

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/02/2022.



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

Natália Bertoni

**Perfil de expressão global de microRNAs em
plasma e tumor de pacientes com carcinomas
de pâncreas.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional. Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis.

**Botucatu
2020**

Natália Bertoni

Perfil de expressão global de microRNAs em plasma e
tumor de pacientes com carcinomas de pâncreas.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Cirurgia e
Medicina Translacional. Área de
Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis.

Botucatu
2020

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

Bertoni, Natália.

Perfil de expressão global de microRNAs em plasma e tumor de pacientes com carcinomas de pâncreas / Natália Bertoni. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Capes: 20200005

1. MicroRNAs. 2. Carcinoma. 3. Pâncreas. 4. Biópsia líquida. 5. Biomarcadores.

Palavras-chave: Biópsia líquida; Carcinoma de pâncreas; Vias moleculares; biomarcadores circulantes; microRNA.

***“Diga-me eu esquecerei,
Ensina-me e eu poderei lembrar,
Envolve-me e eu aprenderei.”
Benjamin Franklin***

*Aos meus amados pais, **Wagner e Lia**,
Meus pilares e grandes incentivadores dessa jornada.*

*Ao meu companheiro **Marcos**,
Meu porto seguro.*

*Aos meus avôs **João e Antônio** (in memoriam),
Luzes que guiam os meus passos.*

Dedico a vocês este trabalho com muito amor, alegria e gratidão.

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** (UNESP), à **Faculdade de Medicina de Botucatu** (FMB) e à **Unidade de Pesquisa Experimental** (UNIPEX), juntamente aos professores, servidores e colaboradores pela infraestrutura, oportunidade, apoio e conhecimentos compartilhados;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da Bolsa de estudo do Programa de Demanda Social; pela concessão da Bolsa de estudo do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), com vigência de 01/11/2018 a 30/04/2019 (Código de Financiamento 001; processo #88881.190242/2018-01);

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis** por fazer parte da minha trajetória acadêmica e me inspirar desde 2011, quando ingressei na Iniciação Científica. Agradeço por todas as oportunidades que me concedeu e por me guiar nessa jornada, sempre muito paciente, carinhosa e disposta a compartilhar todo seu conhecimento. Tenho muito orgulho de ser orientada por essa cientista que é um grande exemplo para nós. Espero que essas palavras possam expressar toda a minha gratidão e amor pelos laços que criamos;

Aos queridos companheiros do laboratório de **Oncologia Molecular e Translacional**: *Dra. Sandra Drigo, Márcio de Carvalho, Tainara Felix, Carolina Fazio, Ana Laura Seneda, Iael Weissberg, Vanessa Souza e Mariana Santesso*. Obrigada pela companhia de todos os dias, pelo suporte, pelos momentos de descontração, alegrias e pela cumplicidade;

Ao querido **Márcio de Carvalho**, assistente de suporte acadêmico e grande companheiro de trabalho, sempre muito paciente e disposto a nos auxiliar;

À querida **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, assistente administrativo

da Seção Técnica de Pós-Graduação, pelo suporte e carinho que sempre demonstrou;

À equipe da **Gastrocirurgia** do Hospital das Clínicas de Botucatu pela colaboração na coleta de amostras e dados clínicos utilizados nos nossos projetos;

À minha amada ‘miga’ **Tainara Felix** por ter se tornado muito mais que uma colega de trabalho. Agradeço pela cumplicidade, por todos os momentos de alegria e também pelos de desabafos, pelos ensinamentos, por me acompanhar e auxiliar na bancada de experimentos e por me ensinar tanto. Obrigada por essa amizade que eu vou carregar sempre;

Aos companheiros do antigo laboratório **Neogene**: *Maisa Pinheiro, Carolina Tavarez, Naiara Cinegaglia, Larissa Cotrim, Tatiane Basso, Renata Bueno, Talita Raposo e Cadu Alves*. Vocês fazem parte da minha formação profissional e pessoal! Nós estivemos juntos por muitos momentos e sinto saudade de vocês;

À **Universidade de Aberystwyth**, juntamente aos professores e colaboradores, pela infraestrutura, pelo apoio e oportunidade de cursar o Doutorado Sanduíche;

Aos queridos companheiros de trabalho do grupo de pesquisa **Aber Systems Biology** (Prof. *Luis Mur, Robert Darby, Manfred Beckmann, Helen Phillips, Rachel de Araújo, Larissa Carvalho, Denisa Asandei, Sumana Bhowmick, Rafael Baptista, Olayemi Adeniyi*). Sou grata pelos aprendizados e pelos momentos que partilhamos durante esse período marcante em minha vida;

Ao querido **Prof. Luis Alejandro Jose Mur**, da Universidade de Aberystwyth, pelo acolhimento. Obrigada por tanto conhecimento compartilhado e por todos os frutos que estamos colhendo dessa colaboração;

Às minhas amadas amigas **Rachel Paes de Araújo** e **Larissa Carvalho**, companheiras da Universidade de Aber. Sou grata pelo grande suporte que me deram e pelo amor e amizade que cultivamos até hoje. As lembranças e o carinho que tenho por vocês serão eternos;

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Prof. Rogério Antônio de Oliveira**, **Profa. Camila Correa Camacho**, **Dr. Cristiano de Pádua Souza**, **Dr. Juan Carlos Llanos**, **Prof. Rafael Plana Simões** e **Profa. Ludmilla Thome Domingos Chinen**, por aceitarem o convite para avaliar e contribuir com o presente trabalho;

Aos meus amados amigos que conheci em Botucatu (*Turma XLVI de Ciências Biológicas, Carolina Santos, Elisângela Cândido, Bruna Barbosa, Tamires Souza, Tatinha Bassoli, Tania Madoglio, Leonardo de Almeida, Thiago Rogério, Daniel Souza e Ana Maria, Angela Rocha e Cristiano Stangel, Gabriel Queiroz e Isabela Lopes, Gabriel Tucci e Fernanda Tavares, Adriana Rocha, Felipe Bossa, Andreia Moreira, “Vó” Maria, Bianca Peres, Dayane Rosa, Graciane Suman, Aline Leite e Lucas Piacitelli, Bruno Castilho, Solange Gonçalves e Dinei, Rogério, Joãozinho, Margarete Penteado*) pelos momentos de alegria e por terem se tornado a minha família nessa cidade;

Às minhas avós, **Lourdes Fernandes Bertoni** e **Zelma Leite** (*in memoriam*), tios, tias e primos da família Bertoni e Graça Leite pelo carinho;

Aos meus amados padrinhos **Domingos Tentor** e **Marli Bertoni Tentor**, pelas palavras carinhosas que sempre confortam meu coração;

Ao meu amado primo **Pedro Henrique Gonçalves da Silva**, por ser também um grande incentivador;

Aos meus queridos **Juarez, Marizete, Luzia, Zélia, Jefferson, Davi, Gael, Márcia, Tomaz, Arthur, Heitor, Dona Cá e Márcio**, obrigada por me acolherem com tanto amor na família e por torcerem por mim;

Aos meus amados pais, **Wagner Luiz Bertoni e Lia Regina Bertoni**, pelo apoio durante esses anos de formação acadêmica. O apoio de vocês sempre foi essencial. Que eu possa retribuir todo suporte e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por me permitirem viver em um lar maravilhoso e de tanto amor! Vocês são meus exemplos, me ensinam tanto todos os dias;

Ao meu amado companheiro **Marcos Oliveira**, que conheci durante essa jornada. Obrigada por me permitir dividir a vida com você e por caminharmos juntos no amor e cumplicidade!

A todos que fazem parte da minha trajetória, muito obrigada!

Sou a soma das nossas coleções de histórias e momentos e cada um faz parte dessa conquista.

***“Aqueles que passam por nós não vão sós.
Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.”***

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Os carcinomas de pâncreas são carcinomas agressivos e estão entre as neoplasias de alta complexidade no diagnóstico, geralmente detectados em estágios avançados da doença. Estes carcinomas estão associados a altas taxas de mortalidade, levando a óbito mais de 432 mil pacientes a cada ano, mundialmente. Uma vez que o diagnóstico precoce é essencial para melhor sobrevida dos pacientes, a identificação de biomarcadores circulantes e relacionados aos tumores provavelmente fornecerão informações úteis sobre o desenvolvimento da doença, a progressão e impacto na sobrevida. O papel dos microRNAs (miRNAs) na regulação de importantes processos celulares desde o desenvolvimento sugere sua aplicabilidade clínica como biomarcadores robustos. miRNAs são altamente estáveis e podem ser detectados nos fluídos corporais. A detecção de miRNAs no plasma e soro tem sido demonstrada útil no diagnóstico precoce e na predição de prognóstico de pacientes com neoplasias malignas. Portanto, nossos objetivos foram identificar o perfil global de expressão de miRNAs e os mRNAs-alvos regulados por miRNAs em tumor e plasma de pacientes com carcinomas de pâncreas e identificar vias moleculares reguladas por miRNAs. O miR-378h apresentou expressão significativamente aumentada (*fold change* ≥ 2 ; $p < 0,05$; FDR $< 0,05$) no tumor e no plasma de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático. Este miRNA atua como modulador de vias de crescimento celular e de resposta imune. Em adenocarcinoma de papila de Vater, o miR-5000-5p apresentou expressão significativamente diminuída (*fold change* ≥ 2 ; $p < 0,05$; FDR $< 0,05$) no tumor e no plasma, modulando vias envolvidas na sinalização Wnt e na proliferação celular. Este estudo contribuiu para a identificação de miRNAs circulantes e relacionados ao tumor como potenciais biomarcadores tumorais específicos importantes no processo de oncogênese pancreática.

Abstract

Pancreatic carcinomas are aggressive carcinomas and are among the tumors with high complexity at diagnosis, usually diagnosed in advanced stages. Pancreatic carcinomas are associated with high mortality rates, with more than 432 thousand deaths every year, worldwide. Since early disease diagnosis is essential for better patient survival, the identification of blood-based and tumor-related biomarkers will likely provide useful information on disease development, progression and impact on survival. Of note, the role of microRNAs (miRNAs) in regulating important cellular processes since early development suggests their clinical applicability as robust biomarkers. miRNAs are highly stable and can be detected in the body fluids. Detection of miRNAs in plasma and serum has been shown useful for early diagnosis and to predict prognosis of patients with cancer. Therefore, our aims were to identify the miRNA global expression profile in tumor and plasma from patients with pancreatic carcinomas and to elucidate molecular pathways regulated by miRNA target-genes. miR-378h was significantly upregulated ($FC \geq 2$ and $p < 0.05$ and $FDR < 0.05$) in plasma and tumor from patients with PDAC. This miRNA acts as a modulator of cell growth and immune response pathways. In AMP cancers, miR-5000-5p was significantly downregulated ($FC \geq 2$ and $p < 0.05$ and $FDR < 0.05$) in plasma and tumor, modulating pathways involved in Wnt signaling and cell proliferation. The identification of specific circulating plasma and tumor-related miRNAs deregulated in patients with PDAC and AMP may indicate these molecules as valuable biomarkers to assist in early diagnosis.

Lista de abreviaturas e siglas

AGO	Argonauta
Ago1	Argonauta 1
Ago2	Argonauta 2
AMP	<i>Adenocarcinoma of Vater ampulla</i> ou Adenocarcinoma de papila de Vater
AUC	<i>Area under the curve</i>
Avidin-PE	Avidina-Peroxidase
BD	Bem diferenciado
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
DGCR8	<i>Di George syndrome critical region 8</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> (microRNA de fita dupla)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELOSA	<i>Enzyme Linked Oligosorbent Assay</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIE-HRMS	<i>Flow Injection Electrospray High Resolution Mass Spectrometry</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HCB	Hospital das Clínicas de Botucatu
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IQR	<i>Interquantile Range</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MD	<i>Moderately differentiated</i> ou Moderadamente diferenciado
min	Minutos
mirDIP	<i>microRNA Data Integration Portal</i>
miR(s) ou miRNA(s)	Micro ácido ribonucleico

mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSEA	<i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADP⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> ou adenocarcinoma ductal pancreático
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PD	<i>Poorly differentiated</i> ou Pouco diferenciado
Pitx2	<i>Pituitary homeobox 2</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
pré-miRNA	miRNA precursor em forma de grampo (<i>hairpin</i>)
pri-miRNA	Transcrito longo primário de miRNA
RPM	Rotação por minuto (unidade de rotação em centrífuga)
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
s	Segundos
SPRY	<i>Sprouty proteins</i>
TCA	<i>tricarboxylic acid cycle</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	<i>T cell antigen receptor</i>
TRBP	<i>transactivating response RNA-binding protein</i>
UHPLC	<i>ultra-high-performance liquid chromatography</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não traduzida)
WD	<i>Well differentiated</i>

Lista de símbolos

~	Aproximadamente
g	Força gravitacional
°C	Grau Celsius
kDa	<i>kilodaltons</i>
®	Marca registrada
≥	Maior ou igual a
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
<i>m/z</i>	<i>Mass to charge</i>
ng	Nanograma
%	Porcentagem
vs	<i>Versus</i>

Sumário

1. Capítulo I	1
1.1. Introdução	1
1.1.1. Carcinomas de pâncreas	1
1.1.2. microRNAs como biomarcadores no câncer	2
1.1.3. microRNAs em carcinomas de pâncreas	4
1.1.4. microRNAs circulantes	5
1.2. Justificativa	8
1.3. Objetivos	9
1.4. Materiais e Métodos	10
1.4.1. Aspectos éticos	10
1.4.2. Critérios de inclusão e exclusão de pacientes	10
1.4.3. Amostras	10
1.4.3.1. Coleta e armazenamento de tecido	13
1.4.3.2. Coleta, separação e armazenamento de plasma	13
1.4.4. Análise molecular	13
1.4.4.1. Extração de RNA	13
1.4.4.2. Quantificação e qualidade do RNA	16
1.4.4.3. Quantificação de expressão de microRNAs	16
1.4.5. Análise de dados	17
1.4.5.1. Processamento de dados de expressão de microRNAs..	17
1.4.5.2. Predição de alvos de microRNAs	17
1.5. Manuscrito. “microRNA global expression profile of liquid and tissue biopsies from patients with pancreatic carcinomas”	20
1.6. Referências (Capítulo I)	68
2. Capítulo II	72
2.1. Manuscrito. “Biopsy and blood plasma metabolomics can distinguish between different types of pancreatic cancer.”	75
3. Conclusões	99

4. Considerações finais	101
5. Anexos	102
5.1. Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP ..	102
5.2. Manuscrito. “Predicting the metabolomic impact of deregulated microRNAs in tumour and plasma from patients with lung squamous cell carcinoma.”	107

1. Capítulo I

Este capítulo refere-se ao projeto intitulado “Perfil de expressão global de microRNAs em plasma e tumor de pacientes com carcinomas de pâncreas”. Os resultados correspondentes ao projeto estão apresentados adiante no formato de manuscrito científico (**item 1.5**).

1.1. Introdução

1.1.1. Carcinomas de pâncreas

Os carcinomas do pâncreas representam a sétima causa mais frequente de morte por câncer em homens e mulheres, levando a óbito mais de 432 mil pacientes a cada ano, mundialmente (1). As estatísticas globais mostraram esses carcinomas como o 11º câncer mais comum, com mais de 459 mil novos casos no ano de 2018 (1). No Brasil, o carcinoma de pâncreas é responsável por aproximadamente 2% de todos os cânceres, com a ocorrência de mais de 12.000 casos novos a cada ano, e 4% do total de mortes por câncer, sendo a sexta causa mais frequente de morte câncer em homens e mulheres. Em 2018 foram registradas 11.858 mortes pela doença (2, 3). O desenvolvimento dos carcinomas de pâncreas está relacionado a fatores de risco como etilismo, tabagismo, obesidade, diabetes e pancreatite crônica (4).

Um dos principais problemas com o carcinoma pancreático é a dificuldade de detecção e diagnóstico destes tumores, estando associada ao diagnóstico tardio e, consequentemente, uma alta taxa de mortalidade (5). O tratamento padrão disponível é a cirurgia, porém apenas 10-20% dos pacientes sem doença metastática são elegíveis para a ressecção do tumor (6). Os pacientes que apresentam doença metastática e não são indicados à cirurgia (cerca de 50-60%) podem ser submetidos à quimioterapia ou quimioterapia combinada com radioterapia a fim de prolongar a sobrevida e aliviar os sintomas clínicos (7). Existem ainda os pacientes que apresentam tumores com bordas ressecáveis,

chamados de *borderlines*: ao momento do diagnóstico eles não são elegíveis à ressecção cirúrgica devido ao envolvimento do tumor com a vasculatura próxima, porém são tratados primeiramente com quimioterapia para redução do tamanho do tumor e são posteriormente submetidos à cirurgia (8).

O tipo histológico adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) compreende cerca de 96% dos casos e os outros tumores pancreáticos incluem carcinomas periampulares (9). Em relação aos carcinomas periampulares, ~12% surgem do complexo ampular (distal ao encontro dos ductos biliar e pancreático) e são classificados como adenocarcinoma de papila de Vater (AMP) (10). O principal tratamento também é a ressecção cirúrgica do tumor, porém ainda existe grande dificuldade em diferenciá-lo dos demais tipos periampulares no pré-operatório (10). No entanto, o adenocarcinoma de papila de Vater apresenta melhor prognóstico (com uma taxa de sobrevida em 5 anos > 45%) e detecção precoce quando comparado ao adenocarcinoma ductal pancreático (10).

Entender as diferenças e estudar as particularidades moleculares dos tipos histológicos adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de papila de Vater podem ajudar na detecção precoce e no direcionamento do tratamento destes pacientes.

1.1.2. microRNAs como biomarcadores no câncer

microRNAs (miRNAs) são RNAs pequenos, de 18-22 nucleotídeos de comprimento, não codantes e que desempenham um papel importante como reguladores da expressão gênica (11). A biogênese miRNAs através da via canônica se inicia com um transcrito longo primário (pri-miRNA) com centenas de pares de bases em forma de *stem-loop* sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir da sequência de DNA. O pri-miRNA é então clivado pela ribonuclease RNase III Drosha, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*), o que resulta em uma estrutura precursora (pré-miRNA) em forma de grampo (*hairpin*) de 60-100 nucleotídeos de comprimento (12). A molécula precursora é exportada, por intermédio da proteína Exportina 5,

do núcleo para o citoplasma, onde é clivada pela enzima RNase III Dicer. A estrutura de *haipin* é desdobrada em uma estrutura madura de miRNA fita dupla de ~18-22 nucleotídeos (dsRNA), composto pelo miRNA maduro guia e pela fita complementar passageira. Tais sequências são nomeadas de acordo com a fita precursora, uma proveniente da fita 5' e uma da fita 3' (por exemplo, miR-125a-5p e miR-125a-3p) (11, 13).

A fita de miRNA maduro com mais ligações de afinidade/estabilidade para a proteína Argonata é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (em inglês RISC, *RNA-Induced Silencing Complex*), composto por uma família de proteínas chamada Argonata (Ago 1 e Ago 2) e pela proteína de ligação ao RNA (em inglês TRBP, *transactivating response RNA-binding protein*) (14). O complexo é responsável por orientar o miRNA para o RNA mensageiro (mRNA) alvo. A outra fita de miRNA é geralmente degradada; entretanto, em alguns casos, ambas as fitas podem ser funcionais (15).

Em humanos, a regulação da expressão gênica ocorre predominantemente por meio do pareamento de bases das extremidades 5' do miRNA maduro com a extremidade 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA alvo, levando, na maioria dos casos, à inibição da tradução ou à degradação do mRNA (11, 16). Na posição dos nucleotídeos de 2-7 da região 5' do miRNA está situada a sequência *seed*, região essencial para o pareamento e que permite aos miRNAs regularem um grande número de genes (11, 17). A predição de alvos regulados por miRNAs ocorre através da identificação de mRNA com complementaridade conservada à sequência *seed* do miRNA (17). Até o momento, existem 2.654 miRNAs maduros anotados e mapeados no genoma humano (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>).

Os miRNAs estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, tais como o desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular (18-20) e em mecanismos de oncogênese (21-23). A descoberta dessas moléculas como importantes reguladores da expressão gênica e seu papel na carcinogênese humana têm os indicado como candidatos ideais a biomarcadores

diagnósticos, prognósticos e como alvos terapêuticos potenciais no câncer (24-30). Além disso, miRNAs são mais estáveis do que mRNAs, sua expressão é tecido-específica e são facilmente detectados utilizando pequenas quantidades de RNA.

Amostras biológicas obtidas através de biópsia de tecido são frequentemente utilizadas para caracterização de tumores, porém existem restrições na frequência de amostragem e uma representação incompleta do tamanho e características do tumor (31). Dessa maneira, amostras extraídas de fluídos corporais, como plasma, obtidas através de técnica minimamente invasiva (conhecida como biópsia líquida), apresentam componentes tumorais que podem auxiliar no diagnóstico precoce, monitoramento e progressão do câncer.

Os principais componentes presentes no sangue periférico que podem fornecer informações sobre os tumores compreendem células tumorais circulantes, DNA circulante livre de célula, DNA tumoral circulante, RNA circulante livre de célula (que contém principalmente pequenos RNAs e RNAs mensageiros), vesículas extracelulares circulantes, plaquetas, proteínas e metabólitos (31). De fato, estudos recentes têm demonstrado a utilidade de miRNAs como biomarcadores minimamente invasivos na detecção de células tumorais circulantes (32-35). Dessa maneira, a análise global de expressão de miRNAs, específicos ao tecido do tumor e circulantes (livres no plasma), integrada à identificação de mRNAs-alvo regulados por miRNAs, deve levar à elucidação de vias moleculares desreguladas e associadas à patogênese dos carcinomas de pâncreas.

1.1.3. microRNAs em carcinomas de pâncreas

Alguns estudos têm mostrado a expressão de miRNAs em carcinomas de pâncreas, porém ainda são necessárias mais informações a respeito dos mecanismos pelos quais os miRNAs podem regular vias moleculares potencialmente envolvidas na tumorigênese, progressão e metástase de carcinomas de pâncreas. Um estudo de expressão global de miRNAs comparou 10 casos de adenocarcinoma ductal pancreático, 7 casos de pancreatite crônica e 7 tecidos normais como controle e mostrou que os níveis de expressão de um grupo de 20

miRNAs foram capazes de diferenciar esses três tipos de tecido. Além disso, os autores identificaram os miRNAs miR-216 e miR-217 expressos em tecido pancreático normal e com perda de expressão em tecido pancreático tumoral, sendo que a expressão desses dois miRNAs sugere uma característica do tecido pancreático normal (36).

Outro estudo comparou 65 amostras de adenocarcinoma ductal pancreático, 65 amostras pareadas de tecido normal adjacente e 42 amostras de pancreatite crônica (37). Nessas amostras foram identificados dois grupos de miRNAs diferencialmente expressos, sendo um capaz de discriminar adenocarcinoma ductal pancreático de pancreatite crônica e pâncreas normal (miR-21, miR-221, miR-222, miR-181, miR-181b, miR-181d e miR-155) e outro com poder de predição de sobrevida a curto e a longo prazos (miR-452, miR-105, miR-127, miR-518a, miR-187 e miR-30a-3p) (37).

Os altos níveis de expressão dos miRNAs miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222 em amostras de adenocarcinoma pancreático também foram relacionados com uma pior sobrevida (38). Outro estudo analisou 17 pares de amostras de carcinomas pancreáticos e tecidos histologicamente normais e identificou oito miRNAs desregulados (miR-196a, miR-190, miR-186, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b e miR-95), os quais desempenham importantes funções e compartilham vias moleculares durante a patogênese desse carcinoma (39).

1.1.4. microRNAs circulantes

Tem sido demonstrado que miRNAs extracelulares circulam pelo sangue de pacientes com câncer, podendo assim, servir como novos marcadores diagnósticos. A primeira evidência que se tem registro a respeito de miRNAs circulantes foi sobre os níveis altos de expressão do miR-21 no soro de pacientes com linfoma difuso de grandes células B, significativamente relacionado com melhora da sobrevida livre de recidiva (40).

Os miRNAs circulantes podem estar envoltos por complexos lipídicos ou lipoproteicos (microvesículas), como exossomos, sendo assim altamente estáveis

na circulação sanguínea (34). A incorporação dos miRNAs ao plasma ocorre através desses complexos extracelulares ou junto a proteínas de ligação ao RNA, como proteínas da família AGO ou HDL (41). Apesar da presença e atividade da ribonuclease RNase no plasma, foi demonstrado que os miRNAs circulantes são resistentes à degradação pois, por meio de centrifugação diferencial e cromatografia de exclusão por tamanho, foram identificadas duas populações de miRNAs circulantes: cerca de 90% na forma livre de vesículas, ou seja, acoplados aos complexos AGO2 e uma pequena porção (~10% do total) encapsulados em vesículas (35, 42, 43). Dessa maneira, estratégias de análise de expressão de miRNAs circulantes na forma livre se faz importante na busca por potenciais biomarcadores em carcinomas.

Estudos têm apresentado o crescente papel dos miRNAs circulantes como biomarcadores em pacientes com carcinomas de pâncreas. Por exemplo, foi observada uma alta expressão dos miRNAs miR-21, miR-210, miR-155 e miR-196a no plasma de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático quando comparados com indivíduos sem a doença (44). A expressão do miR-196a no soro demonstra o potencial valor desse miRNA como marcador de pior prognóstico para pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (45). Amostras de plasma de pacientes com câncer de pâncreas também apresentaram níveis significativamente elevados do miR-210 quando comparadas com amostras de indivíduos saudáveis (46). O miR-18a circulante no plasma de pacientes com câncer de pâncreas pode ser um biomarcador útil para rastreio e monitoramento do tumor (47) e uma assinatura de 7 miRNAs (miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 e miR-191) foi demonstrada útil para diferenciar pacientes com pancreatite crônica daqueles com câncer de pâncreas (48).

Apesar destes e outros estudos, ainda há necessidade de integração de dados de expressão de miRNAs e mRNAs-alvo regulados por miRNAs, fundamental para a elucidação de vias moleculares em carcinomas de pâncreas. As evidências da literatura indicam que miRNAs circulantes podem ser excelentes biomarcadores para monitorar o desenvolvimento e progressão do tumor, pois

podem ser detectados nos fluídos corporais mesmo após longos períodos de armazenamento das amostras (49). Da mesma forma, miRNAs circulantes podem representar biomarcadores com valor potencial para melhorar a detecção da doença, determinação do prognóstico/sobrevida ou predição de resposta ao tratamento em carcinomas de pâncreas. Considerando que a desregulação de miRNAs pode promover a iniciação e progressão tumoral, tais moléculas podem ser biomarcadores robustos para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas para pacientes com carcinomas de pâncreas.

4. Considerações finais

Este foi um estudo de identificação de alterações na expressão de miRNAs no plasma e no tumor de pacientes com carcinoma de pâncreas, com diagnóstico de adenocarcinoma ductal pancreático ou adenocarcinoma de papila de Vater, com etapa adicional de identificação da expressão do metaboloma nas mesmas amostras. Apesar do número limitado de amostras analisadas, os resultados enriqueceram com novas informações e levaram à identificação de miRNAs e de metabólitos diferencialmente expressos e as alterações puderam ser detectadas e quantificadas no plasma dos pacientes. Esses resultados reforçam dados da literatura no sentido de indicar a aplicação das biópsias líquidas como estratégia diagnóstica molecular. Além disso, a integração de dados moleculares e de metabolismo deste estudo, quando validadas, poderá contribuir para o desenvolvimento de potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce de pacientes com carcinomas de pâncreas.

References

1. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.
2. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(1):5-18.
3. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005;309(5740):1519-24.
4. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
5. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):203-22.
6. Tomasetti M, Santarelli L, Neuzil J, Dong L. MicroRNA regulation of cancer metabolism: role in tumour suppression. *Mitochondrion*. 2014;19 Pt A:29-38.
7. Anderton B, Camarda R, Balakrishnan S, Balakrishnan A, Kohnz RA, Lim L, et al. MYC-driven inhibition of the glutamate-cysteine ligase promotes glutathione depletion in liver cancer. *EMBO Rep*. 2017;18(4):569-85.
8. Koufaris C, Valbuena GN, Pomyen Y, Tredwell GD, Nevedomskaya E, Lau CH, et al. Systematic integration of molecular profiles identifies miR-22 as a regulator of lipid and folate metabolism in breast cancer cells. *Oncogene*. 2016;35(21):2766-76.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
10. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
12. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2018;10(8).
13. Gesthalter YB, Vick J, Steiling K, Spira A. Translating the transcriptome into tools for the early detection and prevention of lung cancer. *Thorax*. 2015;70(5):476-81.
14. Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Carnero A, Paz-Ares L. Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(9):671-82.
15. Yu L, Li K, Zhang X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*. 2017;8(70):115774-86.
16. Cameron SJ, Lewis KE, Beckmann M, Allison GG, Ghosal R, Lewis PD, et al. The metabolomic detection of lung cancer biomarkers in sputum. *Lung Cancer*. 2016;94:88-95.
17. Paes de Araújo R, Berton N, Seneda AL, Felix TF, Carvalho M, Lewis KE, et al. Defining Metabolic Rewiring in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Metabolites*. 2019;9(3).
18. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Lianidou E, Mourelatos Z. Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA*. 2009;15(8):1443-61.
19. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
20. Inamura K, Ishikawa Y. MicroRNA In Lung Cancer: Novel Biomarkers and Potential Tools for Treatment. *J Clin Med*. 2016;5(3).
21. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*. 2015;15:38.
22. Huang S, Chaudhary K, Garmire LX. More Is Better: Recent Progress in Multi-Omics Data Integration Methods. *Front Genet*. 2017;8:84.

23. Creixell P, Reimand J, Haider S, Wu G, Shibata T, Vazquez M, et al. Pathway and network analysis of cancer genomes. *Nat Methods*. 2015;12(7):615-21.
24. Ma'ayan A. Introduction to network analysis in systems biology. *Sci Signal*. 2011;4(190):tr5.
25. León LE, Calligaris SD. Visualization and Analysis of MiRNA-Targets Interactions Networks. *Methods Mol Biol*. 2017;1509:209-20.
26. Pan X, Shen HB. Inferring Disease-Associated MicroRNAs Using Semi-supervised Multi-Label Graph Convolutional Networks. *iScience*. 2019;20:265-77.
27. Ammah AA, Do DN, Bissonnette N, Gévry N, Ibeagha-Awemu EM. Co-Expression Network Analysis Identifies miRNA-mRNA Networks Potentially Regulating Milk Traits and Blood Metabolites. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
28. Zhou G, Xia J. Using OmicsNet for Network Integration and 3D Visualization. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2019;65(1):e69.
29. Felix TF, Lopez Lapa RM, de Carvalho M, Bertoni N, Tokar T, Oliveira RA, et al. MicroRNA modulated networks of adaptive and innate immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217421.
30. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, et al. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D360-D70.
31. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30.
32. Pons P, Latapy M. Computing Communities in Large Networks Using Random Walks. In: Yolum., Güngör T., Gürgen F., C. Ö, editors. *Computer and Information Sciences - ISCIS 2005* ISCIS 2005 Lecture Notes in Computer Science. 3733: Springer, Berlin, Heidelberg; 2005.
33. Batchelor E, Mock CS, Bhan I, Loewer A, Lahav G. Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage. *Mol Cell*. 2008;30(3):277-89.
34. Choi H, Na KJ. A Risk Stratification Model for Lung Cancer Based on Gene Coexpression Network and Deep Learning. *Biomed Res Int*. 2018;2018:2914280.
35. Ha MJ, Banerjee S, Akbani R, Liang H, Mills GB, Do KA, et al. Personalized Integrated Network Modeling of the Cancer Proteome Atlas. *Sci Rep*. 2018;8(1):14924.
36. Yuan HL, Wang T, Zhang KH. MicroRNAs as potential biomarkers for diagnosis, therapy and prognosis of gastric cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3891-900.
37. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(7):451-9.
38. Voellenkle C, Rooij J, Guffanti A, Brini E, Fasanaro P, Isaia E, et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA*. 2012;18(3):472-84.
39. Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Stevens JR, Slattery ML. Association of cigarette smoking and microRNA expression in rectal cancer: Insight into tumor phenotype. *Cancer Epidemiol*. 2016;45:98-107.
40. Yasui T, Yanagida T, Ito S, Konakade Y, Takeshita D, Naganawa T, et al. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Sci Adv*. 2017;3(12):e1701133.
41. Camps C, Saini HK, Mole DR, Choudhry H, Reczko M, Guerra-Assunção JA, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol Cancer*. 2014;13:28.

42. Pekarsky Y, Balatti V, Palamarchuk A, Rizzotto L, Veneziano D, Nigita G, et al. Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(18):5071-6.
43. Yan B, Guo Q, Fu FJ, Wang Z, Yin Z, Wei YB, et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Onco Targets Ther*. 2015;8:539-48.
44. Wang C, Bian Z, Wei D, Zhang JG. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2011;352(1-2):197-207.
45. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754:3-29.
46. Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, et al. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6505-11.
47. Mehta A, Dobersch S, Romero-Olmedo AJ, Barreto G. Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(2):229-41.
48. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. *Transl Res*. 2015;165(1):74-90.
49. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
50. Vettore L, Westbrook RL, Tennant DA. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2019.
51. Kim M, Gwak J, Hwang S, Yang S, Jeong SM. Mitochondrial GPT2 plays a pivotal role in metabolic adaptation to the perturbation of mitochondrial glutamine metabolism. *Oncogene*. 2019;38(24):4729-38.
52. Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, Sneddon TP. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet*. 2008;123(4):321-32.
53. Takemura K, Fukushima H, Ito M, Kataoka M, Nakanishi Y, Sakamoto K, et al. Prognostic significance of serum γ -glutamyltransferase in patients with advanced urothelial carcinoma. *Urol Oncol*. 2019;37(2):108-15.
54. Kubo H, Hanaoka K, Kuriki Y, Komatsu T, Ueno T, Kojima R, et al. Rapid detection of metastatic lymph nodes of colorectal cancer with a gamma-glutamyl transpeptidase-activatable fluorescence probe. *Sci Rep*. 2018;8(1):17781.
55. Svensson RU, Parker SJ, Eichner LJ, Kolar MJ, Wallace M, Brun SN, et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat Med*. 2016;22(10):1108-19.
56. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):227-32.
57. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:193-230.
58. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, et al. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate*. 2007;67(15):1654-63.
59. Neubauer E, Latif M, Krause J, Heumann A, Armbrust M, Luehr C, et al. Up regulation of the steroid hormone synthesis regulator HSD3B2 is linked to early PSA recurrence in prostate cancer. *Exp Mol Pathol*. 2018;105(1):50-6.
60. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000(27):67-73.
61. Huang Y, Trentham-Dietz A, García-Closas M, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Hampton JM, et al. Association of CYP1B1 haplotypes and breast cancer risk in Caucasian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1321-3.

62. Bardowell SA, Duan F, Manor D, Swanson JE, Parker RS. Disruption of mouse cytochrome p450 4f14 (Cyp4f14 gene) causes severe perturbations in vitamin E metabolism. *J Biol Chem*. 2012;287(31):26077-86.
63. Imaoka S, Yoneda Y, Sugimoto T, Hiroi T, Yamamoto K, Nakatani T, et al. CYP4B1 is a possible risk factor for bladder cancer in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277(3):776-80.
64. Holmgren A. Regulation of ribonucleotide reductase. *Current Topics in Cellular Regulation*. 191981. p. 47-76.
65. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-75.
66. Mohr LC, Rodgers JK, Silvestri GA. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anticancer Res*. 2003;23(3A):2111-24.
67. Yuan LH, Meng LP, Ma WW, Li S, Feng JF, Yu HL, et al. The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and fruit and vegetable consumption in antioxidant parameters in healthy subjects. *Br J Nutr*. 2012;107(6):928-33.
68. Schneider J, Bernges U, Philipp M, Woitowitz HJ. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Lett*. 2004;208(1):65-74.
69. Tang SC, Wu CH, Lai CH, Sung WW, Yang WJ, Tang LC, et al. Glutathione S-transferase mu2 suppresses cancer cell metastasis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2013;11(5):518-29.
70. Ritchie KJ, Henderson CJ, Wang XJ, Vassieva O, Carrie D, Farmer PB, et al. Glutathione transferase pi plays a critical role in the development of lung carcinogenesis following exposure to tobacco-related carcinogens and urethane. *Cancer Res*. 2007;67(19):9248-57.
71. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett*. 2018;433:33-42.
72. Zhang X, Zhu J, Xing R, Tie Y, Fu H, Zheng X, et al. miR-513a-3p sensitizes human lung adenocarcinoma cells to chemotherapy by targeting GSTP1. *Lung Cancer*. 2012;77(3):488-94.
73. Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet*. 2004;49(3):134-40.
74. Yu C, Yao Z, Dai J, Zhang H, Escara-Wilke J, Zhang X, et al. ALDH activity indicates increased tumorigenic cells, but not cancer stem cells, in prostate cancer cell lines. *In Vivo*. 2011;25(1):69-76.
75. Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest*. 2010;90(2):234-44.
76. Ajani JA, Wang X, Song S, Suzuki A, Taketa T, Sudo K, et al. ALDH-1 expression levels predict response or resistance to preoperative chemoradiation in resectable esophageal cancer patients. *Mol Oncol*. 2014;8(1):142-9.
77. Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(1):75-87.
78. Clark DW, Palle K. Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets. *Ann Transl Med*. 2016;4(24):518.
79. Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ, Naji T, Bidgoli SA. Retinoids and their biological effects against cancer. *Int Immunopharmacol*. 2014;18(1):43-9.
80. Chen MC, Hsu SL, Lin H, Yang TY. Retinoic acid and cancer treatment.

Biomedicine (Taipei). 2014;4:22.

81. Quintero Barceinas RS, García-Regalado A, Aréchaga-Ocampo E, Villegas-Sepúlveda N, González-De la Rosa CH. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. *Biomed Res Int.* 2015;2015:404368.