia e o Miravirsen (anti-miR-122) para infeções por hepatite C, são alguns dos fármacos em fase II dos ensaios clínicos (Kara, Calin e Ozpolat 2022).

2. Classes de RNA não codificante

O RNA pode ser classificado de acordo com a sua capacidade de codificação em RNA codificante e RNA não codificante. A maioria do RNA não tem capacidade codificate, sendo que apenas 1 a 2% do genoma humano codifica proteínas (Paulo *et al.*2013).

Na figura abaixo encontra-se um esquema respetivo às diversas classes de RNA, nomeadamente os miRNA e os RNA não codificantes, e as respetivas subclasses de cada um.

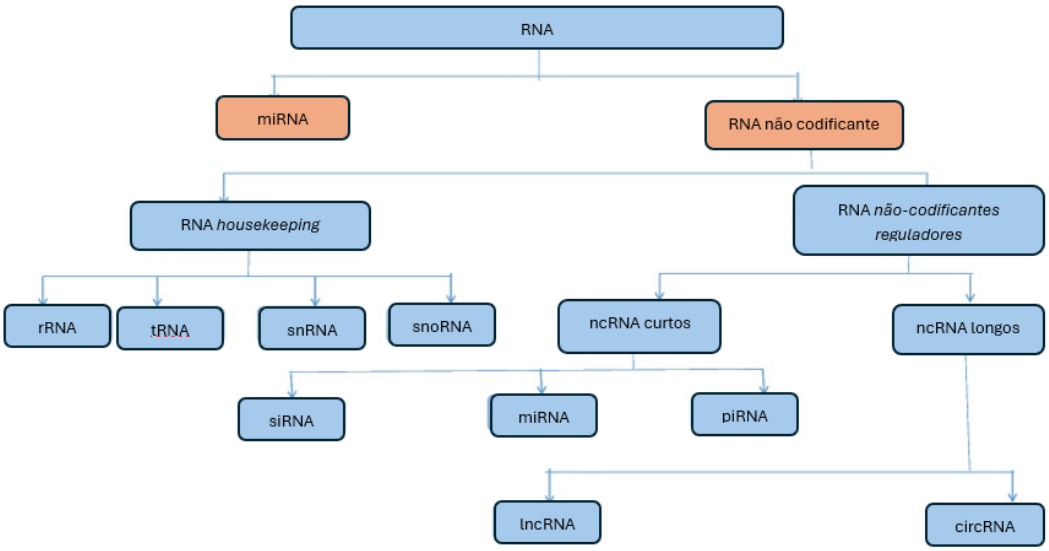

Figura 2. Diferentes classes de RNA e as principais classes de RNA não codificante (Adaptado de Loganathan e Doss 2023).

2.1 RNA não codificantes longos

Os RNA não codificantes longos são uma classe de moléculas de RNA que se caracterizam por terem mais de 200 nucleótidos de comprimento e pela inabilidade de codificarem proteínas. Apesar da sua inabilidade para codificar proteínas são capazes de regular a expressão de genes tanto a nível epigenético como transcricional e pós-transcricional (Shaath *et al.* 2022; Wang *et al.* 2022).

O interesse pelos lncRNA têm vindo a aumentar nos últimos anos devido às enumeras evidências acerca do seu papel na regulação da transcrição de genes, modificações epigenéticas e nos mecanismos de regulação pós-transcricionais (Shaath *et al.* 2022). Sabe-se também que os lncRNA estão envolvidos na regulação de processos vitais como a inativação do cromossoma X, *imprinting* genómico, modificação da cromatina, ativação e interferência transcricional e transporte nuclear, sugerindo o seu possível envolvimento em doenças, inclusive vários estudos realizados mostraram que os lncRNA apresentam expressões aberrantes em doenças bastante complexas (He *et al.* 2014).

Os lncRNA são transcritos pela RNA polimerase II e podem ser originados a partir de zonas distintas do genoma tais como regiões intergénicas, intrões de genes codificantes ou mesmo de zonas *enhancer* (Shaath *et al.* 2022). Os lncRNA podem ser divididos de acordo com a sua maneira de atuar, nomeadamente os que atuam em *cis*, influenciando a expressão e/ou o estado da cromatina de genes localizados no mesmo cromossoma, e os que atuam em *trans* que afetam genes de outros cromossomas (Shaath *et al.*2022; Kopp e Mendell 2018).

Este grupo de RNA não codificantes pode ser utilizado como biomarcador e tem também a capacidade de exercer funções oncogénicas ou supressoras de tumores o que afeta a proliferação, a morte celular e a resistência a fármacos. As proteínas RNA-*binding* (RBP) são um grupo de proteínas que se ligam a diferentes classes de RNA, incluindo os lncRNA e acredita-se que a desregulação das RBP e dos lncRNA contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral. Este grupo de proteínas pode exercer as suas funções por diferentes mecanismos, enquanto algumas interagem com os lncRNA estabilizando-os e bloqueando os sinais de degradação outras atuam precisamente ao contrário, promovendo a degradação dos lncRNA (Shaath *et al.* 2022).

Outro tipo de lncRNA são os RNA circulares (circRNA) onde as extremidades 3' e 5' se encontram ligadas covalentemente, originando uma molécula circular. São bastante expressos em células humanas e desempenham papeis fundamentais na progressão de doenças como o cancro colorretal. Podem ainda funcionar como esponjas dos miRNA nos genes alvo. Um exemplo é o circRNA hsa_circ:0000523 que consegue regular a proliferação e a apoptose de células do cancro colorretal ao atuar como esponja do miRNA (Chen, Xu e Liu 2019). Apesar dos circRNA serem considerados a terceira maior classe de ncRNA, as funções deste grupo ainda não se encontram totalmente caracterizadas. A ligação dos circRNA com o cancro foi primeiro observada em 2013 através de *deep sequencing profiling* e constatou-se que muitos transcritos circulares são abundantes e expressos de maneiras diferentes em vários cancros (Chen *et al.* 2022).

2.2 RNA não codificantes curtos

Fazem parte dos RNA não codificantes curtos os micro RNA (miRNA), piwi-interacting RNA (piRNA) e os pequenos RNA de interferência (siRNA). Os ncRNA não só estão presentes nas células de humanos e animais como também de plantas, estando demonstrada a sua importância nos processos de desenvolvimento das folhas e das sementes e também na morfologia das raízes (Owusu *et al.* 2021)

Os sncRNA podem ser divididos em tradicionais, estruturais e derivados, como se pode observar na figura 3. Todas as famílias têm em comum o seu envolvimento em diferentes mecanismos biológicos, por exemplo os miRNA, piRNA e siRNA, que fazem parte dos sncRNA tradicionais, interagem com proteínas da família Argonauta para mediar o silenciamento de RNA. Já os sncRNA estruturais desempenham funções essenciais na regulação homeostase fisiológica. As características dos sncRNA derivados ainda não se encontram totalmente definidas, sabendo-se apenas que funcionam independentemente das proteínas Argonauta e são gerados após clivagem enzimática através de RNA ancestrais (Shi, Zhou e Chen 2022).

Estudos mais recentes sugerem que os sncRNA podem ser modificados de várias maneiras, o que influencia significativamente as suas funções em diferentes processos biológicos (Xiong e Zhang 2023)

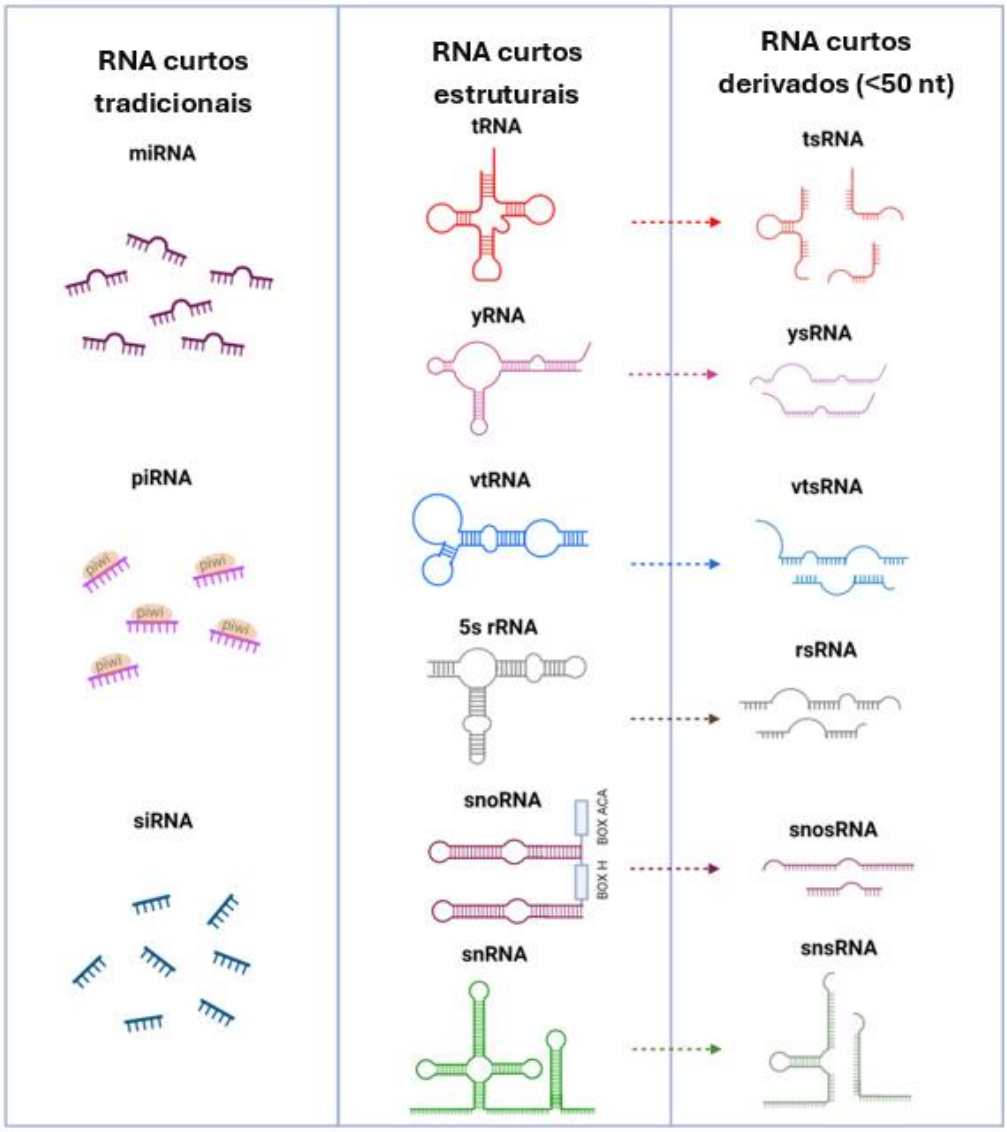

Figura 3. Estrutura e classificação dos RNA não codificantes curtos. Na coluna da esquerda encontram-se os RNA curtos tradicionais; na coluna do meio os RNA curtos estruturais; na coluna da direita os derivados de RNA curtos, cujo tamanho é menos que 50 nucleótidos (Adaptado de Xiong, e Zhang, 2023).

2.2.1 Micro RNA (miRNA)

Estrutura e biogénese

Os miRNA são estruturas de normalmente 22 nucleótidos que funcionam através de RNA de interferência (RNAi). Têm a capacidade de se ligarem a diversas sequências diferentes dentro do RNA, conferindo-lhes o potencial de serem reguladores específicos da sequência de qualquer gene. Tal como esquematizado na figura 4, a sua biogénese começa no núcleo, com a transcrição pela RNA polimerase II em transcritos primários (pri-miRNA). Os pri-miRNA são reconhecidos e processados pelo complexo Drosha/DGCR8 em precursores pré-miRNA que são depois transportados para o citoplasma pela Exportina. Os pré-miRNA são exportados para o citoplasma para serem processados pela enzima DICER e os seus cofatores, tais como a proteínas ativadora da Proteína Kinase R (PACT) ou a trans-ativação da proteína RNA-binding (TRBP), resultando no duplex miRNA. O duplex miRNA maduro é carregado para o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e uma das extremidades do miRNA liga-se à proteína AGO que irá guiar o complexo para o seu mRNA alvo suprimindo a sua expressão (Ho *et al*. 2022; Kilikevicius *et al.* 2022; Correia de Sousa et al. 2019).

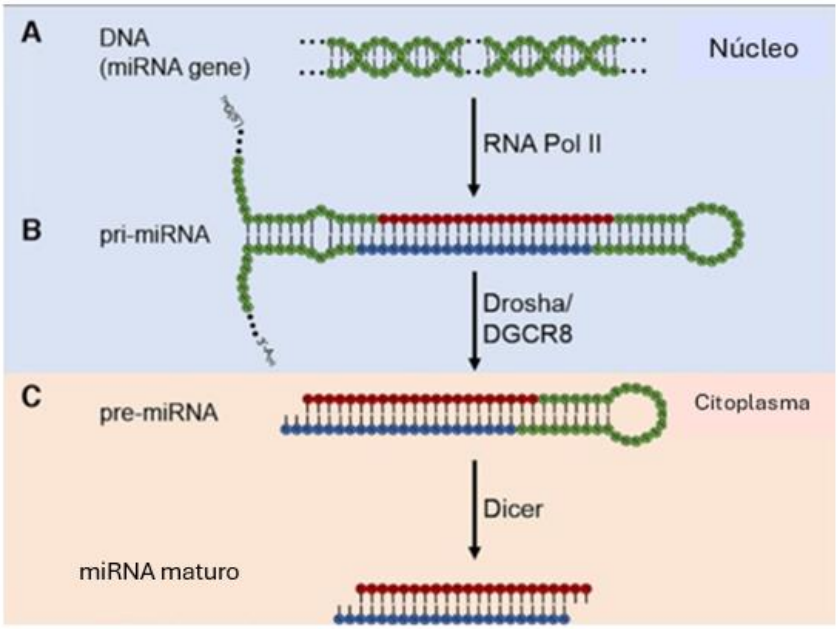

Figura 4. Biogénese de micro RNA. (A) O miRNA é transcrito pela polimerase II em pri-miRNA; (B) O complexo Drosha/ DCGR8 cliva o pri-mRNA em pré-miRNA, o qual entra no citoplasma; (C) O complexo maduro de miRNA é gerado pela Dicer (Adaptado de Kilikevicius, Meister, e Corey 2022).

Existem quatro variantes das proteínas AGO nas células de mamíferos, AG01, AG02, AG03 e AG04. A AGO01, AGO02 e AGO03 são as variantes mais prevalentes, enquanto a AGO04 é encontrada em quantidades vestigiais. A AGO02 contém a habilidade de promover a clivagem do RNA alvo quando o emparelhamento com o miRNA é total. (Kilikevicius *et al*. 2022).

Mecanismos de ação

Os miRNA são moléculas que apesar da incapacidade de codificação são capazes de modular a expressão de genes através da inibição da tradução do mRNA ou mesmo promover a degradação dos mRNA (Correia de Sousa *et al.* 2019).

A biologia dos miRNA é muito mais complexa do que se supunha inicialmente, havendo estudos efetuados ao longo dos últimos anos que evidenciaram vários mecanismos moleculares que regulam a sua atividade, como é o caso dos polimorfismos de nucleótido único, metilação de histonas ou de DNA, seleção de miRNA assimétrica, interações com outras moléculas de RNA codificantes e não codificantes ou proteínas RNA-*binding* (Correia de Sousa *et al.* 2019).

Como foi dito anteriormente, os micro RNA suprimem ou inibem a expressão de genes, a tradução de proteínas e também promovem a clivagem de RNA mensageiro, tendo sido evidenciado desempenharem papéis na comunicação intracelular. Os miRNA podem migrar para fora das células e entrar nos fluidos corporais, sendo chamados miRNA circulantes; 90% destes formam complexos com proteínas incluindo a Ago2, NPM1 e lipoproteína de alta densidade e os outros 10% são secretados por exossomas. Os exossomas que contêm o miRNA podem entrar em células vizinhas e afetar alvos de mRNA, o que pode ser útil no desenvolvimento de diagnósticos e prognósticos não invasivos, sendo por isso cada vez mais considerados biomarcadores promissores para várias doenças humanas nomeadamente para o cancro (Ho *et al.* 2022).

A maneira como os miRNA regulam a expressão genética depende de fatores como o contexto e ambiente celular. A extremidade (5' ou 3') degradada ou incorporada no complexo RISC irá determinar o conjunto de mRNA alvo. A especificidade da ação do complexo RISC em relação aos mRNA depende bastante da complementaridade entre elementos de resposta do miRNA (MRE). Outra característica dos miRNA é que um único miRNA pode ter como alvo centenas de mRNA e regular redes complexas de proteínas (Correia de Sousa *et al*. 2019).

A atividade dos miRNA pode ser modulada de duas maneiras diferentes, baseadas nas funções dos *mimicking* RNA. Os *mimicking* RNA são pequenos RNA com duas cadeias, sintetizados quimicamente, que imitam os miRNA endógenos causando o silenciamento de genes. A estrutura destes RNA - uma cadeia idêntica à cadeia molde e outra cadeia complementar - é necessária para que possam ser reconhecidos pelo RISC. Por outro lado, os AntagomiR são moléculas de RNA sintéticas, complementares à sequência de um miRNA específico, utilizadas para silenciar expressão de miRNA aberrantes. Estes funcionam por ligação ao miRNA inibindo a sua ação. Por fim, os miRNA esponja são transcritos que contêm múltiplos segmentos complementares para miRNA cujo local alvo é o mesmo. Ao introduzir miRNA esponja a uma célula, há ligação com o alvo, reduzindo a quantidade de miRNA livres e ativos (Wojciechowska *et al.* 2017).

A sequenciação de RNA já identificou milhares de moléculas que serão potenciais miRNA, porém, apesar de ser uma técnica sensível, nem todos os miRNA detetados serão expressos em níveis que permitam regulação de genes biologicamente relevantes. É por isso importante perceber o nível de expressão de miRNA individuais e de "famílias" de miRNA. Muitos miRNA têm estruturas base semelhantes ou iguais, o que permite que sejam classificados em famílias, sendo que as diferentes famílias são expressas em níveis diferentes umas em relação às outras (Kilikevicius *et al.*2022).

Na figura 5 podem observar-se diferentes métodos pelos quais é possível alterar a atividade do miRNA, nomeadamente através dos mímicos de miRNA ou silenciando as suas ações

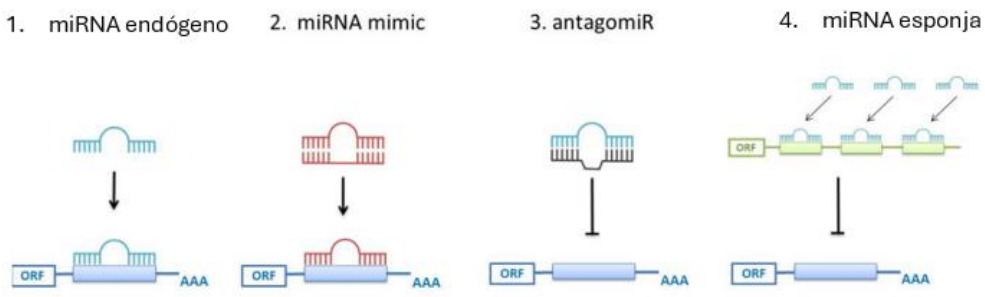

Figura 5. Diferentes métodos de alterar a atividade do miRNA. (1) o miRNA endógeno (azul) liga-se à sequência complementar presente na região 3' não traduzida do mRNA; (2) o mímico de RNA (vermelho) é uma estrutura de cadeia dupla sintetizada quimicamente que imita o miRNA endógeno e tem como o mRNA complementar; (3) o antagomirR (preto) éum oligonucleótidos sintético complementar a um miRNA em particular. Este oligonucleótidos liga-se ao miRNA para inibir a sua ação; (4) o miRNA esponja (verde) contem várias sequências de um miRNA em particular. Ao chegar às células liga-se aos miRNA alvo reduzindo o número de miRNA livres e ativos (Adaptado de Wojciechowska, Braniewska,e Kozar-Kamińska 2017).

A lista completa de microRNA analisados até agora encontra-se na base de dados miRBase (http://www.mirbase.org/) e inclui cerca de 1917 precursores de microRNA humanos, até à data. Alguns destes produzem microRNA ativos com ambas as cadeias, enquanto outros produzem apenas com uma das duas cadeias ativas. Uma vez que a caracterização funcional dos microRNA através de técnicas experimentais é bastante dispendiosa e demorada foram desenvolvidas abordagens bioinformática para identificar os alvos do mRNA, com base na complementaridade entre a extremidade 3'UTR e a sequência molde (Panni *et al.*2020).

2.2.2 Piwi-interacting RNA (piRNA)

Os piwi-interacting RNA (piRNA) são uma classe de RNA não codificantes curtos com 24-31 nucleótidos de comprimento capazes de proteger a linha germinativa ao reprimir transposões (Iwasaki *et al.*2015). Esta família de RNA não codificantes foi descoberta há mais de 20 anos durante um estudo sobre o papel dos RNA curtos na espermatogénese de *Drosophila*, sendo inicialmente chamados rasiRNA (*Repreat Associated* RNA) e mais

tarde passaram a piRNA após a descoberta da sua interação com as proteínas PIWI. Desde então foram realizados diversos estudos que confirmaram a sua existência tanto em vertebrados como em invertebrados (Hanusek *et al.*2022).

Os piRNA são capazes de regular a expressão de transposões e a expressão de genes, através de diversos mecanismos tais como a metilação do DNA, modificação de histonas e degradação do mRNA (Hanusek *et al.*2022). As disfunções dos piRNA resultam na ativação de transposões permitindo que estes se movam livremente pelo genoma, acabando por danificar o DNA, o desenvolvimento gonadal e a fertilidade. (Onishi *et al.*2021). Estes RNA interagem com proteínas PIWI formando complexos chamados de piRISC (piRNA-*induced silencing complex*) o qual regula RNA alvo, incluindo elementos transponíveis e mRNA alvo endógenos pela via da regulação genética transcricional ou pós-transcricional. A via da regulação genética pós-transcricional é normalmente mediada pela atividade das endonucleases das proteínas PIWI, resultando na clivagem do mRNA alvo no citoplasma. (Kim K. 2019).

Uma das funções mais importantes e mais estudadas sobre os piRNA é o silenciamento dos elementos transponíveis (TE). Os TE são elementos de DNA móvel capazes de se deslocarem entre diferentes zonas do genoma através de mecanismos de corte e reintegração, promovendo a inibição da expressão de genes ou rearranjo do DNA genómico (deleções, duplicações ou inversões). Experiências realizadas em ratos *knockout* demonstraram que a perda ou decréscimo dos níveis de piRNA/ proteínas PIWI levava ao aumento da atividade dos TE (Hanusek *et al.* 2022).

Uma vez que um dos papéis principais das vias dos piRNA é a inativação de TE, o comprometimento desta via poderá levar à expressão excessiva dos mesmos, resultando num aumento da instabilidade do genoma e consequentemente alterações nas células germinativas e infertilidade. Contudo, várias espécies de animais produzem piRNA que não têm como alvo as sequências de elementos transponíveis, indicando que existem mais alvos e funções para além do silenciamento dos mesmos (Kim K. 2019). Estudos mais recentes demonstram que os piRNA apresentam diferenças na expressão bem como na origem genómica em tumores e em células normais, sugerindo que podem afetar a expressão de oncogenes e supressores de tumores, contribuindo para o desenvolvimento e progressão de cancro (Hanusek *et al.* 2022).

2.2.3 Pequenos RNA de interferência (siRNA)

O conceito de RNA de interferência (RNAi) foi introduzido em 1998. Estes atuam naturalmente como um mecanismo de defesa contra ácidos nucleicos exógenos, estando também envolvidos na regulação da expressão génica. Logo após a descoberta do RNAi foram descobertos os pequenos RNA de interferência (siRNA) que foram identificados como mediadores dos RNAi nas células de mamíferos. Os siRNA são capazes de bloquear a expressão de genes alvo através de uma sequência específica, ao mediar a degradação de mRNA alvo ou a repressão da transcrição. Como resultado das ligeiras diferenças entre siRNA e miRNA, os siRNA conseguem silenciar genes de forma mais eficiente e específica, que os miRNA poderão comprometer a expressão de vários genes alvo simultaneamente (Hu *et al.* 2020).

Os siRNA inibem a expressão génica ou a transdução através do emparelhamento de Watson-Crick ao despoletarem a degradação de mRNA. Por utilizarem o emparelhamento de Watson-Crick o seu uso torna-se vantajoso em relação aos fármacos que têm por base anticorpos monoclonais que necessitam de reconhecer conformações espaciais de certas proteínas (Hu *et al*. 2020; Dong, Siegwart e Anderson 2019).

Apesar do futuro promissor, o uso dos siRNA para o desenvolvimento de fármacos apresenta algumas limitações tais como a baixa estabilidade e comportamento farmacocinético e a possibilidade de induzir efeitos fora dos alvos desejados. Estas desvantagens acontecem devido ao tamanho relativamente grande destas moléculas, ao seu peso e ainda pela elevada quantidade de grupos fosfato que as torna moléculas altamente aniónicas. Após administração de fármacos de siRNA é ainda necessário evitar que sejam filtrados pelos rins, atuem fora das células alvo e que resistam as RNAses (Dong, Siegwart e Anderson 2019).

Classes de RNA não codificante

Na tabela 1 encontra-se um resumo das principais classes de RNA não codificantes curtos – miRNA, piRNA, siRNA, snRNA e snoRNA – com os respetivos comprimentos, precursores, biogénese e as principais funções desempenhadas.

Tabela 1. Resumo dos principais RNA não codificantes curtos (Adaptado de Xiong e Zhang 2023).

Classificação	Comprimento (nt)	Precursor	Processamento	Função
Micro RNA (miRNA)	20-25	Precursor de miRNA *hairpin loop-like*	Transcritos pela RNA Polimerase II, clivado pelo Drosha/DGCR8 e Dicer	Liga-se a proteínas Argonauta formando o complexo RISC que participa no silenciamento génico transcricional e inibição da tradução do mRNA
Piwi-interating RNA (piRNA)	18-30	RNA de cadeia simples comprida	Transcritos pela RNA polimerase II processado num ciclo "ping-pong" pela Zuc, Aub e AGO3	Interação com as proteínas PIWI para regular o silenciamento de genes e estabilidade genómica das células germinativas através de reguladores epigenéticos
Pequeno RNA de interferência (siRNA)	20-25	RNA de cadeia dupla comprida	Transcritos pela RNA polimerase II e processado pelo Dicer para clivagem	Ligam-se a proteínas Argonauta formando o complexo RISC que participa na mediação do declínio de mRNA
Pequeno RNA nucleolar (snRNA)	90-200	/	Transcritos pelas RNA Polimerase II e III	Liga-se a proteínas para formar pequenas ribonucleoproteínas envolvidas no splicing de mRNA
Pequeno RNA nucleolar (snoRNA)	60-400	/	Transcritos pelas RNA Polimerase II e processados por ribonucleases	Ligam-se a proteínas específicas para formar ribonucleoproteínas que regulam a modificação do RNA ribossomal

3. Influência do RNA não codificante em doenças humanas

Neste capítulo irá ser abordada a relação dos RNA não codificantes com algumas doenças como o cancro, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas tais como Parkinson, Alzheimer, Doença de Huntington e Esquizofrenia.

O cancro é uma doença onde a proliferação celular se encontra descontrolada, que pode ser causado por alterações genéticas tais como mutações, amplificações, deleções e translocações (Kara, Calin e Ozpolat 2022). Existem dois genes nos quais as mutações estão fortemente associadas a diversos tipos de cancro sendo eles o BRCA1 e o BRCA2, ambos genes supressores de tumores (Romagnolo, Romagnolo e Selmin 2015). Pode ainda estar associado a alterações epigenéticas que afetam a metilação, que consiste em modificações químicas que regulam a expressão génica, *imprinting* genómico, inativação do cromossoma X, silenciamento de transposões e a estabilidade do genoma, podendo ser hipermetilação – adição de grupos metil ao DNA, nas bases de citosina em ilhas CpG, levando ao aumento da metilação do DNA e consequentemente silenciamento de genes – ou hipometilação - perda ou redução dos grupos metilo do DNA que tem como consequência a instabilidade do genoma e ativação de oncogenes (Nishiyama e Nakanishi 2021).

Já as doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e a doença de Parkinson têm bastante impacto na população mais idosa. O Alzheimer é caracterizado pela perda de memória e várias funções cognitivas estando associado à perda de neurónios e funções sinápticas, danos mitocondriais, respostas inflamatórias, acumulação de beta-amiloide e formação de Tau hiperfosforilada (Su et al. 2022). A doença de Parkinson também está associada à perda de neurónios dopaminérgicos, tendo como sintomas principais a bradicinesia, rigidez muscular, postura instável, redução dos movimentos e tremores (Pacsosi e Proietti-De-Santis 2023). Já a esclerose múltipla é caracterizada pela desmielinização induzida por células imunes autoreativas, que ocorre no Sistema Nervoso

Central (SNC) e onde a expressão dos miRNA pode ser classificada em três grupos, o primeiro são os miRNA específicos em lesões do SNC, o segundo os miRNA específicos na regulação do sistema imune e o terceiro grupo os miRNA circulantes (Siqueira e Pires 2017).

A doença de Huntington é uma doença hereditária autossómica dominante caracterizada por sintomas como coreoatetose, disfunções cognitivas e distúrbios psiquiátricos Li e Wang 2021). O diagnóstico é normalmente confirmado pela identificação do número excessivo do trinucleótido CAG no gene Huntington (HTT), localizado no cromossoma 4 (Stoker *et al.* 2022). O excesso de repetições CAG leva à formação da proteína Huntington mutante (mHTT) (McColgan e Tabrizi 2018). A mHTT pode exercer as suas funções neurodegenerativas através de vários mecanismos tais como a disfunção dopaminérgica, disfunção mitocondrial e stress oxidativo, autofagia desregulada, agregação proteica anormal e ainda disrupção da transcrição génica (Kim *et al* 2021).

Por fim, a esquizofrenia é uma doença mental crónica caracterizada por vários níveis de comprometimento cognitivo, alterações emocionais e comportamentos anormais que prejudicam processos básicos de perceção e raciocínio. Apesar de anomalias genéticas contribuírem para a hereditariedade da esquizofrenia, também a epigenética pode contribuir para o desenvolvimento desta doença. Os fatores epigenéticos podem estar associados a vários mecanismos como a remodelação da cromatina, modificação das histonas, metilação do DNA e a expressão dos ncRNA (Richetto e Meyer 2021).

3.1 miRNA

Com o decorrer dos anos e com os avanços tecnológicos o conhecimento acerca do papel biológico dos miRNA tem vindo a crescer, havendo cada vez mais interesse no seu potencial terapêutico e no desenvolvimento de fármacos.

Na investigação do potencial terapêutico dos miRNA foram utilizados dois métodos, o primeiro cujo objetivo seria de reparação e o segundo cujo objetivo seria inibitório. No primeiro método recorreu-se a um miRNA não funcional ou regulado negativamente que seria distribuído por um oligonucleótido sintético, e no segundo método, os miRNA expressos em níveis aberrantes seriam inibidos por antagonistas. A eficácia do miRNA para fins terapêuticos ainda se encontra limitada por serem facilmente degradados pelas (Ho *et al.* 2022).

Relação com o cancro: De acordo com o gene alvo, alguns miRNA podem influenciar negativamente oncogenes codificantes de proteínas enquanto outros podem inibir supressores de tumores, podendo por isso agir como onco-miRNA ou miRNA supressores de tumor. Uma vez que muitos miRNA são libertados por células cancerígenas para a corrente sanguínea e para a urina, podem ser utilizados como biomarcadores e indicadores de prognóstico (Yan e Bu 2021; He *et al.* 2020).

Aumentos e diminuições dos níveis de miRNA específicos podem ter como consequência a desregulação de processos celulares como a proliferação, apoptose e a diferenciação celular. Por exemplo, já foi evidenciado que a expressão aumentada do miR-1269 no cancro do estômago promove a proliferação de células cancerígenas, suprimindo simultaneamente a apoptose celular. Outro exemplo é o miR-145, que utilizado com alvo na desintegrina e na metaloproteína 17, tem a capacidade de inibir a proliferação celular no fígado (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017).

A desregulação do sistema imunitário tem bastante impacto no desenvolvimento do cancro e vários miRNA estão implicados no processo de vigilância tumoral. Os miRNA localizados intracelularmente podem ser libertados para a corrente sanguínea transportados por exossomas, sendo normalmente libertados em resposta a estímulos celulares, morte celular ou após lesões. No cancro, os exossomas podem afetar vários fatores como a progressão, metástases e a resistência a fármacos. (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017).

Relação com doenças cardiovasculares: Existem vários miRNA com funções importantes no desenvolvimento cardiovascular e nas doenças do coração. No sistema cardiovascular os miRNA controlam a proliferação e diferenciação das células estaminais e também a função dos miócitos cardíacos, células *pacemaker*, células endoteliais e células do músculo liso, tendo por isso um papel crucial no desenvolvimento cardíaco e na sua regeneração. Estão envolvidos na fisiopatologia cardiovascular e a sua expressão encontra-se alterada em várias doenças cardíacas (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017).

- **miR-1 e miR-133**: Estes dois miRNA promovem a diferenciação do mesoderma nas células estaminais embrionárias, sendo que mais tarde o miR-1 promove a diferenciação enquanto o miR-133 inibe. O miR-1 influencia a cardiogénese através da regulação da expressão do fator de transcrição Irx5 e Hand2, este último é um proteína envolvida no desenvolvimento do ventrículo direito e por sua vez, a proteína Irx5 regula a expressão dos genes responsáveis pelos canais de potássio, determinando o gradiente de repolarização ventricular. O miR-133 influencia a atividade do SRF (*serum response factor*) o qual regula genes responsáveis pela diferenciação e crescimento do músculo cardíaco e do músculo liso (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017);

- **miR-208, miR-499**: envolvidos na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose das células musculares cardíacas. O miR-499 influencia a apoptose de cardiomiócitos ao diminuir os níveis de calcineurina da proteína Drp1, envolvidas na fissão mitocondrial. Por outro lado, a superexpressão de miR-499 pode levar a hipertrofia de cardiomiócitos (Huang 2018);

- **miR-21**: promove a hipertrofia do miócito ao reprimir o fator de transcrição Sprouty2 que controla a ERK-MAPK (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017);

- **miR-24, miR-320 e miR-29**: a expressão destes miRNA é alterada quando as vias de sinalização do stress são ativadas, como por exemplo no enfarte do miocárdio, os níveis do miR-24, miR-320 e miR-29 diminuem. O miR-24 também inibe a tradução da proteína pró-apoptose Bim (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017);

- **miR-214**: a sua expressão aumenta nos tecidos após enfarte do miocárdio, exercendo um efeito de proteção durante a isquemia. Reduz os níveis de cálcio e promove também a sobrevivência dos cardiomiócitos durante a inibição da troca sódio/cálcio e Bim. A deleção do miR-24 aumenta a mortalidade após o enfarte do miocárdio (Wojciechowska , Braniewska e Kozar-Kamińska 2017).

Relação com Doenças Neurodegenerativas:

Doença de Alzheimer: Na doença de Alzheimer a sobrexpressão de certos miRNA tem sido associada a muitos dos efeitos fisiológicos característicos da doença. Por exemplo, a sobrexpressão do miR-193b, cujo alvo é o Precursor da Proteína Beta Amiloide (AβPP), está associada à acumulação de plaquetas Aβ (Gowda *et al.* 2022**).**

Doença de Parkinson:

- **miR-7 e miR-153**: A diminuição do miR-7, miRNA responsável pela diminuição da expressão do gene SNCA, foi encontrada no cérebro de pacientes com Parkinson. Acredita-se também que o miR-153 tem um papel semelhante ao do miR-7, reconhecendo sequências da região 3'UTR do SNCA. Foi também

neuroprotetoras em neurónios dopaminérgicos de pacientes com Parkinson (Paccosi e Proietti-De-Santis 2023);

- **miR-153b**: É expresso no mesencéfalo, regulando tanto a mutação como a função do mesmo, em doentes com Parkinson. Funciona dentro do mecanismo de feedback negativo, no qual o gene Pitx3 inclui a transição do miR-133b e a atividade pós-transcricional do Pitx3 é suprimida pelo miR-133b (Paccosi e Proietti-De-Santis 2023);

- **miR-124**: Tem como alvo os genes Calpain 1, Bim STAT3, Annexin A5 e MEKK3. É o miRNA mais abundante nos neurónios, nos quais regula a sinapse, neurotransmissão, inflamação, autofagia e função mitocondrial (Paccosi e Proietti-De-Santis 2023).

Esclerose múltipla (EM):

- **miR-155**: presente no SNC, encontra-se em níveis elevados em lesões ativas. Este miRNA tem a proteína de superfície CD47 como alvo. A expressão elevada de miR-155 em lesões tem como consequência a redução da expressão da proteína CD47 que conduz à ativação de macrófagos, favorecendo a fagocitose da mielina. O miR-155 tem ainda funções regulatórias da barreira hematoencefálica favorecendo a passagem das células imunológicas para o SNC (Siqueira e Pires 2017);

- **miR-219**: miRNA responsável pela diferenciação de células precursoras de oligonucleótidos. A sua ausência não afeta a produção dos precursores o que salienta a sua função na produção de células maduras capazes de produzir mielina (Siqueira e Pires 2017)

- **miR-132**: miRNA envolvido na regulação do sistema imune através da secreção de citocinas por linfócitos B (Siqueira e Pires 2017);

- **hsa-miR-155, hsa-miR-146a, hsa-miR-326**: miRNA envolvidos na regulação do sistema imune. Em pacientes com EM a expressão deste miRNA encontra-se aumentada. Têm como função a diferenciação celular th1 e th17, regulação da ativação dos linfócitos e diferenciação celular th17, respetivamente (Siqueira e Pires).

3.2 lncRNA

O HOTAIR, é um lncRNA já bastante estudado, situado no *locus* 12q13.13 do gene cluster HOXC (Rajagopal *et al*. 2020). Na base de dados NONCODE (http://www.noncode.org/) constam diversos lncRNA já estudados, tanto em plantas como em animais e ainda a relação entre lncRNA e várias doenças (Zhao *et al.* 2021). Estudos sobre este lncRNA mostram que exercem as suas funções ligando-se a proteínas reguladoras da transcrição, incluindo enzimas de modificação de histonas e fatores de remodelação da cromatina também podendo ligar-se de forma complementar a mRNA e miRNA. Existe ainda uma subclasse de lncRNA denominados lncRNA de iniciação de genes imunológicos (IPL) que ativa genes do sistema imune em células endoteliais durante a resposta imunológica ao recrutar a histona-metiltransferase H3K4 WDR5-MLL1 para os promotores alvos (Panni *et al.* 2020).

O lncRNA de HOTAIR tem vindo a ser cada vez mais estudado dada a sua ligação à proliferação celular em diversos cancros como o cancro do cólon e da mama e ainda doenças cardiovasculares, encontrando-se também ligado à regulação da migração celular, invasão e apoptose (Taghvimi *et al.* 2024). A regulação do miRNA pode ser feita de forma direta ou indireta, sendo que na regulação indireta é capaz de silenciar o miRNA ao ligar-se à PRC2 (complexo repressivo polycomb 2) para formar um complexo de silenciamento, que tem como alvo as regiões promotoras do miRNA, e na regulação direta o HOTAIR participa em vários caminhos de regulação. O HOTAIR tem também capacidade de diminuir a expressão do miR-34a para promover o desenvolvimento de tumores no cancro da mama, estômago entre outros. Esta regulação acontece através da formação do complexo EZH2-HOTAIR que se liga às regiões promotoras do miR-34a para silenciar o mesmo (Wang *et al.* 2022).

O transcrito X-inativo Xist é o lncRNA c*is* mais conhecido e bem estudado. Durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário em mamíferos do sexo feminino, um dos dois cromossomas X é silenciado. Este processo depende da transcrição do Xist de um dos cromossomas X, que mais tarde será o cromossoma X inativo (Xi). Após este processo, o Xist espalha-se pelo Xi, iniciando uma série de eventos que resultam na relocalização do cromossoma para a periferia nuclear, deposição de marcas de cromatina repressiva e, eventual silenciamento de praticamente todo o cromossoma (Kopp e Mendell 2018).

Relação com o cancro: Alguns lncRNA atuam como supressores do desenvolvimento cancerígeno. Existem vários lncRNA associados a diferentes cancros. Alguns exemplos de lncRNA mais conhecidos são o XIST que está associado à proliferação e inibição da apoptose no cancro da mama e o HOTAIR que está associado à promoção da proliferação no cancro do fígado, da mama e dos ovários. Existem também lncRNA associados a outros cancros como o cancro do pulmão, do cólon e do cérebro (H. Yan e P. Bu 2021).

Relação com doenças cardiovasculares: os lncRNA estão relacionados com doenças cardiovasculares através da regulação de diversos processos celulares tais como a diferenciação, proliferação, apoptose, necrose e autofagia celular (Huang 2018)

- **AK048451**: intitulado de Fator relacionado com hipertrofia cardíaca foi primeiro identificado com uma esponja endógena do miR-489 com capacidade de se ligar diretamente ao mesmo, restringindo a sua expressão (Huang 2018).

- **GAS5**: geralmente considerado como supressor de tumor ao atuar como esponja do miR-21, com capacidade de inibir a proliferação e promover a apoptose de várias células cancerígenas. Este lncRNA contém um local de ligação para o miR-23a, atuando também como a sua esponja. A expressão aumentada de GAS5 inibe a hipertrofia dos cardiomiócitos através da regulação negativa do miR-23a e do seu alvo o Foxo3a (Huang 2018).

- **H19**: nos estádios mais avançados da diferenciação cardíaca das células P19CL6, o H19 regula negativamente o miR-19b. A superexpressão do H19 inibe significativamente a proliferação celular e promove a apoptose por modulação do miR-19b e o seu alvo sox6 sendo que a sobre expressão tem o efeito inverso (Huang 2018).

- **AK079427:** lncRNA também conhecido por APF, tem um papel crucial na regulação da autofagia dos cardiomiócitos através da modulação do miR-188-3p e do seu alvo ATG7. A redução da expressão do APF reduz a formação de vesículas de autofagia e a morte celular dos cardiomiócitos, através da inibição da expressão do miR-188-3p e aumento dos níveis de ATG7 (Huang 2018).

- **MIAT**: foi identificado como esponja do miR-150 na regulação de atividades biológicas do epitélio celular e das células dos miócitos. O miR-150 é capaz de modular negativamente a expressão do MIAT e suprimir a proliferação e migração dos ECs. O Fator Vascular Endotelial (VEGF) é um alvo do miR-150-5p porém os seus níveis apresentam-se mais elevados quando existe uma superexpressão do MIAT, sugerindo que a interação entre o MIAT, miR-150-5p e o VEGF será crucial para modular a função cardiovascular (Huang 2018).

Relação com Doenças Neurodegenerativas: com a descoberta dos processos patológicos, a terapia com recurso a lncRNA fornece uma abordagem aliciante. O lncRNA NEAT1 acredita-se estar associado com a agregação de proteínas mal dobradas, modulando os seus níveis de expressão e funções ao agir como esponja do miRNA e regulando a transcrição, estabilidade proteica e modificação das proteínas (Li e Wang 2023).

- **Doença de Alzheimer**: Estudos feitos sobre o lncRNA BACE1-AS concluíram que este se encontra em níveis mais reduzidos no plasma de doentes com Alzheimer em estado inicial, enquanto doentes num nível mais avançado da doença apresentam níveis mais elevados. A expressão alterada do BACE1-AS e do S1A (forma intrónica) está correlacionada com a formação de Aβ (Varesi 2022).

- **Doença de Huntington**: foi a primeira doença neurodegenerativa a ser correlacionada com a desregulação do NEAT1. O TP53 é regulado positivamente e ativado pela mHTT e o NEAT1 contém locais de ligação para o p-53 nos locais de iniciação da transcrição sendo, portanto, observado que a regulação positiva do NEAT1 poderá ser induzida pela ativação do p53 (Li e Wang 2021).

- **Esquizofrenia**: foi demonstrado por Barry et al que os lncRNA MIAT e RNCR2 interagem com fatores de *splicing* como o SF1 e QKI, os quais estão implicados no *splicing* alternativo do DISC1 e ERBB4, ambos envolvidos na etiologia da esquizofrenia. Já foi também demonstrado que os lncRNA respondem stresses ambientais como o *stress* oxidativo, agentes genotóxicos e metais pesados, sendo plausível que alguns desses sinais contribuam para a etiologia da esquizofrenia (Khavari e Cairns 2020).

Na tabela 2 constam vários lncRNA relacionados com doenças humanas e a respetiva localização de cada um, comprimento e a função desempenhada.

Tabela 2. lncRNA relacionados com doenças humanas raras (Adaptado de: He, Han, e Li 2014).

lncRNA	Localização	Comprimento (pb)	Tipo de disfunção	Doença associada
C15Sorf2	Cromossoma 15	8053	Expressão	Síndrome de Prader Willi
H19	Cromossoma 11	2559	Epigenética	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
Ube3a-as	Desconhecida	Desconhecida	*Locus*	Síndrome de Angelman
KCNQ1OT1	Cromossoma 11	91671	Epigenética	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
DGCR5	Cromossoma 12	3334	Expressão e mutação	Síndrome de DiGeorge
NRON	Cromossoma 9q33.3	2730	Expressão	Síndrome de Down
XIST	Cromossoma X	31093	Epigenética	Síndrome de Klinefelter
Ak042766	Desconhecida	1029	Expressão	Síndrome das Pernas Inquietas
BX118939	Cromossoma 6	25578	Mutação	Síndrome West
ASFMR1	Cromossoma X	3026	Expressão	Síndrome do X Frágil
CECR3	Cromossoma 22	1915	Expressão	Síndrome do olho de gato
CECR9	Cromossoma 22	198	Expressão	Síndrome do olho de gato
BPESC1	Cromossoma 3	3518	mutação	Síndrome da Blefarofimose

3.3 snRNA e snoRNA

A remoção de intrões do pré-mRNA e de transcritos não codificantes é um passo essencial para a expressão génica dos eucariotas. O *splicing* de RNA é efetuado pelo *splieceossoma*, uma macromolécula que contém cinco pequenos RNA nucleares (snRNA) na sua composição – U1, U2, U3, U4, U5 e U6 - os quais sofrem alterações conformacionais de modo a reconhecer corretamente os locais de *splice* e catalisar a remoção de intrões (Didychuk, Butcher e Brow 2018). Deste modo, os snRNA são considerados fundamentais no *splicing* de pré-mRNA e essenciais nas células eucariotas (Lin *et al.* 2021).

Por sua vez, os pequenos RNA nucleolares (snoRNA) são RNA não codificantes que atuam dentro no núcleo, onde foram primeiro descobertos (Van der Werf, Chin e Fleming 2021). Estes utilizam sequencias *antisense* para reconhecer alvos de RNA e a maioria dos snoRNA encontra-se classificado em duas categorias, os C/D que guiam a enzima 2'-O-metiltransferase Fibrilarina para catalisar a 2'-O-metalação, e os H/ACA que guiam a proteína DKC1 para catalisar a pseudouridilação (Zhang *et al.* 2023)

Relação com o cancro: Nos últimos anos foram feitos vários estudos que demonstram o papel dos snoRNA na regulação celular e no desenvolvimento e progressão do cancro. Existem também algumas evidências de que os snoRNA atuam de maneira semelhante aos miRNA no silenciamento de genes sendo a primeira evidência o ACA42, um snoRNA capaz de reduzir a expressão do CDC2L6. o SNORA42 é também frequentemente encontrado em níveis mais elevados em NSCLC e a sua regulação negativa reduz a formação de colónias, induz apoptose em NSCLC e inibe a formação de tumores (Romano *et al.* 2017).

3.4 circRNA

Os RNA circulares (circRNA) são uma classe de ncRNA descoberta mais recentemente, caracterizados pela ligação covalente entre as extremidades 3' e 5', que podem desempenhar funções fisiológicas de diversas maneiras nomeadamente agindo como espojas de miRNA (mecanismo utilizado mais frequentemente), regulando a transcrição génica ou interagindo com proteínas RNA-*binding* (Li *et al.* 2023). Os circRNA exibem um grande potencial na regulação de funções biológicas das células do cancro da mama, incluindo a proliferação, migração e invasão (Liang *et al.* 2020).

Relação com o cancro: os circRNA apresentam uma estrutura molecular mais estável sendo por isso mais resistentes às exonucleases sendo mais vantajosos no desenvolvimento de biomarcadores para o cancro da mama. Estes competem com outros RNA para se ligarem ao miRNA e à proteína RNA-binding conseguindo regular a transcrição genética e os pré-mRNA (Zhang *et al.* 2021).

- **circ-Dnmt1:** promove a proliferação de células do cancro da mama por via da autofagia ao interferir com a localização nuclear do p53 e AUF1(Liang *et al.* 2020).

Relação com Doenças Cardiovasculares: apesar de não existirem indícios concretos de que o circRNA tem algum papel na formação e desenvolvimento do coração, emergem cada vez mais estudos que demonstram a sua significância na regulação de diferentes células relacionadas com doenças cardiovasculares bem como na proliferação, diferenciação, migração e apoptose o que acaba por influenciar a estrutura e alterações funcionais das células cardiovasculares. (Zhao *et al.* 2023)

- **circFndc3b**: vários estudos já reportaram que este circRNA apresenta expressão reduzida nos tecidos cardíacos de pacientes com cardiopatia isquémica. Este circRNA também liga proteínas RNA-binding fundidas em sarcomas (FUS), o fator de crescimento regulador do fator endotelial (VEGF), para regular a expressão e a sinalização. Quando apresenta uma expressão aumentada nas células do endotélio cardiovascular, aumenta a expressão do VEGF-A, melhorando a sua atividade angiogénica e reduzindo a apoptose das células endoteliais. Estes achados destacam o papel fisiológico do circFndc3b-FUS na remodelação e neovascularização cardiovascular. (Zhao *et al.* 2023)

- **circEsyt2**: influenciar a proliferação hipertrófica vascular das células do músculo liso, levando ao desenvolvimento de hipertensão. A proteína 1 circEsyt2-polyC-binding (PCBP1)-U2, um pequeno RNA nuclear auxiliar do axis do Fator 2, influencia o splicing β da proteína p53 (p53) o que leva a alterações dos níveis de expressão dos genes alvo da p53 como a ciclina D1, p21, PUMA e NOXA. Estas alterações influenciam a proliferação celular nas células do músculo liso. (Zhao *et al.* 2023)

4. Terapêutica baseada em ncRNA

A capacidade que os ncRNA têm para controlar a expressão de genes faz com que sejam alvos promissores para o tratamento de doenças, podendo ser utilizados no desenvolvimento de fármacos ou como alvo de fármacos (Matsui e Corey 2017). As várias terapias baseadas no RNA incluem o uso de oligonucleótidos *antisense* (ASOs), siRNA, RNA hairpin curtos, ASO anti-microRNA (antimiRs), miRNA mimics, esponjas de miRNA, circRNA e adições no gene CRISP-Cas9. Existem já várias terapêuticas aprovadas pela FDA e/ou pela EMA, com alvo na modificação de genes do fígado, músculo ou sistema nervoso central. Estas terapêuticas consistem em siRNA ou ASO que desregulam genes específicos ou ASO cujo alvo é o *splicing* de pré-mRNA (Winkle *et al.* 2021).

A terapêutica génica é uma terapêutica promissora uma vez que tem como alvo os genes causadores de doenças o que possibilita tratamentos mais precisos e personalizados para cada doente. Ao introduzir certos ácidos nucleicos nos tecidos desejados do paciente, a expressão dos genes pode ser regulada (aumentada ou diminuída). Os siRNA, miRNA e os ASOs são moléculas representativas usadas para despoletar a inibição de genes, enquanto o DNA plasmídeo, mRNA, saRNA, ASOs moduladores de splicing e CRISPR são usualmente utilizados para aumentar ou corrigir a expressão de genes alvo. (Hu *et al.* 2020). Em 2018 a FDA e a Comissão Europeia aprovaram o Onpattro^{tm}, como o primeiro fármaco comercial baseado em RNA de interferência para o tratamento de amiloidose hereditária e em 2019 o Givlaari™ para o tratamento de porfiria hepática aguda em adultos (Hu *et al.* 2020).

4.1 Terapêutica baseada em miRNA

O papel dos miRNA no cancro foi revelado em 2002 quando foi descoberto que os MIR15 e MIR16 são frequentemente deletados na leucemia linfocítica crónica (Chen *et al.* 2022). Alterações fisiológicas na expressão dos miRNA são fundamentais na regulação de redes genéticas complexas e na sinalização de cascatas. Em várias doenças, alterações da expressão dos miRNA têm um papel central na modificação da expressão de proteínas como parte das mudanças celulares patológicas. Para além do potencial de diagnóstico que as alterações na expressão dos miRNA apresentam, também têm potencial terapêutico através da manipulação de funções das células cruciais para o fenótipo da doença (Diener, Keller e Meese 2022). Contudo, o papel desempenhado pelos miRNA está dependente do contexto uma vez que o mesmo miRNA já foi reportado como oncogene num cancro e como supressor de tumor noutro (Chen *et al.* 2022).

Os miRNA circulantes são considerados biomarcadores promissores para muitas doenças, uma vez que cumprem critérios para tal, como a alta especificidade, fácil acessibilidade e sensibilidade, tendo sido considerados biomarcadores para o cancro em 2008. Sabe-se que os miRNA existem em muitos fluidos biológicos onde são altamente estáveis e podem ser facilmente extraídos de sangue ou de biópsias líquidas. Também possuem alta especificidade para diferentes tecidos ou células, por exemplo, o miRNA-122-5p é altamente enriquecido no fígado ou o miRNA-140 que é seletivo para cartilagem. o que possibilita a utilização de miRNA específicos para determinar o início e progressão de uma doença (Ho *et al.* 2022).

Também podem ser usados para prever o efeito da quimioterapia e a recorrência de uma doença. Por exemplo, no cancro de mama, um aumento do miR-125b pode revelar uma resposta terapêutica mais baixa ao 5-fluorouracil, epirubucina ou ciclofosfamida. Níveis mais elevados de miR-210 foram indicados para resistência ao trastuzumabe e desenvolvimento de tumor de pacientes com adenocarcinoma em estádio inicial. Os miRNA circulantes também foram relatados como potenciais marcadores para outras doenças, como é o caso da artrite reumatoide, onde a expressão de miR-125b se encontrava aumentada no soro e no sangue de pacientes com AR, em comparação com controlos osteoartríticos e normais (Ho *et al*. 2022).

Já existem inúmeras ferramentas de diagnóstico utilizadas com aplicação clínicas como por exemplo o miReviewTM Mets, RosettaGX Reveal, ThyraMir, CogniMIR, OsteomiR e ThrombomiR. O miRviewTM Mets é um teste molecular desenvolvido pela Rosetta Genomics, utilizado como auxiliar na classificação de tumores de origem desconhecida. O miRviewTM Mets utiliza um painel de microRNA para identificar padrões de expressão específicos que podem ajudar os médicos a determinar a origem do tumor e consequentemente garantir um tratamento personalizado para pacientes com cancro. Isso é especialmente útil em casos em que a origem do tumor não pode ser determinada apenas por métodos tradicionais, como histologia e imunohistoquímica (Ho *et al.*2022).

Tanto os miRNA como os lncRNA e os circRNA já foram associadas a diferentes processos malignos, incluindo a resistência a várias terapias contra o cancro. De maneira direta ou indireta todas estas classes acabam por interagir - o lncRNA e o circRNA têm capacidade de se ligarem aos miRNA e inibir a ligação dos mesmos ao mRNA - comprovando a existência de uma rede molecular complexa (Chen *et al.* 2022). De modo geral, as terapêuticas de miRNA têm como objetivo a modificação e, idealmente, a reversão patológica da expressão do miRNA. Estes mecanismos incluem o aperfeiçoamento/reconstituição de miRAN endógenos que atuam como supressores patológicos e também a redução da expressão ou bloqueamento funcional de miRNA que atuam como condutores patológicos. Para alterar os níveis de miRNA são comumente utilizados ácidos nucleicos como miRNA sintéticos (miRNA mimics), e inibidores de miRNA baseados em oligonucleótidos (anti-miRs), como se pode observar na figura 6. Outro mecanismo utilizado combina os fármacos convencionais com miRNA, uma vez que as terapêuticas com fármacos podem ser melhoradas pela intervenção do miRNA cujo alvo são caminhos celulares que afetam resultados terapêuticos. A combinação dos miRNA com os siRNA aponta para o aumento da eficiência da terapêutica, uma vez que o desenvolvimento de fármacos de siRNA se encontram mais avançados que os fármacos de miRNA (Diener, Keller e Meese 2022)

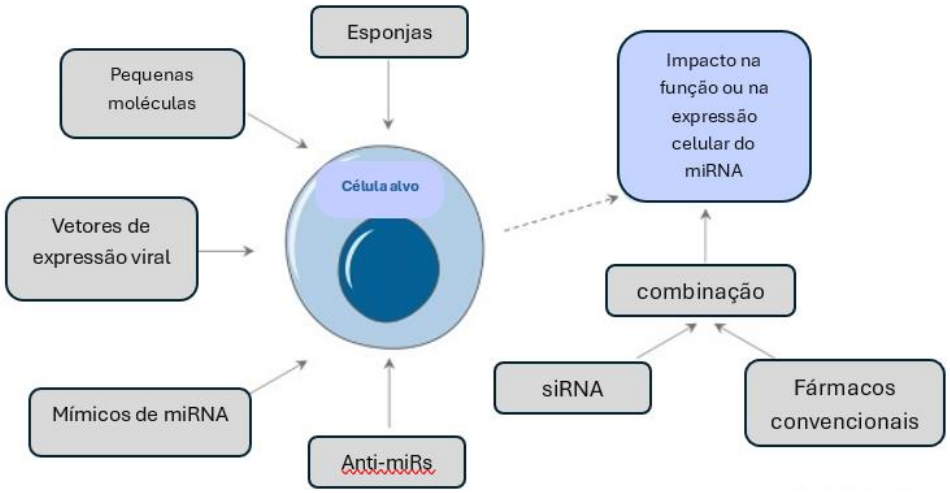

Figura 6. Visão geral das rotas utilizadas para atingir o miRNA nas células (Adaptado de: Diener, Keller e Meese 2022).

Os fármacos de miRNA testados até agora foram administrados por forma intravenosa ou cutânea. Para doenças respiratórias a terapêutica pode ser administrada também por via inalatória. Apesar do uso de terapias baseadas em miRNA ser bastante apelativo ainda existem algumas dificuldades a ser ultrapassadas como a identificação das vias de administração mais apropriadas, a estabilidade dentro do organismo, a chegada do fármaco aos tecidos e células desejados e a obtenção dos resultados intracelulares pretendidos (Diener, Keller e Meese 2022).

O Miravirsen foi o primeiro fármaco de miRNA a entrar em ensaios clínicos, encontrando-se neste momento em fase II. Este fármaco tem como alvo os miR-122, um miRNA com capacidade de aumentar a transcrição do vírus da hepatite C, ligando-se aos dois locais de ligação na UTR 5' do genoma do vírus. O Mesomir é outro exemplo de miRNA em fase II de ensaios clínicos. Este consiste num mímico de miRNA que substitui o miR-16 o qual se encontra reprimido em cancros como o mesotelioma pleural maligno (Ho *et al.* 2022).

Na tabela 3 pode observar-se algumas das terapêuticas de miRNA que se encontram em fase I e II de ensaios clínicos, as respetivas doenças e miRNA alvo.

Tabela 3. Algumas das terapêuticas de miRNA em ensaios clínicos (Adaptado de Ho *et al*. 2022).

Nome	Doença	miRNA alvo	Fase de ensaio clínico
Miravirsen	Vírus da Hepatite C	AntagomiR e miR-122	II
Cobomarsen	Linfoma e Leucemia	AntagomiR e miR-155	II
Mesomir	Mesotelioma pleural maligno	Mímicos de RNA e miR-16	II
ABX464	Doença de Crohn	miR-124	II
Remlarsen	Doença fibrótica	Mímicos de RNA e miR-29a	I
MRX34	Cancro	Mímicos de RNA e miR-34a	I
MRG-110	Doenças isquémicas	miR-92	I

A vantagem do uso terapêutico dos miRNA começa pelo facto de estes serem moléculas inatas das células do corpo humano e por isso apresentam naturalmente os mecanismos para o processamento e seleção dos alvos e em segundo lugar, os miRNA atuam visando múltiplos genes envolvidos da mesma via apresentando por isso uma resposta ampla e simultaneamente específica. Um exemplo é o miR-15 e o miR-16 que desregulam vários fatores anti-apoptose incluindo o BCL-2 e o MCL1 (Winkle *et al.* 2021).

4.2 Terapêutica baseada em lncRNA

Os lncRNA são os RNA não codificantes mais complexos. A complexidade desta classe de RNA advém da sua estrutura 3D multifacetada que é capaz de se modificar rapidamente e conferir-lhes a habilidade de realizarem diferentes funções. Estes apresentam funções *cis* e *trans* onde as *cis* estão normalmente relacionadas com a transcrição do DNA, modificações da cromatina e o looping cromossomal enquanto as funções *trans* incluem a ligação ao mRNA (alterando a sua estabilidade), ligação a proteínas (alterando a sua função) e interação com outros ncRNA, facilitando a formação de *paraspeckles*. Apesar de se saber que os lncRNA estão relacionados com o cancro os estudos raramente se convertem à prática clínica, com exceção do PCA3 que já é considerado como biomarcador para o cancro da próstata (Chen *et al.* 2022).

O cancro da próstata é diagnosticado maioritariamente através dos níveis de PSA (antigénio específico da próstata) presente no soro juntamente com o exame retal digital. Apesar da elevada sensibilidade deste antigénio para a deteção do cancro da próstata, a especificidade é reduzida o que conduz a um elevado número de biópsias negativas apesar dos níveis de PSA aumentados no soro (Day *et al.* 2011). Em 1999 constatou-se que que o lncRNA PCA3 se encontra em níveis elevados nos tecidos tumorais da próstata sendo considerado um biomarcador por não se detetar em tecidos normais nem tecidos neoplásicos provenientes da bexiga, mama, cérvix, endométrio, rim, ovário ou testículo. A deteção do PCA3 pode ser feita em amostras de urina, sangue ou biópsias (Ghafouri-Fard *et al*. 2022).

4.3 Terapêutica baseada em siRNA

Os mecanismos de ação dos fármacos de siRNA acontecem maioritariamente por inibição da expressão de genes alvo do RNAi. O processamento do RNAi começa no citoplasma com a endoribonuclease DICER, que produz siRNA maduros através da clivagem de RNA de cadeia dupla longos ou RNA hairpin curtos. O siRNA resultante tem entre 21-23 nucleótidos de comprimento e é incorporado no complexo RISC o qual é composto por um conjunto de proteínas integrais incluindo a Dicer e Ago-2. As cadeias de siRNA

são depois separadas em *sense* e *antisense* onde a *antisense* servirá de guia para alinhar o complexo à sequência de mRNA. Quando utilizados os RNAi para benefício terapêutico podemos ignorar o passo inicial de maturação do siRNA, mediado pelo Dicer, e administrar diretamente siRNA preparados artificialmente. Uma vez que a atividade do RISC é determinada pela cadeia guia, é crucial sintetizar uma cadeia *antisense* que otimize a seletividade sendo igualmente importante a sintetização de uma cadeia que não se irá ligar a potenciais sequências de mRNA homólogas (Zhang *et al.* 2021).

Primeiro anunciados em 1978, os fármacos baseados em oligonucleótidos *antisense* continuam a ser bastante apelativos por serem baseados na hibridação de Watson-Crick e por serem muito mais específicos que os fármacos tradicionais que utilizam moléculas mais pequenas. Para explorar a oportunidade de utilizar a hibridação Watson-Crick dos oligonucleótidos análogos ao RNA foi primeiro necessário compreender a química medicinal dos oligonucleótidos. A maioria das modificações focou-se no aumento da afinidade por nucleótido para a sequência cognata e/ou no aumento da resistência às nucleases. Já foram feitos e testados milhares de ácidos nucleicos análogos de RNA e DNA, consistindo na modificação de bases, modificação de açúcares, modificação das ligações internucleosídicas. A estrutura de cadeia dupla ou cadeia simples tem um impacto considerável no desempenho dos oligonucleótidos cujo alvo é o RNA, enquanto os ASOs são de cadeia simples, os siRNA são de cadeia dupla, contendo uma cadeia *sense* e uma *antisense*, onde a *antisense* é farmacologicamente ativa enquanto a *sense* pode ser considerada a "distribuidora de fármacos" por transportar a cadeia *antisense* para a Ago2 (endonuclease intracelular). Quanto às classes químicas, os oligonucleótidos dentro de cada classe diferem apenas na sequência tendo por isso características físico-químicas semelhantes e consequentemente propriedades farmacocinéticas e biológicas em comum, sendo essencial definir com precisão a química de cada oligonucleótidos direcionado ao RNA (Crooke, Bennett e Baker 2018).

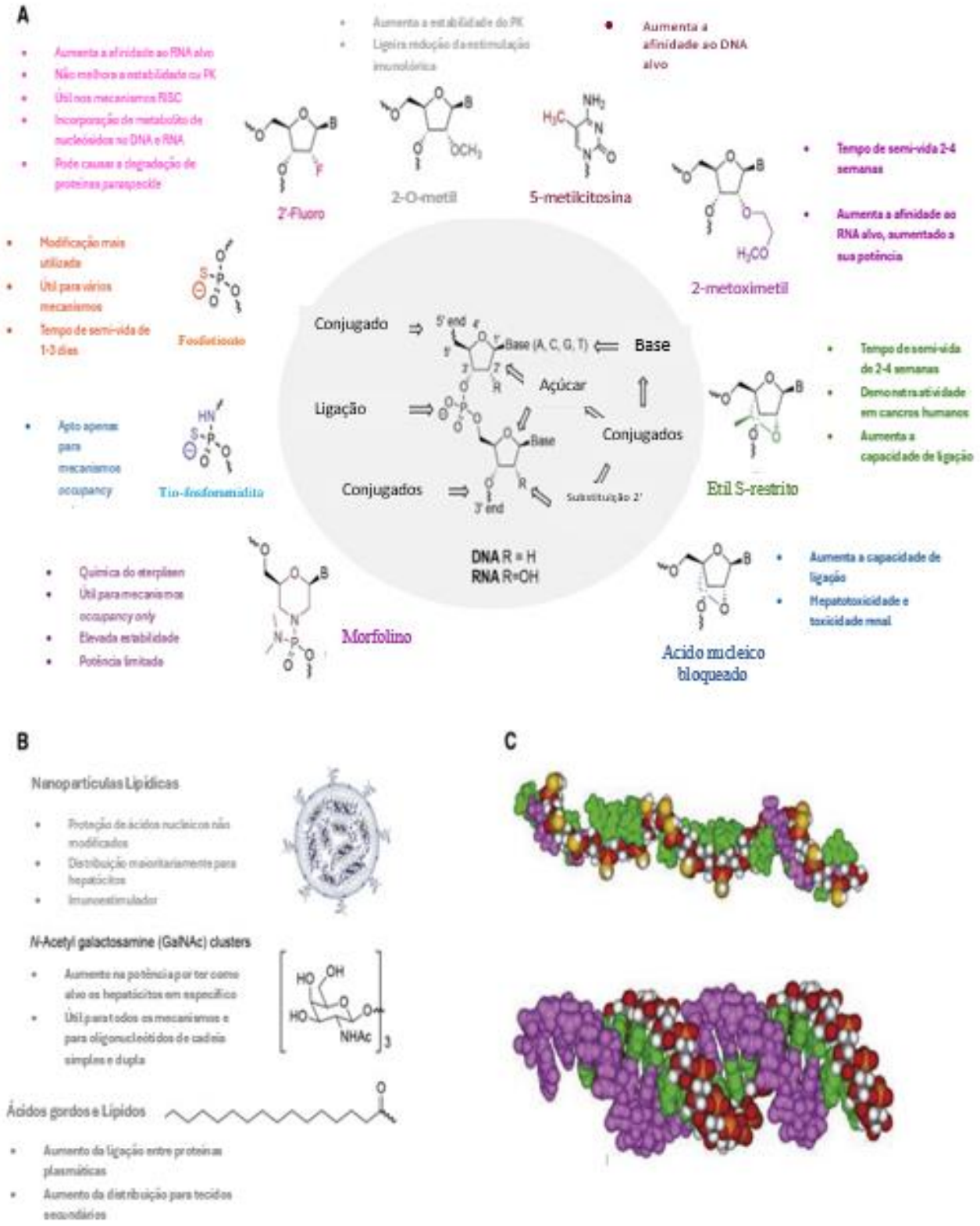

Figura 7. Modificações de oligoncleótidos (Crooke, S. T., Witztum, J. L., Bennett, C. F., & Baker, B. F. 2018).

No painel A da figura 7 observam-se alguns dos ácidos nucleicos análogos de RNA e DNA que já foram testados nos oligonucleótidos *antisense*. Como referido anteriormente, consistem na modificação de bases, açúcares, modificação de ligações internucleosídicas e na conjugação de pequenas e grandes moléculas em todas as posições de dinucleótidos. No painel B observam-se as conjugações utilizadas nos estados mais avançados dos ensaios químicos para aumentar a distribuição e por fim na secção C observam-se as estruturas de cadeia simples e cadeia dupla dos oligonucleótidos Crooke, Bennett e Baker 2018).

Como foi referido anteriormente, já existem fármacos baseados em siRNA aprovados para comercialização como é o caso do Givosiran (Givlaari^{tm}). Este medicamento foi desenvolvido pela Farmacêutica Alnylam para tratamento da porfiria hepática aguda. Esta doença trata-se de uma mutação genética que afeta a produção do grupo heme no fígado. O processo de produção do grupo heme é controlado pela proteína ácido aminolevulínico sintetase 1 (ALAS1). Quando a proteína ALAS1 é ativada, a produção do grupo heme é incapaz de acompanhar, levando à acumulação de ácido aminolevulínico (ALA) e porfobilinogénio. Este fármaco consiste num siRNA de cadeia dupla cujo alvo é o RNA mensageiro ALAS). Este siRNA liga-se covalentemente a um ligando com três N-acetilgalactosaminas que têm como alvo os recetores das asialoglicoproteínas. Uma vez que estes recetores são expressos quase exclusivamente nos hepatócitos, a distribuição do Givosiran é direcionada para os mesmos. A chegada dos siRNA aos hepatócitos resultará na redução da expressão do mRNA do ALAS1 prevenindo simultaneamente a acumulação do ácido aminolevulínico neurotóxico e do porfobilinogénio no fígado (Scott 2020).

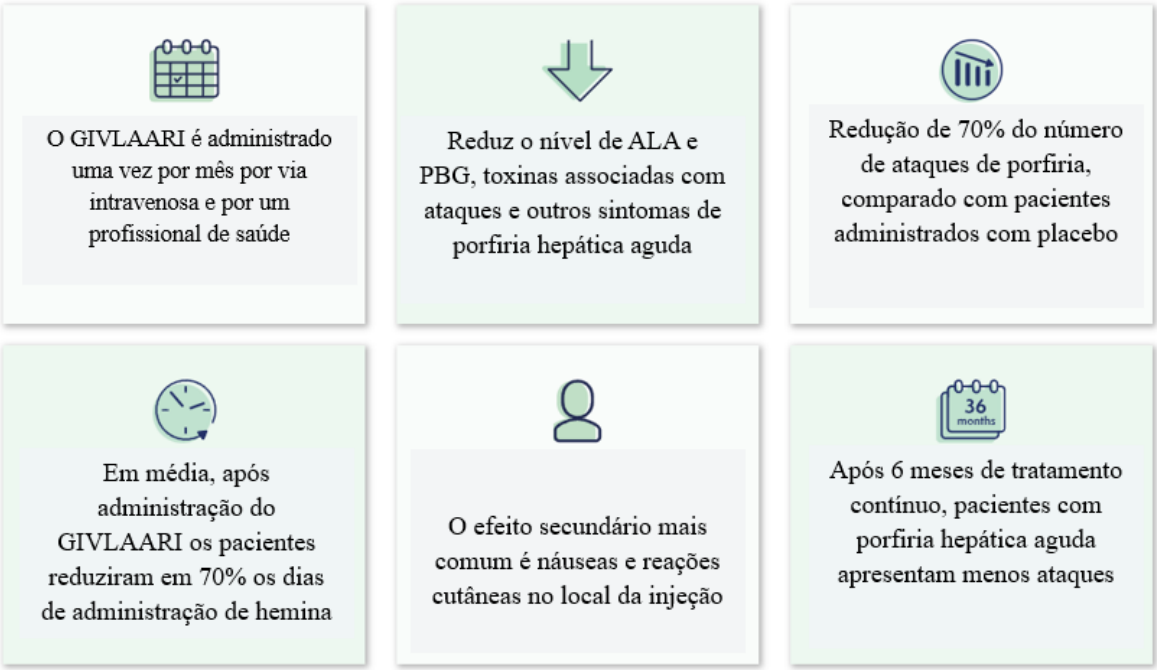

Figura 8. Principais características do fármaco Givosiran (Adaptado de: https://www.givlaari.com/).

Tal como o Givosiran, o Patisiran (Onpattro^{tm}) foi também desenvolvido pela Farmacêutica Alnylan. Este medicamento foi aprovado para o tratamento da amiloidose ATTR hereditária (hATTR) em adultos, uma doença autossómica dominante (figura 9), caracterizada pela deposição da proteína amiloide nos órgãos e tecidos do corpo. Consiste também num siRNA de cadeia dupla, encapsulado numa nano partícula lipídica que permite a sua distribuição para os hepatócitos. Este fármaco liga-se a uma sequência geneticamente conservada na UTR 3' dos mRNA de transtirretinas mutantes e selvagens (TTR), levando à degradação destas proteínas havendo consequentemente uma redução no nível de proteínas TTR no soro e deposição das proteínas TTR no tecido (Urtis *et al.* 2020).

5. Desafios e perspetivas futuras

As terapias com base no ncRNA têm vindo a provar o seu potencial na última década, principalmente para o desenvolvimento de terapias contra o cancro. Com a descoberta das funções dos miRNA gerou-se bastante entusiasmo no desenvolvimento das terapias baseadas no miRNA. Como referido nos capítulos anteriores, a desregulação dos níveis de miRNA contribui para a patogénese de várias doenças nomeadamente através da modulação dos genes envolvidos em processos celulares como a proliferação, diferenciação, apoptose, angiogénese, metastização, resistência a fármacos e também a tumorigénese. Através do RNAi, os miRNA mimic, antagomirs e os siRNA têm a capacidade de inibir a expressão de qualquer gene ou mRNA relacionado com o cancro, representando por isso uma ferramenta terapêutica excecional para terapêuticas alvo e medicina de precisão. O sucesso das terapêuticas com miRNA e siRNA está dependente da distribuição segura e eficaz dos fármacos até as células tumorais ou microambiente tumoral. Por este motivo a nano distribuição tem vindo a ser desenvolvida utilizando uma grande variedade de moléculas para administração sistémica e aperfeiçoamento da chegada dos fármacos aos tumores, com o mínimo de efeitos secundários possíveis (Kara, Calin e Ozpolat 2022).

Apesar do elevado potencial terapêutico dos siRNA, um dos principais desafios da sua utilização em terapias é a biodisponibilidade reduzida, devido ao seu tamanho e carga aniónica. A nível sistémico a distribuição dos siRNA é comprometida pela rápida depuração, principalmente pelos rins. Os siRNA também apresentam como desvantagem a rápida degradação pelas nucleases presentes no plasma, tecidos e citoplasma. Após passarem pela depuração sistémica os fármacos deverão passar pelo endotélio capilar para os tecidos, o que é desafiante devido à abundância de aderência e junções estreitas. Os siRNA têm tendência para se acumulares em locais como o fígado ou tecidos tumorais o que dificulta a sua distribuição para outros locais (Zhang *et al.* 2021). É ainda necessário aperfeiçoar os tratamentos de modo a evitar efeitos secundários, indução de respostas imunes prejudiciais e ainda a complexidade e o elevado custo dos estudos realizados (Fu *et al.* 2023).

Outro obstáculo comumente enfrentado no desenvolvimento de terapias génicas está relacionado com o RNA uma vez que as terapias de RNA requerem conhecimento espec

específico sobre os mecanismos de ação e de mutação de doenças. Por este motivo a sequenciação genómica e a sua análise são fatores muito importantes para a identificação dos alvos para as terapias de RNA (Hastings e Krainer 2023).

6. Conclusão

O interesse pelo uso de RNA não codificantes para fins terapêuticos tem vindo a aumentar bastante nos últimos anos devido ao seu potencial terapêutico para doenças como o cancro, doenças neurodegenerativas e muitas outras. As terapias baseadas em ncRNA têm vindo a demonstrar o seu potencial na medicina de precisão, contribuindo para terapias personalizadas e consequentemente mais adequadas e eficazes para cada paciente.

Apesar de já existirem fármacos de ncRNA aprovados para comercialização, como é o caso do Givosiran e do Patisiran,, e bastantes em fase II de ensaios clínicos, ainda existem alguns obstáculos a superar como a distribuição dos ncRNA nos alvos, de forma segura e eficaz, minimizando ~~os~~ efeitos secundários.

O futuro das aplicações terapêuticas dos RNA não codificantes é bastante promissor por si só, podendo também ser combinado com outras terapêuticas como é o caso da quimioterapia. Com os avanços contínuos nas mais diversas áreas científicas espera-se uma evolução no diagnóstico, terapia, associados à medicina de precisão, no sentido de personalização das terapias a aplicar a cada doente.

7. Referências bibliográficas

Chen, B., Dragomir, M. P., Yang, C., Li, Q., Horst, D., & Calin, G. A. (2022). Targeting non-coding RNAs to overcome cancer therapy resistance. *Signal transduction and targeted therapy*, *7*(1), 121. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00975-3

Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. International journal of molecular sciences, 20(24), 6249. https://doi.org/10.3390/ijms20246249

Crooke, S. T., Witztum, J. L., Bennett, C. F., & Baker, B. F. (2018). RNA-Targeted Therapeutics. Cell metabolism, 27(4), 714–739. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.004

Didychuk, A. L., Butcher, S. E., & Brow, D. A. (2018). The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. RNA (New York, N.Y.), 24(4), 437–460. https://doi.org/10.1261/rna.065136.117

Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. Trends in genetics: TIG, 38(6), 613–626. https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.006

Dong, Y., Siegwart, D. J., & Anderson, D. G. (2019). Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. Advanced drug delivery reviews, 144, 133–147. https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.004

Gowda, P., Reddy, P. H., & Kumar, S. (2022). Deregulated mitochondrial microRNAs in Alzheimer's disease: Focus on synapse and mitochondria. Ageing research reviews, 73, 101529. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101529

Day, J. R., Jost, M., Reynolds, M. A., Groskopf, J., & Rittenhouse, H. (2011). PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. Cancer letters, 301(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.019

de Magalhães, A. X. S. (2017). The impact of non-coding alterations in glioma: hints from HOTAIR and the TERT promoter (Doctoral dissertation, Universidade do Minho (Portugal)

Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Baniahmad, A., Taheri, M., & Rashnoo, F. (2022). A review on the role of PCA3 lncRNA in carcinogenesis with an especial focus on prostate cancer. *Pathology, research and practice*, *231*, 153800. https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153800

Hanusek, K., Poletajew, S., Kryst, P., Piekiełko-Witkowska, A., & Bogusławska, J. (2022). piRNAs and PIWI Proteins as Diagnostic and Prognostic Markers of Genitourinary Cancers. Biomolecules, 12(2), 186. https://doi.org/10.3390/biom12020186

Hastings, M. L., & Krainer, A. R. (2023). RNA therapeutics. *RNA (New York, N.Y.)*, *29*(4), 393–395. https://doi.org/10.1261/rna.079626.123

He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. International journal of biological sciences, 16(14), 2628–2647. https://doi.org/10.7150/ijbs.47203

He, J., Han, Z., & Li, Y. (2014). Association between long non-coding RNA and human rare diseases (Review). Biomedical Reports, 2, 19-23. https://doi.org/10.3892/br.2013.191

Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, *23*(13), 7167. https://doi.org/10.3390/ijms23137167

Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. Signal transduction and targeted therapy, 5(1), 101. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x

Huang Y. (2018). The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, *22*(12), 5768–5775. https://doi.org/10.1111/jcmm.13866

Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. Annual review of biochemistry, 84, 405–433. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258

Kara, G., Calin, G. A., & Ozpolat, B. (2022). RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. Advanced drug delivery reviews, 182, 114113. https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114113

Khavari, B., & Cairns, M. J. (2020). Epigenomic Dysregulation in Schizophrenia: In Search of Disease Etiology and Biomarkers. *Cells*, *9*(8), 1837. https://doi.org/10.3390/cells9081837

Kilikevicius, A., Meister, G., & Corey, D. R. (2022). Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. Nucleic acids research, 50(2), 617–634. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1256

Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Gomes Welter, P., Brocardo, P. S., Rosenstock, T. R., & Gil-Mohapel, J. (2021). New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *International journal of molecular sciences*, *22*(16), 8363. https://doi.org/10.3390/ijms22168363

Kim K. W. (2019). PIWI Proteins and piRNAs in the Nervous System. Molecules and cells, 42(12), 828–835. https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0241

Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. Cell, 172(3), 393–407. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011

Li, K., & Wang, Z. (2023). lncRNA NEAT1: Key player in neurodegenerative diseases. *Ageing research reviews*, *86*, 101878. https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101878

Li, Q., Ren, X., Wang, Y., & Xin, X. (2023). CircRNA: a rising star in leukemia. *PeerJ*, *11*, e15577. https://doi.org/10.7717/peerj.15577

Liang, G., Ling, Y., Mehrpour, M., Saw, P. E., Liu, Z., Tan, W., Tian, Z., Zhong, W., Lin, W., Luo, Q., Lin, Q., Li, Q., Zhou, Y., Hamai, A., Codogno, P., Li, J., Song, E., & Gong, C. (2020). Autophagy-associated circRNA circCDYL augments autophagy and promotes breast cancer progression. *Molecular cancer*, *19*(1), 65. https://doi.org/10.1186/s12943-020-01152-2

Lin, C., Feng, Y., Peng, X., Wu, J., Wang, W., & Liu, Y. (2021). U2.3 Precursor Small Nuclear RNA *in vitro* Processing Assay. *Bio-protocol*, *11*(17), e4142. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4142

Loganathan, T., & Doss C, G. P. (2023). Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets. Functional & integrative genomics, 23(1), 33. https://doi.org/10.1007/s10142-022-00947-4

Matsui, M., & Corey, D. R. (2017). Non-coding RNAs as drug targets. Nature reviews. Drug discovery, 16(3), 167–179. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.117

McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European journal of neurology*, *25*(1), 24–34. https://doi.org/10.1111/ene.13413

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F., & Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. Nature, 495(7441), 333–338. https://doi.org/10.1038/nature11928

Nishiyama, A., & Nakanishi, M. (2021). Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends in genetics: TIG*, *37*(11), 1012–1027. https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002

transcriptional repression in Drosophila, mice, and yeast: new insights and biodiversity. EMBO reports, 22(10), e53062. https://doi.org/10.15252/embr.202153062

Owusu Adjei, M., Zhou, X., Mao, M., Rafique, F., & Ma, J. (2021). MicroRNAs Roles in Plants Secondary Metabolism. *Plant signaling & behavior*, *16*(7), 1915590. https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1915590

Paccosi, E., & Proietti-De-Santis, L. (2023). Parkinson's Disease: From Genetics and Epigenetics to Treatment, a miRNA-Based Strategy. *International journal of molecular sciences*, *24*(11), 9547. https://doi.org/10.3390/ijms24119547

Panni, S., Lovering, R. C., Porras, P., & Orchard, S. (2020). Non-coding RNA regulatory networks. Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms, 1863(6), 194417. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.194417

Paulo P. Amaral, Marcel E. Dinger, John S. Mattick (2013). Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: an evolutionary perspectiv, Briefings in Functional Genomics, https://doi.org/10.1093/bfgp/elt016

Rajagopal, T., Talluri, S., Akshaya, R. L., & Dunna, N. R. (2020). HOTAIR LncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 503, 1–18. https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.028

Richetto, J., & Meyer, U. (2021). Epigenetic Modifications in Schizophrenia and Related Disorders: Molecular Scars of Environmental Exposures and Source of Phenotypic Variability. *Biological psychiatry*, *89*(3), 215–226. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.008

Riella, C. V. (2019). Small non-coding RNAs: from trash to treasure. Brazilian Journal of Nephrology, 41(2), 168–169. https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0075

Romano, G., Veneziano, D., Acunzo, M., & Croce, C. M. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*, *38*(5), 485–491. https://doi.org/10.1093/carcin/bgx026

Romagnolo, A. P., Romagnolo, D. F., & Selmin, O. I. (2015). BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *15*(1), 4–14. https://doi.org/10.2174/1871520614666141020153543

Scott L. J. (2020). Givosiran: First Approval. Drugs, 80(3), 335–339. https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0

Shaath, H., Vishnubalaji, R., Elango, R., Kardousha, A., Islam, Z., Qureshi, R., Alam, T., Kolatkar, P. R., & Alajez, N. M. (2022). Long non-coding RNA and RNA-binding protein interactions in cancer: Experimental and machine learning approaches. Seminars in cancer biology, 86(Pt 3), 325–345. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.05.013

Shi, J., Zhou, T., & Chen, Q. (2022). Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nature cell biology*, *24*(4), 415–423. https://doi.org/10.1038/s41556-022-00880-5

Siqueira, M. K., & Pires, L. (2017). Processo epigenéticos envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla com ênfase na função dos miRNAs. *Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde*, *37*(2), 125–136. https://doi.org/10.5433/1679-0367.2016v37n2p125

Slaby, O., Laga, R., & Sedlacek, O. (2017). Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer. The Biochemical journal, 474(24), 4219–4251. https://doi.org/10.1042/BCJ20170079

Onishi, R., Yamanaka, S., & Siomi, M. C. (2021). piRNA- and siRNA-mediated

Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, *179*(5), 1033–1055. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017

Stoker, T. B., Mason, S. L., Greenland, J. C., Holden, S. T., Santini, H., & Barker, R. A. (2022). Huntington's disease: diagnosis and management. *Practical neurology*, *22*(1), 32–41. https://doi.org/10.1136/practneurol-2021-003074

Su L, Li R, Zhang Z, Liu J, Du J, Wei H. (2017). Identification of altered exosomal microRNAs and mRNAs in Alzheimer's disease. Ageing Res Rev. Jan;73:101497. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101497

Taghvimi, S., Soltani Fard, E., Khatami, S. H., Zafaranchi Z M, S., Taheri-Anganeh, M., Movahedpour, A., & Ghasemi, H. (2024). lncRNA HOTAIR and Cardiovascularh ttps://doi.org/10.1007/s10142-024-01444-6

Toden, S., Zumwalt, T. J., & Goel, A. (2021). Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer, 1875(1), 188491. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188491

Urits, I., Swanson, D., Swett, M. C., Patel, A., Berardino, K., Amgalan, A., ... & Viswanath, O. (2020). A review of patisiran (ONPATTRO®) for the treatment of polyneuropathy in people with hereditary transthyretin amyloidosis. *Neurology and therapy*, *9*, 301-315.

Van der Werf, J., Chin, C. V., & Fleming, N. I. (2021). SnoRNA in Cancer Progression, Metastasis and Immunotherapy Response. *Biology*, *10*(8), 809. https://doi.org/10.3390/biology10080809

Varesi, A., Carrara, A., Pires, V. G., Floris, V., Pierella, E., Savioli, G., Prasad, S., Esposito, C., Ricevuti, G., Chirumbolo, S., & Pascale, A. (2022). Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis and Progression: An Overview. Cells, 11(8), 1367. https://doi.org/10.3390/cells11081367

Wang, F., Lin, H., Su, Q., & Li, C. (2022). Cuproptosis-related lncRNA predict prognosis and immune response of lung adenocarcinoma. World journal of surgical oncology, 20(1), 275. https://doi.org/10.1186/s12957-022-02727-7

Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2021). Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nature reviews. Drug discovery*, *20*(8), 629–651. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z

Wojciechowska, A., Braniewska, A., & Kozar-Kamińska, K. (2017). MicroRNA in cardiovascular biology and disease. Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, 26(5), 865–874. https://doi.org/10.17219/acem/62915

Xiong, Q., & Zhang, Y. (2023). Small RNA modifications: regulatory molecules and potential applications. Journal of hematology & oncology, 16(1), 64. https://doi.org/10.1186/s13045-023-01466-w

Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. Essays in biochemistry, 65(4), 625–639. https://doi.org/10.1042/EBC20200032

Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., & Zhong, X. B. (2021). The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical pharmacology*, *189*, 114432. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114432

Zhang, M., Bai, X., Zeng, X., Liu, J., Liu, F., & Zhang, Z. (2021). circRNA-miRNA-mRNA in breast cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *523*, 120–130. https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.09.013

Zhang, M., Li, K., Bai, J., Van Damme, R., Zhang, W., Alba, M., Stiles, B. L., Chen, J. F., & Lu, Z. (2023). A snoRNA-tRNA modification network governs codon-biased cellular states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *120*(41), e2312126120. https://doi.org/10.1073/pnas.2312126120

Zhao, H., Tan, Z., Zhou, J., Wu, Y., Hu, Q., Ling, Q., Ling, J., Liu, M., Ma, J., Zhang, D., Wang, Y., Zhang, J., Yu, P., Jiang, Y., & Liu, X. (2023). The regulation of circRNA and lncRNAprotein binding in cardiovascular diseases: Emerging therapeutic targets. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *165*, 11506 https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115067

Zhao, L., Wang, J., Li, Y., Song, T., Wu, Y., Fang, S., Bu, D., Li, H., Sun, L., Pei, D., Zheng, Y., Huang, J., Xu, M., Chen, R., Zhao, Y., & He, S. (2021). NONCODEV6: an updated database dedicated to long non-coding RNA annotation in both animals and plants. *Nucleic acids research*, *49*(D1), D165–D171. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1046