



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

Natália Bertoni

**Perfil de expressão de microRNAs circulantes em
carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis.
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde.

**Botucatu
2017**

Natália Bertoni

Perfil de expressão de microRNAs circulantes em carcinomas
de fígado, pâncreas e vias biliares

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

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis.
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde.

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bertoni, Natália.

Perfil de expressão de microRNAs circulantes em
carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares / Natália
Bertoni. - Botucatu, 2017

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. MicroRNAs. 2. Fígado - Câncer. 3. Colangiocarcinoma.
4. Pâncreas - Câncer. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: adenocarcinoma de pâncreas; carcinoma
hepatocelular; colangiocarcinoma; miRNA; microRNA
circulante.

Resumo

Introdução: Os carcinomas hepato-pancreato-biliares (HPB) são carcinomas agressivos e estão entre as neoplasias de alta complexidade no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento. Considerando que o fígado, a árvore biliar e o pâncreas compartilham células progenitoras comuns, a busca de alterações moleculares comumente encontradas nesses carcinomas pode resultar no melhor entendimento e caracterização dos mecanismos de tumorigênese. Os microRNAs (miRNAs) são importantes reguladores da expressão gênica e têm sido apontados como biomarcadores com aplicação clínica no diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes com câncer. A análise do perfil de expressão de miRNAs circulantes pode contribuir para melhor compreensão dos processos envolvidos na tumorigênese dos carcinomas HPB.

Objetivos: Identificar o perfil de expressão de miRNAs circulantes no plasma e potenciais processos biológicos envolvidos na tumorigênese de carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares.

Pacientes e Métodos: Foram analisadas 12 amostras de plasma, sendo 4 obtidas de pacientes diagnosticados com carcinoma hepatocelular, 4 com adenocarcinoma de pâncreas e 4 com colangiocarcinoma e 10 amostras de plasma de indivíduos saudáveis (controles). O perfil de expressão de miRNAs circulantes no plasma dos pacientes foi determinado por meio do ensaio *TaqMan® Array Human MicroRNA Cards* (card A, v3.0). A análise quantitativa da expressão de miRNAs foi calculada relativa aos controles e utilizou o *software ExpressionSuite v.1.0.3*. Métodos de análise bioinformática foram aplicados para a predição de mRNAs-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados. Adicionalmente, redes de interação miRNAs-mRNAs-alvo foram geradas como etapa inicial para a identificação de vias moleculares envolvidas na tumorigênese.

Resultados: Foram identificados 42 miRNAs com expressão desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis, sendo 26 com expressão diminuída e 16 com expressão aumentada. Entre os 42 miRNAs diferencialmente expressos no plasma, 28 miRNAs eram compartilhados entre os três subtipos tumorais (carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pâncreas e colangiocarcinoma), sendo 19 com expressão diminuída (let-7b-5p, let-7c-5p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-16-5p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-194-5p, miR-197-3p, miR-20b-5p, miR-25-3p, miR-362-5p, miR-

425-5p, miR-486-5p, miR-486-3p, miR-500a-5p, miR-532-5p, miR-660-5p e miR-92a-3p) e 9 com expressão aumentada (miR-130a-3p, miR-130b-3p, miR-142-5p, miR-152-3p, miR-199a-3p, miR-29a-3p, miR-26a-5p, miR-27b-3p e miR-148a-3p). Análise de predição de mRNAs-alvo seguida de análise de enriquecimento identificou potenciais genes-alvo dos miRNAs com expressão alterada e compartilhados entre os três subtipos tumorais. Notavelmente, seis miRNAs com expressão aumentada (miR-130b-3p, miR-142-5p, miR-148a-3p, miR-152-3p, miR-130a-3p e miR-27b-3p) foram identificados como potenciais reguladores de genes envolvidos em processos biológicos de desenvolvimento celular. A identificação de miRNAs desregulados no plasma de pacientes com os três subtipos tumorais sugere uma associação dessas alterações com os mecanismos comuns de tumorigênese nesses carcinomas.

Discussão: O perfil de expressão de miRNAs circulantes identificado no plasma de pacientes com carcinomas HPB sugere uma grande complexidade de alterações em processos biológicos potencialmente envolvidos na tumorigênese nesses carcinomas. Além disso, os genes-alvo preditos a serem regulados por esses miRNAs codificam importantes proteínas com papel na transcrição e destino celular, como HMGA2, ZNF516, NFIB, HAS3 e CIT. Estudos de validação em um número maior de casos podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para pacientes com carcinomas HPB.

Abstract

Background: Hepatic-pancreatic-biliary tract (HPB) cancers are aggressive carcinomas and are among the tumors with high complexity regarding diagnosis, determination of prognosis and treatment. Considering that the liver, the biliary tree and the pancreas share common progenitor cells, the search for molecular alterations commonly found in these carcinomas may lead to better understanding and characterization of genetic mechanisms of tumorigenesis. MicroRNAs (miRNAs) are important gene expression regulators and have been identified as biomarkers with clinical application in the diagnosis, prognosis and treatment of patients with cancer. The expression profile analysis of circulating miRNAs may contribute to a better understanding of tumorigenesis in HPB carcinomas.

Objectives: To identify the expression profile of circulating miRNAs in plasma and potential biological processes involved in tumorigenesis in cancers of the liver, pancreas and biliary ducts.

Patients and Methods: Twelve plasma samples were analyzed, 4 of which were obtained from patients diagnosed with hepatocellular carcinoma, 4 with pancreatic adenocarcinoma and 4 with cholangiocarcinoma, and 10 plasma samples from healthy individuals (controls). The expression profile of circulating miRNAs was determined using the *TaqMan Array Human MicroRNA Cards* (card A, v3.0) platform. Quantitative analysis of miRNAs expression was calculated relative to controls using the *ExpressionSuite Software v1.0.3*. Computational bioinformatic analysis was performed to identify predicted miRNA target genes, as well as miRNA-mRNA interaction networks as the initial step for the identification of molecular pathways involved in tumorigenesis.

Results: Forty-two differentially expressed miRNAs were identified in plasma obtained from patients with cancers of the liver, pancreas and biliary ducts, 26 of them downregulated and 16 upregulated. Among the 42 miRNAs, 28 miRNAs were shared between the three tumor subtypes, being 19 downregulated (let-7b-5p, let-7c-5p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-16-5p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-194-5p, miR-197-3p, miR-20b-5p, miR-25-3p, miR-362-5p, miR-425-5p, miR-486-5p, miR-486-3p, miR-500a-5p, miR-532-5p, miR-660-5p e miR-92a-3p) and 9 upregulated (miR-130a-3p, miR-130b-3p, miR-142-5p, miR-152-3p, miR-199a-3p, miR-29a-3p, miR-26a-5p, miR-27b-3p e miR-148a-3p). MiRNA target predictions followed by enrichment analysis revealed putative target genes of altered miRNAs identified in all tumor

subtypes. Notably, six up-regulated miRNAs (mir-130b-3p, miR-142-5p, miR-148a-3p, miR-152-3p, miR-130a-3p e miR-27b-3p) potentially regulate genes involved in cellular development. The identification of miRNAs commonly dysregulated in plasma from patients with HPB carcinomas and not in healthy controls suggests an association of these alterations with tumorigenesis mechanisms of these carcinomas.

Discussion: The expression profile of circulating miRNAs identified in the plasma of patients with HPB carcinomas suggests a great complexity of alterations in biological processes potentially involved in tumorigenesis in these carcinomas. In addition, target genes predicted to be regulated by these miRNAs encode important proteins with role in transcription and cell fate, such as HMGA2, ZNF516, NFIB, HAS3 and CIT. Validation studies in a large number of cases may contribute to the development of new diagnostic and therapeutic strategies for patients with HPB carcinomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento e seleção das amostras de pacientes com carcinomas HPB	18
Figura 2. Diagrama de Venn ilustrando os 26 miRNAs com expressão diminuída no plasma entre os subtipos carcinoma hepatocelular (CHC), adenocarcinoma de pâncreas (ACP) e colangiocarcinoma (CCA)	26
Figura 3. Diagrama de Venn ilustrando os 16 miRNAs com expressão aumentada no plasma entre os subtipos carcinoma hepatocelular (CHC), adenocarcinoma de pâncreas (ACP) e colangiocarcinoma (CCA)	27
Figura 4. Rede de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo.	29
Figura 5. Rede de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miRNAs com expressão alterada no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

..... 24

Tabela 2. Localização no genoma humano dos miRNAs alterados detectados nos três subtipos tumorais, no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

..... 25

Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

..... 55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ABCB7	<i>ATP binding cassette subfamily B member 7</i>
ACP	Adenocarcinoma de pâncreas
ACVR1B	<i>activin A receptor type 1B</i>
AKT2	<i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
AGO	Argonaute
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
CAAE	Certificado de Apresentao para Apreciao tica
CA 19-9	Antgeno de cncer 19-9
CCA	Colangiocarcinoma
CCND3	<i>cyclin D3</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA Complementar
CEP	Comit de tica em Pesquisa
CHC	Carcinoma hepatocelular
CIT	<i>citron rho-interacting serine/threonine kinase</i>
C_{RT}	Relative threshold cycle
C_T	Threshold cycle
CTNNB1	<i>catenin beta 1</i>
DGCR8	Di George syndrome critical region 8
DNA	cido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotdeos Fosfatados
dsRNA	RNA de fita dupla
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELF4	<i>E74 like ETS transcription factor 4</i>
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FANCC	<i>Fanconi anemia complementation group C</i>
FANCG	<i>Fanconi anemia complementation group G</i>
FGF3	<i>fibroblast growth factor 3</i>
FGF4	<i>fibroblast growth factor 4</i>

<i>FGF19</i>	<i>fibroblast growth factor 19</i>
FC	Fold Change
<i>FXR(NR1H4)</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1 group H member 4</i>
<i>GUCY2F</i>	<i>guanylate cyclase 2F, retinal</i>
<i>HAS3</i>	<i>hyaluronan synthase 3</i>
HDL	High Density Lipoprotein
<i>HMGA2</i>	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
HPB	Hepatic-pancreatic-biliary tract
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KIF14	Kinesin-like protein KIF14
<i>KRAS</i>	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LKB1	lkb1 kinase
<i>MAP3K1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
<i>MAP2K4</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
miR(s) ou miRNA(s)	Micro ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
<i>NFIB</i>	<i>nuclear factor I B</i>
NK	Natural killer
<i>NTRK3</i>	<i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 3</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>PALB2</i>	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
<i>PCGF3</i>	<i>polycomb group ring finger 3</i>
PRSS1	protease, serine 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
<i>PIK3CA</i>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
pré-miRNA	MiRNA precursor
pri-miRNA	Transcrito primário longo
<i>QKI</i>	<i>QKI, KH domain containing RNA binding</i>
RB1	RB transcriptional corepressor 1
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNAs	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
siRNAs	RNAs de interferência

SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
STK11	<i>serine/threonine kinase 11</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TET	ten-eleven translocation
TET2	<i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TET3	<i>tet methylcytosine dioxygenase 3</i>
TFAP2C	<i>transcription factor AP-2 gamma</i>
TGFBR1	<i>transforming growth factor beta receptor 1</i>
TGFBR2	<i>transforming growth factor beta receptor 2</i>
TLDA	TaqMan Array Human MicroRNA Cards
TNRC6B	<i>trinucleotide repeat containing 6B</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRBP	<i>transactivating response RNA-binding protein</i>
TWIST	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
UTRN	<i>utrophin</i>
UTR	Untranslated region (região não traduzida)
ZNF516	<i>zinc finger protein 516</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mm	Milimetro
ng	Nanograma
RPM	Rotação por minuto (unidade de rotação em centrífuga)
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	1
1.1.1. Dados de incidência, mortalidade e fatores de risco associados aos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	1
1.1.2. Histologia dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	3
1.1.3. Diagnóstico e Tratamento dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	4
1.1.4. Bases moleculares dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	5
1.2. MicroRNAs como biomarcadores no câncer	7
1.3. MicroRNAs em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	10
1.4. MicroRNAs circulantes em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	12
2. Justificativa	15
3. Objetivos	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Aspectos éticos	17
4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes	17
4.3. Amostras	17
4.4. Delineamento e seleção das amostras de pacientes com carcinomas HPB	17
4.5. Análise molecular	19
4.5.1. Coleta, separação e armazenamento de plasma	19
4.5.2. Confeção do pool das amostras controle	19
4.5.3. Extração de RNA.....	19
4.5.4. Quantificação e qualidade do RNA	20
4.5.5. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs	20
4.5.6. Análise da expressão de miRNAs	21
4.6. Análise dos dados	21
4.6.1. Processamento dos dados de expressão	21
4.6.2. Predição de alvos dos miRNAs	22
5. Resultados	23
5.1. Perfil de expressão de miRNAs circulantes em plasma de pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares	23

5.2. Resultados de predição de mRNAs-alvo regulados por miRNAs	28
6. Discussão	31
7. Conclusão	37
8. Perspectivas futuras	38
9. Referências	39
Anexo 1 – Parecer do CEP	50
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	53
Anexo 3 - Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB	55

1. Introdução

1.1. Carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento do organismo humano, quando o endoderma definitivo forma o canal alimentar anterior, existem células progenitoras comuns para o fígado, o sistema biliar e pâncreas ventral. Os compartimentos celulares localizados na árvore biliar contêm células-tronco para o desenvolvimento do fígado, pâncreas e vias biliares que persistem até a idade adulta [1]. Considerando a origem embrionária comum, tumores primários acometendo esses órgãos podem conter alterações moleculares comuns, as quais podem incluir biomarcadores potencialmente úteis para a melhoria do diagnóstico e tratamento dos pacientes.

1.1.1. Dados de incidência, mortalidade e fatores de risco associados aos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

Dados do GLOBOCAN de 2012 indicam a ocorrência de aproximadamente 782.000 novos casos de tumores primários do fígado, sendo 554.000 em homens (quinto carcinoma mais comum) e 228.000 em mulheres (nono carcinoma mais comum) [2].

Os carcinomas de fígado representam a segunda causa mais comum de morte por câncer, responsáveis por aproximadamente 745.000 mortes em todo o mundo (521.000 em homens e 224.000 em mulheres) [2]. Para o Brasil, os dados de 2013 contabilizam 8.772 mortes pela doença (5.012 homens e 3.759 mulheres) [3]. Uma análise sistemática de Hashim e colaboradores comparou a mortalidade por câncer entre os anos 2000-2010 em 60 países de 6 continentes e revelou que na maioria dos países a taxa de mortalidade diminuiu cerca de 1% ao ano para os carcinomas mais comuns (estômago, colorretal, mama, útero e próstata), com exceção dos carcinomas de fígado e pulmão. Os dados mostram que a mortalidade por carcinoma de fígado aumentou em metade dos países analisados, principalmente na América do Norte e América Latina [4].

Entre os tumores primários do fígado, o carcinoma hepatocelular é a neoplasia mais comum e os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento são a cirrose hepática (lesão crônica devida a inflamação e fibrose), infecção pelo vírus da hepatite B ou C, síndrome metabólica e alcoolismo [5]. Também existem cofatores que contribuem para o carcinoma hepatocelular, como tabagismo e ingestão da aflatoxina B (derivada dos fungos *Aspergillus*

flavus e *A. parasiticus*), substância carcinogênica relacionada a mutações no gene *TP53* e incidência deste carcinoma [5, 6].

O estudo de Carrilho e colaboradores sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos do carcinoma hepatocelular no Brasil demonstrou que a infecção pelo vírus da hepatite C foi a etiologia mais comum para cirrose hepática que, por sua vez, foi o principal fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular [7]. Este estudo incluiu 1.405 pacientes diagnosticados com carcinoma hepatocelular durante o período de Janeiro de 2004 a Outubro de 2009 e foi conduzido por membros da Sociedade Brasileira de Hepatologia [7].

Para os carcinomas de pâncreas foram estimados 338.000 novos casos no mundo todo, em 2012, sendo 178.000 em homens e 160.000 em mulheres [2]. Responsáveis por 331.000 mortes (174.000 homens e 157.000 mulheres), esses carcinomas são considerados a sétima causa mais comum de morte por câncer em ambos os sexos mundialmente [2]. No Brasil, os carcinomas de pâncreas representam 2% de todos os carcinomas e 4% do total de mortes por câncer, com mais de 9.000 casos novos em média, a cada ano. Em 2013 foram registradas 8.710 mortes pela doença (4.373 homens e 4.335 mulheres) [3].

O desenvolvimento dos carcinomas de pâncreas está relacionado a fatores de risco como etilismo, tabagismo, obesidade, diabetes e pancreatite crônica [8]. Cerca de 10% dos casos apresentam um componente hereditário e os fatores genéticos que influenciam os carcinomas de pâncreas podem ser mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, histórico familiar de câncer de pâncreas em pacientes com Síndrome de Lynch e outras síndromes genéticas relacionadas ao surgimento de neoplasias [8-10].

Os tumores do tipo colangiocarcinoma incluem uma pequena parcela dos tumores primários do fígado. Nos Estados Unidos foram diagnosticados, em 2015, cerca de 10.910 novos casos de colangiocarcinoma e carcinomas de vesícula biliar [11]. A incidência do colangiocarcinoma aumenta com a idade, sendo que a maioria dos pacientes é diagnosticada por volta de 65 anos, mas o pico de incidência ocorre por volta dos 80 anos [12].

Nos Estados Unidos, dados de 2015 estimam 3.700 mortes por colangiocarcinoma e carcinoma de vesícula biliar [11]. No Brasil, os carcinomas hepatocelulares e de vias biliares levam à óbito mais de 7 mil pacientes a cada ano (INCA, 2012) [3].

Os fatores de risco relacionados ao colangiocarcinoma incluem a infestação por um parasita do aparelho digestivo (*Clonorchis sinensis*) e infecção crônica de origem alimentar por parasita do fígado (*Opisthorchis viverrini*) frequente em países dos continentes Asiático e

Africano [13, 14]. Além disso, fatores de predisposição podem ser colangite esclerosante primária e cistos de colédoco [12].

1.1.2. Histologia dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

Os tumores primários do fígado são classificados como benignos ou malignos e como tumores mesenquimais ou tumores epiteliais, de acordo com o tecido de origem [13]. Cerca de 1-3% são tumores mesenquimais malignos, 6-12% são tumores benignos de origem epitelial e 85-95% são tumores epiteliais malignos [13].

Aproximadamente 80% dos casos de tumores epiteliais malignos correspondem ao carcinoma hepatocelular [3]. O carcinoma hepatocelular ainda apresenta uma variante histológica rara, o fibrolamelar, que se diferencia por ocorrer em um grupo mais jovem (com pico de incidência na década dos 30 anos), afeta homens e mulheres igualmente e raramente está associado a cirrose ou hepatite viral [13]. Os 20% restante correspondem ao hepatoblastoma (manifesta-se em crianças nos primeiros anos de vida), ao colangiocarcinoma (origina-se nas vias biliares hepáticas) e ao angiossarcoma (origina-se nos vasos sanguíneos hepáticos) [3].

Em relação aos carcinomas pancreáticos, aproximadamente 95% dos casos compreendem o tipo histológico adenocarcinoma ductal pancreático e correspondem aos carcinomas do pâncreas exócrino (responsável pela produção de enzimas para digestão alimentar). Os tumores neuroendócrinos (5%) são mais raros, geralmente diagnosticados em idade mais jovem e apresentam melhor prognóstico [15, 16].

O colangiocarcinoma compreende cerca de 5% dos tumores epiteliais malignos primários do fígado [3]. O termo colangiocarcinoma compreende os tumores originados do epitélio dos ductos biliares e os subtipos são diferenciados de acordo com sua localização anatômica de origem em intra-hepático, hilar e distal [12].

O colangiocarcinoma intra-hepático se caracteriza por apresentar massas hepáticas; o colangiocarcinoma hilar (também referido como tumor de Klatskin) contém a confluência dos ductos direito e esquerdo e geralmente os ductos intra e extra-hepáticos; o colangiocarcinoma distal abrange o ducto hepático sem atingir a confluência dos ductos direito e esquerdo e geralmente envolve a porção intra-pancreática do ducto biliar [12]. O subtipo mais comum é o colangiocarcinoma hilar, que ocorre em 60-70% dos casos, seguido pelo colangiocarcinoma distal (20-30%) e colangiocarcinoma intra-hepático (5-10%) [17].

1.1.3. Diagnóstico e Tratamento dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

O monitoramento de pacientes que apresentam fatores de risco para possível desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (infecção pelo vírus da hepatite B ou C e cirrose hepática) é realizado por meio de exame de ultrassonografia e o intervalo de vigilância recomendado é de seis meses [18].

Os nódulos identificados por ultrassonografia devem ser investigados. O diagnóstico de carcinoma hepatocelular deve ser baseado em exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, e/ou biópsia. Os nódulos hepáticos com menos de 1 cm geralmente não são carcinoma hepatocelular, portanto recomenda-se repetir a ultrassonografia em intervalos de 3 meses para monitoramento [18].

Os nódulos com mais de 1 cm devem ser investigados através de ressonância magnética. Se o nódulo apresentar hipervascularidade arterial seguido por lavagem na fase tardia, provavelmente é carcinoma hepatocelular, caso contrário, um segundo estudo com contraste com outra modalidade de imagem (por exemplo, tomografia computadorizada) deve ser realizado. Se os resultados continuarem inconclusivos, recomenda-se a biópsia [18].

O tratamento de primeira linha geralmente indicado para pacientes com carcinoma hepatocelular primário único com função hepática preservada (bilirrubina normal com gradiente de pressão venosa hepática ≤ 10 mmHg e contagem de plaquetas ≥ 100.000) é a ressecção cirúrgica do tumor. A recorrência do tumor é comum após a ressecção e o tratamento subsequente é influenciado pelo padrão de recorrência, podendo ser uma nova ressecção ou transplante de fígado. O transplante de fígado é indicado como tratamento de primeira linha para pacientes com tumores multinodulares pequenos ou para pacientes com tumor único com menos de 5 cm e disfunção hepática avançada [19].

O carcinoma de pâncreas apresenta grandes dificuldades em relação ao diagnóstico devido à ausência de técnicas de detecção precoce e de terapias eficientes para os pacientes, o que leva a altas taxas de mortalidade pela doença [11]. Durante os estágios iniciais a doença se caracteriza por ser assintomática e, na maioria das vezes, o diagnóstico é realizado quando os pacientes já apresentam doença avançada, com presença de metástase [20]. O biomarcador antígeno de câncer 19-9 (CA 19-9) é comumente utilizado em pacientes com carcinoma de pâncreas para monitoramento da progressão da doença, recorrência e/ou resposta ao tratamento, porém não possui sensibilidade ou especificidade para diagnóstico precoce [21].

O tratamento padrão disponível para o carcinoma de pâncreas é a cirurgia, porém apenas 10-20% dos pacientes sem doença metastática são elegíveis para a ressecção do tumor [22]. Os pacientes que apresentam doença metastática e não são indicados à cirurgia (cerca de 50-60%) podem ser submetidos aos tratamentos paliativos, como quimioterapia ou quimioterapia combinada com radioterapia a fim de prolongar a sobrevida e aliviar os sintomas clínicos [23].

A colangiressonância, colangiogramografia, colangiografia endoscópica retrógrada ou percutânea transhepática contribuem para o diagnóstico e planejamento do tratamento dos tumores de vias biliares [3].

Para o tratamento de colangiocarcinoma são levados em consideração fatores como a condição do paciente, a extensão local do tumor (como também envolvimento parenquimal e/ou vascular) e presença ou não de doença metastática [24]. A ressecção cirúrgica geralmente é realizada quando o paciente apresenta boas condições nutricionais e médicas, com doença passível de ressecção com margens claras e sem evidência de doença metastática [25]. A quimioradioterapia pode ser oferecida após a cirurgia para pacientes em que o tumor invadiu a camada muscular ou em que houve envolvimento de linfonodos regionais a fim de reduzir o risco de recorrência local e melhorar a sobrevida [12]. Para os pacientes com doença avançada ou metastática não ressecável podem ser oferecidos quimioterapia e cuidados paliativos [12].

1.1.4. Bases moleculares dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

A inflamação crônica é um fator importante associado à patogênese dos carcinomas humanos [26]. O carcinoma hepatocelular geralmente está associado à infecção pelo vírus da hepatite B ou C crônica e consequente inflamação do fígado, podendo evoluir para um processo inflamatório crônico no decorrer da vida do paciente [26].

Diversas são as alterações genéticas e vias que participam da progressão do carcinoma hepatocelular (revisado em Llovet e colaboradores) [27]. Algumas alterações genéticas somáticas observadas consistem em mutações no promotor ou amplificação do gene *TERT* e consequente alta expressão da telomerase (em cerca de 90% dos casos de carcinoma hepatocelular). Mutações no gene *CTNNB1* podem ativar a via WNT- β -catenina (em 11-37% dos casos de carcinoma hepatocelular), principalmente em pacientes com tumores bem diferenciados e sem infecção pelo vírus da hepatite B [27]. As vias RAS-RAF-MAPK e PI3K-AKT-mTOR também foram relatadas como frequentemente ativadas nos carcinomas

hepatocelulares devido à amplificação da região que abrange *FGF3*, *FGF4* e *FGF19* (em 5% dos tumores), principalmente [27].

A inativação da proteína p53 e alterações no ciclo celular também estão presentes em pacientes com carcinoma hepatocelular, principalmente nos casos com infecção pelo vírus da hepatite B [27]. Já os pacientes expostos a aflatoxina B1 apresentam mutação específica (R249S) no gene *TP53*. O fenótipo mais agressivo e prognóstico ruim dos pacientes podem estar relacionados a mutações em *RBI* (3-8% dos casos) ou deleções em *CDKN2A* (2-12% dos casos) [27].

Reguladores epigenéticos e complexos de remodelação da cromatina também estão alterados em carcinoma hepatocelular, assim como metilação do DNA [27]. Mutações que ativam *NFE2L2* ou inativam *KEAP1* ativam constitutivamente a via de estresse oxidativo em 5-15% dos casos de carcinoma hepatocelular [27].

O desenvolvimento e a progressão dos carcinomas de pâncreas estão associados à desregulação de vias e processos decorrentes de alterações genéticas em múltiplos genes [28]. A tumorigênese pancreática é dirigida, principalmente, por quatro categorias de genes mutados: oncogenes (*KRAS*, *BRAF*, *AKT2*, *GUCY2F*, *NTRK3*, *EGFR*), supressores tumorais e mantenedores do genoma (*p16*, *TP53*, *SMAD4*, *BRCA2/PALB2*, *FANCC/FANCG*, *MAP2K4*, *LKB1/STK11*, *ACVR1B*, *TGFBR1*, *TGFBR2*) e mantenedores dos tecidos (*PRSSI*) [10].

Aproximadamente 90% dos casos de carcinomas pancreáticos apresentam mutações no oncogene *KRAS*, associadas com as etapas de iniciação tumoral [29, 30]. As principais mutações no gene *KRAS* são transversões dos nucleotídeos G-T na primeira ou segunda base e uma transição dos nucleotídeos G-A na segunda base do códon 12 [30, 31]. Essas mutações levam à substituição do aminoácido glicina (G) pelo aminoácido ácido aspártico (D) na sequência da proteína, que se torna constitutivamente ativa e, por consequência, sinaliza para transcrição de genes associados a progressão do ciclo celular [32].

As alterações no gene supressor tumoral *p16* também apresentam alta prevalência nos carcinomas pancreáticos e resultam no descontrole da proliferação celular e consequente aumento do tamanho do tumor [33]. O gene *TP53* codifica uma proteína que se liga a sítios específicos do DNA e ativa a transcrição de genes responsáveis pela divisão celular e apoptose. Cerca de 75% dos carcinomas de pâncreas apresentam mutações no gene *TP53* que colaboram para a sobrevivência celular [10, 34].

O desenvolvimento do colangiocarcinoma também está associado ao acúmulo de alterações genéticas em genes regulatórios. Pacientes com mutações nos genes *KRAS* e *BRAF*

podem apresentar uma pior sobrevida a longo prazo [35]. Fatores de predisposição podem influenciar os padrões de mutação em colangiocarcinoma intra-hepático, uma vez que mutações no gene *EGFR* foram observadas em pacientes com doença hepática crônica em contrapartida aos pacientes sem doença hepática, que apresentaram mutações nos genes *PIK3CA*, *CDKN2A*, *PTEN* e *TP53* [36].

O colangiocarcinoma intra-hepático parece ser resultado de um processo de carcinogênese que se inicia de uma lesão precursora chamada neoplasia intra-epitelial biliar, tendo como um dos primeiros eventos moleculares a mutação no gene *KRAS* [37].

Os carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares, apesar de suas particularidades, são neoplasias de difícil diagnóstico, complexas na determinação do prognóstico, carentes em estratégias eficientes de tratamento, altamente agressivas e com taxas elevadas de morbidade e mortalidade associadas. Haja vista que o fígado, a árvore biliar e o pâncreas ventral possuem células comuns desde o desenvolvimento até idade adulta, a investigação por biomarcadores comuns e também anatomicamente específicos para esses órgãos pode auxiliar na compreensão genética e no comportamento desses tumores. Esses biomarcadores podem ser quantificados em amostras clinicamente relevantes (como soro ou plasma) por meio de técnicas minimamente invasivas, tais como a biópsia líquida.

1.2. MicroRNAs como biomarcadores no câncer

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs de 18-22 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas, mas que desempenham importante papel na regulação da expressão gênica e na patogênese de muitas doenças humanas [38, 39]. A biogênese dos miRNAs através da via canônica se inicia com um transcrito longo primário (pri-miRNA) com centenas de pares de bases sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir do DNA genômico. O pri-miRNA é então clivado pela ribonuclease RNase III Droscha, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*), o que resulta em uma estrutura precursora (pré-miRNA) em forma de grampo de 60-100 nucleotídeos de comprimento [40]. A molécula precursora é exportada, por intermédio da proteína Exportina 5, do núcleo para o citoplasma, onde é clivada pela enzima RNase III Dicer originando um miRNA de fita dupla de ~18-22 nucleotídeos (dsRNA), composto pelo miRNA maduro guia e pela fita complementar passageira. Tais sequências são nomeadas de acordo com a fita precursora, uma proveniente da fita 5' e uma da fita 3' (por exemplo, miR-125a-5p e miR-125a-3p) [41].

O miRNA maduro de fita simples é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (em inglês RISC, *RNA-Induced Silencing Complex*), composto por uma família de proteínas chamada Argonauta (Ago 1 e Ago 2) e pela proteína de ligação ao RNA (em inglês TRBP, *transactivating response RNA-binding protein*) [42].

Em humanos, a regulação da expressão gênica ocorre predominantemente por meio do pareamento de bases da região 5' do miRNA maduro com a região 3' não traduzida (3'-UTR) do mRNA alvo, no citoplasma [43]. Na posição dos nucleotídeos de 2-7 da região 5' do miRNA está situada a sequência *seed*, região essencial para o pareamento e que permite aos miRNAs regularem um grande número de genes [38, 44]. A predição de alvos regulados por miRNAs ocorre através da identificação de mRNA com complementaridade conservada à sequência *seed* do miRNA [44].

O pareamento do miRNA maduro ao mRNA alvo (região 3'-UTR) pode levar a inibição da tradução do mRNA por pareamento incompleto ou degradação do mRNA por pareamento completo. Mesmo que o pareamento de bases seja incompleto, a sequência *seed* deve ser perfeitamente complementar [38]. Variações genéticas na sequência *seed* do miRNA como também na sequência complementar na região 3'-UTR do mRNA alvo podem afetar o pareamento e resultar em expressão gênica aberrante [45, 46]. Essas variantes podem ser importantes mediadoras das variações fenotípicas e do risco de desenvolvimento de doenças, como Alzheimer e câncer [46-48].

Os mecanismos de ação dos miRNAs vão além deste modelo predominante. De acordo com a revisão de Ling e colaboradores [49], os miRNAs também podem ativar a tradução de um mRNA-alvo através do recrutamento de complexo de proteínas para elementos ricos em AU do mRNA ou ativar a tradução de um gene-alvo em caso de parada do ciclo celular; podem aumentar a síntese global de proteínas (pelo aumento da biogênese de ribossomos) e também podem atuar na comunicação celular (circulantes livres ou em microvesículas na corrente sanguínea) [49]. Os miRNAs também podem se ligar à região 5'-UTR ou à região de fase de leitura aberta (do inglês *open reading frame*, ORF) do mRNA alvo e ativar ou reprimir a síntese de proteínas [50]. Ainda no núcleo, miRNAs podem se ligar às sequências promotoras de genes e conduzir à sua expressão, o que demonstra mais um modelo de regulação da expressão gênica [51]. Adicionalmente, os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos relevantes, como o desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular [52-54] e em mecanismos de oncogênese [55-57].

Os miRNAs funcionais maduros são processados a partir de um ou ambos os braços da molécula precursora, sendo que pode ocorrer um acúmulo maior de produto proveniente de um dos braços do dsRNA (preferencialmente que será incorporado ao complexo RISC). Porém, existe a possibilidade do braço a partir do qual o miRNA maduro dominante é processado mudar em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento, processo chamado *arm switching* [58]. As consequências funcionais potenciais para mudanças no processamento do dsRNA são importantes, pois miRNAs maduros de braços opostos possuem mRNAs alvos potenciais significativamente diferentes [58].

De acordo com o banco de dados miRBase, já foram identificados e caracterizados quanto à sequência e função, 2.588 miRNAs maduros no genoma humano (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>) [41, 59-62] e informações recentes mostram que este número ainda é questionável [63]. No estudo de Londin e colaboradores foram identificados 3.707 novos miRNAs, sendo que 2.772 estão na relação do miRBase 20 [63]. Os miRNAs são encontrados em regiões intrônicas de transcritos não codificadores e de transcritos codificadores, regiões exônicas de transcritos não codificadores e transcritos codificadores e ainda existem os miRNAs que constituem íntrons (miRtrons) [64, 65].

Os miRtrons são precursores alternativos para a biogênese de miRNAs que, através de uma via nuclear não canônica, são processados em pré-miRNA (com estrutura semelhante ao da via canônica) e contornam a clivagem pela enzima ribonuclease RNase III Drosha. Posteriormente são capazes de acessar a via canônica durante a exportação do núcleo ao citoplasma para serem clivados pela enzima RNase III Dicer e incorporados ao complexo RISC [66-68].

A descoberta dos miRNAs como importantes reguladores da expressão gênica e seu potencial papel na tumorigênese têm indicado os miRNAs como candidatos ideais a biomarcadores diagnósticos, prognósticos e como potenciais alvos terapêuticos no câncer [69-74]. Além disso, miRNAs são mais estáveis do que mRNAs, sua expressão pode variar entre tecidos diferentes e são facilmente detectados utilizando pequenas quantidades de RNA. Portanto, a expressão de miRNAs pode ser quantificada em amostras clinicamente relevantes, tais como plasma ou soro. De fato, estudos têm demonstrado a utilidade de miRNAs como biomarcadores sensíveis e minimamente invasivos na detecção de células tumorais circulantes [75].

1.3. MicroRNAs em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

Os mecanismos pelos quais os miRNAs podem regular vias moleculares potencialmente envolvidas na tumorigênese, progressão e metástase de carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares não estão bem elucidados. Recentemente, um estudo integrou dados de expressão de miRNAs e de mRNA de tumores e de tecidos adjacentes não-tumoral de fígado de 100 pacientes com carcinoma hepatocelular [76]. Após análises estatísticas, foram selecionados seis miRNAs, sendo que três (miR-26a, miR-122 e miR-130a) estavam com expressão diminuída e os outros três (miR-21, miR-93 e miR-221) com expressão aumentada. Os miRNAs miR-26a, miR-122 e miR-130a regulam genes altamente expressos principalmente envolvidos com proliferação celular abundante, que abrange transcrição, metabolismo de nucleotídeos e replicação de DNA e os miRNAs miR-21, miR-93 e miR-221 regulam genes com expressão diminuída principalmente envolvidos em processos de metabolismo e do sistema imune [76]. Em outro estudo, foi demonstrado que a expressão do miR-138 regula negativamente a expressão da ciclina *CCND3*, evidenciando seu papel como supressor tumoral em carcinomas hepatocelulares [77].

Em relação aos carcinomas pancreáticos, foi realizado um estudo de expressão global de miRNAs que comparou 10 casos de adenocarcinoma ductal pancreático, 7 casos de pancreatite crônica e 7 tecidos normais como controle que mostrou que os níveis de expressão de um grupo de 20 miRNAs foram capazes de diferenciar esses três tipos de tecido. Além disso, os autores identificaram os miRNAs miR-216 e miR-217 expressos em tecido pancreático normal e com perda de expressão em tecido pancreático tumoral, sendo que a expressão desses dois miRNAs sugere uma característica do tecido pancreático normal [78].

Em outro estudo, foram comparadas 65 amostras de adenocarcinoma ductal pancreático, 65 amostras pareadas de tecido normal adjacente e 42 amostras de pancreatite crônica. Nessas amostras foram identificados dois grupos de miRNAs diferencialmente expressos, sendo um capaz de discriminar adenocarcinoma ductal pancreático de pancreatite crônica e pâncreas normal (miR-21, miR-221, miR-222, miR-181, miR-181b, miR-181d e miR-155) e outro com poder de predição de sobrevida a curto e a longo prazos (miR-452, miR-105, miR-127, miR-518a, miR-187 e miR-30a-3p) [79].

A expressão aumentada do miR-21 em amostras de carcinoma pancreático foi associada com baixa sobrevida, mesmo para um grupo de pacientes que era esperado melhor sobrevida (por não terem os linfonodos acometidos – característica de melhor prognóstico) [80]. Os altos níveis de expressão dos miRNAs miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222 em amostras

de adenocarcinoma pancreático também foram relacionados com uma pior sobrevida [81]. Outro estudo analisou 17 pares de amostras de carcinomas pancreáticos e tecidos histologicamente normais e identificou oito miRNAs desregulados (miR-196a, miR-190, miR-186, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b e miR-95), os quais desempenham importantes funções e compartilham vias moleculares durante a patogênese desse carcinoma [82].

Os níveis de expressão do miR-214 foram detectados como significativamente diminuídos em metástases de colangiocarcinoma intra-hepático, comparado a tecido não-metastático [83]. A inibição do miR-214 levou a um aumento do potencial metastático celular e aumento da expressão do gene *TWIST*, associado à transição epitélio-mesenquimal e diminuição dos níveis de expressão de E-Caderina. Os resultados deste estudo sugerem um papel importante para o miR-214 na regulação da metástase intra-hepática de colangiocarcinoma, e sua aplicação potencial como alvo molecular terapêutico [83]. O miR-421 também foi descrito como potencial biomarcador e alvo terapêutico por modular a expressão do gene supressor tumoral *FXR* em carcinomas do trato biliar (colangiocarcinoma e câncer de vesícula biliar), estimulando proliferação celular, formação de colônias e migração *in vitro* [84].

Outro estudo comparou amostras de tecido de colangiocarcinoma e de ducto biliar normal e identificou diversos miRNAs desregulados, sendo o miR-21 com o maior valor de expressão e com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade para diferenciar os dois tipos de tecidos [85].

Carcinomas de ductos biliares e de pâncreas são difíceis de distinguir entre si apenas utilizando características clínicas e histopatológicas [86]. Amostras de tecido de pacientes com colangiocarcinoma ou adenocarcinoma pancreático foram comparadas com tecido adjacente de ducto biliar e de pâncreas, respectivamente, com o objetivo de identificar perfis de miRNAs adequados para a discriminação desses tipos de carcinomas [86]. A comparação da expressão de miRNAs nessas amostras revelou 15 miRNAs comumente desregulados, sendo que 8 estavam com alta ou baixa expressão similar nos dois carcinomas (miR-221, miR-10a, miR-135b, miR-21, miR-151-3p, miR-181a, miR-106b e miR-139-5p) e os outros 7 estavam com os níveis de expressão invertidos (miR-100, miR-145, miR-125b, miR-127-3p, miR-30e, miR-96 e miR-30b) [86].

Estes são alguns exemplos de estudos que evidenciam a importância e o papel dos miRNAs como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico e/ou preditivo e sugerem

como potenciais alvos moleculares para intervenção terapêutica, com benefícios na prática clínica.

1.4. MicroRNAs circulantes em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

Tem sido demonstrado que miRNAs extracelulares estão presentes nos fluídos corporais (inclusive no sangue) de pacientes com câncer, podendo assim, servir como novos biomarcadores com valor diagnóstico. A primeira descoberta a respeito de miRNAs circulantes foi no soro de pacientes com linfoma difuso de grandes células B em que foi indicada uma relação significativa entre os altos níveis de expressão do miR-21 com uma melhora da sobrevida livre de recorrência [87].

Os miRNAs circulantes podem estar envoltos por complexos lipídicos ou lipoproteicos, protegidos da degradação [88]. Os miRNAs são incorporados ao plasma através desses complexos extracelulares que são vesículas (corpos multivesiculares ou exossomos) ou junto a proteínas de ligação ao RNA, como HDL e proteínas da família AGO [89]. Apesar da presença e atividade da ribonuclease RNase no plasma, foi demonstrado que os miRNAs circulantes são resistentes à degradação pois, por meio de centrifugação diferencial e cromatografia de exclusão por tamanho, foram identificadas duas populações de miRNAs circulantes: cerca de 90% na forma livre de vesículas, ou seja, acoplados aos complexos AGO2 e uma pequena porção (~10% do total) encapsulados em vesículas [90-92]. Dessa maneira, estratégias de análise de expressão de miRNAs circulantes na forma livre se faz importante na busca por potenciais biomarcadores em carcinomas.

Estudos têm apresentado o crescente papel dos miRNAs circulantes como biomarcadores em pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares. Entretanto, na maioria dos estudos, esses tumores têm sido estudados isoladamente. Por exemplo, um estudo com pacientes com carcinoma hepatocelular identificou aumento no nível de expressão do miR-500 no soro dos pacientes que, após cirurgia para retirada do tumor, voltou ao nível basal [93]. Também foi demonstrado que os miRNAs miR-21 e miR-199a podem ser potenciais biomarcadores circulantes em pacientes com carcinoma hepatocelular devido à alta expressão e baixa expressão desses miRNAs, respectivamente, no soro desses pacientes [94].

A presença dos miRNAs miR-21, miR-122 e miR-223 significativamente elevada no soro foi descrita com possível potencial diagnóstico para diferenciar pacientes com carcinoma hepatocelular ou com hepatite crônica do tipo B de indivíduos saudáveis. Além disso, a expressão do miR-21 e miR-122 foi maior em pacientes com hepatite crônica do tipo

B em relação a pacientes com carcinoma hepatocelular [95]. Um painel de sete miRNAs circulantes no plasma foi descrito como clinicamente relevante para o diagnóstico de carcinoma hepatocelular em estágio inicial: miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a e miR-801 [96].

Níveis elevados do miR-221 no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular podem indicar uma taxa de sobrevida significativamente menor em relação aos pacientes com diminuição da expressão deste miRNA, sugerindo o miR-221 como um biomarcador prognóstico [97].

A alta expressão de quatro miRNAs (miR-21, miR-210, miR-155 e miR-196a) foi observada no plasma de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático vs. indivíduos sem a doença [98]. A expressão do miR-196a no soro demonstra o potencial valor desse miRNA como marcador de pior prognóstico para pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático [99]. Amostras de plasma de pacientes com câncer de pâncreas também apresentaram níveis significativamente elevados do miR-210 quando comparadas com amostras de indivíduos saudáveis [100].

O miR-18a circulante no plasma de pacientes com câncer de pâncreas pode ser um biomarcador útil para rastreamento e monitoramento do tumor [101] e uma assinatura de 7 miRNAs (miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 e miR-191) foi demonstrada útil para diferenciar pacientes com pancreatite crônica daqueles com câncer de pâncreas [102].

Em relação aos pacientes com colangiocarcinoma, níveis baixos do miR-106a foram correlacionados a um alto risco de metástase linfonodal, sendo que altos níveis podem indicar maior sobrevida para o paciente [103]. O miR-192 também foi reportado com potencial valor prognóstico e sua expressão relacionada a metástase tumoral e sobrevida pobre em pacientes com colangiocarcinoma, uma vez que os níveis desse miRNA no soro desses pacientes eram maiores quando comparados a indivíduos saudáveis [104].

A presença do miR-9 na bile parece ser um importante marcador clínico para carcinomas de vias biliares útil na distinção entre as condições benignas e malignas da doença [105]. O mesmo se aplica ao miR-21, já que sua expressão no plasma de pacientes com carcinoma de vias biliares foi significativamente maior em relação a pacientes com doenças benignas da vesícula biliar [106]. Além disso, os dados mostram que os níveis do miR-21 no plasma de pacientes com carcinoma de vias biliares reduziram significativamente após intervenção cirúrgica [106].

A alta expressão do miR-150 no plasma de pacientes com colangiocarcinoma intra-hepático em relação aos controles também sugere esse miRNA como biomarcador com potencial valor diagnóstico [107].

Considerando que os miRNAs são estáveis, podem ser obtidos em amostras clinicamente relevantes por métodos minimamente invasivos. Devido ao papel dos miRNAs na iniciação e progressão tumoral, os miRNAs podem representar biomarcadores úteis no desenvolvimento de melhores estratégias diagnósticas, terapêuticas e de monitoramento de resposta ao tratamento em pacientes com câncer.

Apesar dos estudos supracitados e de outros estudos, conforme revisado por Piontek & Selaru [108], ainda há poucos trabalhos de investigação da expressão de miRNAs em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares. Para nosso conhecimento não há estudos visando a identificação de alterações na expressão de miRNAs comumente encontradas em plasma de pacientes com os três tipos tumorais. Adicionalmente, os estudos publicamente disponíveis ainda não integram dados de expressão de miRNAs e de genes-alvo regulados pelos miRNAs, para a identificação de vias moleculares envolvidas na tumorigênese e que tenham sido aplicados na prática clínica. A análise de alterações na expressão de miRNAs circulantes, integrada à identificação (*in silico*) de genes-alvo regulados por miRNAs, deve levar à elucidação de vias moleculares desreguladas e associadas à patogênese dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares.

2. Justificativa

Apesar dos progressos nas estratégias cirúrgicas e de tratamento dos pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares, o diagnóstico desses tumores é de alta complexidade e o prognóstico dos pacientes é pobre. Estratégias de tratamento vigentes para pacientes acometidos por esses carcinomas, especialmente adenocarcinomas ductais pancreáticos e carcinomas hepáticos e de vias biliares avançados, têm falhado em atenuar a agressividade da doença ou melhorar a sobrevida dos pacientes.

Considerando que o fígado, a árvore biliar e o pâncreas compartilham células progenitoras comuns em estágios iniciais do desenvolvimento (as quais persistem até a idade adulta), a busca por biomarcadores comuns, bem como específicos a cada localização anatômica dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares deve resultar no melhor entendimento e caracterização de mecanismos moleculares de tumorigênese.

Justifica-se, portanto, a necessidade da aplicação de estratégias de análise para a identificação de potenciais biomarcadores e processos biológicos desregulados em pacientes com esses carcinomas. A identificação de processos biológicos regulados por miRNAs pode contribuir significativamente para o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias diagnósticas, terapêuticas e de monitoramento de resposta a tratamento de pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares.

3. Objetivos

1. Identificar o perfil de expressão de miRNAs circulantes no plasma de pacientes diagnosticados com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares;
2. Identificar (*in silico*) mRNAs-alvo regulados por miRNAs;
3. Construir redes de interação entre miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares e seus mRNAs-alvo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CAAE: 34958114.2.0000.5411), Anexo 1. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado aos pacientes elegíveis ao estudo (Anexo 2).

4.2. Critério de inclusão e exclusão dos pacientes

Este estudo incluiu amostras de sangue de pacientes atendidos e tratados no Hospital das Clínicas de Botucatu (HCB), da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram: indivíduos maiores de 18 anos e capazes de fornecer consentimento informado, diagnóstico de carcinoma hepático, pancreático ou de vias biliares (HPB), sendo dos subtipos tumorais carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma pancreático ou colangiocarcinoma e de qualquer estadiamento e grau histológico, pacientes submetidos à biópsia ou cirurgia. Quanto aos carcinomas hepatocelulares, foram coletadas amostras independente da presença ou ausência do vírus da hepatite B ou C, um dos fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores.

Os critérios de exclusão foram: pacientes que foram tratados com quimioterapia e/ou radioterapia anteriormente à coleta de sangue, pacientes com doença metastática e não primária do fígado, pâncreas ou vias biliares.

4.3. Amostras

O perfil de expressão de miRNAs circulantes foi determinado em amostras de plasma do sangue periférico de pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma pancreático ou de colangiocarcinoma e de indivíduos voluntários, saudáveis/sem doença (controle) coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu-SP.

4.4. Delineamento e seleção das amostras de pacientes com carcinomas HPB

Entre as amostras de plasma de pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares coletadas pelo nosso grupo de pesquisa, foram selecionadas aquelas que atenderam a todos os critérios de inclusão e exclusão. Nessa fase foi analisado e confirmado o diagnóstico

histopatológico dos tumores dos pacientes. Portanto, essa etapa foi importante para identificar entre todas as amostras coletadas, aquelas dos subtipos tumorais: carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pâncreas e colangiocarcinoma, para análise molecular subsequente.

O delineamento experimental e a seleção das amostras estão apresentados na Figura

1.

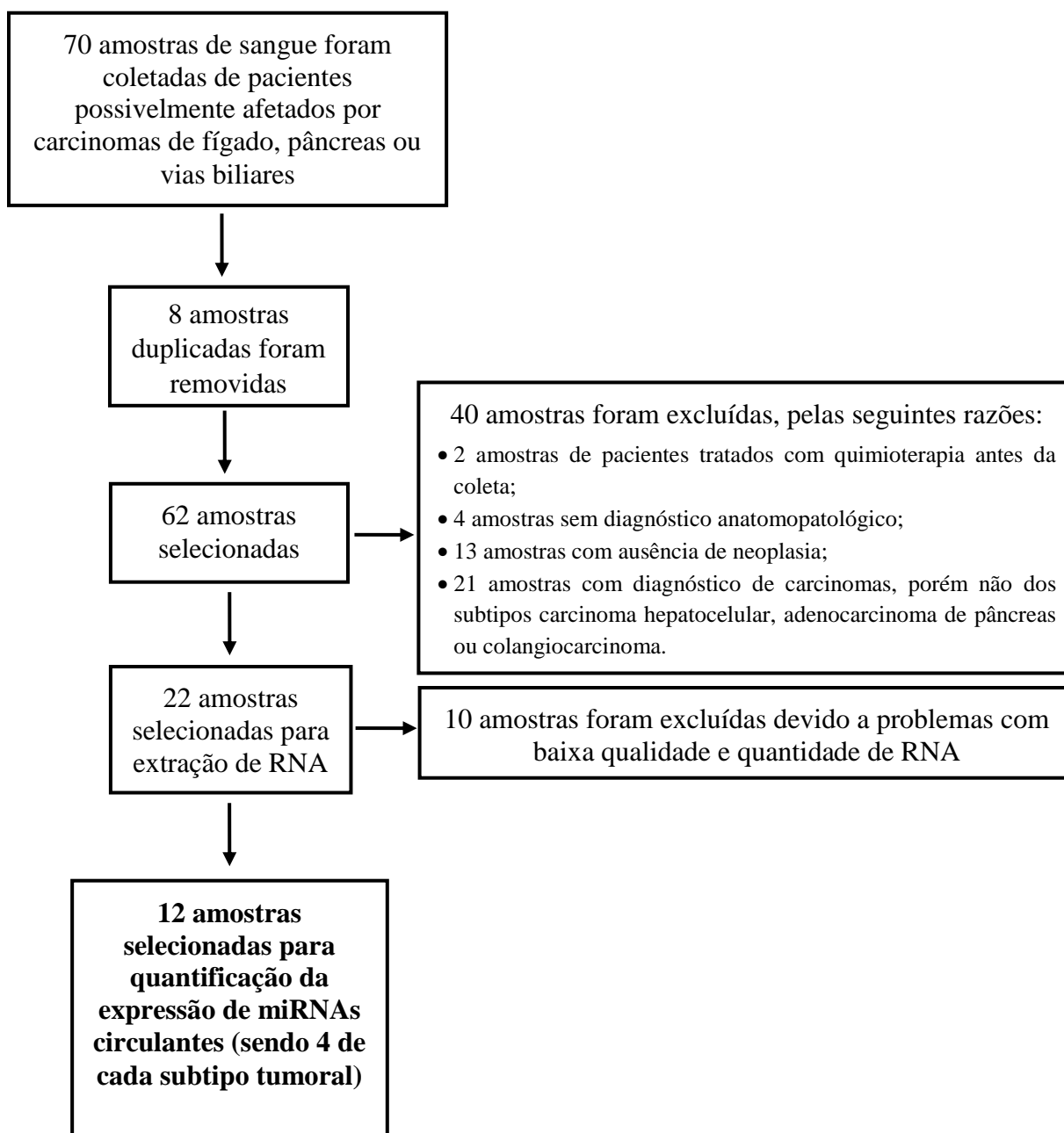


Figura 1. Delineamento e seleção das amostras de pacientes com carcinomas HPB.

4.5. Análise molecular

4.5.1. Coleta, separação e armazenamento de plasma

Foram coletados dos pacientes e indivíduos controle 4 mL de sangue periférico em tubo BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) com EDTA. O sangue foi mantido em gelo a ~4°C até ser processado para obtenção do plasma livre de células, por centrifugação a 1.200 rpm, por 15 minutos a 4°C. A fração plasmática (fase superior) foi aliquoteada e transferida para novos tubos eppendorf de 1,5 mL e então armazenada em freezer, a -80°C até sua utilização.

4.5.2. Confeção do pool das amostras controle

As 10 amostras controle (coletadas de voluntários saudáveis) foram agrupadas em um *pool* contendo 100 µL de cada amostra, o qual foi homogeneizado anteriormente à extração do RNA, a qual foi realizada utilizando 200 µL deste *pool*, volume requerido segundo o protocolo do fabricante.

4.5.3. Extração de RNA

A extração do RNA total enriquecido com moléculas circulantes livres foi realizada utilizando o miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo protocolo do fabricante. Um tubo eppendorf de 1,5 mL de plasma de cada amostra foi descongelado inicialmente em gelo (por ~30 min.) e depois colocado em temperatura ambiente (15-25°C) até descongelamento completo. De cada tubo, foi aliquoteado 200 µL de plasma para extração do RNA. Foram adicionados 1000 µL de reagente de lise (fornecido pelo kit) a cada amostra, as quais foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de desnaturar complexos de proteínas e RNases e remover grande parte do DNA residual. Logo após foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada amostra e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos a 4°C. A centrifugação permite que cada amostra seja separada em fases orgânicas e aquosa, sendo que a fase inferior contém proteínas, a interfase contém DNA e a fase superior (aquosa) contém RNA. A fase aquosa contendo o RNA de cada amostra foi transferida para novos tubos eppendorf e então foi adicionado 900 µL de etanol 100% a cada amostra para fornecer condições de ligação adequadas para todas as moléculas de RNA que contenham de ~18 nucleotídeos para cima. As próximas etapas consistiram na purificação do RNA através de colunas com filtro, onde o RNA total (incluindo

os miRNAs e pequenos RNAs) adere à membrana e os contaminantes são descartados no material filtrado. A fase aquosa contendo etanol de cada amostra foi transferida para as colunas com filtro que foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 700 µL da solução de lavagem *Buffer RWT* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 500 µL da solução de lavagem *Buffer RPE* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 segundos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Adicionou-se 500 µL de etanol 80%, seguida por centrifugação a 10.000 rpm, por 2 minutos a 25°C e o filtrado foi desprezado. Uma nova centrifugação foi realizada para secagem das colunas a 14.000 rpm, por 5 minutos a 25°C. A coluna com filtro foi então transferida para um novo tubo coletor fornecido pelo kit para a eluição do RNA que foi realizada em duas etapas. Primeiro foram adicionados 7 µL de água estéril e livre de RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no centro do filtro, incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm a 25°C. Essa etapa foi repetida uma vez até a obtenção do RNA. O RNA total obtido (enriquecido com miRNAs) foi então armazenado em freezer, a -80°C, até sua utilização.

4.5.4. Quantificação e qualidade do RNA

A análise de quantificação e avaliação da qualidade e pureza das amostras de RNA total (incluindo os miRNAs e pequenos RNAs) foi realizada no equipamento *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra e verificar a presença de contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos.

4.5.5. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs

A transcrição reversa dos miRNAs foi realizada utilizando o TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 (Applied Biosystems), segundo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa dos miRNAs maduros inclusos no cartão *Taqman® Low Density Array Card A* (Applied Biosystems). Na reação foram adicionados ao RNA total os seguintes componentes do kit: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP (100mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 10X RT Buffer, inibidor de RNase (*RNase Inhibitor*) (20U/µL). A mistura foi incubada nas seguintes

condições: 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50°C por 1 segundo; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 minutos. O produto da transcrição reversa foi armazenado no -20°C até o momento da utilização.

4.5.6. Análise da expressão de miRNAs

A análise da expressão dos miRNAs circulantes livres foi realizada utilizando a plataforma *TaqMan® Array Human MicroRNA Cards* (card A, v3.0), a qual consiste em um cartão com sondas liofilizadas, que permite quantificar a expressão de 384 miRNAs humanos. A plataforma inclui três controles (miRNAs endógenos) para normalização dos dados e um ensaio não humano como controle negativo.

Para o preparo da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) foram utilizados: 450 µL de Master Mix TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems); 6 µL de cDNA (produzido em etapa anterior) e 444 µL de água estéril e livre de RNase. Foram adicionados 100 µL desse mix em cada um dos oito poços da placa; seguido por centrifugação da placa a 1.200 rpm por 1 minuto, duas vezes. A RT-qPCR foi realizada no equipamento *QuantStudio 12K Flex* (Applied Biosystems).

Para a normalização dos dados foi aplicada a normalização global, que conforme descrita por Mestdagh e colaboradores [109], em primeiro lugar é encontrado os ensaios comuns para cada amostra e, em seguida, utiliza a mediana de C_{RT}/C_T desses ensaios, como fator de normalização, em uma base por amostra. Demonstrou-se que este tipo de normalização é válido apenas se um grande número (384 ou maior) de alvos forem testados [109].

4.6. Análise dos dados

4.6.1. Processamento dos dados de expressão

Os dados de expressão foram analisados através do programa *ExpressionSuite v1.0.3*, ferramenta de análise de dados que utiliza o método Delta Delta Ct [110] e permite quantificar a expressão gênica relativa através de um grande número de genes e amostras.

Para a determinação de miRNAs diferencialmente expressos tem sido amplamente aceito aplicar um valor de *fold change* (FC) $\geq 1,5$, como descrito em estudos prévios na literatura [111, 112]. Dessa maneira, foi utilizado $FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$ como valor de corte (*cutoff*) para significância estatística.

A construção dos Diagramas de Venn para análise dos conjuntos foi realizada através da ferramenta *InteractiVenn*, disponível online (<http://www.interactivenn.net/>) [113].

4.6.2. Predição de alvos dos miRNAs

A predição dos mRNAs-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) foi realizada por meio de análise bioinformática, utilizando a ferramenta *microRNA Data Integration Portal* v.3.0.1.0 (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) [114]. Esta ferramenta computacional é útil para predição global de genes-alvo regulados por miRNAs por integrar os principais bancos de dados públicos de miRNAs, como DIANA-microT [115, 116], microRNAs.org/miRanda [117, 118], microCosm Targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), picTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html), RNA22 microRNA target detection (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) e TargetScan [44, 119].

A integração dos bancos de dados melhora o rigor das predições, equilibrando a precisão e recuperação de informações. Durante as buscas pelos mRNAs-alvo foi utilizado o filtro '*Balanced Precision and Recall*' para proporcionar maior relação entre precisão e taxa de recuperação dos resultados. Os algoritmos de predição procuram principalmente por alto grau de complementariedade entre a extremidade 3' da sequência alvo do mRNA e a extremidade 5' do miRNA, com maior atenção à sequência *seed* do miRNA [114].

Adicionalmente, para o enriquecimento e identificação de vias biológicas relevantes foi utilizado o programa STRING v10.0 [120, 121] e a montagem e visualização da rede de interação foi através do programa Cytoscape v3.4.0 [122, 123]. As principais funções dos genes-alvo e das proteínas que codificam foram anotadas utilizando as bases de dados disponíveis publicamente NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>) [124].

5. Resultados

5.1. Perfil de expressão de miRNAs circulantes em plasma de pacientes com carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares

As análises foram realizadas para identificar os diferentes níveis de expressão dos miRNAs circulantes nas amostras de plasma de pacientes com carcinomas HPB em relação ao grupo (*pool*) de indivíduos controle. Essa análise identificou 42 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$), sendo 26 miRNAs com expressão diminuída e 16 miRNAs com expressão aumentada nas amostras de pacientes com carcinomas HPB comparado com o grupo controle.

A Tabela 1 apresenta os miRNAs com expressão diminuída e com expressão aumentada e os respectivos valores de FC e de p . Os valores de FC representam o número de vezes que o miRNA está com expressão diminuída ou aumentada. Adicionalmente, apresenta qual o subtipo tumoral de doença em que o miRNA se expressa diferencialmente (no plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pâncreas e/ou colangiocarcinoma). A localização genômica dos miRNAs alterados detectados nos três subtipos tumorais está apresentada na Tabela 2.

A Figura 2 apresenta os 26 miRNAs detectados com expressão diminuída de acordo com o subtipo tumoral. Dentre os 26 miRNAs circulantes com expressão diminuída, 19 miRNAs (73%) eram compartilhados entre os três subtipos tumorais, 2 miRNAs apresentaram expressão diminuída no plasma apenas em carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma de pâncreas, 1 miRNA apenas em carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma e 4 miRNAs apresentaram baixa expressão no plasma apenas em adenocarcinoma de pâncreas e colangiocarcinoma.

A Figura 3 apresenta os 16 miRNAs detectados com expressão aumentada no plasma de pacientes dos três subtipos tumorais. Entre os 16 miRNAs circulantes com expressão aumentada, 9 (56%) eram comuns aos três subtipos tumorais, 5 identificados em carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma de pâncreas e 2 em adenocarcinoma de pâncreas e colangiocarcinoma.

Tabela 1. miRNAs com expressão alterada no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

Expressão diminuída				Expressão aumentada			
miRNA	FC	<i>p-value</i>	Subtipo tumoral no qual o miR está alterado	miRNA	FC	<i>p-value</i>	Subtipo tumoral no qual o miR está alterado
miR-150-5p	0,062	0,000	Todos	miR-98-5p	3,835	0,003	ACP e CCA
miR-140-3p	0,379	0,001	Todos	miR-142-3p	1,697	0,009	CHC e ACP
miR-195-5p	0,314	0,001	Todos	miR-193b-3p	5,346	0,011	CHC e ACP
miR-25-3p	0,351	0,001	Todos	miR-494-3p	2,388	0,011	CHC e ACP
miR-486-5p	0,073	0,001	Todos	miR-130a-3p	3,467	0,015	Todos
miR-486-3p	0,155	0,001	Todos	miR-142-5p	1,994	0,022	Todos
miR-92a-3p	0,178	0,001	Todos	miR-148a-3p	3,055	0,031	Todos
miR-16-5p	0,276	0,003	Todos	miR-29a-3p	2,007	0,032	Todos
miR-20b-5p	0,415	0,004	Todos	miR-26a-5p	1,561	0,033	Todos
miR-425-5p	0,433	0,004	Todos	miR-199a-3p	1,608	0,034	Todos
let-7c-5p	0,337	0,005	Todos	miR-874-3p	3,106	0,034	CHC e ACP
let-7b-5p	0,332	0,006	Todos	miR-214-3p	4,263	0,034	ACP e CCA
miR-363-3p	0,450	0,009	CHC e ACP	miR-27b-3p	2,527	0,037	Todos
miR-660-5p	0,495	0,015	Todos	miR-212-3p	10,070	0,038	CHC e ACP
miR-485-3p	0,105	0,015	CHC e CCA	miR-130b-3p	1,580	0,044	Todos
miR-194-5p	0,493	0,016	Todos	miR-152-3p	4,422	0,045	Todos
miR-328-3p	0,421	0,027	CHC e ACP				
miR-422a	0,333	0,028	ACP e CCA				
miR-483-5p	0,379	0,029	ACP e CCA				
miR-362-5p	0,152	0,030	Todos				
miR-532-5p	0,493	0,030	Todos				
miR-135b-5p	0,407	0,031	ACP e CCA				
miR-500a-5p	0,098	0,038	Todos				
miR-10a-5p	0,348	0,040	ACP e CCA				
miR-183-5p	0,152	0,043	Todos				
miR-197-3p	0,398	0,046	Todos				

FC: *fold change*; ACP: Adenocarcinoma de pâncreas; CCA: Colangiocarcinoma; CHC: Carcinoma hepatocelular.

Tabela 2. Localização no genoma humano dos miRNAs alterados detectados nos três subtipos tumorais, no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

miRNA	Localização genômica
miR-148a	7p15.2
miR-142	17q22
miR-130b	22q11.21
miR-152	17q21.32
miR-29a	7q32.3
miR-26a	3p22.2 (26a-1) / 12q14.1 (26a-2)
miR-130a	11q12.1
miR-27b	9q22.32
let-7b-5p	22q13.31
let-7c-5p	21q21.1
miR-140-3p	16q22.1
miR-150-5p	19q13.33
miR-16-5p	13q14.2 (16-1) / 3q25.33 (16-2)
miR-183-5p	7q32.2
miR-195-5p	17p13.1
miR-197-3p	1p13.3
miR-20b-5p	Xq26.2
miR-25-3p	7q22.1
miR-362-5p	Xp11.23
miR-425-5p	3p21.31
miR-486-3p	8p11.21
miR-500a-5p	Xp11.23
miR-532-5p	Xp11.23
miR-660-5p	Xp11.23
miR-92a-3p	13q31.3 (92a-1) / Xq26.2 (92a-2)
miR-194-5p	1q41 (194-1) / 11q13.1 (194-2)
miR-486-5p	8p11.21

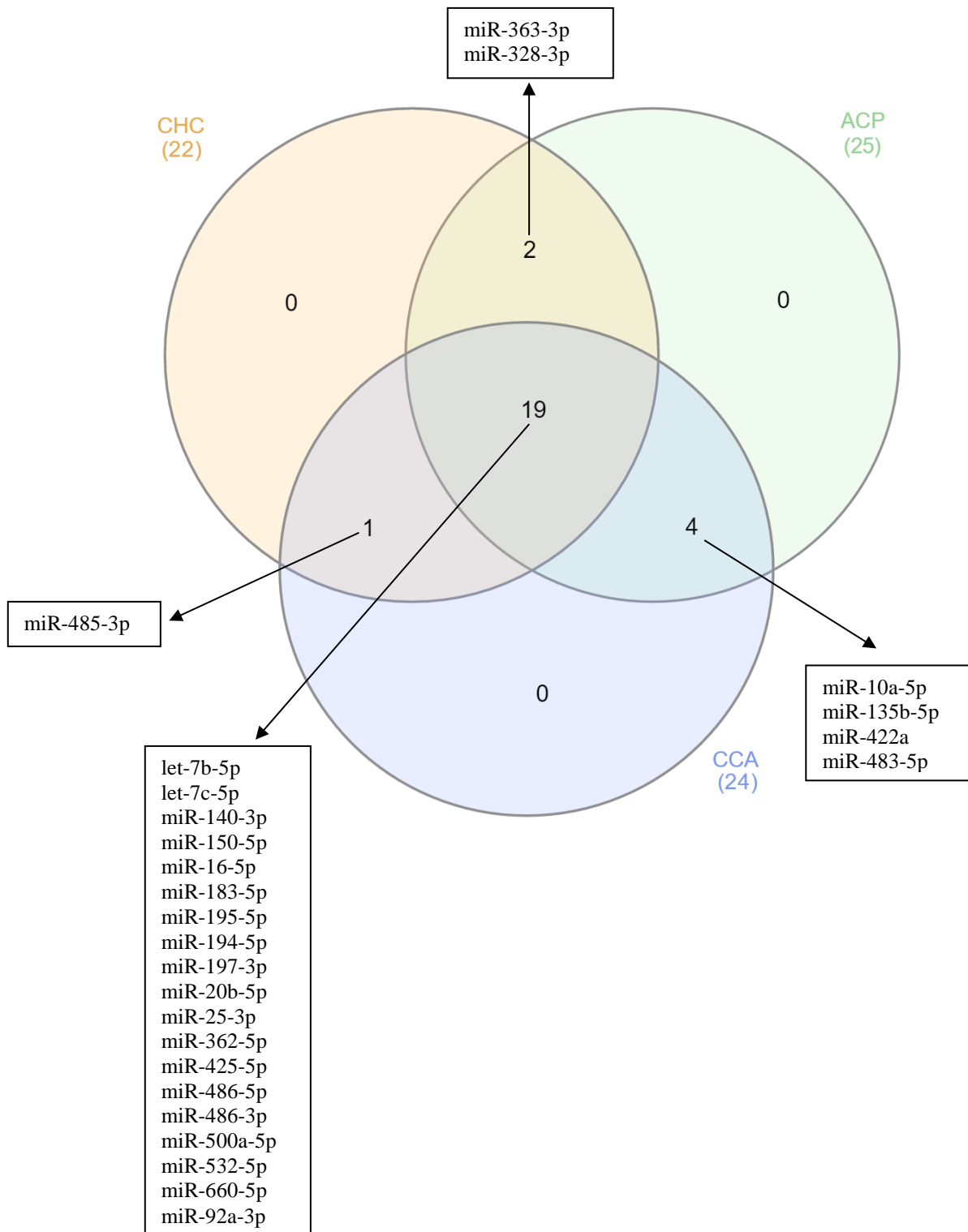


Figura 2. Diagrama de Venn ilustrando os 26 miRNAs com expressão diminuída no plasma entre os subtipos carcinoma hepatocelular (CHC), adenocarcinoma de pâncreas (ACP) e colangiocarcinoma (CCA).

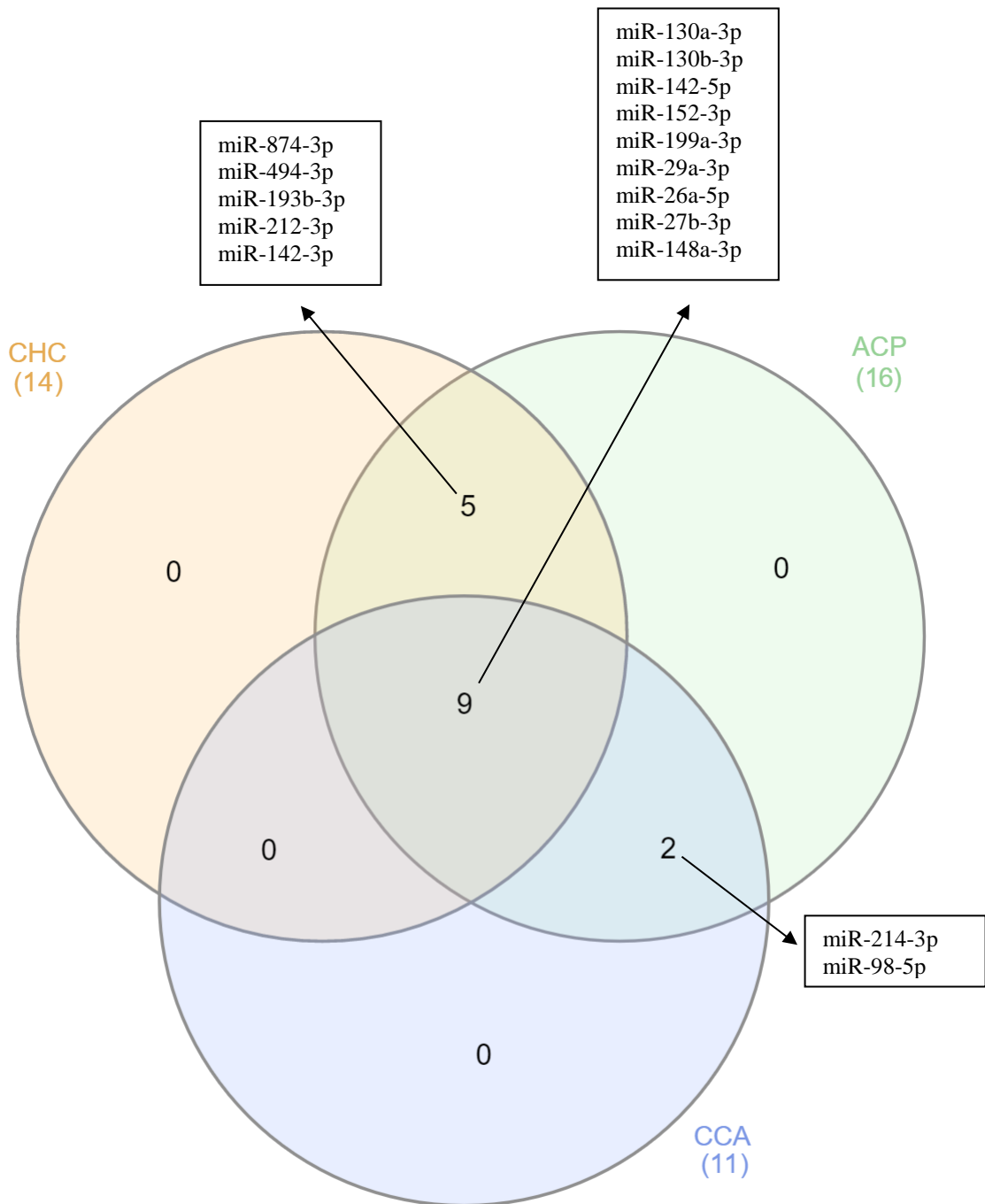


Figura 3. Diagrama de Venn ilustrando os 16 miRNAs com expressão aumentada no plasma entre os subtipos carcinoma hepatocelular (CHC), adenocarcinoma de pâncreas (ACP) e colangiocarcinoma (CCA).

5.2. Resultados de predição de mRNAs-alvo regulados por miRNAs

A análise de predição detectou diversos mRNAs-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos identificados nos carcinomas HPB, como descrito na Tabela Suplementar (Anexo 3). As Figuras 4 e 5 representam redes de interação entre os miRNAs com expressão alterada compartilhados entre os três subtipos tumorais e seus mRNAs-alvo preditos, sendo a Figura 4 para os miRNAs com expressão diminuída e a Figura 5 para o miRNAs com expressão aumentada no plasma dos pacientes em relação aos controles.

Os miRNAs miR-362-5p, miR-183-5p, miR-140-3p e miR-199a-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p não estão incluídos nas Figuras 4 e 5, respectivamente, pois seus mRNAs-alvo não apresentaram significância estatística e não foram incluídos nas redes de interação.

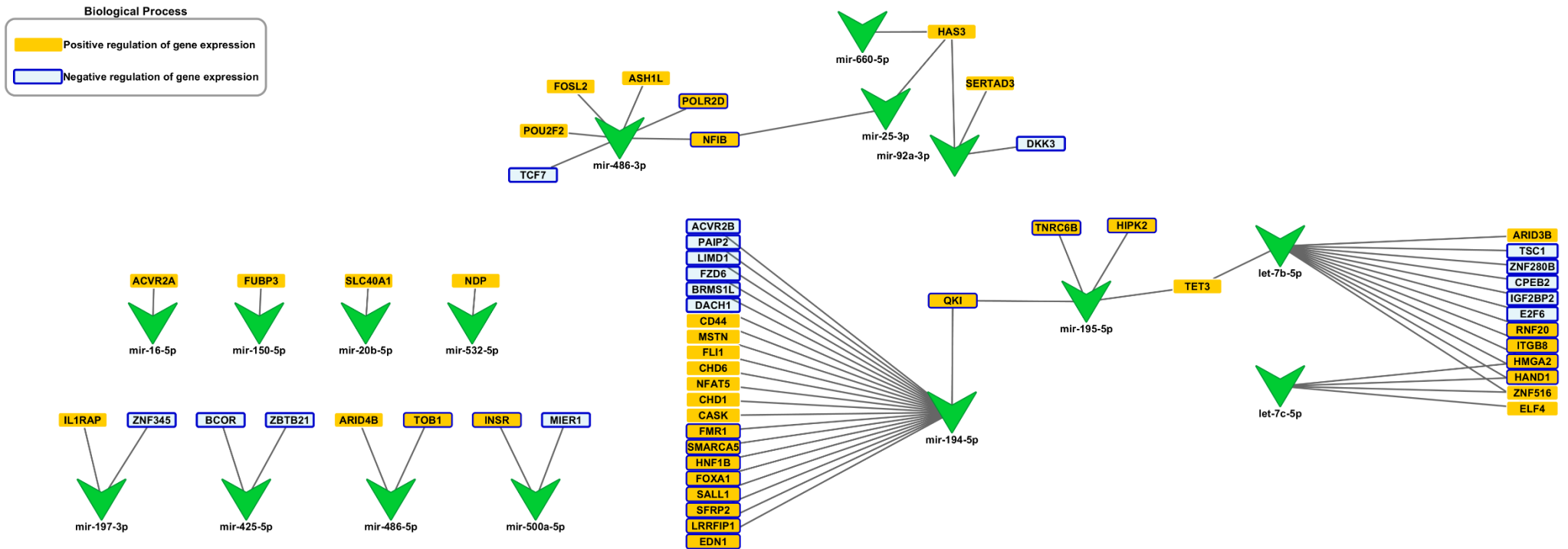


Figura 4. Rede de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo. A rede mostra os miRNAs circulantes com expressão diminuída comum aos três subtipos tumorais de carcinomas HPB. As setas verdes representam os miRNAs e os retângulos os mRNAs-alvo. mRNAs-alvo em amarelo podem participar do processo biológico de regulação positiva da expressão gênica e mRNAs-alvo em azul podem participar do processo biológico de regulação negativa. Dessa maneira, os mRNAs-alvo em amarelo com borda azul podem desempenhar dupla função. Nas análises de enriquecimento de processos biológicos foi utilizado o programa STRING v10.0 e para montagem e visualização da rede de interação o programa Cytoscape v3.4.0.

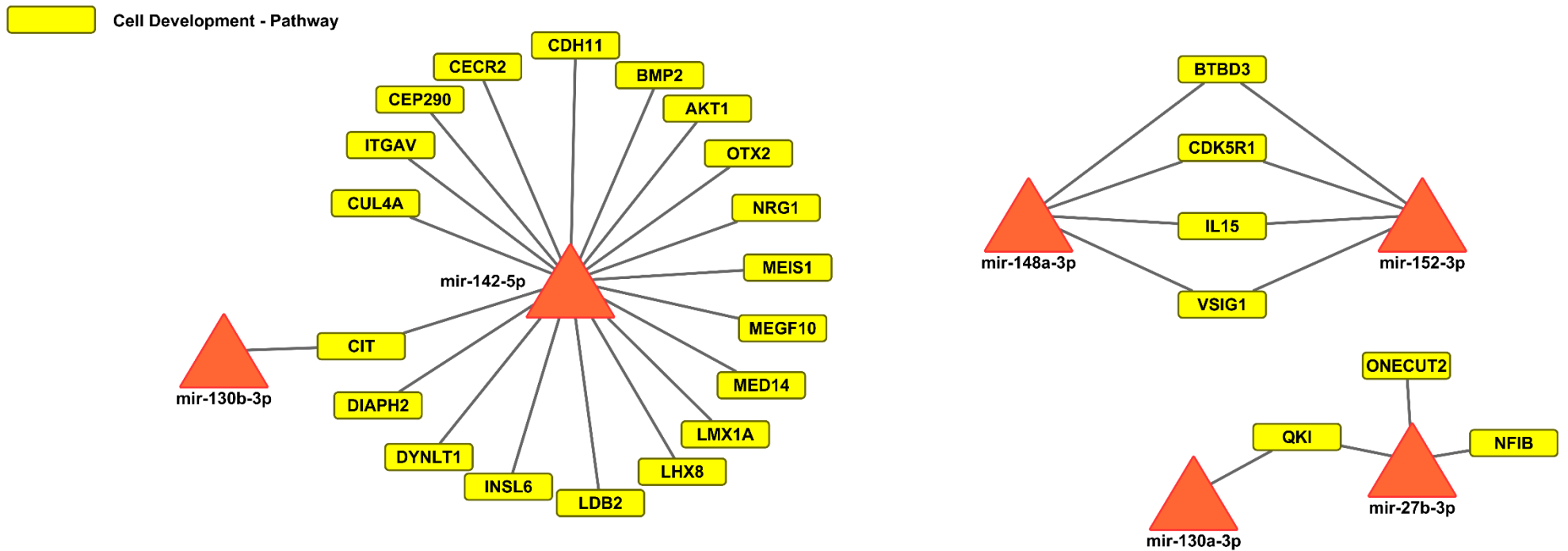


Figura 5. Rede de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo. A rede mostra os miRNAs circulantes com expressão aumentada comum aos três subtipos tumorais de carcinomas HPB. Os triângulos vermelhos representam os miRNAs e os retângulos os mRNAs-alvo. De acordo com as análises de enriquecimento (realizadas utilizando o programa STRING v10.0) os mRNAs-alvo desta rede estão envolvidos em processos biológicos de desenvolvimento celular. Para montagem e visualização da rede de interação foi utilizado o programa Cytoscape v3.4.0.

6. Discussão

Os carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares são patologias de difícil diagnóstico e prognóstico complexo, carentes em tratamentos eficientes e que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade. Considerando o papel biológico dos miRNAs e que miRNAs circulantes podem ser encontrados no sangue periférico de pacientes com câncer, a identificação de miRNAs como potenciais biomarcadores pode fornecer informações sobre a biologia do tumor, auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento da doença, contribuindo para o melhor manejo dos pacientes [125].

Nossos dados mostraram que, no plasma de pacientes com carcinomas HPB, um grupo de 42 miRNAs estava com expressão alterada (26 com expressão diminuída e 16 com expressão aumentada), sendo que 28 miRNAs foram detectados como diferencialmente expressos e compartilhados entre os três subtipos tumorais (19 com expressão diminuída e 9 com expressão aumentada).

Entre os 19 miRNAs detectados em nosso estudo com expressão diminuída nos três subtipos tumorais (Figura 4), alguns se destacam por apresentarem interação com mais de um mRNA-alvo, conforme detectado pela análise de predição. Entre eles estão os miRNAs miR-197-3p, miR-425-5p, miR-486-5p, miR-500a-5p e miR-25-3p que interagem com dois mRNAs-alvo; o miR-92a-3p que interage com três mRNAs-alvo; os miRNAs miR-195-5p e let-7c-5p que interagem com quatro mRNAs-alvo; o miR-486-3p que interage com seis mRNAs-alvo; o let-7b-5p que interage com onze mRNAs-alvo e o miR-194-5p que interage com vinte e um mRNAs-alvo.

Até o momento não existem na literatura relatos sobre o miR-197-3p circulante em pacientes com carcinomas HPB. Há apenas um estudo que sugere este miRNA, juntamente com miR-1281 e miR-32-3p, como potencial biomarcador em pacientes com mesotelioma pleural maligno [126].

O miR-425-5p foi detectado no plasma e soro de pacientes com diferentes carcinomas. Experimentos com cultura de células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tratadas com radioquimioterapia mostraram um perfil de expressão de miRNAs diferencialmente expressos (incluindo miR-425-5p) semelhante ao observado no plasma de pacientes com o mesmo carcinoma, sugerindo que esses miRNAs circulantes no plasma são possivelmente derivados do tumor [127]. Nesse estudo, a expressão diminuída do miR-425-5p foi identificada como um potencial biomarcador de monitoramento de terapia [127]. Um painel

de 7 miRNAs (miR-106a-5p, miR16-5p, miR-20a-5p, miR451a, miR-25-3p e miR139-5p), incluindo miR-425-5p, foi identificado como potencial biomarcador circulante no soro de pacientes com osteosarcoma, todos com expressão diminuída no soro dos pacientes em relação ao soro de indivíduos saudáveis [128].

Estudos recentes também têm demonstrado o miR-486-5p circulante em pacientes com carcinoma de fígado e de pâncreas. Tan e colaboradores avaliaram o soro de pacientes com cirrose que evoluiu para carcinoma hepatocelular relacionado ao vírus da hepatite B e demonstraram 8 miRNAs diferencialmente expressos, incluindo o miR-486-5p [129]. Para pacientes com adenocarcinoma pancreático, o miR-486-5p circulante no plasma apresentou potencial valor diagnóstico para distingui-los de pacientes com pancreatite crônica e de indivíduos saudáveis [130]. Já sobre o miR-486-3p há apenas um estudo que relata ter analisado sua expressão e de mais 11 miRNAs, no soro de pacientes com câncer de mama, porém os resultados para esse miRNA não foram significativos [131].

O trabalho de Zhang e colaboradores analisou a expressão de miRNAs circulantes no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular, pacientes com hepatite crônica e indivíduos saudáveis [132]. Foi demonstrado que os níveis do miR-500a e miR-483-5p estavam aumentados no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular em relação aos dois outros grupos, porém não havia diferença entre os pacientes com hepatite crônica em comparação aos indivíduos saudáveis, o que sugere o potencial papel desses miRNAs como biomarcadores diagnósticos para o carcinoma hepatocelular [132].

O miR-25 circulante no soro já foi relatado como potencial biomarcador para detecção precoce do carcinoma de pâncreas, [133] e, em um painel com mais 5 miRNAs, potencial biomarcador na discriminação entre diabetes associada ao tumor e pacientes saudáveis e diabetes não associada ao tumor [134].

Wang e colaboradores analisaram a expressão de 24 miRNAs (previamente apontados como relacionados ao carcinoma hepatocelular) no soro de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B e identificaram 15 miRNAs com significativa associação ao risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular [135]. Entre os 15 miRNAs, 8 foram associados a um baixo risco (miR-652, miR-23a, miR-27a, miR-34a, miR-145, miR-10a, miR-150 e let-7f) e 7 foram associados a um alto risco (miR-122, miR-99a, miR-331, miR-125b, miR-23b e miR-26a), incluindo o miR-92a, o que sugere esses miRNAs circulantes com potencial valor na predição de risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite B [135].

O miR-194 foi relatado como diferencialmente expresso no soro de pacientes com carcinoma de esôfago e, juntamente com outros miRNAs, possui papel potencial na distinção entre pacientes com carcinoma epidermoide escamoso de esôfago e indivíduos controles [136] além de alta especificidade e sensibilidade na distinção entre adenocarcinoma de esôfago de indivíduos controles e pacientes com esôfago de Barrett [137]. O miR-194 também tem sido relatado como promissor biomarcador para monitoramento de recorrência em pacientes com câncer de mama [138], para predição de progressão de câncer de próstata em pacientes de risco intermediário [139] e para detecção precoce de câncer gástrico [140].

A expressão do miR-195 derivado de exossomos circulantes foi analisada no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular em comparação com indivíduos com hepatite B e se mostrou em baixos níveis no primeiro grupo [141]. Altos níveis de let-7b circulante no soro podem apresentar alta sensibilidade e especificidade na diferenciação entre carcinoma hepatocelular de estágio inicial de nódulos displásicos em pacientes com hepatite B [142].

A análise de predição identificou potenciais genes alvos para seis dos nove miRNAs com expressão aumentada: miR-130b-3p, miR-142-5p, miR-148a-3p, miR-152-3p, miR-130a-3p e miR-27b-3p. Os genes alvo potencialmente regulados por estes miRs foram identificados na análise de enriquecimento como envolvidos em diferenciação celular.

A expressão diferencial do miR-148a circulante tem sido reportada em tecido tumoral e no plasma de pacientes com diferentes tipos de carcinomas. Em pacientes com carcinoma hepatocelular, a alta expressão do miR-148a no plasma apresentou alta sensibilidade e especificidade para prever recorrência tardia do tumor, após terem sido tratados com transplante de fígado [143]. O miR-148a circulante foi sugerido como biomarcador diagnóstico e preditivo em pacientes com osteossarcoma [144] e como biomarcador prognóstico e de resposta ao tratamento em pacientes com tumores epiteliais tímicos [145]. Nossos resultados também mostram alta expressão do miR-148a no plasma de pacientes com carcinoma de fígado, pâncreas e vias biliares (Figura 5).

Já o trabalho de Wang e colaboradores avaliou os níveis dos miRNAs miR-148a e miR-152 no soro de 76 pacientes com carcinoma hepatocelular, 62 controles com doenças benignas do fígado e 55 voluntários saudáveis e identificaram que, nos pacientes, os miRNAs apresentavam baixa expressão em relação aos controles [146].

Pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas apresentaram baixa expressão do miR-152 e let-7c no plasma anteriormente à cirurgia, sendo que, no período pós-operatório, ambos miRNAs apresentaram expressão aumentada. Níveis elevados de miR-152 e

let-7c no plasma podem ser utilizados como potenciais biomarcadores prognósticos para carcinoma pulmonar de células não pequenas [147].

Na literatura há apenas um relato da expressão diferencial do miR-142-5p circulante no soro de pacientes com câncer colorretal [148]. Os estudos mencionam a alta expressão da outra fita do miR-142 (miR-142-3p). Foi demonstrado que a alta expressão do miR-142-3p pode estar relacionada com pior prognóstico em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço [149]. Nossos resultados mostram a alta expressão do miR-142-5p em plasma de pacientes com carcinomas HPB.

Outro miRNA com expressão significativamente aumentada nos nossos dados é o miR-130b. Concordante com nossos achados, o estudo de Liu e colaboradores identificou alta expressão do miR-130b no soro e em tecido tumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular [150].

O estudo de Oksuz e colaboradores analisou a expressão de 58 miRNAs no plasma de pacientes com hepatite C, pacientes com cirrose e hepatite C e pacientes com carcinoma hepatocelular e hepatite C comparados com grupo controle [151]. No grupo de pacientes com cirrose e hepatite C, oito miRNAs foram detectados, incluindo miR-130a-3p, porém com expressão diminuída [151]. O miR-130a também foi relatado com potencial papel na biologia e progressão tumoral de câncer de mama invasivo, com alta expressão detectada em pacientes linfonodo negativas e HER2 positivas [152].

Para o miRNA circulante miR-27b-3p, até o momento, existe apenas um estudo que relata sua expressão diferencial no plasma. Após remoção cirúrgica do tumor, os níveis do miR-27b-3p juntamente com outros 7 miRNAs estavam reduzidos no plasma de pacientes com câncer colorretal, o que pode indicar que esses miRNAs são de origem tumoral, além de representarem potenciais biomarcadores não invasivos para detecção de câncer colorretal [153].

Entre os genes preditos como alvos potenciais para os miRNAs desregulados identificados em nosso estudo (Anexo 3 – Tabela Suplementar), alguns são preditos a serem regulados por mais de um miRNA. Esses genes apresentam funções biológicas importantes e estão envolvidos em processos de transcrição, organização e divisão celular, principalmente. A Figura 4 mostra que os miRNAs miR-194-5p e miR-195-5p podem regular o gene *QKI*. Interessantemente, o gene *QKI* também aparece na Figura 5 como potencial alvo dos miRNAs miR-130a-3p e miR-27b-3p. A proteína codificada pelo gene *QKI* é uma proteína de ligação ao RNA que regula o *splicing* do pré-mRNA, exportação do mRNA do núcleo e sua estabilidade [154]. O gene *TET3* também é alvo potencial do miR-195-5p, além do let-7b-5p. Membros da

família de genes TET (incluindo *TET3*), desempenham papel no processo de metilação do DNA [155].

Os genes *HMGA2*, *HAND1* e *ZNF516* são alvos potenciais tanto do let-7b-5p quanto do let-7c-5p. O gene *HMGA2* codifica uma proteína com domínios de ligação ao DNA estrutural, podendo atuar como regulador da transcrição. Deleções, amplificações e rearranjos neste gene estão associados com lipossarcomas [156]. A proteína codificada pelo gene *HAND1* desempenha papel essencial na morfogênese cardíaca, além de ser necessária em mecanismos de angiogênese e desenvolvimento da vasculatura extra-embriônica [157]. Proteínas *zinc finger* desempenham papéis em diversas funções celulares, como proliferação, diferenciação e morte celular. O gene *ZNF516* codifica uma proteína deste tipo e que pode estar envolvida na regulação da transcrição [158].

Os miRNAs miR-486-3p e miR-25-3p são potenciais reguladores da expressão do gene *NFIB*. O gene *NFIB* codifica uma proteína que reconhece e se liga a uma sequência palindrômica específica presente em promotores viral e celular e na origem de replicação do adenovírus tipo 2, ativando mecanismos de transcrição e duplicação.

A proteína codificada pelo gene *HAS3* é essencial para a síntese do ácido hialurônico (principal componente da matriz extracelular) e desempenha função estrutural na arquitetura dos tecidos, além de regular adesão, migração e diferenciação celular [159]. O gene *HAS3* pode ser alvo dos miRNAs miR-660-5p, miR-92a-3p e também do miR-25-3p.

Na Figura 5, é possível observar que o miR-130b-3p e o miR-142-5p são potenciais reguladores do gene *CIT*. A proteína codificada pelo gene *CIT* desempenha papel importante na divisão celular, promovendo citocinese eficiente junto à proteína KIF14 e também está envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central [160]. Polimorfismos neste gene estão associados com distúrbios de bipolaridade e risco de esquizofrenia [161].

Os miRNAs miR-148a-3p e miR-152-3p têm como potenciais alvos os genes *BTBD3*, *CDK5R1*, *IL15* e *VSIG1*, de acordo com a rede de interação. A proteína codificada pelo gene *BTBD3* atua como reguladora da orientação do campo dendrítico durante o desenvolvimento do córtex sensorial. Além disso, um estudo de predição de alvos candidatos para o tratamento de diabetes tipo 2 demonstrou que esse gene parece desempenhar papel importante no desenvolvimento dessa doença [162].

O gene *CDK5R1* codifica uma proteína necessária para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central. Altos níveis dessa proteína foram descritos em adenoma pituitário [163]. A proteína codificada pelo gene *IL15* é uma citocina que regula a ativação e

proliferação de células T e células NK (do inglês, *natural killer*). Foi demonstrado que a combinação entre as vias de sinalização da citocina IL-15 com a da proteína TLR-9 podem promover expansão clonal de leucemia linfocítica crônica de células B [164]. O gene *VSIG1* e sua proteína apresentam níveis reduzidos em amostras de tecido de câncer gástrico, podendo servir como potencial marcador prognóstico [165].

As divergências entre nossos resultados e alguns dados da literatura em relação a expressão diferencial dos miRNAs podem ser por algumas razões, principalmente (1) diferenças entre o número amostral dos estudos, (2) diferenças entre os grupos analisados, os grupos utilizados como controle e as estratégias de análise, (3) alguns estudos mais antigos não apresentam informação sobre qual fita do miRNA foi analisada e (4) os diversos mecanismos de ação e funções que os miRNAs podem apresentar.

Os diversos miRNAs desregulados identificados neste estudo indicam a complexidade de alterações em processos biológicos potencialmente associados com mecanismos de tumorigênese dos carcinomas HPB que, de fato, apresentam comportamentos biológicos e manifestações clínicas diferentes. Embora nosso estudo tenha sido limitado em relação ao tamanho amostral, sua principal inovação foi a investigação de miRNAs expressos nos três subtipos tumorais. Além disso, até onde temos conhecimento, alguns miRNAs aqui identificados ainda não foram relatados na literatura como desregulados no plasma ou soro de pacientes com carcinomas HPB. Os miRNAs identificados são candidatos potenciais em estudos futuros de validação e podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, de tratamento e/ou monitoramento de doença em pacientes com carcinomas HPB.

7. Conclusão

O perfil de expressão de miRNAs circulantes identificado no plasma de pacientes com carcinomas HPB pode indicar esses miRNAs como biomarcadores com potencial valor clínico. Considerando o importante papel como reguladores da expressão gênica, a identificação de 28 miRNAs circulantes diferencialmente expressos (19 com expressão diminuída e 9 com expressão aumentada) e compartilhados entre os três subtipos tumorais sugere que processos biológicos comuns podem estar desregulados nos carcinomas HPB. Adicionalmente, identificamos que esses miRNAs regulam genes associados à transcrição e divisão, organização, diferenciação, proliferação e morte celular, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento e progressão dos carcinomas HPB.

8. Perspectivas futuras

A continuidade deste estudo inclui a análise dos miRNAs e de seus mRNAs-alvo em tumor e plasma de pacientes com carcinomas HPB em um maior grupo amostral, o que permitirá confirmar o potencial desses miRs e seus mRNAs-alvo como biomarcadores em carcinomas HPB. Além disso, este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, de tratamento e monitoramento de doença, beneficiando dessa forma os pacientes diagnosticados com carcinomas HPB.

9. Referências

1. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Alvaro D, Reid L, Gaudio E: **Multipotent stem cells in the biliary tree.** *Ital J Anat Embryol* 2010, **115**(1-2):85-90.
2. 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.
3. **Instituto Nacional do Câncer - INCA** [<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>]
4. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, Negri E: **The global decrease in cancer mortality: trends and disparities.** *Ann Oncol* 2016.
5. Liver EAFTSOT, Cancer EOFRATO: **EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol* 2012, **56**(4):908-943.
6. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC: **Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas.** *Nature* 1991, **350**(6317):427-428.
7. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA, Group BHS: **Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil.** *Clinics (Sao Paulo)* 2010, **65**(12):1285-1290.
8. Royal RE, Wolff RA, Crane CH: **Cancer of the pancreas.** In: *Cancer Principles & Practice Oncology 9th ed.* edn. Edited by Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 961-989.
9. Klein AP, de Andrade M, Hruban RH, Bondy M, Schwartz AG, Gallinger S, Lynch HT, Syngal S, Rabe KG, Goggins MG *et al*: **Linkage analysis of chromosome 4 in families with familial pancreatic cancer.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(3):320-323.
10. Kern SE, Hruban RH: **Molecular biology of pancreas cancer.** In: *Cancer Principles & Practice Oncology 9th ed.* edn. Edited by Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 955-960.
11. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer statistics, 2015.** *CA Cancer J Clin* 2015, **65**(1):5-29.
12. Bartlett DL, Ramanathan RK, Ben-Josef E: **Cancer of the biliary tree.** In: *Cancer Principles & Practice Oncology 9th ed.* edn. Edited by Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 1019-1047.
13. Bartlett DL, Di Bisceglie AM, Dawson LA: **Cancer of the liver.** In: *Cancer Principles & Practice Oncology 9th ed.* edn. Edited by Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 997-1018.
14. Plieskatt J, Rinaldi G, Feng Y, Peng J, Easley S, Jia X, Potriquet J, Pairojkul C, Bhudhisawasdi V, Sripan B *et al*: **A microRNA profile associated with *Opisthorchis viverrini*-induced cholangiocarcinoma in tissue and plasma.** *BMC Cancer* 2015, **15**:309.
15. Samuel N, Hudson TJ: **The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, **9**(2):77-87.
16. **American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016.** Atlanta: American Cancer Society; 2016. [<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>]
17. Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M: **Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009.** *World J Gastroenterol* 2009, **15**(34):4240-4262.

18. Bruix J, Sherman M, Diseases AAftSoL: **Management of hepatocellular carcinoma: an update.** *Hepatology* 2011, **53**(3):1020-1022.
19. Liver EAfSo, Cancer EOfRaTo: **EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(5):599-641.
20. 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.
21. Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ: **The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates.** *Curr Mol Med* 2013, **13**(3):340-351.
22. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: **Cancer statistics, 2014.** *CA Cancer J Clin* 2014, **64**(1):9-29.
23. 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.
24. Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, Maranki JL, Camp ER, Denlinger CS: **Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma.** *Cancer* 2016.
25. Jarnagin WR, Shoup M: **Surgical management of cholangiocarcinoma.** *Semin Liver Dis* 2004, **24**(2):189-199.
26. Weinberg RA: **Multi-step tumorigenesis.** In: *The biology of cancer.* edn.: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2007: 399-462.
27. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G: **Hepatocellular carcinoma.** *Nat Rev Dis Primers* 2016, **2**:16018.
28. 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.
29. 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.
30. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: **Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.** *Cell* 1988, **53**(4):549-554.
31. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL: **KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(16):7773-7782.
32. Collins MA, Pasca di Magliano M: **Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer.** *Front Physiol* 2013, **4**:407.
33. 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.
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 homopolymer tracts in DNA microdeletions.** *Cancer Res* 1994, **54**(11):3025-3033.
35. Robertson S, Hyder O, Dodson R, Nayar SK, Poling J, Beierl K, Eshleman JR, Lin MT, Pawlik TM, Anders RA: **The frequency of KRAS and BRAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinomas and their correlation with clinical outcome.** *Hum Pathol* 2013, **44**(12):2768-2773.

36. Jang S, Chun SM, Hong SM, Sung CO, Park H, Kang HJ, Kim KP, Lee YJ, Yu E: **High throughput molecular profiling reveals differential mutation patterns in intrahepatic cholangiocarcinomas arising in chronic advanced liver diseases.** *Mod Pathol* 2014, **27**(5):731-739.
37. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakanuma Y: **KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas.** *Cancer* 2013, **119**(9):1669-1674.
38. 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.
39. Boyd SD: **Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask.** *Lab Invest* 2008, **88**(6):569-578.
40. 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.
41. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Database issue):D140-144.
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: target recognition and regulatory functions.** *Cell* 2009, **136**(2):215-233.
44. 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.
45. Ghanbari M, Franco OH, de Looper HW, Hofman A, Erkeland SJ, Dehghan A: **Genetic Variations in MicroRNA-Binding Sites Affect MicroRNA-Mediated Regulation of Several Genes Associated With Cardio-metabolic Phenotypes.** *Circ Cardiovasc Genet* 2015, **8**(3):473-486.
46. Georges M, Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Hiard S, Tordoir X, Caiment F, Meish F, Bibé B *et al*: **Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006, **71**:343-350.
47. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, Novotny J, Försti A, Hemminki K, Canzian F *et al*: **Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer.** *Carcinogenesis* 2008, **29**(3):579-584.
48. Ghanbari M, Ikram MA, de Looper HW, Hofman A, Erkeland SJ, Franco OH, Dehghan A: **Genome-wide identification of microRNA-related variants associated with risk of Alzheimer's disease.** *Sci Rep* 2016, **6**:28387.
49. Ling H, Fabbri M, Calin GA: **MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development.** *Nat Rev Drug Discov* 2013, **12**(11):847-865.
50. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD: **New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites.** *Genome Res* 2009, **19**(7):1175-1183.
51. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R: **MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(5):1608-1613.
52. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
53. Harfe BD: **MicroRNAs in vertebrate development.** *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**(4):410-415.

54. Cummins JM, Velculescu VE: **Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6220-6227.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Griffiths-Jones S, Hui JH, Marco A, Ronshaugen M: **MicroRNA evolution by arm switching.** *EMBO Rep* 2011, **12**(2):172-177.
59. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(Database issue):D68-73.
60. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D152-157.
61. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ: **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Database issue):D154-158.
62. Griffiths-Jones S: **The microRNA Registry.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Database issue):D109-111.
63. Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, Hatzimichael E, Kirino Y, Honda S, Lally M *et al*: **Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(10):E1106-1115.
64. Kim VN, Han J, Siomi MC: **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(2):126-139.
65. Ha M, Kim VN: **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(8):509-524.
66. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP: **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** *Nature* 2007, **448**(7149):83-86.
67. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC: **The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila.** *Cell* 2007, **130**(1):89-100.
68. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC: **Mammalian mirtron genes.** *Mol Cell* 2007, **28**(2):328-336.
69. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y *et al*: **Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival.** *Cancer Res* 2004, **64**(11):3753-3756.
70. 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.
71. 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.

72. 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.
73. 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.
74. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact**. *J Clin Oncol* 2009, **27**(34):5848-5856.
75. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ: **Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer**. *J Clin Oncol* 2010, **28**(29):e573-574; author reply e575-576.
76. Thurnherr T, Mah WC, Lei Z, Jin Y, Rozen SG, Lee CG: **Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways**. *Sci Rep* 2016, **6**:20065.
77. Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT: **MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma**. *Carcinogenesis* 2012, **33**(5):1113-1120.
78. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj 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.
79. 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.
80. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M: **MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival**. *J Gastrointest Surg* 2008, **12**(12):2171-2176.
81. 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.
82. 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.
83. Li B, Han Q, Zhu Y, Yu Y, Wang J, Jiang X: **Down-regulation of miR-214 contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by targeting Twist**. *FEBS J* 2012, **279**(13):2393-2398.
84. Zhong XY, Yu JH, Zhang WG, Wang ZD, Dong Q, Tai S, Cui YF, Li H: **MicroRNA-421 functions as an oncogenic miRNA in biliary tract cancer through down-regulating farnesoid X receptor expression**. *Gene* 2012, **493**(1):44-51.
85. Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, Yang J, Paun B, Jin Z, Agarwal R *et al*: **MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3**. *Hepatology* 2009, **49**(5):1595-1601.
86. Collins AL, Wojcik S, Liu J, Frankel WL, Alder H, Yu L, Schmittgen TD, Croce CM, Bloomston M: **A differential microRNA profile distinguishes cholangiocarcinoma from pancreatic adenocarcinoma**. *Ann Surg Oncol* 2014, **21**(1):133-138.

87. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS *et al*: **Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *Br J Haematol* 2008, **141**(5):672-675.
88. El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE: **Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics.** *Clin Chem* 2004, **50**(3):564-573.
89. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA: **MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers.** *Nat Rev Clin Oncol* 2011, **8**(8):467-477.
90. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al*: **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(30):10513-10518.
91. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL *et al*: **Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(12):5003-5008.
92. Hou J, Meng F, Chan LW, Cho WC, Wong SC: **Circulating Plasma MicroRNAs As Diagnostic Markers for NSCLC.** *Front Genet* 2016, **7**:193.
93. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T *et al*: **MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma.** *Biomarkers* 2009, **14**(7):529-538.
94. Amr KS, Ezzat WM, Elhosary YA, Hegazy AE, Fahim HH, Kamel RR: **The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma.** *Gene* 2016, **575**(1):66-70.
95. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C *et al*: **Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis.** *Mol Carcinog* 2011, **50**(2):136-142.
96. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, Zhang Z, Lu S, Huang X *et al*: **Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(36):4781-4788.
97. Li J, Wang Y, Yu W, Chen J, Luo J: **Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **406**(1):70-73.
98. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S: **MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2009, **2**(9):807-813.
99. Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y *et al*: **Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis.** *Dig Dis Sci* 2011, **56**(2):602-609.
100. 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.
101. Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H, Konishi H, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K *et al*: **Novel diagnostic value of circulating miR-**

- 18a in plasma of patients with pancreatic cancer.** *Br J Cancer* 2011, **105**(11):1733-1740.
102. Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, Hu Z, Zhuang R, Ning G, Zhang C *et al*: **Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.** *Clin Chem* 2012, **58**(3):610-618.
103. Cheng Q, Feng F, Zhu L, Zheng Y, Luo X, Liu C, Yi B, Jiang X: **Circulating miR-106a is a Novel Prognostic and Lymph Node Metastasis Indicator for Cholangiocarcinoma.** *Sci Rep* 2015, **5**:16103.
104. Silakit R, Loilome W, Yongvanit P, Chusorn P, Techasen A, Boonmars T, Khuntikeo N, Chamadol N, Pairojkul C, Namwat N: **Circulating miR-192 in liver fluke-associated cholangiocarcinoma patients: a prospective prognostic indicator.** *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014, **21**(12):864-872.
105. Shigehara K, Yokomuro S, Ishibashi O, Mizuguchi Y, Arima Y, Kawahigashi Y, Kanda T, Akagi I, Tajiri T, Yoshida H *et al*: **Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer.** *PLoS One* 2011, **6**(8):e23584.
106. Kishimoto T, Eguchi H, Nagano H, Kobayashi S, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Tomokuni A, Tomimaru Y *et al*: **Plasma miR-21 is a novel diagnostic biomarker for biliary tract cancer.** *Cancer Sci* 2013, **104**(12):1626-1631.
107. Wang S, Yin J, Li T, Yuan L, Wang D, He J, Du X, Lu J: **Upregulated circulating miR-150 is associated with the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma.** *Oncol Rep* 2015, **33**(2):819-825.
108. Piontek K, Selaru FM: **MicroRNAs in the biology and diagnosis of cholangiocarcinoma.** *Semin Liver Dis* 2015, **35**(1):55-62.
109. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J: **A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization.** *Genome Biol* 2009, **10**(6):R64.
110. 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.
111. Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW: **Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(10):3697-3702.
112. Raouf A, Zhao Y, To K, Stingl J, Delaney A, Barbara M, Iscove N, Jones S, McKinney S, Emerman J *et al*: **Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**(1):109-118.
113. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R: **InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams.** *BMC Bioinformatics* 2015, **16**:169.
114. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I: **NAVIGating the microme--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs.** *PLoS One* 2011, **6**(2):e17429.
115. 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.
116. 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.
117. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: **Human MicroRNA targets.** *PLoS Biol* 2004, **2**(11):e363.
 118. 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.
 119. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 2009, **19**(1):92-105.
 120. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA: **STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(18):3442-3444.
 121. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Lin J, Minguez P, Bork P, von Mering C *et al*: **STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(Database issue):D808-815.
 122. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 2003, **13**(11):2498-2504.
 123. Saito R, Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Lotia S, Pico AR, Bader GD, Ideker T: **A travel guide to Cytoscape plugins.** *Nat Methods* 2012, **9**(11):1069-1076.
 124. Consortium U: **UniProt: a hub for protein information.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D204-212.
 125. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K: **Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer.** *Nat Rev Clin Oncol* 2014, **11**(3):145-156.
 126. Bononi I, Comar M, Puozzo A, Stendardo M, Boschetto P, Orecchia S, Libener R, Guaschino R, Pietrobon S, Ferracin M *et al*: **Circulating microRNAs found dysregulated in ex-exposed asbestos workers and pleural mesothelioma patients as potential new biomarkers.** *Oncotarget* 2016.
 127. Summerer I, Niyazi M, Unger K, Pitea A, Zangen V, Hess J, Atkinson MJ, Belka C, Moertl S, Zitzelsberger H: **Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients.** *Radiat Oncol* 2013, **8**:296.
 128. Li H, Zhang K, Liu LH, Ouyang Y, Guo HB, Zhang H, Bu J, Xiao T: **MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma.** *Oncol Lett* 2015, **10**(3):1662-1668.
 129. Tan Y, Lin B, Ye Y, Wen D, Chen L, Zhou X: **Differential expression of serum microRNAs in cirrhosis that evolve into hepatocellular carcinoma related to hepatitis B virus.** *Oncol Rep* 2015, **33**(6):2863-2870.
 130. Xu J, Cao Z, Liu W, You L, Zhou L, Wang C, Lou W, Sun B, Miao Y, Liu X *et al*: **Plasma miRNAs Effectively Distinguish Patients With Pancreatic Cancer From Controls: A Multicenter Study.** *Ann Surg* 2016, **263**(6):1173-1179.
 131. Hamdi K, Goerlitz D, Stambouli N, Islam M, Baroudi O, Neili B, Benayed F, Chivi S, Loffredo C, Jillson IA *et al*: **miRNAs in Sera of Tunisian patients discriminate between inflammatory breast cancer and non-inflammatory breast cancer.** *Springerplus* 2014, **3**:636.
 132. Zhang Z, Ge S, Wang X, Yuan Q, Yan Q, Ye H, Che Y, Lin Y, Zhang J, Liu P: **Serum miR-483-5p as a potential biomarker to detect hepatocellular carcinoma.** *Hepatol Int* 2013, **7**(1):199-207.

133. Deng T, Yuan Y, Zhang C, Yao W, Wang C, Liu R, Ba Y: **Identification of Circulating MiR-25 as a Potential Biomarker for Pancreatic Cancer Diagnosis.** *Cell Physiol Biochem* 2016, **39**(5):1716-1722.
134. Dai X, Pang W, Zhou Y, Yao W, Xia L, Wang C, Chen X, Zen K, Zhang CY, Yuan Y: **Altered profile of serum microRNAs in pancreatic cancer-associated new-onset diabetes mellitus.** *J Diabetes* 2016, **8**(3):422-433.
135. Wang C, Hann HW, Ye Z, Hann RS, Wan S, Ye X, Block PD, Li B, Myers RE, Wang X *et al*: **Prospective evidence of a circulating microRNA signature as a non-invasive marker of hepatocellular carcinoma in HBV patients.** *Oncotarget* 2016.
136. Wu C, Wang C, Guan X, Liu Y, Li D, Zhou X, Zhang Y, Chen X, Wang J, Zen K *et al*: **Diagnostic and prognostic implications of a serum miRNA panel in oesophageal squamous cell carcinoma.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e92292.
137. Chiam K, Wang T, Watson DI, Mayne GC, Irvine TS, Bright T, Smith L, White IA, Bowen JM, Keefe D *et al*: **Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma.** *J Gastrointest Surg* 2015, **19**(7):1208-1215.
138. Huo D, Clayton WM, Yoshimatsu TF, Chen J, Olopade OI: **Identification of a circulating MicroRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients.** *Oncotarget* 2016.
139. Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, Goodall GJ, Butler LM, Tilley WD: **Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients.** *Br J Cancer* 2013, **109**(3):641-650.
140. Zhang ZZ, Wang CJ, Niu L, Xu J, Wang M, Cao H, Hu B: **Analysis of plasma MicroRNAs to identifying early diagnostic molecule for gastric cancer.** *Int J Clin Exp Med* 2015, **8**(3):3700-3706.
141. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho JY, Cho HC, Shim SG, Paik YH: **Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma.** *Exp Mol Med* 2015, **47**:e184.
142. Hung CH, Hu TH, Lu SN, Kuo FY, Chen CH, Wang JH, Huang CM, Lee CM, Lin CY, Yen YH *et al*: **Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus.** *Int J Cancer* 2016, **138**(3):714-720.
143. Ng KT, Lo CM, Wong N, Li CX, Qi X, Liu XB, Geng W, Yeung OW, Ma YY, Chan SC *et al*: **Early-phase circulating miRNAs predict tumor recurrence and survival of hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation.** *Oncotarget* 2016, **7**(15):19824-19839.
144. Ma W, Zhang X, Chai J, Chen P, Ren P, Gong M: **Circulating miR-148a is a significant diagnostic and prognostic biomarker for patients with osteosarcoma.** *Tumour Biol* 2014, **35**(12):12467-12472.
145. Bellissimo T, Russo E, Ganci F, Vico C, Sacconi A, Longo F, Vitolo D, Anile M, Disio D, Marino M *et al*: **Circulating miR-21-5p and miR-148a-3p as emerging non-invasive biomarkers in thymic epithelial tumors.** *Cancer Biol Ther* 2016, **17**(1):79-82.
146. Wang F, Ying H, He B, Pan Y, Sun H, Wang S: **Circulating miR-148/152 family as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma.** *Tumour Biol* 2016, **37**(4):4945-4953.
147. Dou H, Wang Y, Su G, Zhao S: **Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer.** *Int J Clin Exp Med* 2015, **8**(6):9291-9298.

148. Vychytilova-Faltejskova P, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, Fabian P, Grolich T, Prochazka V, Kala Z, Svoboda M *et al*: **Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer.** *Carcinogenesis* 2016.
149. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P, Kirchner T, Niyazi M, Sage E, Specht HM *et al*: **Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients.** *Br J Cancer* 2015, **113**(1):76-82.
150. Liu AM, Yao TJ, Wang W, Wong KF, Lee NP, Fan ST, Poon RT, Gao C, Luk JM: **Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study.** *BMJ Open* 2012, **2**(2):e000825.
151. Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, Emekdas G, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN: **Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma.** *Mol Biol Rep* 2015, **42**(3):713-720.
152. Stückrath I, Rack B, Janni W, Jäger B, Pantel K, Schwarzenbach H: **Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients.** *Oncotarget* 2015, **6**(15):13387-13401.
153. Ostensfeld MS, Jensen SG, Jeppesen DK, Christensen LL, Thorsen SB, Stenvang J, Hvam ML, Thomsen A, Mouritzen P, Rasmussen MH *et al*: **miRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer.** *J Extracell Vesicles* 2016, **5**:31488.
154. Chénard CA, Richard S: **New implications for the QUAKING RNA binding protein in human disease.** *J Neurosci Res* 2008, **86**(2):233-242.
155. Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH: **TET proteins in malignant hematopoiesis.** *Cell Cycle* 2009, **8**(24):4044-4048.
156. Saâda-Bouazid E, Burel-Vandenbos F, Ranchère-Vince D, Birtwisle-Peyrottes I, Chetaille B, Bouvier C, Château MC, Peoc'h M, Battistella M, Bazin A *et al*: **Prognostic value of HMGA2, CDK4, and JUN amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas.** *Mod Pathol* 2015, **28**(11):1404-1414.
157. Morikawa Y, Cserjesi P: **Extra-embryonic vasculature development is regulated by the transcription factor HAND1.** *Development* 2004, **131**(9):2195-2204.
158. Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N, Domingo E, Kanu N, Dewhurst SM, Gronroos E *et al*: **Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability.** *Nature* 2013, **494**(7438):492-496.
159. Knudson CB, Knudson W: **Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease.** *FASEB J* 1993, **7**(13):1233-1241.
160. Fu Y, Huang J, Wang KS, Zhang X, Han ZG: **RNA interference targeting CITRON can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells.** *Mol Biol Rep* 2011, **38**(2):693-702.
161. Nicodemus KK, Callicott JH, Higier RG, Luna A, Nixon DC, Lipska BK, Vakkalanka R, Giegling I, Rujescu D, St Clair D *et al*: **Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging.** *Hum Genet* 2010, **127**(4):441-452.
162. Wang Q, Zhao Z, Shang J, Xia W: **Targets and candidate agents for type 2 diabetes treatment with computational bioinformatics approach.** *J Diabetes Res* 2014, **2014**:763936.

163. Xie W, Wang H, He Y, Li D, Gong L, Zhang Y: **CDK5 and its activator P35 in normal pituitary and in pituitary adenomas: relationship to VEGF expression.** *Int J Biol Sci* 2014, **10**(2):192-199.
164. Mongini PK, Gupta R, Boyle E, Nieto J, Lee H, Stein J, Bandovic J, Stankovic T, Barrientos J, Kolitz JE *et al*: **TLR-9 and IL-15 Synergy Promotes the In Vitro Clonal Expansion of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells.** *J Immunol* 2015, **195**(3):901-923.
165. Chen Y, Pan K, Li S, Xia J, Wang W, Chen J, Zhao J, Lü L, Wang D, Pan Q *et al*: **Decreased expression of V-set and immunoglobulin domain containing 1 (VSIG1) is associated with poor prognosis in primary gastric cancer.** *J Surg Oncol* 2012, **106**(3):286-293.

ANEXO 1 – Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de expressão de microRNAs circulantes em carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares. **Pesquisador:** Natália Bertoni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34958114.2.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

820.604

Data da Relatoria:

06/10/2014

Apresentação do Projeto:

Os cânceres de fígado, pâncreas e vias biliares, coletivamente chamados HPB (hepato-pancreato-biliares), são carcinomas agressivos e estão entre as neoplasias de alta complexidade no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento. Considerando que o fígado, a árvore biliar e o pâncreas compartilham células progenitoras comuns em estágios iniciais do desenvolvimento, que persistem até a idade adulta, a busca de biomarcadores comuns, bem como específicos a cada localização anatômica dos carcinomas HPB deve resultar no melhor entendimento e caracterização de mecanismos genéticos de tumorigênese. Atualmente, há um consenso geral que a determinação de vias moleculares desreguladas pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para melhorar o diagnóstico e o tratamento do câncer acometendo estes órgãos vitais. O objetivo geral do estudo é identificar alterações na expressão de microRNAs circulantes e genes-alvo regulados por microRNAs em carcinomas HPB. MicroRNAs são importantes reguladores da expressão gênica e têm sido apontados como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos em vários tipos de câncer. Os genes-alvo regulados por microRNAs serão identificados e mapeados em proteínas, como estratégia de caracterização de vias moleculares oncogênicas em carcinomas HPB. Para determinar o perfil de expressão de microRNAs livres no plasma e microRNAs derivados de exossomos em



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU - UNESP



carcinoma hepático, pancreático ou de vias biliares (HPB) será realizada a extração do RNA das amostras de sangue periférico em 40 pacientes com câncer em seguimento. Serão incluídos indivíduos maiores de 18 anos e capazes de fornecer consentimento informado, diagnóstico de carcinoma hepático, pancreático ou de vias biliares (HPB), de todos os subtipos histológicos e de qualquer estadiamento e grau histológico, pacientes submetidos à biópsia ou cirurgia. Quanto aos carcinomas hepatocelulares, serão coletadas amostras independente da presença ou ausência do vírus da hepatite B ou C, um dos fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores. E serão excluídos os pacientes menores de idade ou incapazes de fornecer consentimento informado, pacientes com outros tumores que não HPB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores apresentaram todas as declarações obrigatórias.

O TCLE está redigido em forma de convite, explicando com clareza a participação para o paciente.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 06 de Outubro de 2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Solicitamos aos pesquisadores que apresentem ao CEP, o respectivo "Relatório Final de Atividades" ao final do estudo.

BOTUCATU, 06 de Outubro de 2014

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadora responsável: Dra. Patricia Pintor dos Reis.

Título do Projeto: microRNoma dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares.

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo de pesquisa em genética de doenças e tumores do fígado, pâncreas ou vias biliares.

Antes de concordar em participar deste estudo, é importante que o(a) Sr.(a) leia este Termo de Consentimento e entenda a explicação do estudo.

Por favor, esclareça quaisquer dúvidas ou palavras que não fiquem claras, antes de assinar este documento.

O(A) Sr.(a) têm o direito de recusar a participar deste estudo ou de suspender a sua participação do estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao seu atendimento e acompanhamento médico no hospital.

Proposta do estudo

A proposta deste estudo é identificar genes relacionados ao desenvolvimento de doenças e tumores no fígado, ou pâncreas ou vias biliares. Essa pesquisa poderá ajudar a descobrir se a doença terá uma evolução clínica favorável (por exemplo, com a possibilidade de cura) ou não e pode contribuir para a descoberta de novos tratamentos.

Coleta de amostras para o estudo

O(A) Sr.(a) já recebeu esclarecimento e explicações do seu médico sobre o seu tratamento e/ou sua cirurgia. Caso o(a) Sr(a) necessite de cirurgia para remover um tumor, um pequeno pedaço do tumor (o qual normalmente seria descartado após a cirurgia) será coletado para análise genética. Também serão coletadas duas amostras de 5 mL cada (total de 10 mL ou mais ou menos 1 colher de sopa) de sangue periférico, por punção venosa.

A coleta de material para esse estudo não influenciará em nada no seu tratamento, ou seja, **a sua cirurgia será feita exatamente como planejado pelo seu médico, independente da coleta de material.**

O material coletado para esta pesquisa poderá ser utilizado em estudos futuros e neste caso o(a) Sr(a) será consultado para decidir se concorda ou não com quaisquer pesquisas futuras.

Riscos e Benefícios

A coleta de sangue poderá gerar um desconforto devido à punção venosa, como dor, vermelhidão, inchaço e pequeno hematoma no local da punção.

A coleta de material durante a cirurgia não causará nenhum desconforto ou risco adicional à cirurgia, conforme explicado pelo seu médico.

A participação neste estudo não o beneficiará diretamente no momento, mas poderá contribuir para o entendimento de sua doença e para descobrir novos tratamentos.

Não haverá benefício financeiro com a sua participação neste estudo.

Sigilo

Toda a informação pessoal será mantida em sigilo. O sigilo será garantido pelo uso de números, impedindo a identificação ou acesso aos seus dados pessoais.

Participação

A sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode escolher não participar ou suspender a sua participação neste estudo a qualquer momento, sem nenhum prejuízo e sem influenciar os seus cuidados médicos e tratamento.

Perguntas e Contato

Caso em qualquer momento o(a) Sr.(a) tenha qualquer dúvida ou necessite de esclarecimentos sobre este estudo, por favor ligue para a Dra. Patricia Pintor dos Reis, Depto. de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, telefone (14) 3880-1451 (horário comercial) ou (14) 99618-2826 (24 horas por dia/7 dias por semana). Você também poderá entrar em contato como o Comitê de Ética em Pesquisa, pelos telefones: (14) 3880-1608 ou 3880-1609.

Consentimento

Declaro que tive a oportunidade de discutir esse estudo e minhas dúvidas e perguntas foram respondidas e esclarecidas satisfatoriamente. Concordo em participar desse estudo com o entendimento que eu posso suspender a minha participação a qualquer momento sem afetar o meu tratamento ou acompanhamento médico. Eu recebi uma cópia deste consentimento informado. Declaro que minha participação neste estudo é voluntária e informada.

Nome do Paciente (por extenso) Assinatura do Paciente Data (Dia/Mês/Ano)

Confirmo que expliquei o estudo ao participante declarado acima e que respondi e esclareci todas as perguntas e dúvidas completamente e com acurácia.

Nome da pessoa Assinatura Data (Dia/Mês/Ano)

obtendo o consentimento

ANEXO 3 – Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB.

miRNA	Genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados
Expressão diminuída	
miR-150-5p	<i>FUBP3</i>
miR-140-3p	<i>ALDH1A3</i>
miR-195-5p	<i>HIPK2, QKI, TET3, TNRC6B</i>
miR-25-3p	<i>HAS3, NFIB</i>
miR-486-5p	<i>AFF3, ANKDD1A, ARID4B, BAHCC1, C8orf59, CCDC85C, CD59, COL6A6, COPS7B, DHFR, HEG1, LRRC1, MTERFD1, SLC5A3, SRSF3, ST6GALNAC6, SYT7, TANGO6, TOB1, TWF1, XG, ZFR2, ZNF37A, ZNF594</i>
miR-486-3p	<i>APTX, ASH1L, BSN, CAPN6, CELSR2, CHD3, CYTH2, FNDC4, FOSL2, IQSEC2, NFIB, NSL1, POLR2D, POU2F2, TCF7, TMSB4X, TPM3</i>
miR-92a-3p	<i>DKK3, HAS3, SERTAD3</i>
miR-16-5p	<i>ACVR2A</i>
miR-20b-5p	<i>AAK1, BNIP2, METAP1, SLC40A1, VPS26A, ZNFX1</i>
miR-425-5p	<i>BCOR, BEX4, DPYD, ZBTB21</i>
let-7c-5p	<i>CCNJ, ELF4, HAND1, HMGA2, MAP3K1, MLLT4, PALD1, PCGF3, UTRN, YOD1, ZNF516, ZSWIM5</i>
let-7b-5p	<i>ARID3B, ATP2B3, CCNJ, CPEB2, E2F6, ELF4, FRAS1, GPR137, HAND1, HMGA2, IGDCC3, IGF2BP2, ITGB8, LOC283219, LSM11, MAP3K1, NTN1, PALD1, PCGF3, PLEKHH1, RNF20, SOCS1, TET3, TMEM2, TSC1, UTRN, YOD1, ZNF280B, ZNF516, ZSWIM5</i>
miR-363-3p	<i>HAS3, ODZ3</i>
miR-660-5p	<i>HAS3</i>
miR-485-3p	<i>FXR2</i>

ANEXO 3 – Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB (continuação)

miR-194-5p	<i>AASS, ABCB10, ACBD3, ACVR2B, AGK, ANO1, ARL14EP, ATP6VIH, BRMS1L, BTBD7, C18orf32, C21orf91, C7orf60, CAMSAP2, CASK, CD2AP, CD44, CDK13, CDK19, CERKL, CFL2, CHD1, CHD6, CHORDC1, CNR1, CNTNAP2, CPED1, CTDSPL2, CXCL3, DACH1, DCUN1D4, DENND1B, DISC1, DOCK8, EDN1, ELMSAN1, EMCN, EPC2, FAM76A, FBXW2, FLI1, FMO2, FMR1, FOXA1, FZD3, FZD6, GDAP2, GORAB, GOT2, GYG1, GYPA, HBEGF, HECTD2, HNF1B, HOOK3, ITPKB, KHDRBS2, KIAA1210, KLHL11, LIMD1, LRCH2, LRRFIP1, LSAMP, LUC7L3, MAP2, MCCC2, MSTN, NADK2, NFAT5, NVL, PAIP2, PCDH15, PDK3, PM20D2, PPFIBP1, PPT1, PRLR, PTPN2, QKI, RAB11FIP2, RASAL2, RICTOR, RNASE6, RSNIL, RUFY2, SALL1, SCRNI, SEPHS1, SEPT6, SETD5, SFRP2, SLC15A4, SLC25A27, SLC28A1, SLK, SLTM, SMARCA5, SNAP91, STAU2, TCAIM, TEX30, THAP10, TMBIM4, TMED5, TMEM106B, TMEM136, TMEM194A, TMEM65, TMEM87A, TRDMT1, TTC7B, TUSC3, UBLCP1, UBR3, VPS13C, WDFY1, XPNPEP3, XPR1, ZBBX, ZKSCAN2, ZNF527, ZNF607, ZNF615, ZNF71</i>
miR-328-3p	<i>C5orf24, LIMK1, RUNX1T1, TESK2</i>
miR-422a	<i>ANKRD52, VANGL2</i>
miR-483-5p	<i>NFIX, RBM14</i>
miR-362-5p	<i>CDK20, CRIPT, MANSC4, TRIM50</i>
miR-532-5p	<i>NDP</i>
miR-135b-5p	<i>CPLX1, KCNMA1</i>
miR-500a-5p	<i>BNC2, INSR, MIER1</i>
miR-10a-5p	<i>BCL9, BDNF, EBF2, ELOVL2, GATA6, GNG5, HIATL1, SON, TFAP2C, TMEM132B</i>
miR-183-5p	<i>FOXN2</i>

ANEXO 3 – Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB (continuação)

miR-197-3p	<i>CBL, DNAH5, DNAJB3, IFNA17, IFNA4, IL1RAP, IL22RA1, LYSMD3, METTL9, NAP1L4, NLK, SDR42E1, SEPT11, SYNGAP1, TMEM186, TSEN2, TTPAL, TXLNG, ZNF181, ZNF20, ZNF345, ZNF720, ZNF75D</i>
Expressão aumentada	
miR-98-5p	<i>HMGA2, IGDC3, IGF2BP1, PRTG</i>
miR-142-3p	<i>ANKRD11, AP1S2, ATF7IP, CDC25C, CEP192, CLTA, EARS2, FMNL2, FOXR2, GABRA6, GALNT11, HEATR5A, HSD17B4, LARP1B, LRRC3B, MEI1, RAB2A, RERE, SGMS1, SLC12A9, SPDYE8P, STAM, TTTY4B, YBX3, ZFYVE16, ZNF90</i>
miR-193b-3p	<i>MBTD1, SESN2, SLC39A5</i>
miR-494-3p	<i>NELLI</i>
miR-130a-3p	<i>CNOT6, CPEB2, LCOR, QKI, TNRC6B</i>
miR-142-5p	<i>ADAMTS1, ADCY3, AKT1, ANGPTL5, AQP3, ATP1B1, ATXN7L2, BAI3, BMP2, BOD1L1, BOLL, BRD1, BRIX1, C11orf87, C8orf34, CARF, CD38, CDH11, CECR2, CEP290, CHIC2, CHPT1, CHSY3, CIT, CLINT1, CNEP1R1, CUL2, CUL4A, DIAPH2, DNAJC25, DNAJC7, DNAJC7, DYNLT1, EGFL6, EMC4, FAM24A, FIGN, FOXP2, GBP5, GEMIN2, GUCY1B3, HELQ, HERPUD1, HMGXB4, HNRNPH3, HOXD8, HSD11B1, HSPB11, IGF2BP3, IL22, INSL6, IPO5, ITGAV, KAT6B, LDB2, LEPROT, LHX8, LMX1A, LRP12, LRP1B, MAPK6, MBD2, MED14, MEGF10, MEGF9, MEIS1, MORN2, MRPS36, MSH6, NDUFA2, NLN, NRG1, OGFRL1, OTX2, PGM2, PIBF1, PLEKHA3</i>
miR-148a-3p	<i>ABCB7, ABHD12, ATP4B, B4GALT6, BAI3, BCCIP, BTBD3, C12orf4, CCT6A, CDK5R1, CELSR1, CNTNAP3B, CTSL, DLEU7, EOGT, ERFF11, HBS1L, HOPX, HPS5, IL15, KCTD16, KRT76, LEPROTL1, MED12L, MMP10, MMP15, MRGPRX3, NPEPL1, OSBPL11, PSMC2, RPL36A, SCN9A, TGFA, USP32, VPS37A, VSIG1, WDFY4, XPO4</i>
miR-29a-3p	<i>TET2, TET3</i>
miR-26a-5p	<i>BRWD1, CHORDC1, FAM98A, SLC7A11, TET2, TNRC6B</i>

ANEXO 3 – Tabela Suplementar. Lista dos genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs com expressão significativamente desregulada no plasma de pacientes com carcinomas HPB (continuação)

miR-199a-3p	<i>PTPRF</i>
miR-874-3p	<i>ARHGAP6, CDCA7L, PLEKHH3, SPTB, SYPL2, ZCCHC14, ZNRF1</i>
miR-214-3p	<i>BAZ2A, CSF1, FAM134A, GALNT18, HR, KPNA3, LDOC1L, OPRK1, QKI, SCARF1, SEC24C, SRGAP3, TFAP2C, UNC5A</i>
miR-27b-3p	<i>NFIB, ONECUT2, QKI, ZNF704</i>
miR-212-3p	<i>EPN2</i>
miR-130b-3p	<i>CIT, MTMR4</i>
miR-152-3p	<i>ABCB7, ABHD12, ATP4B, B4GALT6, BCCIP, BTBD3, C12orf4, CCT6A, CDK5R1, CELSR1, CNTNAP3B, CTSL, DLEU7, ERRF1, HBS1L, HOPX, HPS5, IL15, KCTD16, KRT76, LEPROTL1, MED12L, MMP10, MMP15, MRGPRX3, NOL4L, NPEPL1, OSBPL1, PSMC2, RPL36A, SCN9A, USP32, VPS37A, VSIG1, WDFY4, XPO4</i>
