

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/01/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Tainara Francini Felix**

**MicroRNoma do carcinoma de pâncreas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Bases Gerais da Cirurgia. Área de concentração: Genética.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Patrícia Pintor dos Reis

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Sandra Drigo Linde

**Botucatu  
2016**

Tainara Francini Felix

MicroRNoma do carcinoma de pâncreas

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestre(a)  
em Bases Gerais da Cirurgia.  
Área de concentração:  
Genética.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Patrícia Pintor dos Reis

Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Sandra Drigo Linde

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Felix, Tainara.

MicroRNoma do carcinoma de pâncreas / Tainara Felix. -  
Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Coorientador: Sandra Drigo Linde

Capes: 20200005

1. Pâncreas - Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3. MicroRNAs.  
4. Expressão gênica. 5. Ampola hepatopancreática.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de ductos pancreáticos;  
Adenocarcinoma de papila de Vater; Carcinoma de pâncreas;  
MicroRNA; miRNA.

Dedico este trabalho...

Aos meus avôs CICERO e FRANÇA (*in memorian*), por todo amor que dedicarão a mim, e por serem o exemplo de vida, e sempre me guiarem para os melhores caminhos.

A minha mãe SANDRA meu irmão FELIPE, por me encherem de amor e carinho, e sempre estarem presentes.

Aos meus AMIGOS, pela presença e paciência constante em meio às tempestades.

Obrigado por existirem... AMO VOCÊS!!!

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS** por me dar a vida, guiar o meu caminho, me orientar sempre e colocar em meu caminho pessoas tão especiais, que me apoiaram, me deram amor e dividirão o seu conhecimento.

A minha mãe **SANDRA**, por todo apoio, carinho e companheirismo não só nestes dois últimos anos, mas em toda a minha existência. Por sempre ter um abraço nas horas difíceis e palavras que me estimularam a seguir em frente, por ouvir atentamente todas as minhas histórias as sexta-feira, quando eu falo e falo sem parar, por todo esforço investido em minha pessoa na minha jornada pelo conhecimento, e acima de tudo por sempre ter confiado em mim. Te amo!

Aos meus avôs **CICERO** e **FRANÇA** (*in memoriam*), por terem me dado tudo e um pouco mais, por serem meu refúgio e minha fortaleza e me incentivarem a lutar por meus sonhos, assim como ter me dado todo o apoio moral e financeiro, por me incentivarem a ir além de casa, mas sempre levar um pouquinho de cada um comigo. Vocês sempre serão o meu melhor exemplo!

Aos meus tios **SELMA**, **JULIANO**, **NILSON** e **FERNANDA**, por sempre estarem lá quando precisei, sendo ótimos exemplos de família, força e união.

Ao meu irmão **ADILAN** e meus primos **ALLAN**, **MARIA EDUARDA** e a pequena **JÚLIA**, por todo amor incondicional e por me fazerem sempre querer ser melhor e exemplo por eles e para eles. A minha cunhada **FABIANE** por todo o incentivo e apoio sempre.

A minha orientadora Dra. **PATRICIA PINTOR REIS**, por ter me aceito e me incentivado desde o primeiro estágio em seu laboratório, e também por ser muito mais que uma orientadora, esses anos pude aprender muito não só nas práticas laboratório mas também a ser uma pessoa melhor, sempre pronta a ouvir e ajudar, muito obrigado por sempre estar presente, pronta para ouvir, explicar e ajudar.

A minha co-orientadora Dra. **SANDRA DRIGO LINDE**, por toda ajuda e apoio, pela disponibilidade em ajudar, e a amizade ao longo desses anos de laboratório Neogene, sempre pronta para dar conselhos, muito obrigada.

A Dra. **SILVIA REGINA ROGATTO**, por nos oferecer a estrutura do laboratório Neogene e por todo ensinamento nas conversas aos longos destes anos.

A Dra. **MARIA APARECIDA**, por toda ajuda nas análises anatomopatológicas das amostras utilizadas e por todo ensinamento.

A Dra. **CLAUDIA** e Dr. **JUAN**, por toda a ajuda na coleta dos dados clínicos.

Ao Dr. **ROBSON**, por toda ajuda na fase inicial dos testes e com a primeira etapa das análises de dados, e por ceder o laboratório de morfologia como apoio.

Ao Dr. **ROGÉRIO**, por toda a ajuda na parte das análises estatísticas.

As primeiras amigas de laboratório em Botucatu **ALINE, NATÁLIA e SARITA**, com as quais dividi meus primeiros anos de formação, dividimos alegrias e tristezas, e nós unimos em um ponto de apoio e incentivo, muito obrigada por serem parte da minha família botucuda meninas.

As amigas de laboratório Neogene, **NAIARA, NATÁLIA, CAROL, LARISSA, JOVITA, MAÍSA, TATIANE** e ao **MÁRCIO**, por terem me acolhido e compartilhado comigo os cafés para fortalecer as amizades, assim como os ensinamentos e momentos de descontração, foi muito bom partilhar este momento com vocês.

Aos meus amigos, conhecidos por **MANADA** (AMANDA, BARBARA, BRUNO, DANIEL, DANILO, DUDA, ELIAS, EVANDRO, FELIPE, GIOVANA, JULIA, LEANDRO, MAYCON, NATALIA, NATY, PAMELA, RAFAELA, CORÓ, RODOLFO, RODRIGO, RONE, VINICIUS E VITÓRIA) por sempre me incentivarem, me apoiarem, e me ouvirem horas falando sobre pâncreas ou quando as coisas não saiam ao meu gosto, foi, é e sempre será bom ter vocês por perto.

Ao **GSSOLLO** (DUDA, FANO e CORÓ) por todos os momentos de descontração, apoio e comemoração aos dias bons e ruins, vocês foram muito importantes!

Aos meus amigos que cresceram comigo (**BRUNA, ELI, DIEGO, DIONI, FERNANDO, LUCAS, LUIZ PAULO**) que sempre torceram por mim, desde os tempos remotos da escolinha até hoje, nesta busca por mais conhecimento.

A **MÁRCIA** secretária da pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia, muito obrigado por toda a ajuda sempre.

As secretárias do departamento de Patologia, por toda a ajuda com a captação dos laudos.

À CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado (processo 2014/00367-4).

## RESUMO

**Introdução:** Alterações genéticas foram previamente identificadas e associadas ao desenvolvimento e progressão dos carcinomas pancreáticos, entretanto, o conhecimento dessas alterações não resultou, até o momento, no desenvolvimento de tratamentos eficazes para os pacientes com essas neoplasias. Sendo assim, torna-se necessária e justificada a identificação de outras alterações, tais como alterações em moléculas reguladoras da expressão gênica, as quais têm o potencial de levar ao delineamento de novas terapias. Estudos recentes têm sugerido que os microRNAs (miRNAs) estão frequentemente desregulados em diversos carcinomas, e podem contribuir em várias etapas do desenvolvimento e progressão tumoral. A análise do perfil de expressão de miRNAs em carcinomas de pâncreas e genes regulados por estes miRNAs, deve fornecer novas direções para a identificação de biomarcadores que possam ser úteis na prática clínica.

**Objetivos:** Identificar perfis globais de expressão de microRNAs (miRNAs) e potenciais genes-alvo regulados por miRNAs em carcinomas de pâncreas.

**Pacientes e Métodos:** Foram incluídas 30 amostras de tecido, fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFPE) de carcinoma de pâncreas, sendo 24 adenocarcinomas de ductos pancreáticos (PDAC) e 6 adenocarcinomas de papila de Vater (AMP) e os tecidos histologicamente normais, adjacentes ao tumor, correspondentes a cada caso. O perfil de expressão de miRNAs das amostras tumorais foi determinado utilizando o ensaio *TaqMan Array Human MicroRNA Cards* (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies). A análise dos dados utilizou o programa ExpressionSuite Software v1.0.3. A análise estatística dos dados de expressão de miRNAs e dados clínico-anatomopatológicos utilizou o programa SAS 9.3. Análises computacionais utilizando algoritmos de bioinformática foram realizadas com o objetivo de identificar genes-alvo regulados por miRNAs, bem como redes de interação protéica e vias moleculares envolvendo genes e miRNAs.

**Resultados:** Foram identificados 63 miRNAs desregulados em PDAC, sendo 33 com expressão aumentada e 30 com expressão diminuída, quando comparado com tecido histologicamente normal adjacente ao tumor. Nos carcinomas AMP, um grupo de 7 miRNAs estavam desregulados, sendo 4 com expressão aumentada e 3 com expressão diminuída. Nossos resultados indicam uma complexidade de alterações associadas à tumorigênese dos adenocarcinomas ductais pancreáticos, devido ao grande número de miRNAs e genes-alvo



desregulados nesses tumores. Interessantemente, 3/7 miRNAs identificados como desregulados em carcinomas AMP estão comumente alterados nos PDAC.

**Discussão:** O perfil de expressão global de miRNAs identificado em PDAC e carcinomas AMP revelou que os PDACs apresentam um número significativamente maior de miRNAs desregulados, o que pode estar diretamente associado a um maior grau de progressão e maior agressividade tumoral comparado com os carcinomas AMP. A identificação de 3 miRNAs comumente alterados em PDAC e carcinomas AMP sugere que vias moleculares comuns podem estar desreguladas nesses subtipos histológicos tumorais. Dentre os miRNAs alterados exclusivamente nos PDACs, identificamos que esses regulam vários genes associados à invasão tecidual, metástase e pior prognóstico de pacientes com câncer.

**Conclusão:** Os miRNAs identificados estão potencialmente associados à biologia tumoral dos PDAC e carcinomas AMP. Estudos de validação funcional são necessários para elucidar o papel dos miRNAs como moduladores de mecanismos de oncogênese em PDAC e carcinomas AMP.

## ABSTRACT

**Background:** Genetic alterations were previously identified and associated with the development and progression of pancreatic carcinoma, however, identification of such alterations has not been currently used for the development of efficient treatment strategies. Therefore, the identification of other genetic and epigenetic changes, such as alterations in non-coding RNA molecules is urgently needed for the development of novel therapies. Recent studies have suggested that microRNAs (miRNAs) are frequently deregulated in several carcinomas and may contribute in the several steps of development and tumor progression. Global miRNA profiling analysis in pancreatic carcinoma and the identification of miRNA target genes may lead to new avenues for the identification of clinically applicable biomarkers.

**Objectives:** To identify global microRNA (miRNA) expression profiles and miRNA predicted target genes in pancreatic carcinoma.

**Patients and Methods:** 30 formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) pancreatic carcinoma tissue samples were used, including 24 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and 6 adenocarcinomas of Vater papilla (AMP) and their paired histologically adjacent normal tissues. Global miRNA expression profiles were determined using the *TaqMan Array Human MicroRNA Cards* (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies) platform. Data analysis used the ExpressionSuite Software v1.0.3. Statistical analysis was performed to correlate miRNA expression with relevant clinical data, using SAS 9.3 software. Computational bioinformatic analysis was performed to identify predicted miRNA target genes, as well as protein-protein interaction networks and miRNA-mRNA molecular pathways.

**Results:** We identified 63 significantly deregulated (significantly deregulated is herein defined as  $FC \geq 2$  and  $p < 0.05$ ) miRNAs in PDAC (33 over-expressed and 30 under-expressed) compared to paired histologically normal pancreatic tissue. In AMP, a group of 7 miRNAs was significantly deregulated (4 over-expressed and 3 under-expressed) compared to normal. Our results showed a complexity of miRNAs changes potentially associated to PDAC tumorigenesis. Interestingly, 3/7 miRNAs were commonly deregulated in PDAC and AMP tumors.

**Discussion:** Global miRNA expression profiles identified in PDAC and AMP showed that PDAC have a significantly higher number of altered miRNAs and consequently, a higher

number of predicted miRNA target genes than AMP, which could be potentially associated to disease progression and tumor aggressiveness in PDAC compared to AMP. Commonly deregulated miRNAs in PDAC and AMP suggest that common molecular pathways may be deregulated in these two histological subtypes of pancreatic carcinoma. Among the miRNAs exclusively deregulated in PDAC, we identified several predicted miRNA target genes associated to tumor invasion and metastasis and poor prognosis of patients with cancer.

**Conclusion:** miRNAs identified herein may be associated to the biology of PDAC and AMP. Functional validation studies are required to elucidate the role of miRNAs as modulators of oncogenesis mechanisms in PDAC and AMP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cortes histológicos representativos em A e B: AMP, em C e D: PDAC, corado com H&E. Em A e C: Visão dos cortes em aumento de 100X; em B e D: Detalhe das células neoplásicas dispostas em papilas das atipias celulares e em grandes ductos, respectivamente, em aumento de 200X. ....	13
<b>Figura 2.</b> Delineamento e seleção das amostras. ....	14
<b>Figura 3.</b> Delineamento da meta-análise [90]. ....	20
<b>Figura 4.</b> Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ( $FC \geq 2$ e $p < 0,05$ ) em PDAC comparado com tecido pancreático histologicamente normal. $FC = \text{fold change}$ . ....	24
<b>Figura 5.</b> Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ( $FC \geq 2$ e $p < 0,05$ ) em carcinomas AMP comparado com tecido histologicamente normal. ....	26
<b>Figura 6.</b> Diagrama de Venn ilustrando o número de miRNAs diferencialmente expressos entre os subtipos tumorais e os miRNAs comumente desregulados em PDAC e carcinomas AMP. ....	27
<b>Figura 7.</b> Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em adenocarcinoma de ductos pancreáticos. Rede de interação proteína e os 63 miRNAs desregulados em adenocarcinoma de ductos pancreáticos comparado com o tecido histologicamente normal adjacente. A rede de interação foi construída utilizando o programa I2D - <i>Interologous Interaction Database</i> e visualizada no programa NAViGaTOR. As anotações funcionais estão destacadas na figura, pela cor, para cada interação proteína-proteína. ....	29
<b>Figura 8.</b> Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em adenocarcinoma de ductos pancreáticos. Rede de interação proteína e os 63 miRNAs desregulados em adenocarcinoma de ductos pancreáticos comparado com o tecido normal adjacente, mostrando todos os alvos que são regulados por mais de um miRNA. A rede de interação foi construída utilizando o programa I2D - <i>Interologous Interaction Database</i> e visualizada no programa NAViGaTOR. As anotações funcionais estão destacadas na figura, pela cor, para cada interação proteína-proteína. ....	30

**Figura 9.** Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma de papila de Vater. Rede de interação proteína e os 7 miRNAs desregulados em carcinoma de papila de Vater comparado com o tecido histologicamente normal adjacente ao tumor. A rede de interação foi construída utilizando o programa I2D - Interologous Interaction Database e visualizada no programa NAViGaTOR. As anotações funcionais estão destacadas na figura, pela cor, para cada interação proteína-proteína. .... 31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos 6 estudos utilizados na meta-análise. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de papila de Vater. ....	23
<b>Tabela 3.</b> miRNAs com expressão alterada em adenocarcinomas de ductos pancreáticos.....	25
<b>Tabela 4.</b> miRNAs com expressão alterada em carcinomas de papila de Vater. ....	26
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos miRNAs com expressão diferencial concordante entre nossos resultados e os miRNAs identificados na meta-análise. ....	28

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

<b>AKT</b>	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<b>AMP</b>	Adenocarcinoma de ampola de Vater
<b>BAX</b>	<i>BCL2-associated X protein</i>
<b>BCL2</b>	B-cell CLL/lymphoma 2
<b>BDNF</b>	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BRCA1</b>	Breast cancer 1
<b>BRCA2</b>	Breast cancer 2
<b>CCKBR</b>	<i>cholecystokinin B receptor</i>
<b>CDC25B</b>	<i>cell division cycle 25B</i>
<b>CDK</b>	Ciclina dependente de quinase
<b>CDK6</b>	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>
<b>CDKN1C/p57</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
<b>CDKN2A/p16</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>cDNA</b>	DNA Complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CLL</b>	Leucemia Linfocítica Crônica
<b>Cm</b>	Centimetro
<b>CRLF-1</b>	<i>cytokine receptor-like factor 1</i>
<b>DGCR8</b>	<i>Di George syndrome critical region 8</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>dsRNA</b>	RNA de fita dupla
<b>E2F1</b>	<i>E2F transcription factor 1</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>ERK</b>	mitogen-activated protein kinase 1
<b>FC</b>	Fold Change
<b>FFPE</b>	Fixado(a) em formalina e embebido(a) em parafina

<b><i>FGFR3</i></b>	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<b><i>GSK-3<math>\beta</math></i></b>	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b><i>HER-2</i></b>	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
<b><i>HGF</i></b>	<i>hepatocyte growth factor</i>
<b><i>HLA-G</i></b>	<i>major histocompatibility complex, class I, G</i>
<b><i>HMGA1</i></b>	<i>high mobility group AT-hook 1</i>
<b><i>IGF1</i></b>	insulin like growth factor 1
<b><i>JAK2</i></b>	<i>Janus kinase 2</i>
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b><i>K-RAS</i></b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog p53
<b><i>MCL-1</i></b>	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
<b><i>MEK</i></b>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
<b>miR(s) ou miRNA(s)</b>	Micro ácido ribonucleico
<b>miRNoma</b>	Conjunto de miRNAs do genoma
<b><i>MMP13</i></b>	matrix metallopeptidase 13
<b><i>MMTV</i></b>	<i>integration site family member 4</i>
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b><i>mTOR</i></b>	mechanistic target of rapamycin; serine/threonine kinase
<b><i>MUC1</i></b>	<i>mucin 1, cell surface associated</i>
<b><i>MUC4</i></b>	<i>mucin 4, cell surface associated</i>
<b>N</b>	Normal
<b>Ng</b>	nanograma
<b><i>NF-kB</i></b>	<i>nuclear factor kappa B</i>
<b>OPN</b>	osteopontina
<b><i>PAK5</i></b>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase</i>
<b><i>PAX2</i></b>	<i>paired box 2</i>



<b>PC</b>	Pancreatic Cancer
<b>PDAC</b>	Adenocarcinoma ductal pancreático
<b><i>PDGFR<math>\beta</math></i></b>	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
<b><i>PDK1</i></b>	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
<b><i>PI3K</i></b>	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>pré-miRNA</b>	MiRNA precursor
<b>pri-miRNA</b>	Transcrito primário longo
<b><i>PTCH1</i></b>	<i>patched 1</i>
<b>RISC</b>	RNA-Induced Silencing Complex
<b>RNAs</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ROS</b>	espécies reativas do oxigênio
<b>RT-qPCR</b>	PCR quantitativa em tempo real
<b><i>SMAD2</i></b>	<i>SMAD family member 2</i>
<b><i>SMAD4</i></b>	<i>SMAD family member 4</i>
<b>SNPs</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único
<b><i>SOX4</i></b>	<i>SRY-box 4</i>
<b><i>STAT3</i></b>	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b><i>STAT4</i></b>	<i>signal transducer and activator of transcription 4</i>
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b><i>TCF4</i></b>	<i>transcription factor 4</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b><i>TGF-<math>\beta</math></i></b>	<i>transforming growth factor beta 1</i>
<b>TLDA</b>	TaqMan Array Human MicroRNA Cards
<b><i>TNF</i></b>	tumor necrosis factor
<b><i>TNFR1</i></b>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
<b>TNM</b>	Tumor Nódulo Metástase
<b><i>TRIB2</i></b>	<i>tribbles pseudokinase 2</i>

<b>UTR</b>	Região não traduzida
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>WNT4</b>	<i>wingless-type</i>
<b>WT1</b>	<i>Wilms tumor 1</i>
<b>YAP1</b>	<i>yes associated protein 1</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>~</b>	Aproximadamente
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>≤</b>	Menor ou igual a
<b>≥</b>	Maior ou igual a
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>RPM</b>	Rotação por minuto (unidade de rotação em centrífuga)
<b>s</b>	Segundo
<b>μL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Carcinoma de pâncreas.....	1
1.2. Adenocarcinoma ductal pancreático .....	2
1.3. Adenocarcinoma da ampola de Vater .....	2
1.4. Alterações genéticas em carcinomas de pâncreas .....	3
1.5. MicroRNAs .....	5
1.6. miRNAs e o câncer .....	6
1.7. MicroRNAs em carcinomas de pâncreas .....	8
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
4.1. Considerações sobre os aspectos éticos.....	12
4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.....	12
4.3. Identificação das amostras.....	12
4.4. Delineamento e seleção das amostras .....	14
4.5. Coleta de dados epidemiológicos, fatores de risco e anatomopatológicos.....	15
4.6. Análise molecular.....	15
4.6.1. Microdissecção com agulha .....	15
4.6.2. Extração de RNA .....	15
4.6.3. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA.....	16
4.6.4. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs.....	16

4.6.5.	Análise da expressão de microRNAs .....	17
4.7.	Análise dos dados.....	18
4.7.1.	Processamento dos dados de expressão.....	18
4.7.2.	Análise estatística .....	18
4.7.3.	Predição de alvos e vias dos miRNAs.....	18
4.8.	Meta-análise em adenocarcinoma ductal pancreático .....	19
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
5.1.	Dados demográficos e anatomopatológicos .....	22
5.2.	Perfil de expressão de microRNAs em adenocarcinoma de ductos pancreáticos .....	24
5.3.	Perfil de expressão de microRNAs em carcinoma de papila de Vater .....	26
5.4.	Correlação da expressão de miRNAs com os dados demográficos e anatomopatológicos 27	
5.5.	miRNAs desregulados em adenocarcinoma pancreático: meta-análise de dados da literatura 27	
5.6.	Correlação dos miRNAs expressos em adenocarcinomas ductais com dados da meta- análise 28	
5.7.	Resultados de predição de genes-alvo regulados por miRNAs.....	29
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXO 1 – Parecer do CEP.....</b>	<b>61</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Carcinoma de pâncreas**

Os cânceres são considerados um problema de saúde pública mundial, pois estão associados a um alto índice de morbidade e mortalidade. A ocorrência de novos casos de câncer, no mundo, em 2012, foi estimada em 14,1 milhões de casos, associados a 8,2 milhões de óbitos. Segundo dados do Globocan (2012), estimam-se cerca de 20 milhões de novos casos de câncer, até 2020, em todo o mundo [1].

O pâncreas é uma glândula de aproximadamente 15 cm de extensão, localizada no sistema digestório humano, atrás do estômago e entre o duodeno e o baço. Anatomicamente, o pâncreas é dividido em: cabeça, corpo e cauda e funcionalmente, é classificado em: exócrino (secretando suco pancreático, que contém enzimas digestivas) e endócrino (produzindo hormônios importantes, como a insulina, o glucagon e a somatostatina) [2].

A maioria dos carcinomas de pâncreas (96%) compreende os carcinomas exócrinos e a minoria (4%) compreende os carcinomas endócrinos, esses frequentemente diagnosticados em idade mais jovem e associados com um melhor prognóstico [3]. No Brasil, dados de incidência de carcinoma de pâncreas estimam que essa neoplasia corresponde a 2% de todos os carcinomas diagnosticados e a 4% dos óbitos associados com a doença [4]. Em 2015, foi estimado, nos Estados Unidos, a ocorrência de 48.960 novos casos de carcinoma de pâncreas e 40.560 óbitos [3]. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma de pâncreas incluem o tabagismo, etilismo, diabetes e obesidade. Fatores genéticos também podem conferir risco para o desenvolvimento desses tumores, tais como história familiar de câncer de pâncreas em indivíduos com síndrome de Lynch, indivíduos com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além de portadores de outras síndromes genéticas associadas ao desenvolvimento de neoplasias [2]. Outros fatores relacionados ao desenvolvimento do carcinoma de pâncreas são pancreatite crônica familiar e fibrose cística [5, 6].

A falta de métodos de detecção precoce, bem como de terapias eficazes para o tratamento de pacientes com carcinomas pancreáticos é responsável pelo alto índice de mortalidade associado a essas neoplasias [7]. A ausência de sintomas clínicos em estágios iniciais dificulta a identificação precoce do carcinoma de pâncreas, sendo que comumente o diagnóstico é realizado quando o paciente já apresenta doença avançada, incluindo a presença de metástase,

não sendo indicada nestes casos a ressecção cirúrgica [8]. A cirurgia é o tratamento padrão disponível; entretanto, apenas 10-20% dos pacientes sem doença metastática são elegíveis para a remoção cirúrgica do tumor [9]. Para os pacientes com doença metastática, quando a cirurgia não é indicada, podem ser oferecidos radioterapia e quimioterapia como tratamentos paliativos, com o intuito de prolongar a sobrevida e/ou aliviar os sintomas clínicos [10].

### **1.2. *Adenocarcinoma ductal pancreático***

A grande maioria dos adenocarcinomas de pâncreas compreende os tumores exócrinos, os quais se originam nas células do epitélio ductal. A ocorrência de alterações genéticas foi associada à transformação do epitélio pancreático ductal normal, desenvolvimento de lesões pré-malignas e progressão para carcinoma invasivo [11]. Os adenocarcinomas ductais são os carcinomas mais comuns no pâncreas (~90% dos casos) [12]. Por este motivo, a maioria dos estudos utiliza o termo “carcinoma de pâncreas” como sinônimo de adenocarcinoma ductal.

A maioria dos pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas (PDAC) apresenta doença avançada ao diagnóstico, e mesmo nos casos onde é realizada a ressecção cirúrgica, recidiva precoce é observada na maioria dos casos, devido à micro-metástases clinicamente indetectáveis [13]. Os PDAC se tornam sintomáticos quando invadem e/ ou obstruem o ducto biliar comum ou vias biliares extra-hepáticas [6].

A compreensão de alterações genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento e progressão do PDAC podem ter grande valor para identificar biomarcadores que possam auxiliar na identificação precoce do tumor, assim como ajudar nas decisões terapêuticas, no tratamento adjuvante e neo-adjuvante [6, 14].

### **1.3. *Adenocarcinoma da ampola de Vater***

A ampola de Vater é definida como um canal que resulta da união do ducto biliar e do ducto pancreático e é uma parte importante do sistema digestivo. Uma variedade de condições patológicas pode causar anomalias da ampola de Vater [15]. A maioria dos tumores da ampola de Vater (AMP) constitui-se de adenocarcinomas bem diferenciados, uma entidade rara, que representa 0,2% de todas as neoplasias gastrointestinais [16]. Este subtipo de câncer está associado com melhor prognóstico em comparação com os adenocarcinomas de ductos pancreáticos. Carcinomas ampulares tornaram-se sintomáticos precocemente devido à obstrução biliar e subsequente icterícia persistente. Por este motivo, ao diagnóstico, apresentam-se como pequenos tumores, podendo muitas vezes a massa tumoral não ser

aparente em exames de imagem [15]. O tratamento padrão para 80% a 90% destes tumores é a cirurgia. Os pacientes diagnosticados com AMP e com ressecção completa do tumor têm uma sobrevida, em longo prazo, aproximadamente duas vezes maior quando comparada com pacientes diagnosticados com PDAC e submetidos à ressecção cirúrgica do tumor [17]. Apesar dos inúmeros avanços nas estratégias de tratamento, estas não têm aumentado significativamente a sobrevida dos pacientes, sendo necessário o desenvolvimento de novos tratamentos [18].

A baixa incidência destes tipos tumorais se traduz em raros estudos nestes tumores. Há poucos relatos mostrando que AMP e PDAC podem compartilhar alterações moleculares, como por exemplo, mutações levando à ativação do proto-oncogene *K-RAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e mutações, eventos de perda de heterozigose ou metilação levando à inativação ou perda da função de genes supressores tumorais como o *TP53* (*tumor protein p53*), *SMAD4* (*SMAD family member 4*) e *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) [19]. Portanto, estudos moleculares adicionais são necessários para a elucidação do comportamento biológico dos AMP e para o melhor entendimento das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao desenvolvimento e progressão desses tumores.

#### **1.4. Alterações genéticas em carcinomas de pâncreas**

Estudos mostram que o desenvolvimento e a progressão dos carcinomas de pâncreas estão associados à ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos genes [20]. Alterações genéticas foram previamente relacionadas com o desenvolvimento de adenocarcinoma ductal pancreático [21]. Por exemplo, mutações em *K-RAS* são consideradas importantes no desenvolvimento de carcinomas pancreáticos, pois ocorrem na maioria (~90%) dos casos e estão associadas com as etapas de iniciação tumoral [22-24]. Mutações no códon 12 do gene *K-RAS* levam à substituição do aminoácido glicina (G) pelo aminoácido ácido aspártico (D) na sequência da proteína. A proteína K-RAS se torna constitutivamente ativa, sinalizando para a transcrição de genes associados à progressão do ciclo celular [25]. Interessantemente, um estudo integrou dados de perfil transcricional em adenocarcinoma pancreático primário e de culturas de células tumorais humanas e de camundongo. Os autores subdividiram os adenocarcinomas pancreáticos em três subtipos: clássico, quase-mesenchimais e exócrinos, utilizando dados de evolução clínica e diferenças de resposta terapêutica. Os resultados mostraram que o nível de expressão do oncogene *K-RAS* estava associado aos subtipos tumorais, com uma maior expressão do *K-RAS* no subtipo clássico,



sugerindo que os pacientes diagnosticados com esse subtipo da doença poderiam se beneficiar de terapias dirigidas à K-RAS [26].

Mutações no gene supressor tumoral *CDKN2A/p16* também foram relacionadas com o desenvolvimento de câncer de pâncreas [27, 28]. Observou-se que 80 – 95% dos carcinomas de pâncreas apresentam alterações neste gene [29, 30]. O gene *CDKN2A/p16* codifica uma proteína que pertence à família de inibidores quinase dependente de ciclina (CDK), com papel importante no controle da progressão do ciclo celular [31]. A perda de sua função, devido à ocorrência de mutações, deleções ou hipermetilação, resulta em uma proliferação descontrolada das células e está diretamente associada com um tamanho aumentado do tumor, maior risco de metástase precoce e diminuição da sobrevivência de pacientes com PDAC [29, 32]. Estudos apontam que ao menos uma das alterações genéticas: *K-RAS* e/ou *CDKN2A/p16* estão presentes no início da tumorigênese dos carcinomas de pâncreas, embora geralmente não ocorram simultaneamente [33].

Estima-se que mais de 50% dos carcinomas de pâncreas tenham mutações em *TP53*, o que causa a perda de função desse gene supressor tumoral, contribuindo para uma maior sobrevivência celular, instabilidade genética e conseqüente acúmulo de outras alterações [34, 35]. O gene *TP53* codifica uma fosfoproteína nuclear (TP53) com a capacidade de se ligar a elementos específicos de DNA e ativar a transcrição gênica. Adicionalmente, a TP53 apresenta um papel central na regulação do ciclo celular, sendo capaz de interromper a proliferação celular no ponto de verificação G1/S [36]. Embora as alterações em *TP53* sejam frequentemente observadas em carcinomas pancreáticos, este mecanismo não foi associado às etapas de iniciação tumoral [37].

Nas últimas décadas, vários genes que participam das etapas de iniciação e progressão tumoral no pâncreas foram identificados, bem como perfis moleculares distintos associados aos diferentes subtipos histológicos da doença [38]. Entretanto, é necessária a identificação de biomarcadores e vias moleculares incluindo reguladores de genes associados ao desenvolvimento e progressão dos carcinomas pancreáticos. Tais estudos têm o potencial de levar a melhorias no diagnóstico e tratamento de pacientes com essas neoplasias.

### 1.5. *MicroRNAs*

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs que possuem 22-25 nucleotídeos de comprimento, não codificadores, mas que atuam como reguladores da expressão gênica [39]. Estudos recentes têm elucidado que os miRNAs podem ser um ponto crucial para o entendimento molecular dos carcinomas humanos [40]. A biogênese dos miRNAs tem início com um transcrito primário longo de centenas de pares de base (pri-miRNA) em forma de grampo (conhecido como *hairpin*), o qual é sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir do DNA genômico. No núcleo celular, a enzima Drosha (uma RNase III) cliva este pri-miRNA, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*). A ação desse complexo em uma molécula de pri-miRNA resulta em um miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de *hairpin* de ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento [41, 42]. A proteína Exportina-5 exporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer (RNase III), cliva a região do loop originando um RNA de fita dupla (dsRNA) de ~18-22 nucleotídeos, sendo a forma madura denominada miRNA. O miRNA maduro de fita simples é então incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*). O complexo RISC contém uma família de proteínas denominada Argonata (Ago 1 e Ago 2) e uma proteína de ligação ao RNA (TRBP, do inglês *Trans-activator RNA Bindin Protein*) [42].

O miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional; essa atividade ocorre pela ligação, por pareamento complementar de bases, da extremidade 5' do miRNA (também denominada de seqüência *seed*) à extremidade 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA, levando, na maioria dos casos, à inibição da tradução do mRNA por homologia incompleta ou à degradação do mRNA por homologia completa [39].

Os miRNAs também podem se ligar a ribonucleoproteínas na seqüência *seed* de modo independente de RISC, e conseqüentemente, interferir na ligação miRNA:mRNA resultando na ativação da tradução. Adicionalmente, foi demonstrado que os miRNAs também podem regular a expressão gênica em nível transcricional, através da ligação direta com o DNA [30]. Os miRNAs constituem, portanto, moléculas com papel relevante na regulação da expressão gênica e estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, entre eles o desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose, proliferação celular [43-45] e em mecanismos de oncogênese [46-48].

No câncer, os miRNAs atuam como moléculas reguladoras agindo de forma similar a genes supressores tumorais ou a oncogenes, sendo denominados *oncomiRs* [48-50]. Atualmente, foram identificados 2.588 miRNAs maduros no genoma humano (Banco de dados miRBase, última atualização em Junho de 2014, acesso em novembro de 2015 <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>), sendo que miRNAs são encontrados em localizações genômicas tais como regiões intrônicas de transcritos não codificadores, regiões intrônicas de transcritos codificadores (tais miRNAs compartilham o promotor gênico), regiões exônicas de transcritos não codificadores ou regiões exônicas de transcritos codificadores, além de miRNAs que constituem íntrons (miRtrons) [51, 52].

Os avanços na descoberta dos miRNAs como reguladores da expressão gênica e seu papel na tumorigênese têm evidenciado os miRNAs como biomarcadores úteis no diagnóstico, prognóstico e como potenciais alvos terapêuticos no câncer humano [53-56]. Por serem moléculas pequenas e estarem associados ao complexo protéico RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), os miRNAs são moléculas estáveis e podem ser detectadas em amostras quimicamente degradadas, tais como tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE - *Formalin-Fixed, Paraffin Embedded*). Os miRNAs também são detectáveis em fluidos corporais, tais como plasma e soro. Adicionalmente, os miRNAs têm expressão tecido-específica e podem ser detectados utilizando pequenas quantidades de RNA [57]. Estas características tornam os miRNAs relevantes para estudos direcionados ao melhor entendimento de vias moleculares reguladas por miRNAs e envolvidas na patogênese dos cânceres humanos. Tais estudos podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de pacientes com câncer.

### **1.6. *miRNAs e o câncer***

A expressão dos miRNAs tem se mostrado desregulada em vários estudos de doenças humanas, entre elas os diversos tipos de câncer, sugerindo que a desregulação dos miRNAs pode alterar mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão tumoral [53, 58, 59]. Alterações na expressão de miRNAs podem ocorrer devido a diferentes mecanismos, em nível genômico, tais como amplificações, deleções e mutações na seqüência da molécula de miRNA, defeitos na maquinaria da biogênese de miRNAs ou modificações epigenéticas, tais como alterações no perfil de metilação e remodelação da cromatina [60].

Estudos em larga escala mostraram que os miRNAs são úteis como biomarcadores moleculares, pois apresentam assinaturas de expressão diferencial entre células normais e neoplásicas, contribuindo com a classificação de doença [61].

Um dos primeiros estudos que associou o papel dos miRNAs na tumorigênese humana foi em leucemia linfocítica crônica (CLL - *Chronic Lymphocytic Leukemia*), onde constatou-se que os miRNAs miR-15a e miR-16 estão mapeados na região 13q14, que é uma região de deleção característica na CLL. Esse resultado associou essa deleção com a perda da expressão desses miRNAs e, conseqüentemente, a perda do controle da expressão do gene *BCL2* (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), o qual apresenta papel biológico anti-apoptótico em algumas células, tais como os linfócitos [49]. Outros estudos evidenciaram que os miRNAs estão frequentemente localizados em regiões de ganhos e perdas genômicas relacionadas ao câncer (revisado em [30]). Interessantemente, um estudo de genoma total identificou alterações no número de cópias do DNA associadas à desregulação da expressão de 41 miRNAs em diferentes tipos de câncer, incluindo carcinomas de ovário, mama e melanoma [62]. Outro estudo avaliou a expressão global de miRNAs por *microarrays* em 540 amostras de seis tumores sólidos diferentes (pulmão, colón, mama, estômago, pâncreas e próstata). Inicialmente, foi realizada uma comparação entre os níveis de expressão de miRNAs em tecidos tumorais e normais; os autores identificaram 26 miRNAs com expressão aumentada e 17 miRNAs com expressão diminuída nos tumores. Os miRNAs miR-21 e miR-17-5p estavam com expressão aumentada em todos os tipos de cânceres. O miR-155 estava com expressão aumentada nos carcinomas de mama, pulmão e colón. O miR-106a estava com expressão aumentada nos carcinomas colorretais, entretanto apresentou diminuição de expressão nos carcinomas de mama [63].

O miR-21 é um dos miRNAs mais estudados no câncer humano, cuja alteração nos níveis de expressão está relacionada com a tumorigênese. Devido ao grande número de interações possíveis entre mRNAs-alvo e o miR-21, o papel desse miRNA ainda não foi completamente elucidado. Estudos relatam que o miR-21 está envolvido em diversos processos celulares, como sobrevivência, proliferação e transformação celular, além de estar associado a processos inflamatórios [64]. A expressão aumentada de miR-21 já foi relacionada a diversos tipos tumorais, entre eles: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma pulmonar de células não-pequenas, PDAC e CLL [65]. Um estudo em carcinoma gástrico, observou que o miR-21 atuava promovendo a proliferação, invasão celular e inibindo a apoptose. No mesmo estudo foi observado o aumento da expressão do miR-21 no soro de pacientes com carcinoma gástrico, associado com tamanho tumoral e estadios mais avançados

da doença [66]. Estes resultados sugerem que os miRNAs circulantes podem ser usados como potenciais biomarcadores no câncer, já que são estáveis no sangue, resistem a vários ciclos de congelamentos e descongelamentos e são facilmente detectáveis no soro de pacientes com câncer [66]. A expressão anormal de miRNAs no tumor, caracterizada por níveis diferentes de expressão do miRNA maduro ou sequências de miRNA precursor, ou “miRNoma” (conjunto de miRNAs do genoma), em comparação com as células normais, tem provado ser uma das principais anormalidades nas células neoplásicas [67].

Embora a expressão desregulada de miRNAs tenha sido identificada em diversos tipos de tumores, o envolvimento dos miRNAs no processo de tumorigênese ainda precisa ser elucidado. Portanto, estudos para a identificação de perfis de expressão global de miRNAs, bem como caracterização funcional de miRNAs e genes-alvo e seu papel na iniciação e progressão de neoplasias, são necessários para o melhor entendimento da biologia tumoral. Tais estudos devem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos no câncer.

### ***1.7. MicroRNAs em carcinomas de pâncreas***

O papel dos miRNAs no desenvolvimento e progressão dos carcinomas de pâncreas não está completamente elucidado [68]. Estudos anteriores identificaram perfis diferenciais de expressão de miRNAs entre PDAC e tecido histologicamente normal adjacente ao tumor, sugerindo a potencial aplicação dos miRNAs como biomarcadores diagnósticos [11, 69].

Um estudo de expressão global de miRNAs foi realizado por Szafranska [70] onde foram analisados 10 casos de PDAC, 7 casos de pancreatite crônica e 7 tecidos normais como controle, sendo identificado um grupo de 20 miRNAs como classificador diferencial entre carcinoma de pâncreas, pancreatite crônica e pâncreas normal. Além disso, os autores identificaram dois miRNAs específicos de tecido pancreático normal; miR-216 e miR-217, os quais apresentavam expressão diminuída ou ausente em carcinoma pancreático, sugerindo-os como potenciais biomarcadores com valor diagnóstico. Outro estudo analisou a expressão de 95 miRNAs em 17 amostras de PDAC e os tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor e identificou 8 miRNAs (miR-196a, miR-190, miR-186, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b e miR-95) com expressão aumentada nos tumores comparado aos tecidos normais. Os autores sugeriram que esses miRNAs podem compartilhar vias moleculares comuns na patogênese do carcinoma de pâncreas e que investigações funcionais dessas vias podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico e tratamento de carcinomas de pâncreas [71].

Perfis de expressão diferencial de miRNAs entre 65 amostras de PDAC, tecido normal adjacente e 42 amostras de pancreatite crônica também foram analisados em outro estudo, onde 25 miRNAs estavam diferencialmente expressos [72]. Um grupo de sete miRNAs (miR-21, miR-221, miR-222, miR-181, miR-181b, miR-181d, e miR-155) foi capaz de diferenciar os carcinomas de pâncreas dos tecidos de pancreatite crônica e normal. Utilizando estes sete miRNAs, foi possível classificar corretamente 90% das amostras, sendo que todos esses miRNAs estavam altamente expressos nos carcinomas quando comparado com tecido normal e pancreatite crônica. Os autores também identificaram um sub-grupo de 6 miRNAs (miR-452, miR-105, miR-127, miR-518a, miR-187 e miR-30a-3p) com poder de predição da sobrevida a curto e longo prazos [72].

Recentemente, um estudo de meta-análise utilizou dados de expressão de miRNAs em tecido tumoral ou sangue de 1.525 pacientes com PDAC e identificou sete miRNAs (miR-10b; miR-21; miR-155; miR-196a/b; miR-203 e miR-222 e miR-34a/b) com valor prognóstico, sendo que a alta expressão do miR-21 estava associada com baixa sobrevida após a ressecção cirúrgica [13].

## 7. CONCLUSÕES

O perfil de expressão global de miRNAs identificado em adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de papila de Vater, revelou que os PDACs apresentam um número significativamente maior de miRNAs desregulados, o que pode estar diretamente associado a um maior grau de progressão e maior agressividade tumoral comparado com os adenocarcinomas de papila de Vater. A expressão desregulada de miRNAs não estava associada significativamente aos dados clínicos dos pacientes. Adicionalmente, a identificação de 3 miRNAs comumente alterados em PDAC e carcinomas AMP sugere que vias moleculares comuns podem estar desreguladas nesses subtipos histológicos tumorais. Dentre os miRNAs alterados exclusivamente nos PDACs, identificamos que esses regulam vários genes associados à invasão tecidual, metástase e pior prognóstico de pacientes com câncer. Estudos de validação funcional são necessários para elucidar o papel dos miRNAs aqui identificados como moduladores de mecanismos de oncogênese em PDAC e carcinomas AMP.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *Int J Cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
2. ROYAL RE, WOLF A, CRANE CH: **Cancer of the Pancreas.** In: *Cancer Principles & Practice of Oncology.* edn. Edited by DEVITA VT, LAWRENCE TS, ROSEMBERG SA; 2001: 961-989.
3. **American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014.** In: *American Cancer Society.* Atlanta: American Cancer Society; **2014.**
4. [<http://www1.inca.gov.br/>]
5. Maisonneuve P, Marshall BC, Lowenfels AB: **Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis.** *Gut* 2007, **56**(9):1327-1328.
6. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL: **Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(32):11182-11198.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer statistics, 2015.** *CA Cancer J Clin* 2015, **65**(1):5-29.
8. Ansari D, Chen BC, Dong L, Zhou MT, Andersson R: **Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**(13):1417-1424.
9. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: **Cancer statistics, 2014.** *CA Cancer J Clin* 2014, **64**(1):9-29.
10. Malik NK, May KS, Chandrasekhar R, Wee W, Flaherty L, Iyer R, Gibbs J, Kuvshinoff B, Wilding G, Warren G *et al*: **Treatment of locally advanced unresectable pancreatic cancer: a 10-year experience.** *J Gastrointest Oncol* 2012, **3**(4):326-334.
11. Singh D, Upadhyay G, Srivastava RK, Shankar S: **Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1856**(1):13-27.
12. Samuel N, Hudson TJ: **The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, **9**(2):77-87.
13. Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N, Mato Prado M, Krell D, Habib NA, Castellano L *et al*: **microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis.** *Eur J Cancer* 2015, **51**(11):1389-1404.
14. Cid-Arregui A, Juarez V: **Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma.** *World J Gastroenterol* 2015, **21**(31):9297-9316.



15. Guo ZJ, Chen YF, Zhang YH, Meng FJ, Lin Q, Cao B, Zi XR, Lu JY, An MH, Wang YJ: **CT virtual endoscopy of the ampulla of Vater: preliminary report.** *Abdom Imaging* 2011, **36**(5):514-519.
16. Wakasugi M, Tanemura M, Furukawa K, Murata M, Miyazaki M, Oshita M, Yoshida K, Yasuoka H, Akamatsu H: **Signet ring cell carcinoma of the ampulla of vater: Report of a case and a review of the literature.** *Int J Surg Case Rep* 2015, **12**:108-111.
17. Todoroki T, Koike N, Morishita Y, Kawamoto T, Ohkohchi N, Shoda J, Fukuda Y, Takahashi H: **Patterns and predictors of failure after curative resections of carcinoma of the ampulla of Vater.** *Ann Surg Oncol* 2003, **10**(10):1176-1183.
18. Relias V, Saif MW: **Biological identification of ampullary adenocarcinomas.** *JOP* 2014, **15**(4):306-307.
19. Fischer HP, Zhou H: **Pathogenesis of carcinoma of the papilla of Vater.** *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004, **11**(5):301-309.
20. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A *et al*: **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.** *Science* 2008, **321**(5897):1801-1806.
21. Basturk O, Coban I, Adsay NV: **Biological classification and biological behavior of pancreatic neoplasia.** In: *Neoptolemos.* edn. Edited by Urrutia R, Abbruzzese J, Buchler M. New York: Springer Science and Business Media; 2010: 40-70.
22. Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP: **Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice.** *Cancer Res* 2003, **63**(9):2016-2019.
23. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA: **Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Genes Dev* 2003, **17**(24):3112-3126.
24. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U *et al*: **Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(15):5947-5952.
25. Collins MA, Pasca di Magliano M: **Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer.** *Front Physiol* 2013, **4**:407.
26. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L *et al*: **Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy.** *Nat Med* 2011, **17**(4):500-503.
27. Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ: **Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene.** *N Engl J Med* 1995, **333**(15):975-977.
28. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zametkin DP, Fontaine LS, Organic SM, Dracopoli NC, Clark WH: **Increased risk of pancreatic cancer in**

- melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations.** *N Engl J Med* 1995, **333**(15):970-974.
29. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ *et al*: **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.** *Cancer Res* 1997, **57**(9):1731-1734.
30. Schneider G, Schmid RM: **Genetic alterations in pancreatic carcinoma.** *Mol Cancer* 2003, **2**:15.
31. Maitra A, Hruban RH: **Pancreatic cancer.** *Annu Rev Pathol* 2008, **3**:157-188.
32. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H *et al*: **Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas.** *Oncol Rep* 2003, **10**(1):21-25.
33. Saif MW, Karapanagiotou L, Syrigos K: **Genetic alterations in pancreatic cancer.** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(33):4423-4430.
34. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE: **p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions.** *Cancer Res* 1994, **54**(11):3025-3033.
35. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 2004, **10**(8):789-799.
36. Pei D, Zhang Y, Zheng J: **Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx.** *Oncotarget* 2012, **3**(3):228-235.
37. Reid MD, Saka B, Balci S, Goldblum AS, Adsay NV: **Molecular genetics of pancreatic neoplasms and their morphologic correlates: an update on recent advances and potential diagnostic applications.** *Am J Clin Pathol* 2014, **141**(2):168-180.
38. Wood LD, Hruban RH: **Genomic landscapes of pancreatic neoplasia.** *J Pathol Transl Med* 2015, **49**(1):13-22.
39. Di Leva G, Calin GA, Croce CM: **MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006, **78**(2):180-189.
40. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM: **MicroRNAs in cancer.** *Annu Rev Pathol* 2014, **9**:287-314.
41. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**(20):4051-4060.
42. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review.** *EMBO Mol Med* 2012, **4**(3):143-159.
43. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.

44. Harfe BD: **MicroRNAs in vertebrate development.** *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**(4):410-415.
45. Cummins JM, Velculescu VE: **Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6220-6227.
46. Rinaldi A, Poretti G, Kwee I, Zucca E, Catapano CV, Tibiletti MG, Bertoni F: **Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma.** *Leuk Lymphoma* 2007, **48**(2):410-412.
47. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH: **Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(2):1026-1033.
48. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordóñez B, Grénman R, Gilbert RW *et al*: **Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma.** *Mol Cancer* 2010, **9**:238.
49. Shenouda SK, Alahari SK: **MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?** *Cancer Metastasis Rev* 2009, **28**(3-4):369-378.
50. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA: **Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer.** *Expert Opin Biol Ther* 2007, **7**(7):1009-1019.
51. Kim VN, Han J, Siomi MC: **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(2):126-139.
52. Ha M, Kim VN: **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(8):509-524.
53. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA *et al*: **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature* 2005, **435**(7043):834-838.
54. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M *et al*: **A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2005, **353**(17):1793-1801.
55. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, Cheng CL, Yu CJ, Lee YC, Chen HS *et al*: **MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer.** *Cancer Cell* 2008, **13**(1):48-57.
56. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY: **MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis.** *RNA* 2008, **14**(11):2348-2360.
57. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N *et al*: **Serum microRNAs are promising novel biomarkers.** *PLoS One* 2008, **3**(9):e3148.

58. He L, Hannon GJ: **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(7):522-531.
59. Meltzer PS: **Cancer genomics: small RNAs with big impacts.** *Nature* 2005, **435**(7043):745-746.
60. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(34):5848-5856.
61. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA signatures in human cancers.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(11):857-866.
62. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR *et al*: **microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(24):9136-9141.
63. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M *et al*: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2257-2261.
64. Sheedy FJ: **Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response.** *Front Immunol* 2015, **6**:19.
65. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, Wang X, He X, Zhao Y: **Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis.** *Eur J Clin Invest* 2011, **41**(11):1245-1253.
66. Song J, Bai Z, Zhang J, Meng H, Cai J, Deng W, Bi J, Ma X, Zhang Z: **Serum microRNA-21 levels are related to tumor size in gastric cancer patients but cannot predict prognosis.** *Oncol Lett* 2013, **6**(6):1733-1737.
67. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA: **Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines.** *Cancer Res* 2007, **67**(6):2456-2468.
68. Singh PK, Brand RE, Mehla K: **MicroRNAs in pancreatic cancer metabolism.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, **9**(6):334-344.
69. Halkova T, Cuperkova R, Minarik M, Benesova L: **MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Involvement in Carcinogenesis and Potential Use for Diagnosis and Prognosis.** *Gastroenterol Res Pract* 2015, **2015**:892903.
70. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoouj A, Labourier E, Hahn SA: **MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Oncogene* 2007, **26**(30):4442-4452.
71. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C: **Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis.** *World J Surg* 2009, **33**(4):698-709.

72. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM: **MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis.** *JAMA* 2007, **297**(17):1901-1908.
73. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
74. Pagano M, Gauvreau K: **Princípios de Bioestatística** 2004.
75. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I: **NAVIGating the microne--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs.** *PLoS One* 2011, **6**(2):e17429.
76. Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Simossis VA *et al*: **Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:295.
77. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K *et al*: **DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(Web Server issue):W273-276.
78. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: **Human MicroRNA targets.** *PLoS Biol* 2004, **2**(11):e363.
79. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: **The microRNA.org resource: targets and expression.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Database issue):D149-153.
80. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005, **120**(1):15-20.
81. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP: **MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.** *Mol Cell* 2007, **27**(1):91-105.
82. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 2009, **19**(1):92-105.
83. Kanehisa M: **The KEGG database.** *Novartis Found Symp* 2002, **247**:91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.
84. Safran M, Solomon I, Shmueli O, Lapidot M, Shen-Orr S, Adato A, Ben-Dor U, Esterman N, Rosen N, Peter I *et al*: **GeneCards 2002: towards a complete, object-oriented, human gene compendium.** *Bioinformatics* 2002, **18**(11):1542-1543.
85. Peri S, Navarro JD, Amanchy R, Kristiansen TZ, Jonnalagadda CK, Surendranath V, Niranjan V, Muthusamy B, Gandhi TK, Gronborg M *et al*: **Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans.** *Genome Res* 2003, **13**(10):2363-2371.

86. Xenarios I, Salwinski L, Duan XJ, Higney P, Kim SM, Eisenberg D: **DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(1):303-305.
87. Brown KR, Jurisica I: **Online predicted human interaction database.** *Bioinformatics* 2005, **21**(9):2076-2082.
88. Brown KR, Otasek D, Ali M, McGuffin MJ, Xie W, Devani B, Toch IL, Jurisica I: **NAViGaTOR: Network Analysis, Visualization and Graphing Toronto.** *Bioinformatics* 2009, **25**(24):3327-3329.
89. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, Wøjdemann M, Johansen JS: **MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma.** *Mod Pathol* 2012, **25**(12):1609-1622.
90. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P: **Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement.** *PLoS Med* 2009, **6**(7):e1000097.
91. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD: **Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer.** *Int J Cancer* 2007, **120**(5):1046-1054.
92. Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA: **MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(2):534-545.
93. Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, di Mola FF, Paziienza V, Mazzoccoli G, Biscaglia G *et al*: **Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e33663.
94. Frampton AE, Castellano L, Colombo T, Giovannetti E, Krell J, Jacob J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Funel N, Gall TM *et al*: **MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression.** *Gastroenterology* 2014, **146**(1):268-277.e218.
95. Donahue TR, Tran LM, Hill R, Li Y, Kovochich A, Calvopina JH, Patel SG, Wu N, Hindoyan A, Farrell JJ *et al*: **Integrative survival-based molecular profiling of human pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(5):1352-1363.
96. Kasinski AL, Slack FJ: **Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**(12):849-864.
97. Baroukh NN, Van Obberghen E: **Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain.** *FEBS J* 2009, **276**(22):6509-6521.
98. Li X: **MiR-375, a microRNA related to diabetes.** *Gene* 2014, **533**(1):1-4.
99. Yan JW, Lin JS, He XX: **The emerging role of miR-375 in cancer.** *Int J Cancer* 2014, **135**(5):1011-1018.



100. Zhou J, Song S, He S, Zhu X, Zhang Y, Yi B, Zhang B, Qin G, Li D: **MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway.** *Int J Mol Med* 2014, **33**(4):950-956.
101. Muilenburg D, Parsons C, Coates J, Virudachalam S, Bold RJ: **Role of autophagy in apoptotic regulation by Akt in pancreatic cancer.** *Anticancer Res* 2014, **34**(2):631-637.
102. Hu H, Gu Y, Qian Y, Hu B, Zhu C, Wang G, Li J: **DNA-PKcs is important for Akt activation and gemcitabine resistance in PANC-1 pancreatic cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **452**(1):106-111.
103. Xia J, Guo X, Yan J, Deng K: **The role of miR-148a in gastric cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2014, **140**(9):1451-1456.
104. Zhang R, Li M, Zang W, Chen X, Wang Y, Li P, Du Y, Zhao G, Li L: **MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2.** *Tumour Biol* 2014, **35**(1):837-844.
105. Liffers ST, Munding JB, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, Nambiar S, Maghnouj A, Mirmohammadsadegh A, Hahn SA, Tannapfel A: **MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B.** *Lab Invest* 2011, **91**(10):1472-1479.
106. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G: **miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy.** *Curr Mol Med* 2012, **12**(1):27-33.
107. Matsuzaki J, Suzuki H: **Role of MicroRNAs-221/222 in Digestive Systems.** *J Clin Med* 2015, **4**(8):1566-1577.
108. Liu S, Sun X, Wang M, Hou Y, Zhan Y, Jiang Y, Liu Z, Cao X, Chen P, Chen X *et al*: **A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NFκB and STAT3 in colorectal cancer cells.** *Gastroenterology* 2014, **147**(4):847-859.e811.
109. Zhao Y, Wang Y, Yang Y, Liu J, Song Y, Cao Y, Chen X, Yang W, Wang F, Gao J *et al*: **MicroRNA-222 Controls Human Pancreatic Cancer Cell Line Capan-2 Proliferation by P57 Targeting.** *J Cancer* 2015, **6**(12):1230-1235.
110. Xu Q, Li P, Chen X, Zong L, Jiang Z, Nan L, Lei J, Duan W, Zhang D, Li X *et al*: **miR-221/222 induces pancreatic cancer progression through the regulation of matrix metalloproteinases.** *Oncotarget* 2015, **6**(16):14153-14164.
111. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME: **The role of let-7 in cell differentiation and cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2010, **17**(1):F19-36.
112. Roush S, Slack FJ: **The let-7 family of microRNAs.** *Trends Cell Biol* 2008, **18**(10):505-516.
113. Viñas JL, Ventayol M, Brüne B, Jung M, Sola A, Pi F, Mastora C, Hotter G: **miRNA let-7e modulates the Wnt pathway and early nephrogenic markers in mouse embryonic stem cell differentiation.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e60937.

114. Tsai CH, Lin LT, Wang CY, Chiu YW, Chou YT, Chiu SJ, Wang HE, Liu RS, Wu CY, Chan PC *et al*: **Over-expression of cofilin-1 suppressed growth and invasion of cancer cells is associated with up-regulation of let-7 microRNA.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1852**(5):851-861.
115. Feng DD, Zhang H, Zhang P, Zheng YS, Zhang XJ, Han BW, Luo XQ, Xu L, Zhou H, Qu LH *et al*: **Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia.** *J Cell Mol Med* 2011, **15**(10):2164-2175.
116. Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Chen X, Cai Q, Li J, Gu Q, Liu B, Zhu Z *et al*: **miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **398**(1):1-6.
117. Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggenbach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E: **Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling.** *J Mol Diagn* 2008, **10**(5):415-423.
118. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, Wang B, Grizzle WE, Singh AP: **MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells.** *Carcinogenesis* 2011, **32**(12):1832-1839.
119. Arora S, Swaminathan SK, Kirtane A, Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Panyam J, Singh AP: **Synthesis, characterization, and evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based nanoformulation of miRNA-150: potential implications for pancreatic cancer therapy.** *Int J Nanomedicine* 2014, **9**:2933-2942.
120. Miyamae M, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Hirajima S, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Konishi H, Shiozaki A *et al*: **Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer.** *Br J Cancer* 2015, **113**(10):1467-1476.
121. Zhou W, Li Y, Gou S, Xiong J, Wu H, Wang C, Yan H, Liu T: **MiR-744 increases tumorigenicity of pancreatic cancer by activating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.** *Oncotarget* 2015, **6**(35):37557-37569.
122. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC: **Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer.** *Transl Oncol* 2010, **3**(2):109-113.
123. Wang J, Raimondo M, Guha S, Chen J, Diao L, Dong X, Wallace MB, Killary AM, Frazier ML, Woodward TA *et al*: **Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer.** *J Cancer* 2014, **5**(8):696-705.
124. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H: **Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.** *Int J Cancer* 2010, **126**(1):73-80.
125. Hu Y, Zhu Q, Tang L: **MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e92099.



126. Yu SH, Zhang CL, Dong FS, Zhang YM: **miR-99a suppresses the metastasis of human non-small cell lung cancer cells by targeting AKT1 signaling pathway.** *J Cell Biochem* 2015, **116**(2):268-276.
127. Wu D, Zhou Y, Pan H, Zhou J, Fan Y, Qu P: **microRNA-99a inhibiting cell proliferation, migration and invasion by targeting fibroblast growth factor receptor 3 in bladder cancer.** *Oncol Lett* 2014, **7**(4):1219-1224.
128. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC *et al*: **Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors.** *Am J Pathol* 2001, **158**(6):1955-1959.
129. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F: **Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas.** *Nat Genet* 1999, **23**(1):18-20.
130. Willers IM, Martínez-Reyes I, Martínez-Diez M, Cuezva JM: **miR-127-5p targets the 3'UTR of human  $\beta$ -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1817**(5):838-848.
131. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA: **Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells.** *Cancer Cell* 2006, **9**(6):435-443.
132. Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, Kim HA: **MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 $\beta$ -induced catabolic effects in human chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2013, **65**(12):3141-3152.
133. Mendonsa AM, VanSaun MN, Ustione A, Piston DW, Fingleton BM, Gorden DL: **Host and tumor derived MMP13 regulate extravasation and establishment of colorectal metastases in the liver.** *Mol Cancer* 2015, **14**:49.
134. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell* 2005, **120**(5):635-647.
135. Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA: **MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer.** *Br J Cancer* 2012, **107**(8):1354-1360.
136. Ali S, Almhanna K, Chen W, Philip PA, Sarkar FH: **Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer.** *Am J Transl Res* 2010, **3**(1):28-47.
137. Li JH, Xiao X, Zhang YN, Wang YM, Feng LM, Wu YM, Zhang YX: **MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells.** *Gynecol Oncol* 2011, **120**(1):145-151.
138. Azizi M, Teimoori-Toolabi L, Arzanani MK, Azadmanesh K, Fard-Esfahani P, Zeinali S: **MicroRNA-148b and microRNA-152 reactivate tumor suppressor genes through suppression of DNA methyltransferase-1 gene in pancreatic cancer cell lines.** *Cancer Biol Ther* 2014, **15**(4):419-427.

139. Guan Z, Song B, Liu F, Sun D, Wang K, Qu H: **TGF- $\beta$  induces HLA-G expression through inhibiting miR-152 in gastric cancer cells.** *J Biomed Sci* 2015, **22**:107.
140. Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z: **The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL.** *Mol Oncol* 2013, **7**(3):334-345.
141. Liu PF, Jiang WH, Han YT, He LF, Zhang HL, Ren H: **Integrated microRNA-mRNA analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Genet Mol Res* 2015, **14**(3):10288-10297.
142. Kwon MS, Kim Y, Lee S, Namkung J, Yun T, Yi SG, Han S, Kang M, Kim SW, Jang JY *et al*: **Integrative analysis of multi-omics data for identifying multi-markers for diagnosing pancreatic cancer.** *BMC Genomics* 2015, **16 Suppl 9**:S4.
143. Vychytilova-Faltejskova P, Kiss I, Klusova S, Hlavsa J, Prochazka V, Kala Z, Mazanec J, Hausnerova J, Kren L, Hermanova M *et al*: **MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Diagn Pathol* 2015, **10**:38.
144. Alemar B, Izetti P, Gregório C, Macedo GS, Castro MA, Osvaldt AB, Matte U, Ashton-Prolla P: **miRNA-21 and miRNA-34a Are Potential Minimally Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.** *Pancreas* 2015.
145. Birk DM, Barbato J, Mureebe L, Chaer RA: **Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation.** *Vasc Endovascular Surg* 2008, **42**(6):517-530.
146. Hao Y, Yang J, Yin S, Zhang H, Fan Y, Sun C, Gu J, Xi JJ: **The synergistic regulation of VEGF-mediated angiogenesis through miR-190 and target genes.** *RNA* 2014, **20**(8):1328-1336.
147. Hung TM, Ho CM, Liu YC, Lee JL, Liao YR, Wu YM, Ho MC, Chen CH, Lai HS, Lee PH: **Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased IGF-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma.** *PLoS One* 2014, **9**(2):e89446.
148. Zehavi L, Avraham R, Barzilai A, Bar-Ilan D, Navon R, Sidi Y, Avni D, Leibowitz-Amit R: **Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor.** *Mol Cancer* 2012, **11**:44.
149. Liu A, Shao C, Jin G, Liu R, Hao J, Song B, Ouyang L, Hu X: **miR-208-induced epithelial to mesenchymal transition of pancreatic cancer cells promotes cell metastasis and invasion.** *Cell Biochem Biophys* 2014, **69**(2):341-346.
150. Li H, Zheng D, Zhang B, Liu L, Ou J, Chen W, Xiong S, Gu Y, Yang J: **Mir-208 promotes cell proliferation by repressing SOX6 expression in human esophageal squamous cell carcinoma.** *J Transl Med* 2014, **12**:196.
151. Zhao E, Keller MP, Rabaglia ME, Oler AT, Stapleton DS, Schueler KL, Neto EC, Moon JY, Wang P, Wang IM *et al*: **Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice.** *Mamm Genome* 2009, **20**(8):476-485.

152. Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, Eliasson L: **Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat.** *PLoS One* 2011, **6**(4):e18613.
153. Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD: **miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **406**(4):518-523.
154. Ma C, Nong K, Wu B, Dong B, Bai Y, Zhu H, Wang W, Huang X, Yuan Z, Ai K: **miR-212 promotes pancreatic cancer cell growth and invasion by targeting the hedgehog signaling pathway receptor patched-1.** *J Exp Clin Cancer Res* 2014, **33**:54.
155. Li X, Ma Q, Duan W, Liu H, Xu H, Wu E: **Paracrine sonic hedgehog signaling derived from tumor epithelial cells: a key regulator in the pancreatic tumor microenvironment.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2012, **22**(2):97-108.
156. Lu Y, Yao J, Yu J, Wei Q, Cao X: **The association between abnormal microRNA-10b expression and cancer risk: a meta-analysis.** *Sci Rep* 2014, **4**:7498.
157. Ouyang H, Gore J, Deitz S, Korc M: **microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- $\beta$  actions.** *Oncogene* 2014, **33**(38):4664-4674.
158. Chen Y, Gorski DH: **Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5.** *Blood* 2008, **111**(3):1217-1226.
159. Pan Y, Wang R, Zhang F, Chen Y, Lv Q, Long G, Yang K: **MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**(1):384-393.
160. Häger M, Pedersen CC, Larsen MT, Andersen MK, Hother C, Grønbaek K, Jarmer H, Borregaard N, Cowland JB: **MicroRNA-130a-mediated down-regulation of Smad4 contributes to reduced sensitivity to TGF- $\beta$ 1 stimulation in granulocytic precursors.** *Blood* 2011, **118**(25):6649-6659.
161. Ungefroren H, Groth S, Sebens S, Lehnert H, Gieseler F, Fändrich F: **Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF- $\beta$ 1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1.** *Mol Cancer* 2011, **10**:67.
162. Brock M, Haider TJ, Vogel J, Gassmann M, Speich R, Trenkmann M, Ulrich S, Kohler M, Huber LC: **The hypoxia-induced microRNA-130a controls pulmonary smooth muscle cell proliferation by directly targeting CDKN1A.** *Int J Biochem Cell Biol* 2015, **61**:129-137.
163. Chen Z, Sangwan V, Banerjee S, Mackenzie T, Dudeja V, Li X, Wang H, Vickers SM, Saluja AK: **miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death.** *Mol Cancer* 2013, **12**(1):105.

164. Sacconi A, Biagioni F, Canu V, Mori F, Di Benedetto A, Lorenzon L, Ercolani C, Di Agostino S, Cambria AM, Germoni S *et al*: **miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer**. *Cell Death Dis* 2012, **3**:e423.
165. Li W, Jin X, Zhang Q, Zhang G, Deng X, Ma L: **Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer**. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, **7**(6):3287-3292.
166. Zhang J, Chong CC, Chen GG, Lai PB: **A Seven-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Hepatocellular Carcinoma**. *PLoS One* 2015, **10**(6):e0128628.
167. Puimège L, Van Hauwermeiren F, Steeland S, Van Ryckeghem S, Vandewalle J, Lodens S, Dejager L, Vandevyver S, Staelens J, Timmermans S *et al*: **Glucocorticoid-induced microRNA-511 protects against TNF by down-regulating TNFR1**. *EMBO Mol Med* 2015, **7**(8):1004-1017.
168. Zhang HH, Pang M, Dong W, Xin JX, Li YJ, Zhang ZC, Yu L, Wang PY, Li BS, Xie SY: **miR-511 induces the apoptosis of radioresistant lung adenocarcinoma cells by triggering BAX**. *Oncol Rep* 2014, **31**(3):1473-1479.
169. Zhu ZM, Xu YF, Su QJ, Du JD, Tan XL, Tu YL, Tan JW, Jiao HB: **Prognostic significance of microRNA-141 expression and its tumor suppressor function in human pancreatic ductal adenocarcinoma**. *Mol Cell Biochem* 2014, **388**(1-2):39-49.
170. Moroishi T, Hansen CG, Guan KL: **The emerging roles of YAP and TAZ in cancer**. *Nat Rev Cancer* 2015, **15**(2):73-79.
171. Zhou X, Xia Y, Su J, Zhang G: **Down-regulation of miR-141 induced by helicobacter pylori promotes the invasion of gastric cancer by targeting STAT4**. *Cell Physiol Biochem* 2014, **33**(4):1003-1012.
172. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Di Rocco C, Riccardi R, Giangaspero F, Farcomeni A *et al*: **MicroRNA profiling in human medulloblastoma**. *Int J Cancer* 2009, **124**(3):568-577.
173. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y: **microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer**. *Int J Oncol* 2009, **34**(2):537-542.
174. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárata R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M *et al*: **Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues**. *Mol Cancer* 2006, **5**:29.
175. Yu X, Song H, Xia T, Han S, Xiao B, Luo L, Xi Y, Guo J: **Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer**. *Gene* 2013, **532**(1):87-93.
176. Huang HY, Cheng YY, Liao WC, Tien YW, Yang CH, Hsu SM, Huang PH: **SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer**. *PLoS One* 2012, **7**(12):e48637.

177. Dong C, Wilhelm D, Koopman P: **Sox genes and cancer**. *Cytogenet Genome Res* 2004, **105**(2-4):442-447.
178. Karaayvaz M, Zhai H, Ju J: **miR-129 promotes apoptosis and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer**. *Cell Death Dis* 2013, **4**:e659.
179. Zhai J, Qu S, Li X, Zhong J, Chen X, Qu Z, Wu D: **miR-129 suppresses tumor cell growth and invasion by targeting PAK5 in hepatocellular carcinoma**. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, **464**(1):161-167.
180. Shim SM, Jung SY, Nam HY, Kim HR, Lee MH, Kim JW, Han BG, Jeon JP: **Network signatures of cellular immortalization in human lymphoblastoid cell lines**. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **441**(2):438-446.
181. Heyn H, Schreek S, Buurman R, Focken T, Schlegelberger B, Beger C: **MicroRNA miR-548d is a superior regulator in pancreatic cancer**. *Pancreas* 2012, **41**(2):218-221.
182. Tenedini E, Roncaglia E, Ferrari F, Orlandi C, Bianchi E, Bicciato S, Tagliafico E, Ferrari S: **Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in physiological myelopoiesis: role of hsa-mir-299-5p in CD34+ progenitor cells commitment**. *Cell Death Dis* 2010, **1**:e28.
183. Formosa A, Markert EK, Lena AM, Italiano D, Finazzi-Agro' E, Levine AJ, Bernardini S, Garabadgiu AV, Melino G, Candi E: **MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells**. *Oncogene* 2014, **33**(44):5173-5182.
184. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H: **The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(6):1087-1097.
185. Shevde LA, Metge BJ, Mitra A, Xi Y, Ju J, King JA, Samant RS: **Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells demonstrates vasculogenic mimicry via hsa-miR-299-5p regulated de novo expression of osteopontin**. *J Cell Mol Med* 2010, **14**(6B):1693-1706.
186. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G *et al*: **MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer**. *Breast Cancer Res* 2009, **11**(3):R27.
187. Xu X, Wells A, Padilla MT, Kato K, Kim KC, Lin Y: **A signaling pathway consisting of miR-551b, catalase and MUC1 contributes to acquired apoptosis resistance and chemoresistance**. *Carcinogenesis* 2014, **35**(11):2457-2466.
188. Kuśnierz-Cabala B, Nowak E, Sporek M, Kowalik A, Kuźniewski M, Enguita FJ, Stępień E: **Serum levels of unique miR-551-5p and endothelial-specific miR-126a-5p allow discrimination of patients in the early phase of acute pancreatitis**. *Pancreatology* 2015, **15**(4):344-351.

189. Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Diaz T, Tejero R, Gimferrer JM, Molins L, Cabanas ML, Ramirez J, Monzo M *et al*: **Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer.** *Eur Respir J* 2013, **41**(5):1172-1178.
190. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S: **Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription.** *RNA* 2009, **15**(2):287-293.
191. Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, Weissleder R, Breakefield XO, Krichevsky AM: **miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells.** *Cancer Cell* 2008, **14**(5):382-393.
192. Wei JJ, Wu X, Peng Y, Shi G, Basturk O, Olca B, Yang X, Daniels G, Osman I, Ouyang J *et al*: **Regulation of HMGA1 expression by microRNA-296 affects prostate cancer growth and invasion.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(6):1297-1305.
193. Vaira V, Faversani A, Dohi T, Montorsi M, Augello C, Gatti S, Coggi G, Altieri DC, Bosari S: **miR-296 regulation of a cell polarity-cell plasticity module controls tumor progression.** *Oncogene* 2012, **31**(1):27-38.
194. Gu J, Chen Y, Huang H, Yin L, Xie Z, Zhang MQ: **Gene module based regulator inference identifying miR-139 as a tumor suppressor in colorectal cancer.** *Mol Biosyst* 2014, **10**(12):3249-3254.
195. Liu X, Duan B, Dong Y, He C, Zhou H, Sheng H, Gao H, Zhang X: **MicroRNA-139-3p indicates a poor prognosis of colon cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2014, **7**(11):8046-8052.
196. Shen K, Liang Q, Xu K, Cui D, Jiang L, Yin P, Lu Y, Li Q, Liu J: **MiR-139 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting the type I insulin-like growth factor receptor.** *Biochem Pharmacol* 2012, **84**(3):320-330.
197. Gu W, Li X, Wang J: **miR-139 regulates the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma through the WNT/TCF-4 pathway.** *Oncol Rep* 2014, **31**(1):397-404.