



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

Tainara Francini Felix

MicroRNoma do carcinoma de pâncreas

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

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

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

**Botucatu
2016**

Tainara Francini Felix

MicroRNoma do carcinoma de pâncreas

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

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

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

Botucatu

2016

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

Felix, Tainara.

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

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

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Coorientador: Sandra Drigo Linde

Capes: 20200005

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

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

Dedico este trabalho...

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

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

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

Obrigado por existirem... AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

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

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

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Carcinoma de pâncreas*

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

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

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

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

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

1.2. *Adenocarcinoma ductal pancreático*

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

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

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

1.3. *Adenocarcinoma da ampola de Vater*

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

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

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

1.4. Alterações genéticas em carcinomas de pâncreas

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

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

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

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

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

1.5. *MicroRNAs*

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

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

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

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

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

1.6. miRNAs e o câncer

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

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

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

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

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

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

1.7. MicroRNAs em carcinomas de pâncreas

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

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

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

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

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nas estratégias cirúrgicas para tratamento do carcinoma pancreático, o prognóstico dos pacientes ainda é muito pobre. Estratégias de tratamento vigentes têm falhado em atenuar a agressividade da doença ou melhorar a sobrevida dos pacientes. Estudos prévios relataram uma variedade de genes alterados, revelando heterogeneidade genética entre tumores de diferentes pacientes. Portanto, o insucesso da quimioterapia convencional pode ser atribuído à agressividade dos PDACs, a qual pode estar associada à heterogeneidade da biologia tumoral. A identificação de alterações moleculares específicas no câncer de pâncreas é necessária para o desenvolvimento subsequente de estratégias direcionadas e eficazes de tratamento [12].

Justifica-se, portanto, a necessidade de identificação de vias moleculares como alvos terapêuticos potenciais nos PDACs, e vias moleculares alteradas e associadas ao desenvolvimento de outros carcinomas presentes na região próxima ao pâncreas, por exemplo, os AMP. Interessantemente, tais carcinomas, embora apresentem sintomatologia clínica similar, têm comportamento clínico distinto após a ressecção cirúrgica.

As estratégias de identificação de alterações na expressão de miRNAs podem contribuir para elucidar mecanismos moleculares modulados por miRNAs em PDAC e AMP. Os resultados podem ter futura aplicação clínica utilizando miRNAs e os genes-alvo regulados por miRNAs como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutico para pacientes com PDAC.

3. OBJETIVOS

1. Identificar o perfil global de expressão de miRNAs em carcinomas de pâncreas;
2. Correlacionar os dados de expressão de miRNAs com os dados clínicos e histopatológicos;
3. Utilizar ferramentas de análise bioinformática para identificar:
 - a) mRNAs-alvo regulados por miRNAs,
 - b) redes de regulação miRNA-mRNA alvo,
 - c) redes de interação protéica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Considerações sobre os aspectos éticos*

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) (4382-2012), Anexo 1. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi dispensado, uma vez que foram utilizadas amostras de arquivo, coletadas retrospectivamente (blocos de parafina), e a grande maioria dos casos era proveniente de pacientes que já foram a óbito devido ao caráter agressivo da doença.

4.2. *Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes*

Este estudo incluiu um grupo amostral de conveniência, onde foram utilizadas amostras de tumor de pacientes que foram atendidos no Hospital das Clínicas de Botucatu (HCB) da FMB, UNESP.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram: diagnóstico de carcinoma pancreático, subtipo histológico adenocarcinoma ou adenocarcinoma de papila de Vater, de qualquer estadiamento e grau histológico, amostras provenientes de pacientes submetidos à cirurgia ou biópsia, pacientes não tratados com quimio e/ou radioterapia anteriormente à cirurgia.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com outros tumores não classificados histologicamente como adenocarcinoma pancreático ou adenocarcinoma de papila de Vater, pacientes que foram tratados com quimio e/ou radioterapia anteriormente à cirurgia.

4.3. *Identificação das amostras*

Foram realizadas buscas no banco de dados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para a identificação dos casos de PDAC e AMP que atendessem aos critérios propostos neste estudo. Após a identificação dos casos, as lâminas histológicas de cada caso foram requisitadas e analisadas pela patologista responsável pelo serviço de Gastroenterologia (MAMRK). Nessa etapa inicial foi analisada uma média de 20 lâminas histológicas para cada caso (n=63), totalizando uma média de 1.260 lâminas. Essa análise histológica rigorosa foi importante para identificar os blocos de melhor qualidade para a análise molecular subsequente. Este procedimento garantiu uma melhor homogeneidade das amostras, evitando pequenos fragmentos e amostras com grande heterogeneidade celular. Além disso, as lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) foram marcadas

a fim de identificar as áreas de tecido tumoral e normal em cada corte histológico. Essas áreas foram utilizadas como guia na etapa de microdissecção dos cortes de parafina contendo áreas dos tecidos de interesse. A Figura 1 é um exemplo representativo das amostras de AMP e PDAC selecionados para o estudo de expressão de miRNAs.

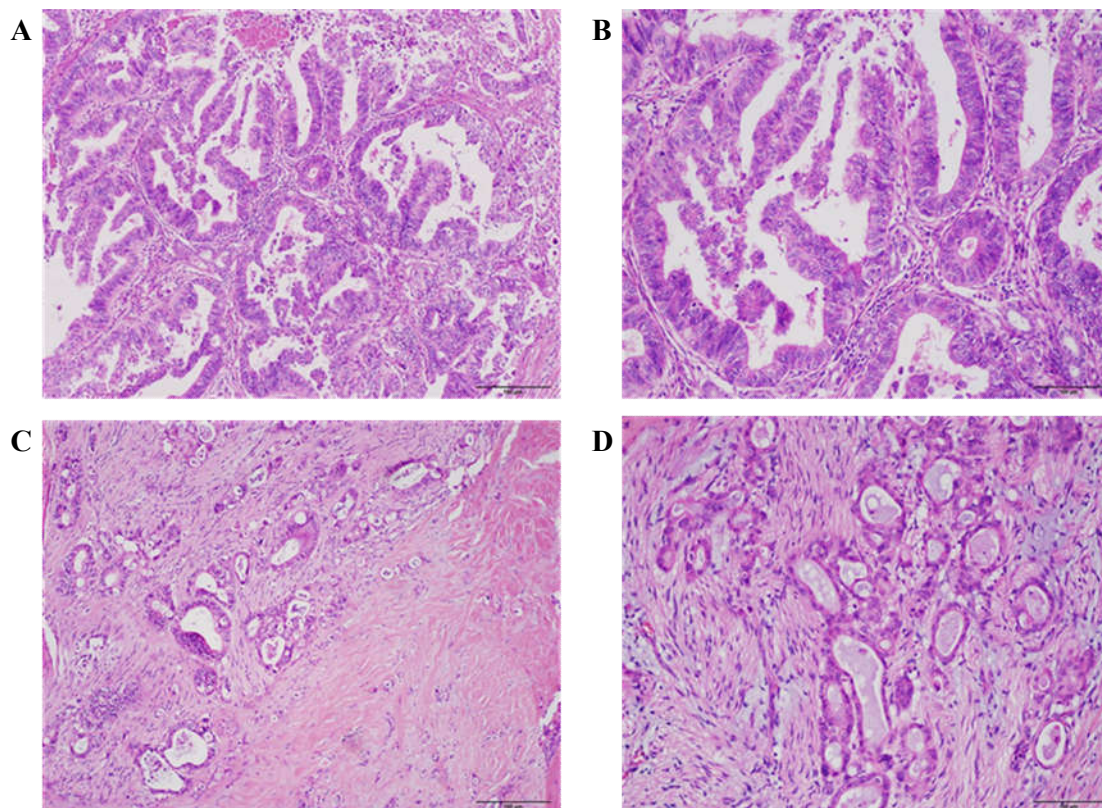


Figura 1. Cortes histológicos representativos em A e B: AMP, em C e D: PDAC, corado com H&E. Em A e C: Visão dos cortes em aumento de 100X; em B e D: Detalhe das células neoplásicas dispostas em papilas das atipias celulares e em grandes ductos, respectivamente, em aumento de 200X.

4.4. Delineamento e seleção das amostras

O delineamento e a seleção das amostras utilizadas estão apresentados na Figura 2.

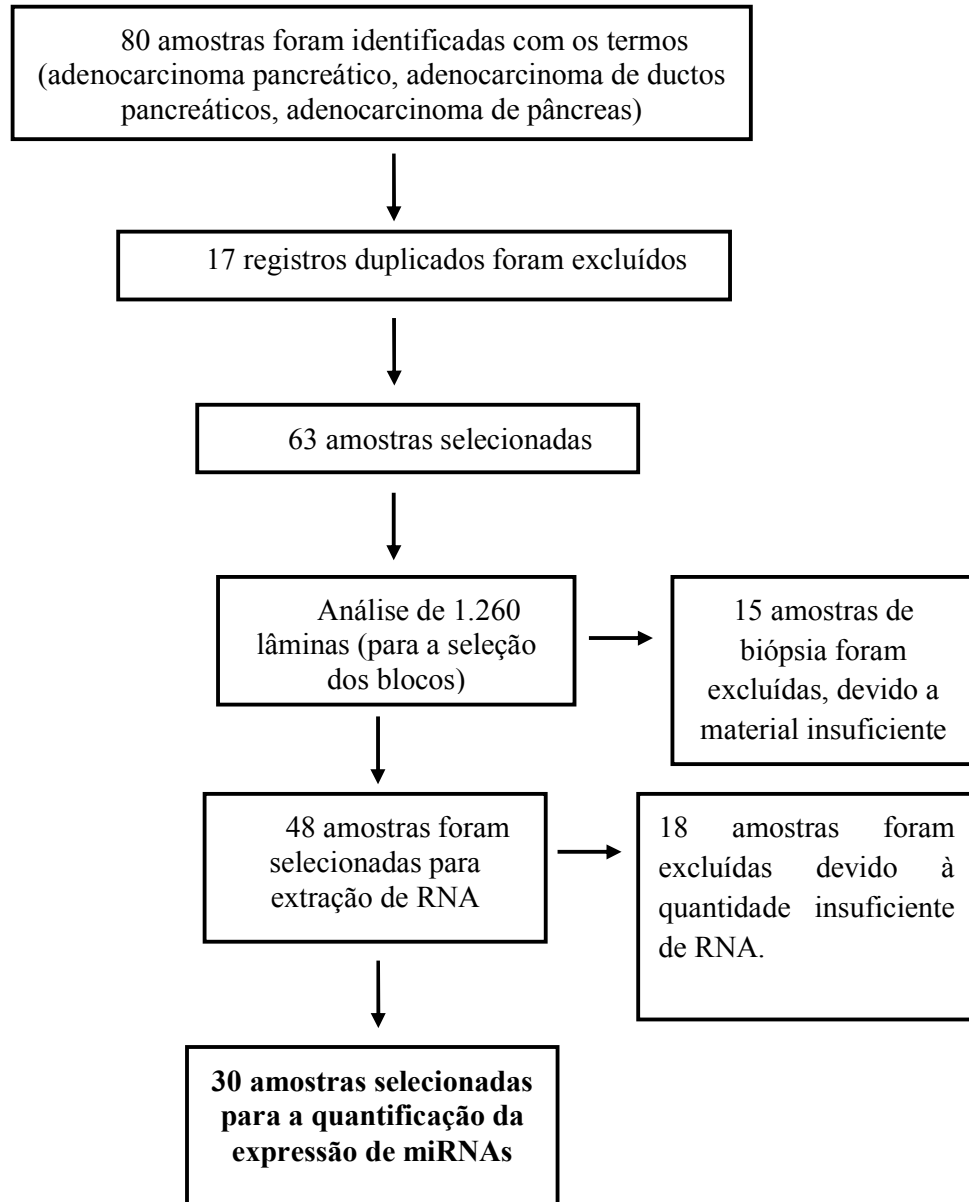


Figura 2. Delineamento e seleção das amostras.

4.5. Coleta de dados epidemiológicos, fatores de risco e anatomopatológicos

O levantamento dos dados foi realizado por meio da análise dos prontuários médicos de cada paciente e laudo da patologia. Os dados obtidos foram a data de diagnóstico, idade do paciente ao diagnóstico, sexo, grau histológico do tumor, grau de diferenciação tumoral, estadiamento da doença, presença de metástase regional e/ou à distância.

4.6. Análise molecular

4.6.1. Microdissecção com agulha

Após a identificação dos blocos, cada bloco foi cortado, sendo confeccionadas 5 lâminas de 10µm cada. Para a microdissecção dos tecidos, as lâminas foram incubadas em Xilol 100% (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) por 10 min e em seguida transferidas para cubas para desidratação e re-hidratação em uma série de etanol, 100% - 5 min, 95% - 5 min, 80% - 5 min, 70% - 5 min. Os tecidos foram posteriormente corados em uma solução de hematoxilina diluída 5:1 por 15 s, para identificação das áreas a serem microdissecadas. As lâminas foram armazenadas em água MilliQ ddH₂O até o momento da raspagem com agulha hipodérmica estéril 1,60x40mm (Becton Dickinson, Curitiba, Paraná, BR). As áreas correspondentes ao tumor e ao tecido histologicamente normal foram removidas, separadamente, utilizando o estereomicroscópio Leica EZ4 (Leica Microsystems, China) para a visualização e raspagem dos tecidos. Os tecidos foram colocados em tubos eppendorf de 1,5 mL, livres de RNase e estéreis e acrescidos de tampão de digestão do kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA), para o início da extração do RNA total, conforme descrito abaixo.

4.6.2. Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA), segundo o protocolo do fabricante. A partir das amostras microdissecadas e acrescidas de 200 µL de tampão de digestão, foram adicionados 4µL de enzima protease a cada amostra, e incubadas por 2 h a 50°C, permitindo a lise do tecido e liberação do RNA, seguido de 15 min de incubação a 80°C para a inativação da protease. Após esta primeira incubação, foram adicionados 550µL de etanol absoluto e 240µL do reagente *isolation additive* (fornecido pelo kit) totalizando um volume de 790µL por amostra; essa etapa tem o objetivo de ajudar na separação dos ácidos nucléicos do restante dos componentes celulares. As próximas etapas consistiram na

purificação do RNA através de colunas com filtros de sílica, onde o RNA total adere à sílica e os contaminantes são descartados no material filtrado. A purificação foi realizada em duas etapas, na primeira etapa adicionou-se 700µL da solução de lavagem *Wash1* (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm e temperatura ambiente (TA) por 30 s. Desprezou-se o filtrado e na mesma coluna de purificação adicionou-se 500µL da solução de lavagem *Wash2/3* (também incluída no kit). As amostras foram então novamente submetidas à centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA. Para evitar a contaminação do RNA com DNA, foi realizado tratamento com DNase. Mix contendo 4µL da enzima DNase, 6µL do tampão 10X DNA buffer e 50µL de água livre de nuclease (*nuclease-free*) foi preparado. Todos estes reagentes fazem parte do kit de extração. Foram então adicionados a cada amostra, 60µL deste mix no centro da coluna, seguida de incubação por 30 min em TA. Após este tratamento foi realizada a segunda etapa de lavagem, onde inicialmente adicionou-se 700µL da solução *Wash1* seguida por centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA. Desprezou-se o filtrado e em seguida na mesma coluna de purificação, adicionou-se 500µL da solução *Wash2/3*. As amostras foram então novamente centrifugadas por 30 s a 10.000 rpm em TA. Com o intuito de eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, nova centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA foi realizada. O filtro foi então transferido para um novo tubo coletor fornecido pelo kit para a eluição do RNA que foi realizada em duas etapas. Primeiro foram adicionados 10µL de água RNase-free no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguido de centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. Na segunda etapa foram adicionados 5µL de água estéril e livre de RNase (Sigma) no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguida por centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. O RNA total obtido foi então armazenado a -80°C.

4.6.3. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA

A análise de quantificação e avaliação da qualidade/pureza das amostras de RNA total foi realizada no equipamento NanoDrop 8000 (ThermoScientific, EUA), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra, verificando também a presença de contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos.

4.6.4. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs

A transcrição reversa dos miRNAs foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse

sistema permite a transcrição reversa apenas dos miRNAs maduros incluídos no cartão *Taqman Low Array Density Card A* (Life Technologies, EUA). Na reação foram adicionados ao RNA total (600ng) 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 min., 42°C por 1 min. e 50°C por 1 s; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. O produto da transcrição reversa foi armazenado no -20°C até o momento da utilização.

4.6.5. Análise da expressão de microRNAs

A análise de expressão global de miRNAs foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies), um cartão de microfluidos contendo 384 miRNAs e otimizado para o uso com amostras de arquivo (FFPE). A plataforma inclui três controles (miRNAs endógenos) para normalização dos dados, e um ensaio não humano como controle negativo.

Para o preparo da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados: 450 μL de master mix Taqman® Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies); 6 μL de cDNA (produzido em etapa anterior) e 444 μL de água livre de nuclease (Sigma ddH₂O). Foram adicionados 100 μL desse mix em cada poço da placa; seguido por centrifugação da placa a 1.200 rpm por 1 min, duas vezes. A RT-qPCR foi realizada no equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNAs foram analisados no programa Expression Suite (Life Technologies); que é componente do equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNAs foram normalizados utilizando controles endógenos, os quais constituem controles internos que não devem variar significativamente em níveis de expressão nas amostras teste (carcinoma) e controle normal. Os controles endógenos mais utilizados em análises de expressão de miRNAs e presentes no cartão TLDA são o RNU-44, RNU-48 e U6 (RNA nucleolar pequeno). A análise dos controles endógenos indica a qualidade das reações de amplificação. Assim, esta análise é fundamental e um dos primeiros passos a serem realizados em estudos de expressão de miRNAs.

4.7. Análise dos dados

4.7.1. Processamento dos dados de expressão

Os dados de expressão foram extraídos do equipamento QuantStudio™ 12K Flex, utilizando o programa *ExpressionSuite Software v1.0.3 for Microsoft® Windows®*, uma ferramenta de análise de dados que utiliza o método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) [73], esta plataforma permite quantificar a expressão gênica relativa através de um grande número de genes e amostras.

4.7.2. Análise estatística

Foram utilizados diferentes metodologias de análise estatística para estudar a possível correlação entre a expressão dos miRNAs alterados com os dados demográficos e anatomopatológicos dos pacientes com adenocarcinoma de ductos pancreáticos e carcinoma de papila de Vater. Os dados de expressão dos miRNAs foram testados utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon para duas amostras independentes. Um estudo das curvas de sobrevivência dos pacientes foi realizado para os dados clínicos dos pacientes e aplicou-se o teste do log-rank [74]. A análise de sobrevida livre de doença considerou o intervalo de tempo entre a data de cirurgia e a data do último seguimento ou óbito. Para detectar diferenças estatisticamente significativas, considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise descritiva dos dados foi realizada, para verificar a distribuição dos dados de expressão de miRNAs com diferença estatisticamente significativa entre tumor e normal. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.3 (*Statistical Analyses System*). Essa etapa do trabalho foi realizada com auxílio do Prof. (R.A.O.), Depto. de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP.

4.7.3. Predição de alvos e vias dos miRNAs

Os miRNAs significativamente desregulados ($p < 0,05$) em tumor vs. normal foram utilizados em análise bioinformática de predição dos mRNAs-alvo regulados por estes miRNAs. Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) [75]. Esta ferramenta é útil para a predição global de genes-alvo regulados por miRNAs, pois integra dados de miRNAs disponíveis nos principais bancos de dados públicos; DIANA-microT [76, 77], microRNA.org/miRanda [78, 79], 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 [80-82].

A integração de bancos de dados oferece maior acurácia na predição de genes-alvo regulados por miRNAs. Por exemplo, integrando interações conhecidas e preditas entre proteínas e combinando com vias moleculares descritas em banco de dados públicos, tais como o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [83] e com as anotações gênicas disponíveis no banco de dados GeneCards [84], é possível interpretar as alterações na expressão de miRNAs e seu significado funcional [85, 86].

Adicionalmente, os programas I2D (*Interologous Interaction Database*) (<http://ophid.utoronto.ca/i2d>, v.2.3), um banco de dados de interações protéicas [87] e NAViGaTOR v.2.3.2 [88] foram utilizados para construção de redes de interação protéica entre as proteínas codificadas pelos genes-alvo regulados por miRNAs e visualização das redes de interação moduladas pelos miRNAs, respectivamente.

4.8. Meta-análise em adenocarcinoma ductal pancreático

A meta-análise foi realizada com o objetivo de comparar nossos dados de expressão de miRNAs com dados da literatura de expressão de miRNAs em PDAC. Em nossa meta-análise, identificamos apenas um trabalho contendo dados de expressão de miRNAs em AMP [89], entretanto, esse estudo não atendia aos critérios de inclusão por não apresentar validação dos dados. Portanto, a meta-análise contém apenas dados gerados em PDAC.

A Figura 3, abaixo, mostra o delineamento da meta-análise, realizada de acordo com as recomendações de Moher *et al.* [90].

Dados de estudos publicados (2000-2015) foram pesquisados e obtidos dos bancos de dados públicos PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) e *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Os critérios de inclusão de estudos foram os seguintes: trabalhos em PDAC, amostras de tumor primário, humano, inclusão de amostras de tecido pancreático normal dos mesmos pacientes, mesmo que um subgrupo, amostras provenientes de tecido coletado a fresco e/ou congelado ou fixado em parafina (FFPE), contendo dados de expressão global de miRNAs e que foram validados, acesso aos dados brutos de expressão de miRNAs. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram: *global gene expression, global microRNA expression, microRNA expression, microRNA signature, pancreatic adenocarcinoma, tissue, human*. De acordo com esses critérios, foram incluídos 6

estudos [70-72, 91-95] (Tabela 1). Nossos dados de expressão de miRNAs foram comparados aos dados de miRNAs identificados na meta-análise.

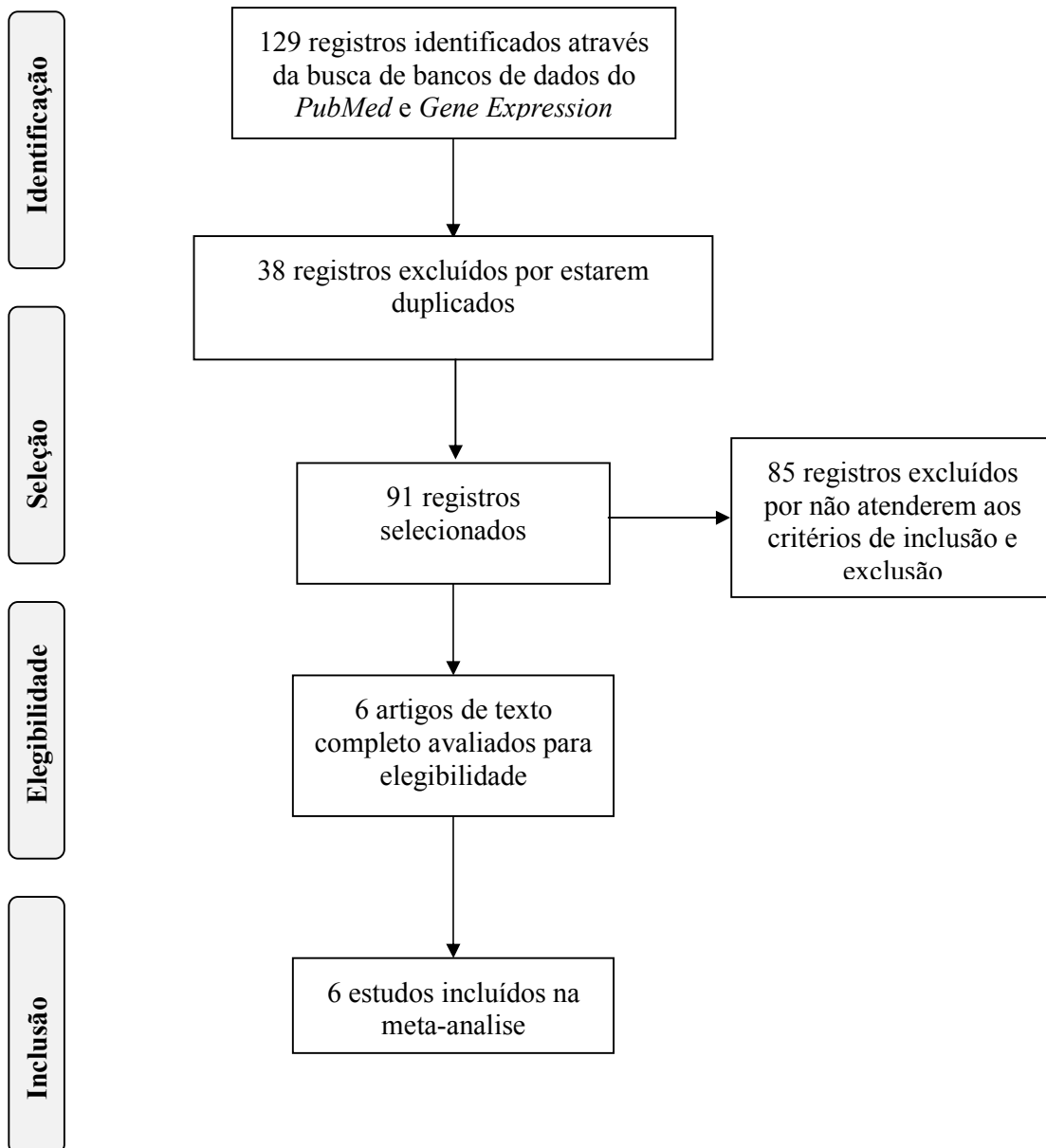


Figura 3. Delineamento da meta-análise [90].

Tabela 1. Descrição dos 6 estudos utilizados na meta-análise.

Autores	Acrônimo	Tamanho amostral	Plataforma de análise
Bloomston M et al. 2007	BM	65 PDAC, 65N	miRNA microarray (customizado)
Lee EJ, et al. 2007	LE	28 PDAC, 15N	miRNA microarray (Agilent)
Szafranska AE, et al. 2007	SA	8 PDAC, 5N	miRNA microarray (customizado)
Zhang Y, et al. 2009	ZY	6 PDAC, 5N	miRCURY LNA array (Exiqon)
Jamieson NB, et al. 2012	JN	48 PDAC, 10N	miRNA Microarray v.2.0 (Agilent)
Piepoli A, et al. 2012	PA	17 PDAC, 17N	GeneChip miRNA array (Affymetrix)

PDAC - adenocarcinoma ductal pancreático
N- tecido pancreático histologicamente normal.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos e anatomopatológicos

Os casos foram divididos de acordo com o resultado anatomopatológico em dois grupos: PDAC (n=24 casos) e AMP (n= 6 casos). A distribuição dos casos de PDAC de acordo com o gênero mostrou que a 50% dos pacientes eram do sexo feminino e 50% do sexo masculino. A média das idades foi de 59 anos. Dentre os casos de AMP, houve uma predominância de pacientes do sexo masculino (83,3% dos casos). A média das idades foi de 60 anos. Quanto ao estadiamento da doença, a maioria dos casos (18/30; 75%) de PDAC eram de estadio IIB, onde há a presença de metástase em linfonodos regionais. Dentre os pacientes com AMP, 2 apresentavam doença classificada com estadio IA, 2 com doença em estadio IIA e 2 com estadio IIB. Os dados demográficos e histopatológicos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de papila de Vater.

Variáveis	Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) N=24	N (%)	Adenocarcinoma de papila de Vater (AMP) N=6	N (%)
Idade (anos)				
Mediana	59		65	
Media	59 (38 a 77)		60 (31 a 73)	
Sexo				
Masculino	12	50	5	83,3
Feminino	12	50	1	16,7
Grau tumor				
BD	20	83,4	4	66,6
MD	2	8,3	1	16,7
PD	2	8,3	1	16,7
Categoria T				
T1-T2	9	37,5	2	33,3
T3-T4	15	62,5	4	66,7
Metástase em linfonodos				
Positivo (N1)	15	62,5	2	33,3
Negativo (N0)	4	16,6	4	66,7
Indeterminado (Nx)	5	20,9	0	0
Metástase à distância				
Positivo (M1)	1	4,2	0	0
Negativo (M0)	1	4,2	0	0
Indeterminado (Mx)	22	91,6	6	100
Estadiamento da doença				
Ia	1	4,2	2	33,3
Ib	0	0	0	0
IIa	2	8,3	2	33,3
IIb	18	75	2	33,3
III	1	4,2	0	0
IV	2	8,3	0	0

BD: bem diferenciado

MD: moderadamente diferenciado

PD: pobremente diferenciado

5.2. Perfil de expressão de microRNAs em adenocarcinoma de ductos pancreáticos

As análises foram realizadas para identificar os diferentes níveis de expressão dos miRNAs nas amostras tumorais em relação aos tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor. Essa análise identificou 63 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) (Figura 4), sendo que 33 miRNAs estavam com expressão aumentada e 30 miRNAs estavam com expressão diminuída nos tumores comparado com os tecidos normais (Tabela 3). Os valores de FC (*fold change*) indicam ou número de vezes no qual o miRNA está com expressão aumentada ou diminuída.

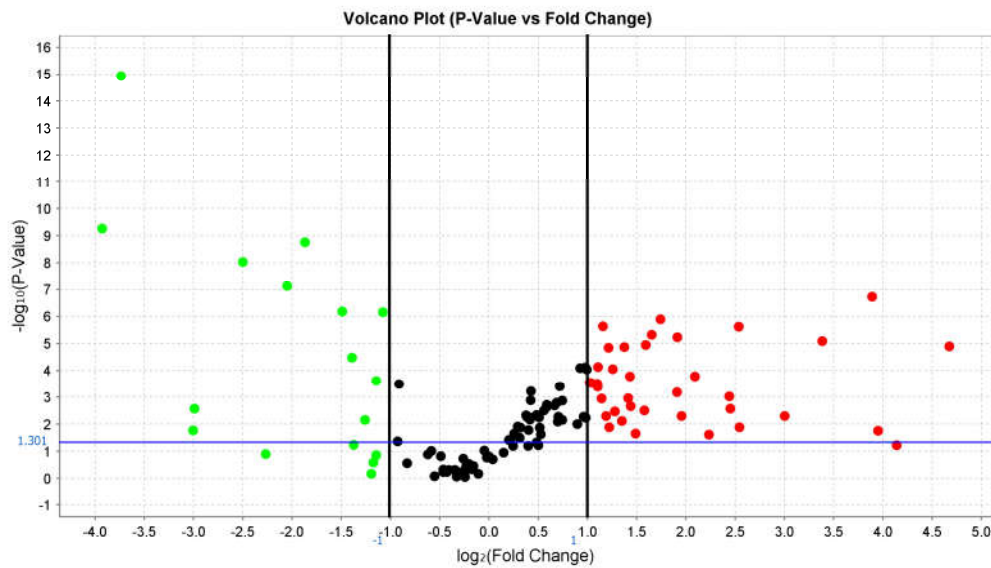


Figura 4. Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) em PDAC comparado com tecido pancreático histologicamente normal. FC=*fold change*.

Tabela 3. miRNAs com expressão alterada em adenocarcinomas de ductos pancreáticos.

miRNA	Expressão diminuída	<i>P-Value</i>	miRNA	Expressão aumentada	<i>P-Value</i>
	<i>FC</i>			<i>FC</i>	
miR-10b	0,001	0,000	miR-127-5p	5,179	0,000
miR-139-3p	0,000	0,000	miR-744	5,164	0,000
miR-296	0,001	0,000	miR-222	4,522	0,000
miR-872	0,001	0,000	miR-210	8,365	0,000
miR-367	0,000	0,000	miR-99a	6,212	0,000
miR-570	0,000	0,000	miR-152	3,122	0,000
miR-551b	0,000	0,000	let-7d	3,665	0,000
miR-520f	0,001	0,000	miR-886-5p	3,317	0,000
miR-299-5p	0,001	0,000	miR-34a	2,801	0,000
miR-548a	0,005	0,000	miR-199a-3p	2,191	0,001
miR-129	0,005	0,000	miR-223	2,740	0,001
miR-130a	0,056	0,000	miR-27a	2,488	0,001
miR-148a	0,089	0,000	miR-21	3,861	0,001
miR-375	0,084	0,000	miR-208	115,677	0,002
miR-511	0,113	0,000	miR-125b	2,117	0,002
miR-204	0,408	0,000	miR-127	2,488	0,003
miR-376a	0,266	0,000	miR-451	7,178	0,004
miR-141	0,249	0,000	miR-31	5,479	0,004
let-7b	0,268	0,000	let-7c	2,123	0,007
miR-455-3p	0,000	0,001	miR-532	2,506	0,009
miR-137	0,001	0,001	miR-186	2,645	0,010
miR-337-5p	0,401	0,001	miR-490	9,554	0,011
miR-483-5p	0,419	0,001	miR-636	4,776	0,013
miR-30b	0,433	0,001	miR-135b	3,118	0,016
miR-624	0,002	0,002	miR-365	8,055	0,017
miR-216b	0,126	0,003	miR-532-3p	3,666	0,021
miR-215	0,323	0,004	miR-15a	55,964	0,024
miR-615	0,000	0,008	miR-145	2,327	0,029
miR-20b	0,369	0,029	miR-190	392,215	0,030
miR-301	0,062	0,031	miR-125a-5p	3,790	0,032
			miR-422a	14,886	0,033
			miR-887	116,270	0,044
			miR-212	12,988	0,044

FC: *fold change*. Na análise dos dados, apenas os miRNAs com $FC \geq 2$ foram incluídos.

5.3. Perfil de expressão de microRNAs em carcinoma de papila de Vater

Essa análise identificou 7 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) nos AMP (Figura 5), em comparação com os tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor, dos mesmos pacientes (Tabela 2). Três miRNAs (miR-148a, miR-375 e let7-e) mostraram expressão diminuída e quatro miRNAs (miR-150, miR-324-3p, miR-222 e miR-331) expressão aumentada nos tumores. Interessantemente, diminuição da expressão dos miRNAs miR-375 e miR-148a e aumento da expressão do miR-222 foram detectados tanto nos PDACs quanto nos AMPs (ambos com $FC \geq 2$ e $p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 6.

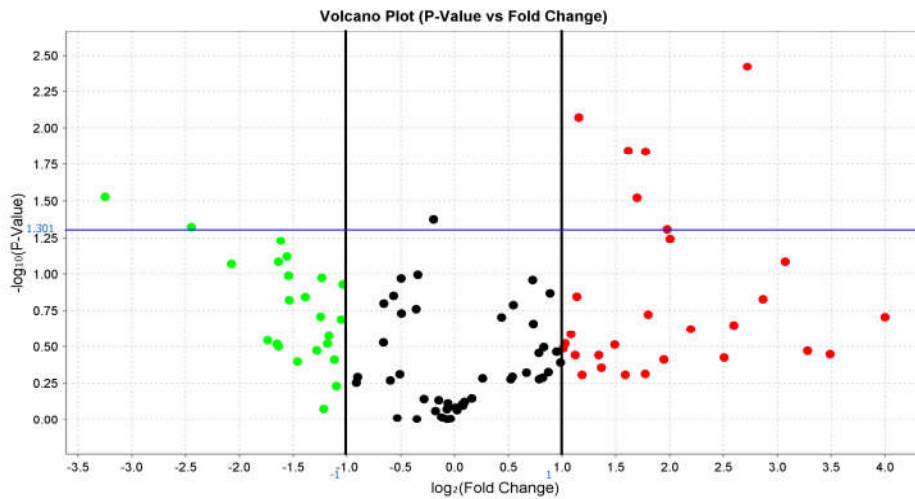


Figura 5. Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) em carcinomas AMP comparado com tecido histologicamente normal.

Tabela 4. miRNAs com expressão alterada em carcinomas de papila de Vater.

miRNA	Expressão diminuída		miRNA	Expressão aumentada	
	FC	P-value		FC	P-value
miR-148a	0,096	0,023	miR-331	3,672	0,013
miR-375	0,168	0,035	miR-150	3,135	0,035
let-7e	0,299	0,037	miR-324-3p	6,046	0,037
			miR-222	7,723	0,045

FC: *fold change*. Na análise dos dados, apenas os miRNAs com $FC \geq 2$ foram incluídos.

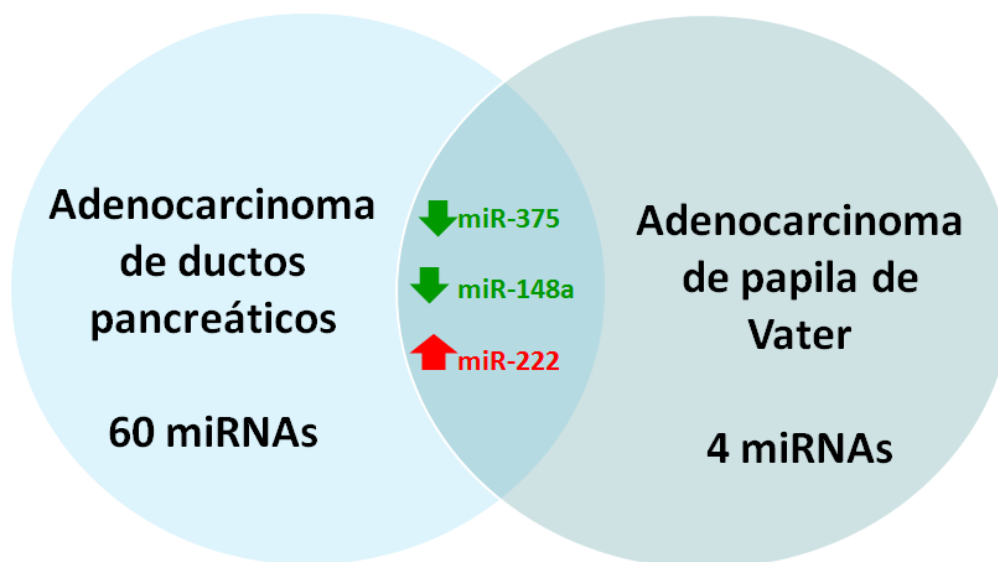


Figura 6. Diagrama de Venn ilustrando o número de miRNAs diferencialmente expressos entre os subtipos tumorais e os miRNAs comumente desregulados em PDAC e carcinomas AMP.

5.4. Correlação da expressão de miRNAs com os dados demográficos e anatomopatológicos

Quando correlacionamos a expressão dos miRNAs com os dados clínicos disponíveis, não foi encontrado nenhum resultado significativo, provavelmente devido ao número limitado de amostras.

5.5. miRNAs desregulados em adenocarcinoma pancreático: meta-análise de dados da literatura

Os resultados da meta-análise identificaram 109 miRNAs desregulados em 172 tumores comparados com 117 tecidos pancreáticos histologicamente normais. 12/109 miRNAs (miR-100, miR-107, miR-143, miR-145, miR-155, miR-21, miR-221, miR-222, miR-223, miR-23a, miR-24 e miR-148a) foram identificados com expressão aumentada ou diminuída em pelo menos 3 estudos diferentes.

Os dados da análise de predição mostraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados, os quais codificam proteínas com funções biológicas importantes na tumorigênese, tais como controle da transcrição, tradução, morte celular, entre

outras. Os genes-alvo preditos, na sua maioria, também estão frequentemente desregulados em câncer, incluindo carcinomas de pâncreas.

5.6. *Correlação dos miRNAs expressos em adenocarcinomas ductais com dados da meta-análise*

Corroborando nossos achados, 4 miRNAs (miR-139-3p, miR-141, miR-148a e miR-375) foram relatados com expressão diminuída e 14 miRNAs (let-7d, miR-125a-5p, miR-125b, miR-127, miR-145, miR-186, miR-190, miR-21, miR-210, miR-212, miR-222, miR-223, miR-27a, miR-31 e miR-34a) com expressão aumentada nos dados da literatura. Outros miRNAs foram relatados como alterados, porém com resultado inverso ao observado no nosso estudo. Por exemplo, os miRNAs miR-10b, miR-130a, miR-301, miR-376a e miR-887 foram identificados com expressão diminuída nos nossos resultados e com expressão aumentada nos dados da meta-análise. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos miRNAs com expressão diferencial concordante entre nossos resultados e os miRNAs identificados na meta-análise.

miRNAs com expressão diminuída	Estudos (acrônimo)	miRNAs com expressão aumentada	Estudos (acrônimo)
miR-139-3p	JN	let-7d	LE PA
miR-141	SA JN	miR-125a-5p	PA
miR-148^a	BM SA JN	miR-125b-1	BM LE
miR-375	BM SA	miR-145	AS JN PA
		miR-186	ZY
		miR-190	ZY
		miR-21	BM LE JN
		miR-210	BM SA
		miR-212	LE
		miR-222	BM SA ZY JN
		miR-223	BM SA JN
		miR-27a	JN
		miR-31	SA PA
		miR-34a	JN

Bloomston M et al. 2007 (BM)
Lee EJ, et al. 2007 (LE)
Szafranska AE, et al. 2007 (SA)
Zhang Y, et al. 2009 (ZY)
Jamieson NB, et al. 2012 (JN)
Piepoli A, et al. 2012 (PA)

5.7. Resultados de predição de genes-alvo regulados por miRNAs

Os dados da análise de predição mostraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados, os quais codificam proteínas com funções biológicas importantes na tumorigênese, tais como controle da transcrição, tradução, morte celular, entre outras, tanto em adenocarcinoma de ductos pancreáticos (Figuras 7 e 8), quanto em carcinoma de papila de Vater (Figura 9).

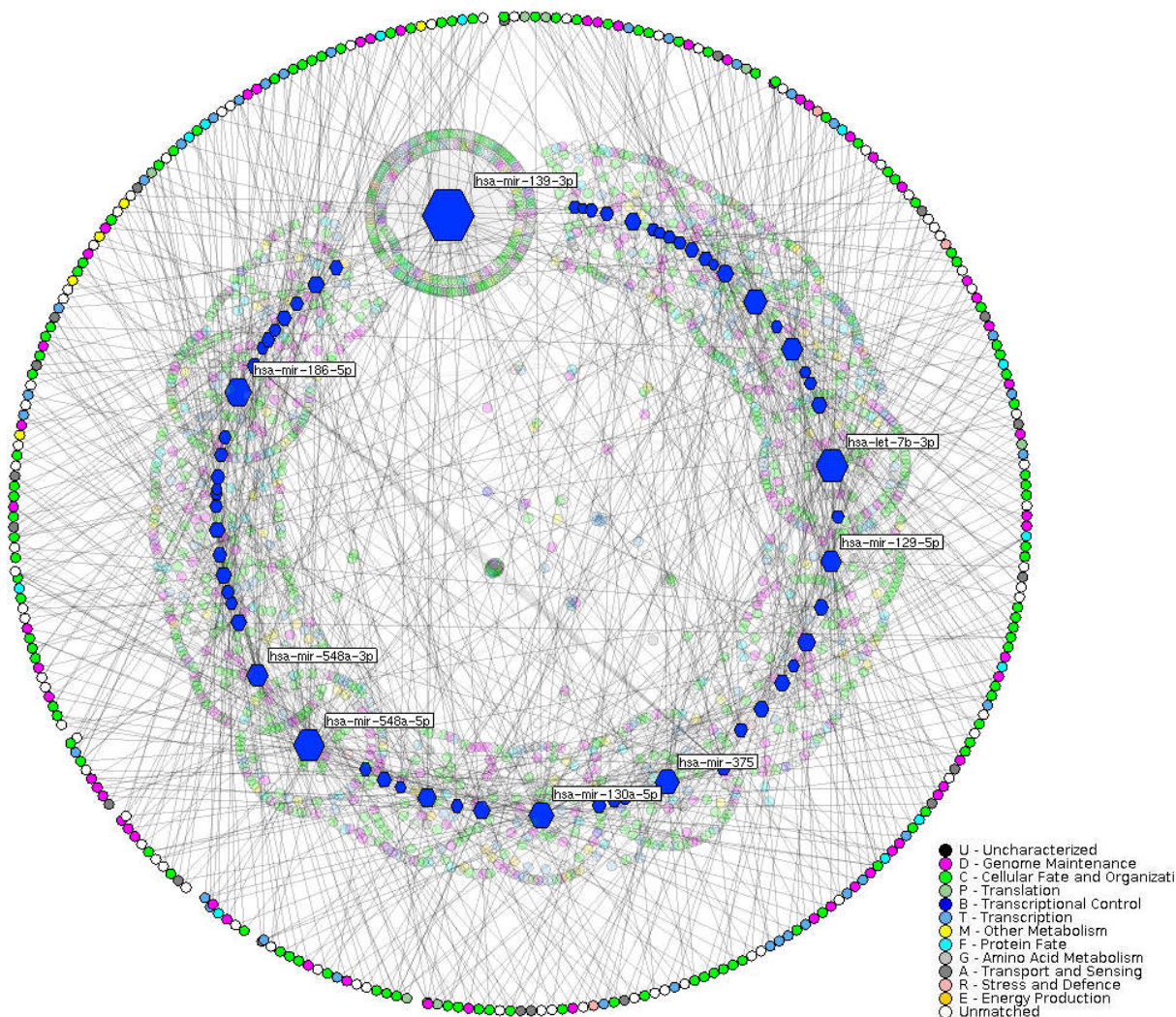


Figura 7. Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em adenocarcinoma de ductos pancreáticos. Rede de interação proteína e os 63 miRNAs desregulados em adenocarcinoma de ductos pancreáticos comparado com o tecido histologicamente normal adjacente. A rede de interação foi construída utilizando o programa I2D - *Interologous Interaction Database* e visualizada no programa NAViGaTOR. As anotações funcionais estão destacadas na figura, pela cor, para cada interação proteína-proteína.

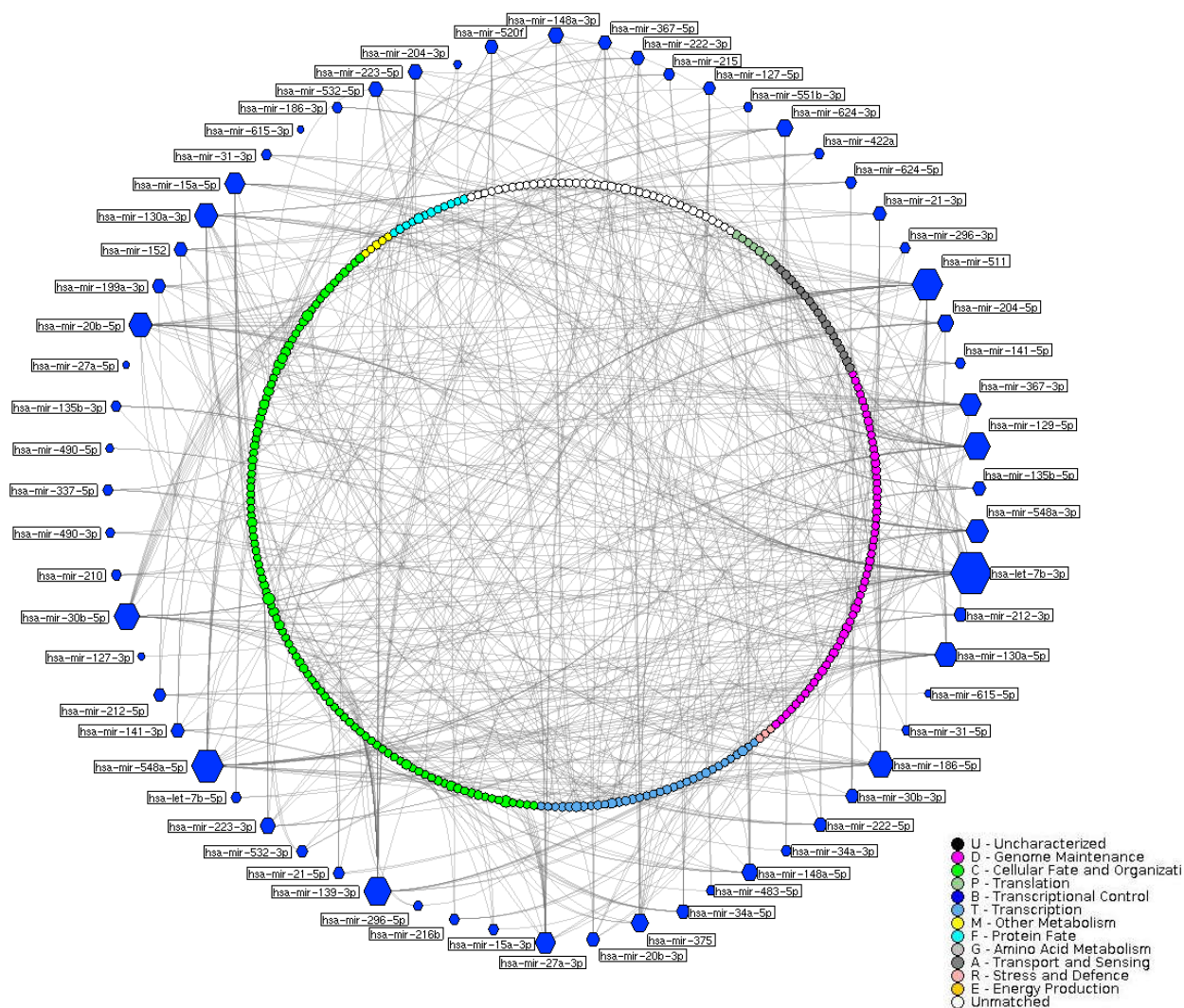


Figura 8. Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em adenocarcinoma de ductos pancreáticos. Rede de interação proteína e os 63 miRNAs desregulados em adenocarcinoma de ductos pancreáticos comparado com o tecido normal adjacente, mostrando todos os alvos que são regulados por mais de um miRNA. A rede de interação foi construída utilizando o programa I2D - Interologous Interaction Database e visualizada no programa NAViGaTOR. As anotações funcionais estão destacadas na figura, pela cor, para cada interação proteína-proteína.

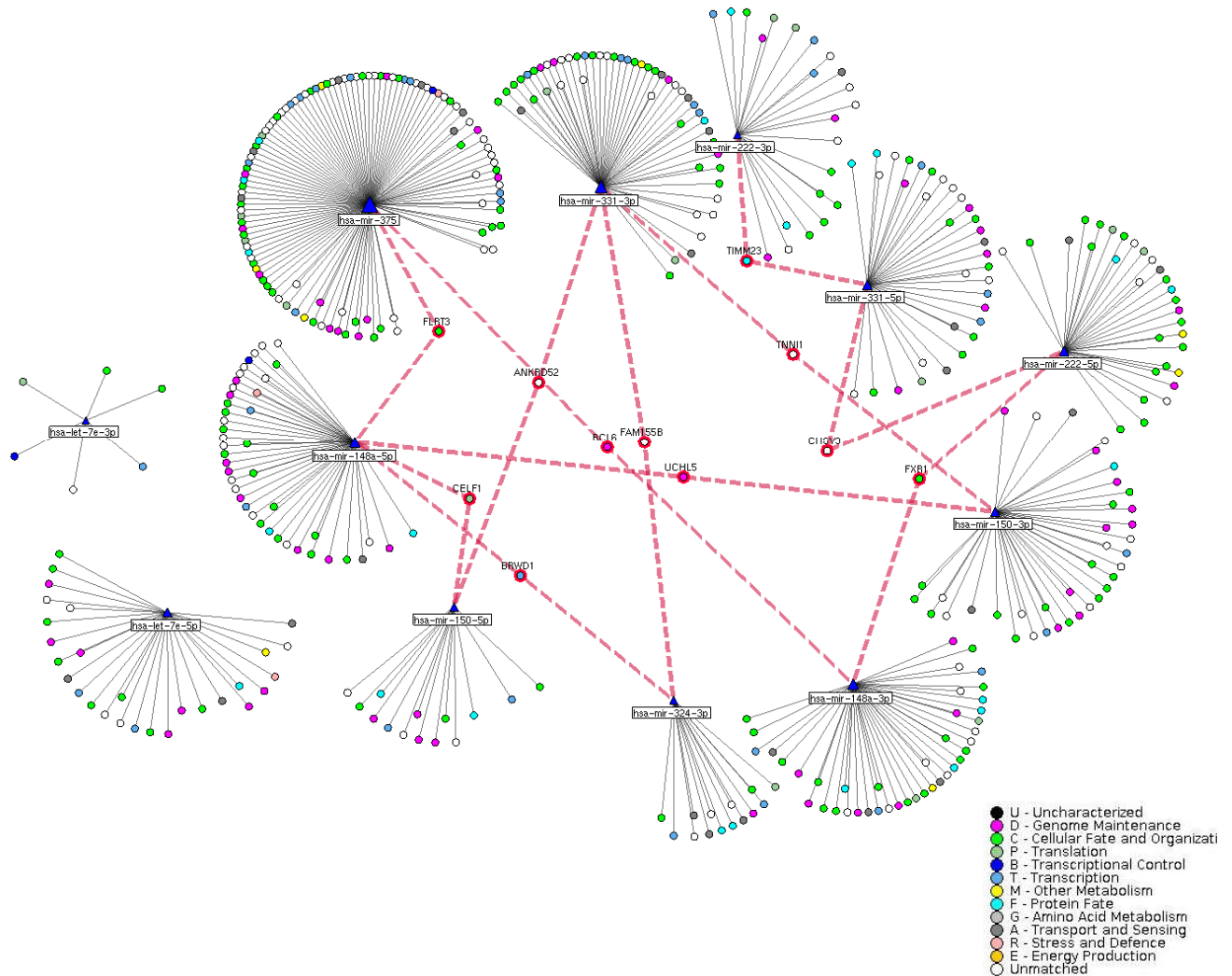


Figura 9. Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma de papila de Vater. Rede de interação proteína e os 7 miRNAs desregulados em carcinoma de papila de Vater comparado com o tecido histologicamente normal adjacente ao tumor. A rede de interação foi construída utilizando o programa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

6. DISCUSSÃO

Alterações na expressão de miRNAs contribuem com o desenvolvimento e progressão tumoral, sendo que as neoplasias humanas possuem perfis diferenciais de expressão de miRNAs associados ao comportamento biológico tumoral [96]. A identificação de perfis desregulados de expressão de miRNAs no câncer pode contribuir para o entendimento da biologia tumoral pela identificação de vias moleculares moduladas pelos miRNAs. Devido ao seu papel importante na regulação gênica, os miRNAs têm sido indicados como moléculas promissoras no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer [42].

Nossos resultados identificaram que em PDAC um grupo de 63 miRNAs estava com a expressão alterada (30 miRNAs com expressão diminuída e 33 com a expressão aumentada. Nos AMP, 7 miRNAs estavam desregulados (3 com expressão diminuída e 4 com expressão aumentada). Quando comparamos a expressão entre ambos os tipos tumorais, identificamos que 3 miRNAs (miR-375, miR-148a e miR-222) apresentavam níveis semelhantes de expressão, sugerindo que vias moleculares comuns devem estar alteradas nesses tumores.

Nossos resultados de expressão de miRNAs em PDAC foram comparados com dados de meta-análise incluindo 6 estudos [70-72, 91-95] os quais identificaram 120 miRNAs desregulados (84 com expressão aumentada e 36 com expressão diminuída) em 172 tumores comparados com 117 tecidos pancreáticos histologicamente normais. Níveis de expressão de 18 miRNAs: 14 miRNAs com expressão aumentada (let-7d, miR-125a-5p, miR-125b, miR-145, miR-186, miR-190, miR-21, miR-210, miR-212, miR-222, miR-223, miR-27a, miR-31 e miR-34a), 4 miRNAs estavam com a expressão diminuída (miR-139-3p, miR-141, miR-148a e miR-375) foram concordantes entre os nossos resultados e os dados da meta-análise. Níveis discordantes de expressão foram detectados para 5 miRNAs (miR-10b, miR-130a, miR-301, miR-376a e miR-887). Os demais miRNAs identificados em nosso estudo não foram relatados ou não estavam significativamente desregulados nos dados da meta-análise.

Recentemente, Schultz e cols. [89], avaliaram a expressão de 475 miRNAs em PDAC (n=160) e carcinoma ampolar (n=96); esses últimos subdivididos em dois tipos: intestinal (n=48) e de papila de Vater (n=48). Nesse estudo, os perfis de expressão de miRNAs nos carcinomas foram comparados com pancreatite e tecido normal de pâncreas. Em PDAC, 84 miRNAs estavam significativamente desregulados ($p < 0,05$), sendo 43 com expressão aumentada e 41 com expressão diminuída. Em adenocarcinoma ampolar, 110 miRNAs

estavam significativamente desregulados ($p < 0,05$), sendo 55 com expressão aumentada e 55 com expressão diminuída. Dentre esses, os miRNAs miR-375 e miR-148a estavam com expressão diminuída nos PDAC e nos carcinomas ampolares. Nossos achados foram concordantes com esses dados e com os resultados dos trabalhos de Bloomston e cols. [72] e Szafranska e cols. [70] em PDAC.

A expressão de miR-375 no pâncreas é abundante e sua inibição pode ter efeito no desenvolvimento desse órgão [97]; o miR-375 é um dos miRNAs que participam da regulação da glicose, controlando o crescimento e a morfogênese das ilhotas de Langerhans [98]. A expressão desregulada de miR-375 também já foi identificada em vários tipos tumorais, tais como carcinoma hepatocelular e pulmonar e cânceres de estômago, esôfago, cabeça e pescoço, entre outros, sendo que esse miRNA atua como um supressor tumoral por inibição da transformação celular maligna [99]. Em carcinoma pancreático já foi demonstrado que o miR-375 regula negativamente o oncogene *PDK1* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1*) e modula a proliferação de células e a apoptose pela sinalização do *AKT* (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) [100]. A sinalização do *AKT* já foi relacionada com a regulação da apoptose [101] e resistência a Gemcitabina em carcinoma de pâncreas [102]. Portanto, a expressão desregulada do miR-375 pode estar associada ao desenvolvimento tumoral e contribuir para a falha no tratamento dos pacientes com carcinoma pancreático.

Adicionalmente, a expressão diminuída do miR-148a foi identificada em outros estudos em carcinoma de pâncreas [70, 72, 89, 92], corroborando nossos resultados. O miR-148a regula genes com papel na proliferação, invasão e metástase tumoral e foi sugerido como um biomarcador com valor diagnóstico e prognóstico em carcinoma gástrico [103]. Os genes *CCKBR* (*cholecystokinin B receptor*) e *BCL-2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*) foram identificados como alvos do miR-148a; experimentos *in vitro* com linhagens de adenocarcinoma pancreático mostraram que o miR-148a pode suprimir a proliferação celular e induzir a apoptose por meio desses genes-alvo [104]. Outro estudo *in vitro* em linhagens de adenocarcinoma pancreático identificou que o gene *CDC25B* (*cell division cycle 25B*) é um alvo direto do miR-148a. Nesse estudo, alterações na expressão do miR-148a estavam correlacionadas com alterações na expressão de *CDC25B*, aumento da instabilidade genômica e desenvolvimento tumoral [105].

Outros miRNAs significativamente desregulados ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) nos nossos dados incluem o miR-222, o qual pode atuar como oncomiR ou supressor tumoral [106].

Identificamos a expressão aumentada do miR-222 em PDAC e AMP. Alterações na expressão do miR-222 têm sido relatada em carcinomas pancreáticos [70-72, 92] e hepatobiliares [107]. O papel do miR-222 na regulação de genes que controlam vias de proliferação celular e apoptose tais como o *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*) e o *NF-kB* (*nuclear factor kappa B*) foi demonstrada em carcinoma colorretal [108]. Outro estudo demonstrou que o miR-222 controla a progressão do ciclo celular por meio da regulação de *CDKN1C/p57* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) em linhagens de adenocarcinoma pancreático [109]. A expressão aumentada dos miRNAs miR-221 e miR-222 foi detectada tanto em tumores primários quanto em linhagens celulares de carcinoma de pâncreas, sugerindo que esses miRNAs podem estar associados com o processo de tumorigênese [110].

Embora os PDACs e AMPs apresentem 3 miRNAs comumente desregulados, identificamos diferenças no número de miRNAs desregulados nesses tumores (63 miRNAs nos casos de PDAC e apenas 7 miRNAs nos casos de AMP). Tais diferenças podem ser responsáveis pelo comportamento biológico tumoral distinto, incluindo a agressividade da doença e o prognóstico dos pacientes.

Os miRNAs exclusivamente desregulados em adenocarcinomas de papila de Vater foram let-7e, miR-331, miR-150 e miR-324-3p. Para nosso conhecimento, esses miRNAs não foram previamente relatados em outros estudos. Entre esses, o let-7e é membro da família let-7 de miRNAs com atividade supressora tumoral e associada a diversos tipos tumorais [111, 112]. Experimentos *in vitro* em células de embriões de ratos demonstraram uma associação inversa entre a expressão do let-7e com a expressão dos genes *PAX2* (*paired box 2*), *WT1* (*Wilms tumor 1*) e *WNT4* (*wingless-type MMTV integration site family member 4*), sugerindo que o let-7e deve modular a expressão desses genes durante a embriogênese murina [113]. Outro estudo observou que a redução na expressão de let-7e estava diretamente relacionada com o aumento da expressão de *CRLF-1* (*cytokine receptor-like factor 1*) em carcinomas de pulmão [114]. A diminuição da expressão do miR-331-5p e miR-27a foi associada a resistência à doxorrubicina na linhagem celular K562 de leucemia humana; esse estudo demonstrou que o aumento da expressão do miR-331-5p e/ou do miR-27a foi associado à aquisição de sensibilidade das células K562 e HL60 ao tratamento com doxorrubicina [115]. Baixos níveis de expressão do miR-331-3p também foram relatados em carcinoma gástrico, sendo que o aumento da expressão do miR-331-3p leva à parada do ciclo celular e inibição do crescimento celular mediado por *E2F1* (*E2F transcription factor 1*) [116]. De acordo com esses dados, níveis desregulados de expressão de miR-331 em AMP, conforme identificado em nosso

estudo, contribuem para alterações no ciclo celular durante o processo de tumorigênese; entretanto estudos de validação experimental são necessários para demonstrar o mecanismo molecular dessas alterações.

A expressão aumentada ($FC > 2$) do miR-150 foi previamente associada ao carcinoma de pâncreas [92, 117]. Entretanto, expressão diminuída do miR-150 foi identificada em um estudo *in vitro*, o qual demonstrou que o miR-150 regula negativamente o gene *MUC4* em linhagens celulares de carcinoma de pâncreas, estando associado com diminuição do crescimento celular, clonogenicidade, migração e invasão celular [118]. Adicionalmente, o mesmo grupo desenvolveu estratégias de tratamento com nanopartículas para entrega de moléculas miméticas do miR-150 (miR-150 *mimics*) em linhagens celulares de carcinoma pancreático, mostrando uma diminuição significativa da expressão de *MUC4* (*mucin 4, cell surface associated*) e do gene *HER-2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), o qual interage com *MUC4* e, conseqüentemente, a repressão da sinalização da via molecular correspondente [119]. Em nosso estudo, identificamos um aumento significativo da expressão do miR-150 nos carcinomas AMP, concordante com dados de Szafranska *et al.* 2008 [117] e Jamieson *et al.* 2012 [92]. De acordo com nossos achados e a literatura, o miR-150 deve desempenhar funções importantes durante a carcinogênese pancreática, entretanto estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo envolvendo alterações no miR-150 e os seus genes-alvo nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma de pâncreas.

Comparando nossos dados com a literatura, identificamos um número de miRNAs diferencialmente expressos entre PDAC e carcinomas AMP. Particularmente, níveis significativamente aumentados de expressão do miR-324-3p foram exclusivos dos carcinomas AMP do nosso grupo amostral. Ao contrário, a diminuição da expressão do miR-324-3p foi associada à amostras de PDAC [92]. Perfis de expressão diferencial de miRNAs podem estar associados ao comportamento biológico dos diferentes subtipos histológicos de carcinoma de pâncreas. Os PDACs geralmente são tumores mais agressivos e os pacientes apresentam pior prognóstico comparado aos carcinomas AMP. De fato, nossos resultados identificaram um maior número de miRNAs desregulados em PDAC, sugerindo uma maior complexidade de alterações moleculares em PDAC comparado com carcinomas AMP. Dentre os 63 miRNAs desregulados, 60 miRNAs estavam exclusivamente alterados em PDAC (32 com expressão aumentada e 28 com expressão diminuída) e 4 estavam exclusivamente desregulados em carcinomas AMP. Interessantemente, 3 miRNAs estavam comumente desregulados em PDAC e carcinomas AMP. Nossos dados foram submetidos à correção estatística de

Boferroni e identificamos 28/63 miRNAs com valor de $p < 0,0001$, sendo que 19 miRNAs estavam com expressão diminuída (miR-10b, miR-139-3p, miR-296, miR-872, miR-367, miR-570, miR-551b, miR-520f, miR-299-5p, miR-548a, miR-129, miR-130a, miR-148a, miR-375, miR-511, miR-204, miR-376a, miR-141 e let-7b) e 9 com expressão aumentada (miR-127-5p, miR-744, miR-222, miR-210, miR-99a, miR-152, let-7d, miR-886-5p e miR-34a).

Entre os miRNAs identificados em nosso estudo como exclusivamente desregulados em PDAC, a expressão aumentada do miR-744 foi detectada em outro estudo, no plasma de pacientes com PDAC (n=94) comparado com indivíduos saudáveis (n=68) e em tecido tumoral de pâncreas, sugerindo o miR-744 como um biomarcador clinicamente relevante nessa neoplasia [120]. Adicionalmente, foi demonstrado que o aumento da expressão do miR-744 leva a um aumento da capacidade tumorigênica de células de carcinoma pancreático, pela ativação da via molecular Wnt/ β -catenina [121], a qual está comumente envolvida em mecanismos de tumorigênese.

Dentre os miRNAs com potencial aplicação clínica no câncer, o miR-210 foi relatado como um marcador de hipóxia tumoral, *in vivo*, e associado ao prognóstico desfavorável de pacientes com câncer de mama [122]. Em adenocarcinoma pancreático, níveis de expressão alterados de uma assinatura composta pelo miR-205, miR-210, miR-492 e miR-1247 foram indicados como biomarcadores de evolução clínica dos pacientes [123]. Em outro estudo, a expressão aumentada dos miRNAs miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222 em adenocarcinoma de pâncreas foi associada ao crescimento e desenvolvimento tumoral e pior prognóstico [124]. Nossos resultados mostraram aumento de expressão do miR-210 e miR-222 em PDAC, concordante com os dados da literatura, sugerindo um papel desses miRNAs como indicadores prognósticos nesse subtipo tumoral.

O miR-99a tem sido relatado como um supressor tumoral, com expressão diminuída em vários tipos de tumores, incluindo o carcinoma de mama e pulmão, modulando vias moleculares importantes como a via do mTOR (mechanistic target of rapamycin; serine/threonine kinase) e *AKT* (*v-akt murine thymoma viral oncogene*) [125, 126]. Em carcinoma de bexiga, foi demonstrado que o miR-99a modula a expressão do *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), levando à ativação das vias moleculares do *K-RAS* e do *PI3K* (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/*AKT* [127]. O *FGFR3* faz parte de uma família de receptores tirosina-quinase com papel importante na tumorigênese, pela ativação da

transcrição, promoção da divisão celular, diferenciação, migração e apoptose [128, 129] Esses dados demonstram que outros mecanismos, tais como os modulados pelo miR-99a, levam à ativação da via de sinalização do *K-RAS*, contribuindo para a tumorigênese no pâncreas.

miRNAs, tais como o miR-127, podem contribuir para a regulação do ciclo celular e da diferenciação celular [130, 131]. Interessantemente, o miR-127 foi identificado em regiões de ilhas CpG no genoma e foi demonstrado que o tratamento de células T24 (carcinoma transicional de bexiga) com drogas modificadoras da cromatina [*5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR)* and *4-phenylbutyric acid (PBA)*] levou à indução da expressão do miR-127, sugerindo que o miR-127 é regulado por mecanismos de silenciamento epigenético. Adicionalmente, foi demonstrado que o miR-127-5p regula o gene *MMP13* e alterações na sua expressão já foram associadas ao desenvolvimento de osteoartrite [132]. Recentemente, foi demonstrado que o gene *MMP13* contribui para a progressão tumoral metastática no fígado [133]. Para nosso conhecimento, não há outros relatos de identificação de expressão desregulada do miR-127-5p em carcinomas pancreáticos. Portanto, o miR-127-5p pode ser considerado um novo miRNA identificado pelo nosso grupo e associado a PDAC.

A família de miRNAs let-7 tem sido amplamente implicada na tumorigênese como reguladores da expressão de *K-RAS* [134]. Nossos resultados identificaram um aumento da expressão de let-7d e let-7c e diminuição da expressão de let-7b em PDAC. Na literatura, dois estudos relataram que a expressão de let-7d estava aumentada em PDAC [91, 93], e em outros dois estudos a expressão de let-7d estava diminuída nesse mesmo tipo tumoral [117, 135]. A diminuição da expressão de membros da família let-7 em plasma foi associada com a melhor sobrevida de pacientes com PDAC [136].

Para nosso conhecimento, não há relatos de aumento de expressão dos miRNAs miR-886-5p e miR-152 em câncer de pâncreas. Nosso estudo identificou expressão aumentada ($FC > 3$) de ambos miRNAs nos PDACs. O miR-886-5p foi identificado como um inibidor da apoptose em células de carcinoma cervical pela regulação negativa da produção de BAX (*BCL2-associated X protein*) [137]. Adicionalmente, identificamos apenas um estudo que mostrou diminuição da expressão do miR-152 e modulação do gene *DNMT-1* por esse miRNA em linhagens de carcinomas de pâncreas e relacionada com a progressão da doença [138]. Alterações na expressão do miR-152 em carcinoma gástrico foram mostradas atuar sobre a regulação do TGF- β (*transforming growth factor beta 1*) por indução de HLA-G (*major histocompatibility complex, class I, G*), sugerindo que o miR-152 deve atuar no

desenvolvimento do carcinoma gástrico [139]. O papel desses miRNAs na oncogênese do pâncreas ainda não foi elucidado.

A expressão aumentada do miR-21 foi amplamente associada à tumorigênese, incluindo o desenvolvimento e a progressão do carcinoma pancreático [13, 70, 91, 92] e a resistência adquirida à quimioterapia [140]. Semelhante à expressão do miR-21, a expressão do miR-34a foi relatada como aumentada em PDAC [92, 141, 142]. Um estudo recente avaliou a expressão de miRNAs em 74 pacientes com PDAC e 18 pacientes com pancreatite crônica, e sugeriu que o conjunto de miRNAs: miR-21, miR-34a, miR-198 (esses com expressão aumentada) e miR-217 (com expressão diminuída) pode constituir uma assinatura com valor diagnóstico e prognóstico na evolução de pancreatite para adenocarcinoma invasivo. Adicionalmente, aumento da expressão do miR-21 e do miR-198 estava associado à menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global [143]. Outro estudo similar sugeriu que a expressão aumentada dos miRNAs miR-21 e miR-34a em soro e saliva pode constituir um biomarcador diagnóstico para pacientes com PDAC [144]. Os dados da literatura corroboram nossos achados de expressão aumentada de ambos os miRNAs, miR-21 e miR-34a, em amostras de PDAC comparado com tecidos pancreáticos histologicamente normais.

Uma via molecular importante associada com o desenvolvimento de diversos tumores é a do *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) [145]. O miR-190 tem como alvo vários efetores angiogênicos, incluindo o *TCF4*, *SMAD2*, *SMAD4*, *RAS*, *JAK2*, *IGF1* e *HGF*. Entre eles, o IGF-1 e o HGF têm a capacidade de alterar o microambiente tecidual local, bloqueando a expressão do *VEGF* em células endoteliais. Além disso, o *VEGF* também é um alvo direto do miR-190 [146]. O aumento da expressão de miR-190 e a consequente redução da expressão de IGF-1 também foi relacionado com a resistência à insulina em pacientes com hepatocarcinoma [147]. Adicionalmente, a molécula de mRNA que codifica o receptor do IGF-1 (*IGF1R*) contém um sítio de ligação ao miR-376a no seu terminal 3'UTR. A expressão do miR-376a foi relatada como aumentada em carcinoma de pâncreas [91] e associada com a progressão e metástase de melanoma mediada pelo *IGF1R* [148].

O aumento da expressão de miR-208, *in vitro*, na linhagem celular BxPC3 de carcinoma de pâncreas, altera a via *AKT/GSK-3 β* (*glycogen synthase kinase 3 beta*), induzindo o fenótipo de transição epitelial-mesenquimal, promovendo invasão celular e metástase [149]. O aumento da expressão de miR-208 foi detectado em carcinoma epidermóide de esôfago e associado à promoção da proliferação e progressão do ciclo celular, por um mecanismo de

repressão do gene *SOX6* [150]. Nos nossos resultados, a expressão do miR-208 estava muito elevada nos PDAC comparado com tecidos normais do pâncreas ($FC=115$, $p=0,002$), sendo que esse aumento de expressão pode levar à desregulação de genes-alvo importantes, estando relacionado com a complexidade deste carcinoma.

O aumento da expressão do miR-212 foi relacionado à obesidade e ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 [151]. A expressão diferencial deste miRNA nas ilhotas pancreáticas de ratos obesos foi observada, sugerindo que o miR-212 pode estar envolvido na regulação da insulina [152]. Em carcinoma de pâncreas, o aumento da expressão do miR-212 foi observado em tumores primários e linhagens celulares [91, 153]. O miR-212 promoveu o aumento de proliferação celular, a formação de colônias, migração e invasão de células tumorais pancreáticas das linhagens PANC-1, SW1990, BxPC-3. O gene *PTCH1* (*patched 1*) foi identificado como um alvo regulado pelo miR-212, sendo que o miR-212 pode atuar como um oncomiR e a via molecular miR-212/*PTCH1* pode representar um alvo potencial para tratamento de pacientes com carcinoma de pâncreas [154]. O *PTCH1* codifica o receptor para a ativação da via do sonic hedgehog, a qual tem papel na embriogênese e na oncogênese. Em células tumorais do pâncreas, a expressão dos ligantes do sonic hedgehog promove o crescimento tumoral, indiretamente, pela ativação da sinalização do hedgehog no microambiente tumoral, além de promover mecanismos de metástase e resistência à terapia [155].

Em nossos resultados em PDAC, os miRNAs com expressão significativamente diminuída ($p<0,0001$) no tumor relativo às amostras de tecido pancreático normal, foram: miR-10b, miR-139-3p, miR-296, miR-872, miR-367, miR-570, miR-551b, miR-520f, miR-299-5p, miR-548a, miR-129, miR-130a, miR-148a, miR-375, miR-511, miR-204, miR-376a, miR-141 e let-7b.

Uma meta-análise de 36 estudos em 14 tipos diferentes de tumores identificou a expressão aumentada ou diminuída do miR-10b nesses tumores, incluindo carcinoma hepatocelular, carcinoma oral, cânceres de mama, próstata, pulmão, esôfago, cólon, melanoma, glioblastoma, schwannoma vestibular, entre outros. Esse estudo identificou que o aumento da expressão do miR-10b estava associado a um maior risco de desenvolvimento de neoplasias. Além disso, a expressão aumentada do miR-10b foi capaz de predizer um pior prognóstico de pacientes com alguns tipos de câncer. Os autores sugeriram que a expressão aumentada do miR-10b pode ser útil para a identificação de alguns carcinomas, com maior acurácia para os

carcinomas do sistema digestório [156]. Ao contrário dos nossos resultados em PDAC, a expressão aumentada do miR-10b foi identificada em carcinoma pancreático [13]. Outro estudo detectou níveis aumentados de expressão do miR-10b em plasma de pacientes com carcinoma de pâncreas, associados a mecanismos reguladores dos genes *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) e *TGF- β* , e a presença desse miRNA na circulação sanguínea foi sugerida como um biomarcador diagnóstico nessa neoplasia [157].

Concordante com nossos dados, a expressão diminuída do miR-130a foi identificada em vários tipos de tumores e associada a processos celulares importantes tais como angiogênese [158]. Em carcinoma de mama, o miR-130a foi identificado como um miRNA supressor tumoral que inibe a proliferação celular, migração e invasão [159]. Os genes *SMAD4* e *TGF- β 1* também foram identificados como alvos regulados pelo miR-130a na maturação de neutrófilos [160]. Alterações em *TGF- β 1* foram identificadas em adenocarcinoma pancreático e relacionadas com o maior potencial de migração celular pela ativação de *SMAD2* e *SMAD3* [161]. Em carcinoma pulmonar, alterações na expressão do miR-130a induzem à hipóxia tumoral por meio da modulação de *CDKN1A* e podem estar envolvidas no processo de remodelação vascular nesse carcinoma [161, 162]. Os genes *TGF- β 1*, *SMAD2*, *SMAD3* e *CDKN1A*, potencialmente regulados pelo miR-130a, foram associados com o desenvolvimento do carcinoma de pâncreas [12], sugerindo que a desregulação do miR-130a pode ter um efeito importante na tumorigênese.

A expressão de MCL-1 (*myeloid cell leukemia 1*), uma proteína anti-apoptótica e altamente expressa em culturas de células pancreáticas, é regulada negativamente pelo miR-204 em carcinoma de pâncreas [163]. A perda da expressão do miR-204 foi identificada em carcinoma gástrico e associada ao aumento de expressão da proteína anti-apoptótica, BCL-2 e pior prognóstico dos pacientes [164]. Baixos níveis de expressão do miR-204 também foram detectados em carcinomas de mama e associados a uma menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença [165]. A perda da expressão do miR-204 foi correlacionada com o aumento da expressão do gene *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) e subsequente ativação da via de sinalização AKT/mTOR, a qual promove um aumento da migração e invasão celular [165]. De acordo com esses estudos, a perda da expressão de miR-204 e a consequente desregulação de vias moleculares responsáveis pela promoção de crescimento e proliferação celular aumentados, resistência à apoptose e aumento da capacidade de migração e invasão podem estar associados a um comportamento biológico tumoral mais agressivo e possivelmente associado ao pior prognóstico dos pacientes com PDAC.

Uma assinatura de 7 miRNAs, incluindo duas isoformas do miR-511 (miR-511-1, miR-511-2, miR-9-1, miR-9-2, miR-30d, miR-326 e miR-3677) foi associada com a sobrevida de pacientes com hepatocarcinoma, sendo que o miR-511 estava com expressão diminuída nos tumores [166]. A diminuição significativa da expressão do miR-511 foi detectada em nossas amostras de PDAC. O miR-511 também foi identificado como um regulador do *TNF* por meio do *TNFR1* [167]. Em adenocarcinoma pulmonar, o miR-511 foi caracterizado como um dos possíveis reguladores da expressão de *TRIB2* (*tribbles pseudokinase 2*)/*BAX*, sendo que esse estudo sugeriu que o miR-511 pode ter potencial uso como molécula terapêutica para pacientes com esses carcinomas [167, 168].

Um baixo nível de expressão do miR-141 foi relatado em carcinoma pancreático e correlacionado com estadiamento avançado, invasão linfática e menor sobrevida global de pacientes adenocarcinoma de pâncreas. Estudos funcionais sugeriram que o miR-141 inibe o crescimento e a capacidade de formação de colônias, aumenta a apoptose dependente de caspase-3 em células PANC-1, atuando como um supressor tumoral pela modulação da proteína YAP1 (*yes associated protein 1*) [169], que consiste em um efetor *downstream* da via Hippo, a qual regula mecanismos de homeostase e regeneração tecidual e está envolvida na tumorigênese [170]. Em carcinoma gástrico associado à infecção por *H. pylori*, foi demonstrado que o miR-141 regula o gene *STAT4*, diminuindo o potencial de invasão celular [171].

A expressão diminuída do miR-129, assim como identificada em nossos casos de PDAC, tem sido relatada em vários tumores, tais como: meduloblastoma [172], câncer gástrico [173], carcinoma colorretal [174] e adenocarcinoma pulmonar [67]. O miR-129 é considerado um supressor tumoral e sua expressão foi diretamente associada ao crescimento celular de carcinoma gástrico, por meio da regulação dos genes-alvo *CDK6* (*cyclin-dependent kinase 6*) e *SOX4* (*SRY-box 4*) [175]. A diminuição da expressão do miR-129-2 foi inversamente correlacionada com o nível de expressão de *SOX4* em carcinoma de pâncreas [176]. Esses achados corroboram o papel dos miRNAs como potentes reguladores de fatores de transcrição, como os genes da família SOX, envolvidos na regulação do desenvolvimento embrionário e determinação do destino celular [177]. Em carcinoma colorretal, foi demonstrado que o miR-129 promove a apoptose pela supressão da proteína BCL2, além de aumentar a quimiosensibilidade ao 5-fluorouracil, *in vitro* e *in vivo* [178]. A diminuição da expressão do miR-129 foi associada ao estadio avançado e desenvolvimento de metástases em carcinoma hepatocelular; além disso foi demonstrado que o miR-129 levou à diminuição

da expressão de PAK5 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase*), uma proteína supressora tumoral [179].

Um estudo que avaliou a expressão de miRNAs em linhagens celulares linfoblastóides detectou a expressão diminuída de miR-548a associada com a expressão diferencial de múltiplos genes, incluindo *C13orf31*, *CFLAR*, *DOCK10*, *CD38*, *LAP3*, *IFI44L*, *GBP5*, *RABGAP1L*, *LRRK2*, *HSP90B1*, *IKZF3*, *KIAA1618*, *FBXO16* e *LACTB2* [180]. Há poucos relatos na literatura sobre o envolvimento da família do miR-548 em carcinomas de pâncreas. Um estudo identificou o miR-548d como um regulador do desenvolvimento e progressão de carcinomas pancreáticos, por meio da modulação de múltiplas vias moleculares [181]. Em nosso estudo, evidenciamos baixos níveis de expressão do miR-548a associados a um grande número de vias moleculares potencialmente reguladas por esse miRNA.

A expressão de miR-299a-5p estava diminuída nas nossas amostras de PDAC comparado com margens cirúrgicas histologicamente normais. O miR-299a-5p foi associado a células progenitoras CD34⁺ na hematopoiese, sendo um dos responsáveis pela modulação da diferenciação celular [182]. A expressão diferencial de miR-299-5p foi encontrada entre carcinomas de próstata e células normais, sendo esse miRNA responsável pela regulação da proliferação, apoptose, migração e invasão celular em carcinomas metastáticos de próstata [183]. Níveis aumentados de expressão da proteína osteopontina (OPN), uma proteína com atividade oncogênica, foram associados a parâmetros clínicos de prognóstico pobre em pacientes com câncer de mama [184]. Posteriormente a esse estudo, a expressão aumentada da OPN foi associada a baixos níveis de expressão do miR-299-5p em linhagens celulares de carcinoma de mama [185]. Nesse estudo, os autores demonstraram que o gene OPN é um alvo regulado pelo miR-299-5p e que a expressão da OPN desempenha um papel importante na promoção da proliferação e tumorigenicidade das linhagens testadas.

Nossos resultados mostraram a expressão diminuída do miR-520f em PDAC. Para nosso conhecimento, esse miRNA não foi previamente identificado na literatura em carcinoma pancreático. Em carcinomas de mama, perfis de expressão diferencial de miRNAs foram associados ao status de receptores hormonais, sendo que os miRNAs miR-342, miR-299, miR-217, miR-190, miR-135b e miR-218 classificaram os tumores positivos para o receptor de estrogênio, os miRNAs miR-520g, miR-377, miR-527-518a, miR-520f e 520c classificaram os tumores positivos para o receptor de progesterona e os miRNAs miR-520d, miR-181c, miR-302c, miR-376b e miR-30e foram classificadores dos tumores HER2/neu

positivos [186]. A importância desses resultados baseia-se no desenvolvimento futuro de novas terapias mais precisas para pacientes com subtipos moleculares específicos de câncer de mama.

A expressão aumentada do miR-551b em células de câncer de pulmão com resistência adquirida à apoptose inibiu a expressão da catalase e potencializou o acúmulo de espécies reativas do oxigênio (ROS) e a expressão do gene *MUC1* (*mucin 1, cell surface associated*). Esse estudo demonstrou que um mecanismo envolvendo o miR-551b/catalase/ROS leva ao aumento da expressão de *MUC1* e os autores sugerem que esse mecanismo pode ser explorado como um alvo para superar a resistência à quimioterapia em carcinoma pulmonar [187]. No pâncreas, a expressão do miR-551-5p foi indicada como um marcador de progressão de doença em pancreatite crônica [188].

Entre os demais miRNAs desregulados, detectamos um aumento significativo da expressão do miR-145, concordante com dados de estudos anteriores em PDAC [70, 92, 93] e baixa expressão do miR-367 em nossas amostras de PDAC. Entretanto, em outro tipo tumoral, como o carcinoma pulmonar, a diminuição da expressão do miR-145 e o aumento da expressão do miR-367 foram correlacionadas com um menor tempo para recorrência, sugerindo o papel desses miRNAs como marcadores prognósticos em carcinoma de pulmão [189]. Esses dados sugerem que perfis diferenciais de alterações na expressão desses miRNAs podem estar associadas a diferentes contextos teciduais no câncer.

O papel dos miRNAs tem sido evidenciado em mecanismos celulares importantes, tais como o metabolismo da glicose [190]. Nesse mecanismo, foi identificado que o miR-296 regula o crescimento de hepatócitos por meio da sinalização de *VEGFR2/PDGFR β* [191]. Foi demonstrado que o miR-296 regula a expressão do gene *HMGAI* (*high mobility group AT-hook 1*) afetando o crescimento e invasão tumoral em carcinoma de próstata [192]. Interessantemente, a expressão do miR-296 encontra-se diminuída durante a progressão tumoral e está associada com metástase de cânceres de cólon, mama, pulmão, estômago, paratireóide, fígado e tumores biliares, sendo que a perda da expressão do miR-296 promove a migração celular e o aumento da capacidade de invasão tumoral [193].

O miR-139 foi sugerido como um miRNA com atividade de supressor tumoral nas etapas iniciais da tumorigênese colorretal [194], sendo que a expressão diminuída do miR-139 estava associada ao pior prognóstico de pacientes com esse tipo de carcinoma [195]. Concordante

com nossos achados, Jamieson e cols. [92] identificaram a expressão diminuída do miR-139-3p em PDAC. Níveis desregulados do miR-139 podem alterar a via de sinalização *IGF1R/MEK/ERK* promovendo processos celulares de invasão e metástase [196]. Outra via importante modulada pelo miR-139 é a *WNT/TCF-4*, identificada em carcinoma hepatocelular [197].

Diferenças significativas no número de miRNAs desregulados entre PDAC e carcinomas AMP, em nosso estudo, indicam diferenças na complexidade de alterações em vias moleculares associadas ao desenvolvimento e progressão desses tumores. De fato, esses tumores apresentam comportamentos biológicos distintos, os quais refletem as diferenças no prognóstico dos pacientes. Interessantemente, as vias moleculares moduladas pelos miRNAs identificados em nosso estudo e nos dados da literatura podem representar alvos terapêuticos potenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes com PDAC e carcinomas AMP.

7. CONCLUSÕES

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N Engl J Med* 1995, **333**(15):970-974.

29. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ *et al*: **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.** *Cancer Res* 1997, **57**(9):1731-1734.

30. Schneider G, Schmid RM: **Genetic alterations in pancreatic carcinoma.** *Mol Cancer* 2003, **2**:15.

31. Maitra A, Hruban RH: **Pancreatic cancer.** *Annu Rev Pathol* 2008, **3**:157-188.

32. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H *et al*: **Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas.** *Oncol Rep* 2003, **10**(1):21-25.

33. Saif MW, Karapanagiotou L, Syrigos K: **Genetic alterations in pancreatic cancer.** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(33):4423-4430.

34. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE: **p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions.** *Cancer Res* 1994, **54**(11):3025-3033.

35. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 2004, **10**(8):789-799.

36. Pei D, Zhang Y, Zheng J: **Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx.** *Oncotarget* 2012, **3**(3):228-235.

37. Reid MD, Saka B, Balci S, Goldblum AS, Adsay NV: **Molecular genetics of pancreatic neoplasms and their morphologic correlates: an update on recent advances and potential diagnostic applications.** *Am J Clin Pathol* 2014, **141**(2):168-180.

38. Wood LD, Hruban RH: **Genomic landscapes of pancreatic neoplasia.** *J Pathol Transl Med* 2015, **49**(1):13-22.

39. Di Leva G, Calin GA, Croce CM: **MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006, **78**(2):180-189.

40. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM: **MicroRNAs in cancer.** *Annu Rev Pathol* 2014, **9**:287-314.

41. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**(20):4051-4060.

42. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review.** *EMBO Mol Med* 2012, **4**(3):143-159.

43. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 1 – Parecer do CEP



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de agosto de 2013

OF. 111/2013-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Patrícia Pintor dos Reis
Do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Patrícia,

Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4382-2012) "MicroRNoma dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares", conduzido por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Claudia Nishida Hasimoto, Giovanni Faria Silva, Igor Jurisica, Juan Carlos Llanos Leonardo Pelafsky, Luiz Lehmann Coutinho, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi, Rodrigo Severo de Camargo Pereira e Robson Francisco Carvalho, aprovado por este colegiado 01/10/2012, conta com 02 sub-projetos à saber:

Sub-Projeto I: (Protocolo CEP 4382-2012-A) "MicroRNoma dos carcinomas de fígado" que será conduzido por Jovita Ramos Ariede (Objetivo Acadêmico de Doutorado) e terá a colaboração de: Dra Sandra Drigo Linde, Dr. Rui Manoel Vieira Reis, Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, Cristóvan Scapulatempo Neto, André Lopes Carvalho e o Prof. Dr. Wan Lam (British Columbia Câncer Center, Vancouver, Canadá).

Sub-Projeto II: (Protocolo CEP 4382-2012-B) "MicroRNoma dos carcinomas de pâncreas" que será conduzido por Tainara Francini Felix (Objetivo Acadêmico de Mestrado) e terá a colaboração de: Dra Sandra Drigo Linde, Dr. Rui Manoel Vieira Reis, Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, Cristóvan Scapulatempo Neto, André Lopes Carvalho e o Prof. Dr. Wan Lam (British Columbia Câncer Center, Vancouver, Canadá).

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução dos projetos, deverá ser apresentado ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP.