

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese será disponibilizado
somente a partir de 28/02/2021.



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

Tainara Francini Felix

**Caracterização funcional de microRNAs em carcinoma
pancreático**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Profa.Dra.Patrícia Pintor dos Reis
Coorientador: Prof.Dr.Robson Francisco Carvalho

**Botucatu
2019**

Tainara Francini Felix

Caracterização funcional de microRNAs em carcinoma
pancreático

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis
Coorientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 9/7500

Felix, Tainara Francini.

Caracterização funcional de microRNAs em carcinoma pancreático / Tainara Francini Felix. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Patrícia Pintor dos Reis

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20000006

1. Pâncreas - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Biologia molecular. 4. Expressão gênica.

Palavras-chave: Carcinoma Pancreático; microRNAs; vias moleculares.

**“Aquilo que eu escuto eu esqueço,
Aquilo que eu vejo eu lembro,
Aquilo que eu faço eu aprendo.”**

Confúcio

Dedicatória

Aos meus avôs, **CICERO** e **FRANÇA** (*in memoriam*),
Que sempre me deram todo amor do mundo,
Que me ensinaram que eu poderia ir além,
Que sempre foram e sempre serão o meu mais belo exemplo!

A minha mãe, **SANDRA**,
Que me ouviu e teve os melhores conselhos,
Que me deu amor e carinho em todos os momentos,
E sempre me mostrou que desistir não era opção!

Ao meu irmão, **FELIPE**,
Que sempre esteve ao meu lado,
Apoiando e incentivando incondicionalmente!

Se hoje estou aqui, é porque vocês acreditaram e incentivaram
o meu sonho! ***EU AMO VOCÊS!***

Agradecimento Especial

A **DEUS**, por me dar o dom da vida,
Por guiar meus passos em seus caminhos,
Por me proteger de todo o mal,
E sempre me mostrar que seus planos são melhores que o meu!

**“Muitos são os planos do coração do homem, mas é o
propósito do Senhor que permanecerá” *Provérbios 19:21***

Agradecimento

A Profa. Dra. **PATRICIA PINTOR REIS**,
minha orientadora, que foi muito mais que apenas uma orientadora.

Agradeço por me receber em seu grupo de pesquisa,
por acreditar em minha capacidade,
por confiar em mim nossos projetos,
por sempre estar presente e pronta a ajudar!

Agradeço também por seu carinho
e companheirismo ao longo desta trajetória,
foi e é muito bom aprender com você!

Serei eternamente grata por tudo que fez por mim ao longo
desta caminhada!

OBRIGADA!

Agradecimentos

A minha mãe **SANDRA**, que me sempre me apoiou e incentivou a lutar pelos meus sonhos. Por ser calma em meio à tempestade, e me ensinar que a fé move montanhas! Obrigada por me ouvir, quando eu falava e falava sobre tudo o que acontecia no “meu projeto”, mesmo sem entender. E obrigada, por tudo o que fez para que esta caminhada se tornasse mais leve! Amo você!

Aos meus avôs **CICERO** e **FRANÇA** (*in memoriam*), que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, que foram meu porto seguro, e a certeza que tudo daria certo! E o meu eterno suporte para tudo! Obrigada por serem a minha fortaleza!

Ao meu irmão **ADILAN**, meus tios **SELMA**, **JULIANO** e **FERNANDA**, meus primos **ALLAN**, **DUDA** e **JÚLIA** e minha cunhada **FABIANE**, minha pequena grande família, obrigada pelo carinho, pelas palavras de incentivo, e por sempre acreditarem que eu seria capaz. Obrigada por serem a minha base e meu porto seguro.

Ao meu coorientador Dr. **ROBSON FRANCISCO CARVALHO**, agradeço muito por toda ajuda e apoio, pela disponibilidade em ajudar, e a amizade ao longo desses anos.

A equipe do **LABORATÓRIO NEOGENE** (*Dra. Sandra, Márcio, Ana Laura, Carolina F., Iael, Marco e Natália B.*), muito obrigada por toda ajuda sempre. Obrigada por cada dia que compartilhamos, sejam dividindo conhecimento ou apenas coisas do cotidiano, foi muito bom dividir estes momentos com vocês.

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

A **Dra. Cláudia**, por toda a ajuda na coleta dos dados clínicos

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

As amigas da **ERA JURÁSSICA do Neogene** (*Carol L., Maísa, Naiara, Natália B., Tatiane, Talita e Renata*) obrigada por terem me acolhido quando cheguei ao lab. e por até hoje

compartilharmos um pouquinho de nossas vidas, sempre levarei um pedaço de vocês comigo.

As primeiras amigas de **Botucatu** (*Aline, Natália P. e Sarita*) obrigada por todos os momentos que compartilhamos ao longo destes 10 anos, obrigarem por sempre estarem presente, mesmo que virtualmente.

Aos meus amigos **RAGATANGA** (*Amanda, Ariane, Barbara, Bruno, Coró, Duda, Giovanni, Jessica, Karen, Maria O, Marla, Natália, Paula e Vitória*), obrigada por serem exatamente como são, obrigada por estarem sempre presente, e por confiarem e acreditarem que eu conseguiria, eu amo vocês!

A **Natália B.**, amiga do lab. que virou amiga da vida, obrigada por me ouvir, apoiar e incentivar sempre. Obrigada por entender meus devaneios! Você é um presente que levarei sempre comigo.

A **Carol F.**, minha amiga e filha, que chegou ao lab. e embarcou comigo nesta viagem da Biologia celular, obrigada por me ajudar com cada escolha e por todas as imagens “celulares” deste projeto.

A **Sarita** por todas as caronas diárias, e muitas vezes mudar seu horário para que eu pudesse conciliar as caronas com os experimentos. Obrigada “*mano*”, você sempre será minha família Botucuda.

A **Natália Pegoraro**, minha amiga e psicóloga particular, obrigada por todo apoio sempre. Por ser luz e incentivo, todas as vezes que eu sentia que não conseguiria.

A **Júlia**, minha amiga e agora mãe do **Joaquim**, obrigada por sempre me ouvir e apoiar. Obrigada por ser suporte e alegria sempre.

Aos membros da banca de qualificação e banca de defesa, **Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto**, **Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior**, **Profa. Dra. Claudia Nishida Hasimoto**, **Profa. Dra. Nilva de Karla Cervigne Furlan** e **Profa. Dra. Luciana Schultz Amorim** pelos valorosos conselhos e sugestões para a melhoria dessa tese e para a elaboração dos artigos.

Aos colegas, **André**, **Cadu** e **Paula** por toda a ajuda na parte experimental com as linhagens celulares.

A toda equipe da **UNIPEX** por todo o auxílio no decorrer deste projeto.

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

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, muito obrigada.

A Capes pela bolsa de doutorado e a FAPESP pelo auxílio financeiro #2016-03905-2.

“Que eu sempre saiba expressar minha gratidão às pessoas que fazem a minha vida ser mais leve e bonita. Que estão ao meu lado no riso e na dor. Não quero mandar flores ou escrever textos quando elas não puderem mais receber. Quero ama-las e quero que saibam que são amadas. E bobeira morrer de orgulho. Bom é viver de amor!” Autor desconhecido.

Resumo

Introdução: O carcinoma de pâncreas apresenta altas taxas de mortalidade, geralmente associadas ao diagnóstico tardio da doença. MicroRNAs (miRNAs) são importantes reguladores da expressão gênica e têm sido apontados como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico no câncer. **Objetivos:** (1) identificar níveis de expressão de miRNAs em tumores de pacientes com câncer de pâncreas; (2) identificar, “*in silico*”, genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares envolvendo miRNAs e genes-alvo correspondentes; (3) realizar estudos funcionais “*in vitro*” para demonstrar experimentalmente os efeitos da desregulação de miRNAs nos potenciais de migração e invasão celulares. **Materiais e Métodos:** Foram incluídas 19 amostras de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) e 6 de adenocarcinoma de ampola de Vater (AMP), pareadas com tecido histologicamente normal. Além disso, 3 linhagens celulares de carcinoma pancreático (BxPC-3, Capan-2 e Panc-1) foram analisadas quanto ao seu perfil global de expressão de miRNAs. Em todas as amostras, o perfil de expressão de miRNAs foi determinado utilizando a plataforma GeneChip® 4.0 miRNAarrays. A validação “*in silico*” utilizou dados de transcriptoma do *The CancerGenome Atlas* (TCGA) (N=178 carcinomas pancreáticos e 4 tecidos histologicamente normais dos mesmos pacientes). A linhagem Panc-1 foi testada em ensaios de migração e invasão antes e depois da expressão dos miRNAs miR-148a-3p e miR-216b-5p por meio de moléculas miméticas. Análises computacionais utilizaram algoritmos de bioinformática para identificar genes-alvo regulados por miRNAs (miRNA Data Integration Portal, mirDIP) e vias moleculares envolvendo genes e miRNAs (ToppGenes). Adicionalmente, os genes-alvo dos miRNAs foram testados quanto ao seu valor prognóstico (SurvExpress). **Resultados:** Foram identificados diferentes perfis de expressão global de miRNAs entre tumores e controles normais e entre os subtipos de adenocarcinoma pancreático (PDAC e AMP). Os miRNAs que apresentaram o maior nível de desregulação, com expressão diminuída entre tecido tumoral e normal foram: miR-148a-3p, miR-216b-5p e miR-217. A análise de predição de genes-alvo e vias moleculares identificou um enriquecimento para vias do sistema imune inato e adaptativo em PDAC. A validação “*in silico*” (dados do TCGA) revelou um conjunto de genes-alvo (*PTPRC/KLRK1/SELL/KLRF1/HLA-DOA/RASGRP3/BTLA/BTNL9*) com expressão aumentada em PDAC e correlacionados com a pior sobrevida dos pacientes. Os ensaios funcionais demonstraram que o aumento da expressão dos miRNAs miR-148a-3p e miR-216b-5p diminuiu o potencial de migração celular da linhagem Panc-1. **Conclusões:** Os resultados desse estudo identificaram que perfis distintos de expressão de miRNAs, nos subtipos de carcinoma pancreático PDAC e AMP, modulam diferentes vias moleculares associadas à oncogênese. Os resultados sugerem que a modulação da expressão de miRNAs pode ter um impacto no desenvolvimento tumoral. Tais achados podem contribuir para a melhoria das estratégias de diagnóstico e tratamento de pacientes com carcinoma pancreático.

Abstract

Introduction: Pancreatic carcinoma is associated with high mortality rates, usually due to late disease diagnosis. MicroRNAs (miRNAs) are important gene expression regulators and have been identified as biomarkers with diagnostic, prognostic and therapeutic value in cancer. **Objectives:** (1) to identify miRNA expression levels in tumors of patients with pancreatic cancer; (2) to identify, *in silico*, miRNA target genes and molecular pathways involving miRNAs and corresponding target genes; (3) to perform *in vitro* functional studies to experimentally demonstrate the effects of miRNA dysregulation on cell migration and invasion. **Materials and Methods:** We included 19 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and 6 adenocarcinoma of Vater ampulla (AMP) samples, paired with histologically normal tissues. In addition, 3 pancreatic carcinoma cell lines (BxPC-3, Capan-2 and Panc-1) were analyzed for their global miRNA expression profile. miRNA expression profiles were determined using the GeneChip® 4.0 miRNA arrays platform. *In silico* validation used transcriptome data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (N = 178 pancreatic carcinomas and 4 histologically normal tissues from the same patients). The Panc-1 cell line was used for migration and invasion assays before and after miR-148a-3p and miR-216b-5p expression by mimetic molecules. Computational analyzes used bioinformatics algorithms to identify target genes regulated by miRNAs (miRNA Data Integration Portal, mirDIP) and molecular pathways involving genes and miRNAs (ToppGenes). In addition, the target genes of the miRNAs were tested for their prognostic value (SurvExpress). **Results:** Different global miRNA expression profiles between tumors and normal controls and between pancreatic adenocarcinoma (PDAC and AMP) subtypes were identified. The miRNAs that had the highest level of dysregulation, with decreased expression between tumor and normal tissue were: miR-148a-3p, miR-216b-5p and miR-217. Prediction analysis of target genes and molecular pathways identified an enrichment for innate and adaptive immune system pathways in PDAC. *In silico* validation (TCGA data) revealed a set of target genes (*PTPRC* / *KLRK1* / *SELL* / *KLRF1* / *HLA-DOA* / *RASGRP3* / *BTLA* / *BTNL9*) with increased expression in PDAC and correlated with worse patient survival. Functional assays demonstrated that increased expression of miR-148a-3p and miR-216b-5p decreased cell migration potential. **Conclusions:** Results of this study identified that distinct miRNA expression profiles in the PDAC and AMP pancreatic carcinoma subtypes modulate different molecular pathways associated with oncogenesis. The results suggest that modulation of miRNA expression may have an impact on tumor development. Such findings may contribute to improve diagnostic and treatment strategies for patients with pancreatic carcinoma.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ADEX – *Aberrantly differentiated endocrine exocrine*

AGO1 - Argonauta 1

AGO2 - Argonauta 2

AMP - Adenocarcinoma de ampola de Vater

ARID1A -*AT-rich interaction domain 1A*

ATCC -*American Type Culture Collection*

ATM -*ATM serine/threonine kinase*

BCL2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

BD - Bem diferenciada

BRCA1 – *Breast cancer 1*

BRCA2 - *Breast cancer 2*

BTLA - *B and T lymphocyte associated*

CA-19-9 - Antígeno de câncer 19-9

CCKBR- *Cholecystokinin B receptor*

CDC25B – *Cell division cycle 25B*

CDK- Ciclina dependente de quinase

CDKN2A/p16 -*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

cDNA - DNA Complementar

CELF2 - *CUGBP- and ETR-3-like family 2*

BRCs - Centros de Recursos Biológicos

CLL - Leucemia linfocítica crônica

CP- Carcinoma de pâncreas

CPM - *Counts per million*: esse valor reflete o número de leituras da sequência expressa de um gene, por milhão;

DGCR8 - *Di George syndrome critical region 8*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsRNA - RNA de fita dupla

DSMZ -*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

ELOSA -*Enzyme Linked Oligosorbent Assay*

FANCC - *FA complementation group C*

FANCG- *FA complementation group G*

FC - *Fold Change*

FDR - *False discovery rate*

FFPE – Fixado(a) em formalina e embebido(a) em parafina

FOXA2 - *Forkhead box A2*

GNAS- *GNAS complex locus*

HLA-DOA - *Major histocompatibility complex, class II, DO alpha*

HMGA1- *High mobility group AT-hook 1*

HRAS - *HRas proto-oncogene, GTPase*

INCA - Instituto Nacional do Câncer

KDM6A - *Lysine demethylase 6A*

KLRK1 – *Killer cell lectin like receptor K1*

K-RAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologp53

MALAT-1 - *Metastasisassociatedlung adenocarcinoma transcript 1*

MD - Moderadamente diferenciada;

MEK - *Mitogen-activated protein kinase kinase 1*

miR(s) ou miRNA(s)– microRNAs

mirDIP - *microRNA Data Integration Portal*

MNX1 - *Motor neuron and pancreas homeobox 1*

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

N - Normal

NCM - Neoplasia cística mucinosa

NEUROD1 - *Neuronal differentiation 1*

NIP - Neoplasia intraepitelial pancreática

NKX2-2 - *NK2 homeobox 2*

NPIM - Neoplasia papilar intraductalmucinosa

NR5A2- *Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2*

PALB2 - *Partner and localizer of BRCA2*

PBRM1- *Polybromo 1*

PD - Pobremente diferenciada.

PDAC- Adenocarcinoma ductal pancreático

PDX1- *Pancreaticand duodenal homeobox 1*

pré-miRNA–Precursor de miRNA(*stem loop, hairpin?*)

pri-miRNA - Transcrito primário longo (microRNA primário?)

PTPRC - *Protein tyrosine phosphatase, receptor type C*

RAP1A - *Member of RAS oncogene family*

RASGRP3 - *RAS guanyl releasing protein3*

RBPJL- *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region like*

RISC - *RNA-InducedSilencingComplex*

RNAs - Ácido Ribonucleico

RNA-Seq - Sequenciamento do transcrito

RNF43 - *Ring finger protein 43*

ROCK1 - *ρ -associatedcoiled-coilcontainingproteinkinase 1*

RT - Transcrição reversa

RT-qPCR - Reação de Amplificação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

SELL - *Selectin L*

SFB - Sorobovino fetal

SMAD4 - *SMAD family member 4*

STR - Sequências curtas repetidas em tandem (*Short Tandem Repeats*,)

TAC -*Transcriptome Analysis Console*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TGF β R2- *Transforming growth factor beta receptor 2*

TP53 - *Tumor protein p53*

TPT1 -*Translationallycontrolled tumor protein*

TRBP -*Trans-activator RNA BindinProtein*

UICC - União Internacional para o Controle do Câncer

UNG - Uracil-N-Glicosilase

UTR - Região não traduzida

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

~ - Aproximadamente

< - Menor que

> - Maior que

$\leq$ - Menor ou igual a

$\geq$ - Maior ou igual a

°C -Graus Celsius

min - Minuto

mL - Mililitro

mm -Milímetro

ng - Nanograma

RPM - Rotação por minuto (unidade de rotação em centrífuga)

s - Segundo

μL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental dos ensaios com as linhagens celulares.....	48
Figura 2: Morfologia das linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático.....	49
Figura 3: Resultado da análise de micoplasma, visualizado em gel de agarose 1,5%..	60
Figura 4: Exemplo representativo dos resultados dosequeciamento (análise de STR), obtidos para o marcador D7S820. (A)mostra o controle positivo com amplificação dos picos contendo 8 e 11 repetições de STR. (B, C e D)mostrama amplificação do marcador D7S820 nas linhagens celulares Panc-1, BxPC-3 e Capan-2, respectivamente.	62
Figura 5: Resultados de autenticação das linhagens celulares para todos os marcadores testados, mostrando 100% de correspondência com perfis de STR do banco de dados DSMZ. O número de repetições, para cada marcador, é mostrado nos painéis correspondentes.	63
Figura 6: Curva de Crescimento das células Panc-1, expresso em porcentagem em relação ao fechamento da monocamada em poço de $1,9\text{cm}^2$, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96H após plaqueamento.....	69
Figura 7: Análise da expressão do miR-218a-3p por RT-qPCR. (A) 24 horas após transfecção da molécula de miRNA <i>mimics</i> ; (B) 48 horas após transfecção da molécula de miRNA <i>mimics</i>	70
Figura 8: A restauração da expressão dos miRNAs: miR-148a-3p e miR-216b-5p diminui o potencial de migração da linhagem celular Panc-1. (A) Imagens representativas das células Panc-1 transfectadas com miR-148a-3p, miR-216b-5p, controle (lipofectamina) e células não transfectadas, nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão. (B) Análise semi-quantitativa da migração celular das células Panc-1 transfectadas com miR-148a-3p mensurada pelo método de <i>Wound Healing</i> . (C)	

Análise da migração celular das células Panc-1transfectadas com miR-216b-5p mensurada pelo método de *Wound Healing*. Em ambos, o fechamento do corte foi quantificado nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h após a inserção da lesão pela medida das áreas não cicatrizadas, utilizando o software ImageJ. 73

Figura 9: A restauração da expressão dos miRNAs miR-148a-3p e miR-216b-5p não alterou o potencial de invasão das células Panc-1. 74

Figura 10: Combinação de genes com valor prognóstico em câncer de pâncreas. Os resultados para o banco de dados GSE21501 estão ilustrados nos painéis (A) e (B) e para o banco de dados do TCGA em (C) e (D). Esses painéis mostram, respectivamente, os níveis de expressão de cada gene e as curvas de Kaplan-Meier correspondentes. Em ambos os bancos de dados, a expressão aumentada dos genes, em combinação, está correlacionada com a menor sobrevida dos pacientes. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações do doador e características das linhagens celulares, sendo que todas foram estabelecidas a partir de tumores primários.....	49
Tabela 2: Perfil das linhagens celulares utilizadas nesse estudo, mostrando o número de repetições de STR detectado no genoma de cada linhagem. Esse perfil mostrou-se 100% concordante com os bancos de dados.	61
Tabela 3: miRNAs diferencialmente expressos nas linhagens celulares Panc-1, BxPC-3 e Capan-2 vs. referência normal. Os miRNAs estão mostrados de acordo com a significância estatística <i>p-val</i>	64
Tabela 4: 75 genes-alvo dos miRNAs (miR-148a-3p e miR-216b-5p) validados " <i>in silico</i> " no banco de dados TCGA, como desregulados em câncer de pâncreas (N=178) comparado com tecidos pancreáticos histologicamente normais (N=4).	75
Tabela 5: Vias moleculares identificadas utilizando os 75 genes desregulados em câncer de pâncreas (dados do TCGA).	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Carcinoma de pâncreas.....	1
1.2. Alterações genéticas em carcinoma de pâncreas.....	4
1.3. O transcrito não codificador e o câncer	7
1.3.1. MicroRNAs	8
1.4. miRNAs no câncer	10
1.4.1. MicroRNAs em carcinoma de pâncreas	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos Gerais	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. CAPÍTULO I.....	18
MicroRNA modulated networks of adaptive and innate immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma.....	18
Introduction	20
Materials and methods.....	22
Results	27
Discussion.....	33
Conclusions	36
References	38
Supporting information	47
4. CAPÍTULO II.....	48

4.1. Material e Métodos	48
4.1.1. Delineamento experimental	48
4.1.2. Cultura Celular	49
4.1.3. Teste molecular para detecção de <i>Mycoplasma</i>	50
4.1.4. Extração de DNA.....	50
4.1.5. Análise do perfil de <i>Single Tandem Repeats</i> (STR).....	51
4.1.6. Extração de RNA.....	52
4.1.7. Análise da expressão de miRNAs	52
4.1.8. Curva de Crescimento Celular.....	53
4.1.9. Transfecção Celular	54
4.1.10. Reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA)	55
4.1.11. PCR Quantitativa em Tempo Real	55
4.1.12. Ensaio de Migração – <i>Wound Healing</i>	56
4.1.13. Ensaio de Invasão	57
4.1.14. Análises computacionais: predição de mRNAs-alvo de miRNAs, validação e identificação de vias moleculares	57
4.1.15. Identificação do valor prognóstico	58
4.1.16. Análise estatística dos dados	59
4.2. Resultados.....	60
4.2.1. A análise das linhagens celulares confirmou ausência de contaminação por <i>Mycoplasma</i>	60
4.2.2. A análise de <i>Short Tandem Repeats</i> (STR) confirmou a autenticidade das	

linhagens celulares.....	60
4.2.3. Perfil de expressão de miRNAs das linhagens de adenocarcinoma pancreático: Panc-1, BxPC-3 e Capan-2	63
4.2.4. Curva de crescimento das células Panc-1.....	69
4.2.5. Confirmação da transfecção de <i>mimics</i>	69
4.2.6. Avaliação do potencial de migração celular.....	71
4.2.7. Avaliação da invasão celular após transfecção de miRNAs.....	74
4.2.8. Genes-alvo regulados por miRNAs, alterados em câncer de pâncreas e que desempenham papéis em vias moleculares associadas à tumorigênese	74
4.2.9. Genes inseridos nas vias moleculares enriquecidas têm valor prognóstico em carcinoma de pâncreas.....	77
4.3. Discussão	80
4. 4. Conclusões.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma de pâncreas

O carcinoma de pâncreas (CP) apresenta altos índices de mortalidade mundial, associados principalmente ao diagnóstico tardio e à inexistência de terapias eficazes para o tratamento dos pacientes com esta neoplasia (1,2).

Dados recentes de incidência e mortalidade por câncer de pâncreas no mundo indicam a ocorrência de 458.918 casos novos (2.5% do total dos cânceres humanos) e de 432.242 óbitos (4.5% do total de óbitos de todos os tipos de câncer), no ano de 2018 (3).

Dados da União Internacional para o Controle do Câncer (UICC) indicam um aumento nos casos de câncer de pâncreas de acordo com o avanço da idade: de 10/100.000 habitantes entre 40 e 50 anos para 116/100.000 habitantes entre 80 e 85 anos, sendo que a incidência do CP é maior no sexo masculino. No Brasil, dados recentes (2018) do Instituto Nacional do Câncer – INCA mostram que o número de óbitos por CP foi de 9.464, sendo 4.654 homens e 4.808 mulheres (4). Estima-se que apenas 10% dos pacientes diagnosticados com CP tenham sobrevida superior a cinco anos, sendo a maioria dos óbitos observados entre 4 e 12 meses após o diagnóstico (5).

A cirurgia é a melhor opção de cura para os pacientes, entretanto, apenas 10-15% dos pacientes tem diagnóstico em fase inicial onde a cirurgia é recomendada (5). O tratamento com drogas quimioterápicas, utilizado para os pacientes inoperáveis à cirurgia e/ou com doença em estadiamento avançado, não apresenta alta eficácia, refletindo nas altas taxas de mortalidade dos pacientes (6).

Os CP são classificados histologicamente em dois subtipos: tumores exócrinos (originários de células exócrinas) e tumores endócrinos (originários de células endócrinas), e são também agrupados de acordo com a localização anatômica do tumor (65% na cabeça do pâncreas; 30% no corpo e 5% envolvendo o pâncreas como um

todo) (7,8). Os tumores mais comuns são os exócrinos, correspondendo a 95% dos carcinomas de pâncreas, sendo que 90% desses são do subtipo adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) (1). Esses tumores têm origem nas células que revestem os ductos que transportam os sucos digestivos e, embora possam se desenvolver em qualquer local do pâncreas, acometem principalmente a região da cabeça do órgão (9). Outro subtipo de carcinoma pancreático, são os adenocarcinomas de ampola de Vater (10). Os pacientes com AMP geralmente apresentam um melhor prognóstico comparado com aqueles diagnosticados com PDAC, devido à presença de sintomatologia precoce (obstrução biliar e subsequente icterícia persistente) (11). A presença ou ausência de sintomas é determinada de acordo com a localização do tumor, sendo que os sintomas mais comuns incluem dor abdominal, perda de peso, astenia e anorexia (12). Entretanto, na grande maioria dos pacientes com PDAC a doença é assintomática, sendo este um fator associado à detecção tardia do câncer (12).

Os carcinomas pancreáticos são, na sua maioria, esporádicos e acometem preferencialmente indivíduos com idade acima de 60 anos (7,13). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do CP esporádico são: tabagismo, consumo excessivo de álcool, dieta, Diabetes Mellitus tipo 2, obesidade, síndrome metabólica e pancreatite recorrente associada a um quadro de inflamação (14).

O CP hereditário é menos frequente (~1-2% de todos os casos de câncer de pâncreas) (15) e está associado a mutações germinativas. Entretanto, a mutação herdada e responsável pela predisposição ao desenvolvimento desse subtipo de CP é identificada em apenas 20% dos casos e associada a síndromes de predisposição hereditária (16).

Dados de sequenciamento do genoma de 593 pacientes com carcinoma pancreático familiar mostraram que esses tumores estão associados a uma herança poligênica, ou seja, muitos indivíduos afetados apresentavam mais do que uma

mutação ou variação germinativa de alto risco; entretanto a frequência dessas alterações foi de, no máximo, 3% da população estudada (17). As variantes genéticas herdadas associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de pâncreas envolvem principalmente os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *FANCC* e *FANCG* e *ATM*. Esses genes são componentes da maquinaria de reparo a danos no DNA (18,19).

Há três lesões precursoras distintas que podem dar origem ao adenocarcinoma ductal: neoplasia intraepitelial pancreática (NIP), neoplasia papilar intraductalmucínica (NPIM) e neoplasia cística mucínica (NCM) (20). De acordo com esse estudo, essas lesões precursoras iniciam-se a partir de diferentes populações celulares no pâncreas; a origem provável das lesões NIP é a transdiferenciação de células acinares, e das lesões NPIM, a partir de células progenitoras do epitélio ductal pancreático. Adicionalmente, esse mesmo estudo demonstrou, *in vivo*, que o desenvolvimento dessas lesões precursoras está associado à ocorrência de alterações genéticas (20).

A oncogênese pancreática, portanto, é dependente de uma série de eventos genéticos, moleculares, agressões do ambiente (como a exposição ao consumo excessivo de tabaco e álcool) e dos tipos celulares envolvidos na iniciação tumoral. Estudos moleculares adicionais ainda são necessários para um melhor entendimento das etapas de iniciação e processo de progressão dos tumores de pâncreas.

Quanto à utilização de marcadores diagnósticos, o antígeno de câncer 19-9 (CA-19-9) é o biomarcador rotineiramente usado para o acompanhamento da resposta ao tratamento, progressão da doença e/ou recorrência em pacientes com carcinomas pancreáticos (21). Entretanto esse biomarcador não possui sensibilidade ou especificidade adequadas para uso no diagnóstico precoce (22).

Embora alterações genéticas incluindo mutações e alterações genômicas tenham

sido identificadas e associadas ao desenvolvimento e progressão do CP (9,23,24), o prognóstico dos pacientes ainda é muito pobre. Portanto, a identificação de alterações moleculares, tais como aquelas ocorrendo em moléculas regulatórias, pode contribuir para a identificação de novos biomarcadores com aplicação clínica. Tais estudos são importantes para melhorar as terapêuticas existentes, beneficiando os pacientes acometidos por esses carcinomas.

1.2. Alterações genéticas em carcinoma de pâncreas

O avanço nas tecnologias de sequenciamento para análises genômicas abriu fronteiras para a identificação de alterações genéticas subjacentes à carcinogênese e progressão dos tumores pancreáticos, sendo capaz de identificar e classificar os diferentes subtipos tumorais de acordo com suas alterações genéticas (25–27).

Entre as principais mutações que ocorrem na maioria dos carcinomas pancreáticos (~95% dos casos), estão as mutações no oncogene *KRAS* (28). O *KRAS* codifica um membro da família RAS de proteínas de ligação ao GTP, que medeiam muitas funções celulares como proliferação, sobrevivência e remodelação do citoesqueleto (29). Mutações nos códons 12 e 13 do *KRAS* resultam na ativação constitutiva da proteína *KRAS*, a qual ativa vias de transdução de sinais envolvidas na iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral (25).

Outro gene frequentemente mutado em carcinomas de pâncreas (~90% dos casos) é o gene supressor tumoral *CDKN2A*, o qual codifica uma proteína da família de inibidores quinase dependente de ciclina (CDK), com papel no controle do ciclo celular (30). Mutações no gene *CDKN2A* foram associadas à proliferação descontrolada das células, aumento do tamanho do tumor e maior risco de metástase precoce (31,32). Alterações genéticas em *KRAS* e/ou *CDKN2A/p16* podem estar presentes no início da

tumorigênese dos carcinomas de pâncreas, ocorrendo simultaneamente na maioria dos tumores (33).

Outro gene supressor tumoral frequentemente alterado em CP é o *TP53*, o qual codifica a fosfoproteína nuclear TP53 que se liga a sítios específicos do DNA, ativando a transcrição de genes responsáveis pela divisão celular e apoptose (34). A perda da função de *TP53* (em 50%-75% dos casos de CP) ocorre devido a mutações e a perda de um segundo alelo, sendo que a perda da função proteica contribui para a sobrevivência celular e instabilidade genética, levando ao acúmulo de outras alterações (35).

Baseado nas alterações genéticas características dos CP, um estudo recente propôs um modelo de progressão do câncer de pâncreas, constituído por três etapas: iniciação, expansão clonal e colonização de novos microambientes (35). De acordo com esse modelo, a fase de iniciação ocorre quando uma célula pancreática normal sofre uma mutação – que pode ser causada por exposição ambiental ou falhas no reparo a danos do DNA; essa mutação escapa dos *checkpoints* celulares, possibilitando o escape da célula aos mecanismos de controle de divisão celular, crescimento e proliferação. Os autores desse estudo explicam que esse escape fornece à célula as vantagens de sobrevivência necessárias para iniciar um processo de expansão clonal. A expansão clonal ocorre quando a célula já modificada começa a se dividir descontroladamente, originando novas células (filhas) que irão sofrer e acumular mutações adicionais, aumentando a heterogeneidade celular. A heterogeneidade celular pode conferir a capacidade de invasão do estroma adjacente, dando início à fase de invasão do microambiente tumoral, quando as células que apresentam um acúmulo de mutações são capazes de colonizar novos tecidos e formarem metástases (35).

Considerando a existência da heterogeneidade tumoral dos CP, estudos recentes propuseram uma classificação dos CP de acordo com as alterações moleculares

presentes no tumor, as quais podem servir como base para novas terapias alvo-dirigidas (36–39). O primeiro trabalho que propôs essa classificação identificou três subtipos moleculares de CP: clássico (com alta expressão de genes associados à adesão celular e epitélio celular), quase-mesenquimais (com alta expressão de genes associados ao mesênquima) e exócrinos (com alta expressão de genes de enzimas digestivas derivadas das células tumorais). De acordo com essa classificação, esses subtipos de tumores estariam associados a diferenças na resposta terapêutica. Além disso, o subtipo clássico foi associado com o maior nível de expressão do gene *KRAS*. Um estudo mais recente avaliou o perfil de expressão gênica em amostras tumorais – separando por microdissecção as áreas tumorais, estromais e normais adjacentes – e a capacidade desses genes em predizerem o prognóstico dos pacientes com CP (37). Esses autores classificaram os CP em dois subtipos: *basal-like* (pior prognóstico e molecularmente semelhante aos tumores basais nos cânceres de bexiga e de mama) e clássico.

Por meio de análise de RNA-Seq, um correlacionou dados moleculares com características histopatológicas e classificou os CP em quatro subtipos: escamosos (enriquecidos para as mutações *TP53* e *KDM6A*); progenitor pancreático (expressam genes envolvidos no desenvolvimento pancreático inicial - *FOXA2/3*, *PDX1* e *MNX1*); imunogênico (genes que regulam a resposta imune); ADEX – *aberrantly differentiated endocrine exocrine* (expressam genes que regulam vias envolvendo *KRAS*, diferenciação endócrina e exócrina (*NR5A2*, *RBPJL*, *NEUROD1* e *NKX2-2*) (38).

Um estudo do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), um consórcio de integração de dados genômicos, transcritômicos e proteômicos de vários tipos de câncer, incluiu 150 amostras de adenocarcinoma ductal pancreático (41). Essas amostras foram sequenciadas utilizando estratégias de sequenciamento de nova geração ou alto desempenho. Os dados de sequenciamento do exoma total (porção codificante do

genoma) desse estudo mostraram mutações somáticas recorrentes nos genes *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*, *RNF43*, *ARID1A*, *TGF β R2*, *GNAS*, *RREB1* e *PBRM1*. Muitas dessas mutações já eram conhecidas, entretanto, como esse estudo do TCGA incluiu a análise de um grande número de amostras (150), foi possível mapear alterações co-ocorrentes dos oncogenes *KRAS*, *GNAS*, *BRAF*, *CTNNB1* e outros genes na via de transdução de sinais do *KRAS*. De maneira interessante, em tumores negativos para mutações em *KRAS* (5-10% dos casos), os genes *BRAF*, *ERBB2*, *FGFR4*, *NF1*, *SPRED1*, *DUSP6*, *RREB1*, *GNAS*, *CTNNB1*, *JAK1*, *ATM* e *PRSS1* foram apontados como condutores alternativos da tumorigênese pancreática. Adicionalmente, esse estudo identificou que alguns tumores pancreáticos continham múltiplas alterações no oncogene *KRAS*, algumas delas em ambos os alelos (mutações bialélicas) (41).

De acordo com a revisão de Collisson *et al.* (2019) (42) a identificação de subtipos de CP de acordo com as alterações moleculares presentes, está ainda em fase inicial e pode abrir novas fronteiras para a identificação de terapias mais precisas.

1.3. O transcrito não codificador e o câncer

A maioria dos estudos sobre o câncer tem sido focada em genes codificadores de proteínas com função oncogênica ou supressora tumoral, apesar da porção codificadora (exoma) constituir apenas aproximadamente 1,5% do genoma humano (43). Estudos do transcrito humano têm identificado um grande número de RNAs não codificadores de proteínas (44–46). Dados desses estudos revelam que o transcrito humano se estende muito além dos transcritos codificadores e inclui um grande número de RNAs não codificadores com padrões dinâmicos de expressão em células e tecidos (47,48).

Dependendo do tipo de RNA não codificador, a transcrição dessas moléculas pode utilizar diferentes enzimas com atividade de RNA polimerase (RNA polimerase I,

II ou III). Os RNAs não codificadores são classificados em duas categorias principais: RNAs pequenos, com tamanho menor que 200 pares de bases (pb), e longos, com tamanho maior que 200 pb (49). Diferentes moléculas de RNA fazem parte dessas duas grandes classes (50). Dentre essas moléculas, os microRNAs (miRNAs) têm sido identificados como biomarcadores associados ao diagnóstico e/ou prognóstico e/ou resposta ao tratamento de pacientes com câncer (51,52).

1.3.1. MicroRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA, de aproximadamente 17 a 25 nucleotídeos de comprimento, que não codificam proteínas (53). Uma característica dessas moléculas é que um único miRNA é capaz de atuar na regulação da expressão de diversos RNAs mensageiros (mRNAs) envolvidos no desenvolvimento embrionário e em vários processos celulares, incluindo a diferenciação, progressão do ciclo celular e apoptose (54–58).

A atuação do miRNA maduro no mRNA-alvo, geralmente, ocorre pelo reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus mRNAs alvos (59). A região “seed” (semente) do miRNA, está localizada nas posições 2-7 da extremidade 5' do miRNA; esta sequência é emparelhada com o mRNA alvo, para que o miRNA possa atuar no mRNA (60).

Estima-se que mais de 50% dos genes que codificam proteínas contenham ao menos um sítio de ligação para miRNAs, sendo assim os miRNAs atuam na regulação da codificação de diversas proteínas, e a sua desregulação está frequentemente associada a doenças humanas, tais como o câncer (61).

De acordo com um dos maiores e mais completos bancos de dados de miRNAs - miRBase, já foram identificados em *Homo sapiens* 1.917 miRNAs precursores e 2.654

miRNAs maduros (miRBaseRelease 22: March, 2018 disponível em: <http://www.mirbase.org/>). Adicionalmente, estudos recentes (2015-2018) sugerem a existência de novos miRNAs ainda não anotados no miRBase (45,62). O número menor de precursores em relação ao número de miRNAs maduros se deve ao fato de que um mesmo miRNA precursor pode dar origem a mais de um miRNA maduro (61).

As sequências que dão origem aos transcritos de miRNAs estão distribuídas em todo o genoma, sendo localizadas em regiões exônicas ou intrônicas, bem como em locais intergênicos (63).

No mecanismo clássico ou canônico de biogênese dos miRNAs, essas moléculas têm origem em um transcrito primário (pri-miRNA), sintetizado pela enzima RNA polimerase II, o qual se arranja em forma de grampo (*hairpin*), e tem comprimento de até 1.000 nucleotídeos. O pri-miRNA é posteriormente clivado pela ribonuclease RNase III *Drosha*, formando um complexo acoplado ao cofator 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 (64,65). Essa molécula é exportada do núcleo para o citoplasma pela proteína de exportação Exportina5, onde sofrerá uma nova clivagem pela enzima RNase *Dicer*, na região do *loop*, originando um RNA de fita dupla (dsRNA), que tem aproximadamente 18 a 22 nucleotídeos de comprimento. Esse dsRNA se dissocia dando origem ao miRNA maduro, de fita simples, o qual é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*). O complexo RISC contém uma família de proteínas denominada Argonata (AGO1 e AGO2) e uma proteína de ligação ao RNA (TRBP, do inglês *Trans-activator RNA Bindin Protein*) (65). O miRNA maduro incorporado ao complexo RISC, irá agir no mRNA alvo 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 de mRNA pelo miRNA das seguintes maneiras: regulação pela repressão da tradução; regulação por repressão do início da tradução; regulação por degradação de mRNA, regulação por degradação ou armazenamento de alvos de mRNA (66).

Alternativamente, algumas vias de biogênese não canônicas podem ocorrer durante o *splicing* da molécula de mRNA, dando origem a “miRtrons”; estes têm sua biogênese via *splicing* (67). MiRtrons são íntrons de mRNAs que foram removidos por *splicing* e que constituem pré-miRNAs funcionais, sendo que a sua produção é independente da ação da *Drosha* (68).

Outro modo de regulação pelo qual os miRNAs atuam é por meio de ligação a ribonucleoproteínas na sequência *seed*, independente do complexo RISC. Nesse mecanismo ocorre a interferência na ligação miRNA-mRNA alvo, resultando na ativação da tradução, adicionalmente, foi demonstrado que os miRNAs também podem regular a expressão gênica em nível transcricional, por meio da ligação direta com o DNA (65).

1.4. miRNAs no câncer

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 moléculas terapêuticas no câncer humano (69,70).

Por constituírem moléculas muito pequenas e estarem associadas ao complexo proteico RISC, os miRNAs são estáveis e podem ser detectados em amostras clinicamente relevantes, porém degradadas devido a tratamentos histológicos, tais como

os tecidos removidos por biópsia ou cirurgia e que são fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE – do inglês *Formalin-Fixed, Paraffin Embedded*). Os miRNAs também são detectáveis em fluidos corporais e inúmeros estudos têm indicado o seu potencial de investigação como biomarcadores em biópsias líquidas como o sangue (71–73). Adicionalmente, os miRNAs podem ter expressão tecido-específica e podem ser detectados utilizando pequenas quantidades de RNA (74).

As características acima relatadas tornam os miRNAs relevantes para estudos direcionados ao melhor entendimento de vias moleculares na patogênese dos diferentes tipos de câncer, bem como para a identificação de biomarcadores tumorais. A indicação dos miRNAs como biomarcadores tumorais vem de estudos em larga escala, os quais observaram que as células normais e células neoplásicas apresentam diferentes níveis de expressão de um mesmo miRNA, o que pode contribuir para um melhor entendimento da biologia tumoral (75).

Em conjunto, a relevância desses estudos é a identificação de miRNAs que possam ser utilizados para a melhoria do diagnóstico, determinação do prognóstico e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de pacientes com câncer.

Entre os primeiros miRNAs identificados como desregulados em células tumorais estão os miRNAs miR-15a e miR-16, mapeados na região cromossômica 13q14(76). Alterações na expressão desses miRNAs foram relatadas em casos de leucemia linfocítica crônica (CLL – do inglês *Chronic Lymphocytic Leukemia*), sendo que a perda da expressão estava associada à perda do controle da expressão do gene *BCL2* (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), o qual apresenta papel biológico anti-apoptótico em células tais como os linfócitos (76).

A diferença nos níveis de expressão de miRNAs entre tecidos normais e tumorais foi relatada em um estudo incluindo 540 amostras representativas de seis tumores

sólidos humanos (pulmão, colón, mama, estômago, pâncreas e próstata) (77). Esse estudo identificou 26 miRNAs com expressão aumentada e 17 miRNAs com expressão diminuída comuns a esses tumores; os miRNAs: miR-21 e miR-17-5p estavam com expressão aumentada em todos os tipos tumorais, o miR-155 apresentou expressão aumentada nos carcinomas de mama, pulmão e cólon, e o miR-106a estava com expressão aumentada nos carcinomas colorretais, entretanto com expressão diminuída nos carcinomas de mama (77).

A alteração dos níveis de expressão dos miRNAs em carcinomas pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos: genômicos, incluindo amplificações, deleções e mutações na sequência do miRNA, defeitos na maquinaria da biogênese dos miRNAs ou modificações epigenéticas, como as alterações na metilação e remodelação da cromatina (78).

Os miRNAs envolvidos no câncer são classificados como miRNAs oncogênicos ou supressores tumorais, de acordo com o gene que regulam e o seu papel em diferentes tipos de neoplasias(79). Os oncomiRs têm sua expressão aumentada em células tumorais comparado com células normais e são miRNAs que atuam na regulação de genes supressores tumorais; dessa forma um oncomiRs abundante exerce um efeito de silenciamento sobre genes supressores de tumor. Os miRNAs supressores tumorais são miRNAs que atuam regulando oncogenes, sendo que a ausência ou diminuição de sua expressão em células tumorais leva à falta de controle da regulação de genes codificadores de oncoproteínas. Ambos os mecanismos contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral(65).

A família do miR-let-7 é reconhecida como uma família de miRNAs supressores tumorais; inclui dez isoformas e tem como alvo vários mRNAs que codificam oncogenes (80). A sua desregulação já foi identificada em vários tipos tumorais (81),

sendo que a perda do miR-let-7 resulta em progressão acelerada do tumor devido a alterações na via de sinalização do oncogene *KRAS*(82).

O miR-21 é um oncomiR 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 (83). A expressão aumentada de miR-21 já foi relacionada a diversos tipos tumorais, entre eles os carcinomas de cabeça e pescoço, pulmão, pâncreas e a leucemia linfocítica crônica(84).

Embora a expressão desregulada de miRNAs tenha sido identificada em diversos tipos de tumores, o papel dos miRNAs no câncer ainda é um grande campo de pesquisas, pois envolve uma rede complexa de alterações afetando inúmeras vias moleculares associadas à tumorigênese.

1.4.1. MicroRNAs em carcinoma de pâncreas

Estudos apontam perfis diferenciais de expressão de miRNAs entre carcinomas de pâncreas e áreas de tecido normal adjacentes ao tumor (85). O primeiro estudo abrangente sobre o perfil de expressão de miRNAs foi realizado por Szafranska e colaboradores (86) que identificam um grupo de 20 miRNAs capaz de diferenciar carcinoma de pâncreas, pancreatite crônica e pâncreas normal. Além disso, os autores identificaram dois miRNAs específicos de tecido de pâncreas normal; miRNA-216 e miRNA-217, os quais apresentavam expressão mínima ou ausente em carcinoma pancreático, sugerindo-os como potenciais biomarcadores com valor prognóstico. Outro estudo avaliou 95 miRNAs em câncer de pâncreas, encontrando 8 miRNAs (miRNA-

196a, miRNA-190, miRNA-186, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-200b, miRNA-15b e miRNA-95) com expressão aumentada de no mínimo 2 vezes quando comparado o tumor com o tecido normal (87).

Os níveis de expressão de outros miRNAs foram capazes de diferenciar carcinoma de pâncreas, pancreatite crônica e tecido pancreático normal: os miRNAs miRNA-21, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-181, miRNA-181b, miRNA-181d, e miRNA-155 classificaram corretamente 90% das amostras investigadas, sendo que todos esses miRNAs estavam altamente expressos em amostras tumorais quando comparado com tecido normal e pancreatite crônica (88).

Estudos anteriores identificaram alguns genes regulados por miRNAs envolvidos no desenvolvimento do carcinoma pancreático. Zhao e colaboradores avaliaram a expressão do miR-130b no carcinoma pancreático e no tecido adjacente normal, e avaliaram a proliferação e invasão em linhagens PANC-1 e ASPC-1 transfectadas com miR-130b e relacionaram a baixa expressão desse miRNA com a inibição da capacidade de invasão, “*in vitro*”. Além disso, o gene *STAT3*, um membro da família (*STAT*) envolvido na transdução de sinal e ativação da transcrição, foi caracterizado como alvo funcional do miR-130b. Nesse estudo, os autores demonstraram que a inibição do *STAT3* mediada pelo miR-130b levava à inibição do crescimento celular e da capacidade de invasão de células de câncer de pâncreas (89). Outro estudo identificou que os miRNAs let-7a, let-7c e let-7f atuam na modulação da expressão de *STAT3* em carcinoma de pâncreas (90).

A expressão de miR-615-5p foi encontrada diminuída em tecidos adjacentes de carcinoma pancreático quando comparado com tecidos pancreáticos normais, e o gene *AKT2*, envolvido em mecanismos de sinalização celular em carcinoma de pâncreas, foi identificado como regulado negativamente por miR-615-5p (91).

Embora estudos de caracterização funcional tenham sido realizados, a identificação e validação experimental de alvos moleculares de miRNAs em carcinoma pancreático ainda é necessária. Tal identificação é requerida para o entendimento dos mecanismos moleculares regulados por miRNAs e para o desenvolvimento de estratégias com potencial uso clínico para melhorar o diagnóstico e o tratamento de pacientes com carcinoma pancreático.

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.

4. 4. Conclusões

1. Os carcinomas do subtipo adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de ampola de Vater apresentam um perfil de expressão de miRNAs distinto, quando comparados com tecidos pancreáticos histologicamente normais. A diferença de perfil de expressão entre os subtipos tumorais, pode ser relacionada a progressão e agressividade tumoral entre os diferentes subtipos tumorais.
2. Os perfis de expressão de miRNAs entre os subtipos histológicos tumorais estão associados a diferentes vias moleculares de tumorigênese. Os adenocarcinomas ductais pancreáticos apresentam um enriquecimento de vias do sistema imune, enquanto os adenocarcinomas de ampola de Vater um enriquecimento para vias de crescimento celular. As vias imunes desreguladas em PDAC, aqui identificadas podem ser utilizadas para a identificação de futuros alvos para imunoterapias neste tipo tumoral.
3. miRNAs desregulados no tecido tumoral também foram identificados nas linhagens celulares Panc-1, BxPC-3 e Capan-2. O aumento da expressão dos miRNAs: miR-148a-3p e miR-216b-5p, com a utilização de moléculas sintéticas *mimics*, diminuiu o potencial de migração da linhagem Panc-1. Esses resultados sugerem que a modulação da expressão destes miRNAs pode ser utilizada para diminuir o poder de invasão de tumores do subtipo PDAC.
4. Identificamos um conjunto de 8 genes (*PTPRC/KLRK1/SELL/KLRF1/HLA-DOA/RASGRP3/BTLA/BTNL9*) com valor prognóstico em PDAC, e estudos de validação são necessários para a confirmação destes achados e a possível aplicação desses biomarcadores na prática clínica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. Lancet [Internet]. 2016 Jul 2 [cited 2019 Feb 2];388(10039):73–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616001410>
2. Crawford HC, di Magliano MP, Banerjee S. Signaling Networks that Control Cellular Plasticity in Pancreatic Tumorigenesis, Progression and Metastasis. Gastroenterology [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2019 Feb 13];0(0). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30716326>
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer [Internet]. 2018; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350310>
4. INCA - Câncer - Tipo - Pâncreas [Internet]. [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>
5. Drouillard A, Manfredi S, Lepage C, Bouvier A-M. Épidémiologie du cancer du pancréas. Bull Cancer [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Jan 23];105(1):63–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000745511730365X?via%3DiHub>
6. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. Cancer J [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 2];23(6):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29189329>
7. ROYAL RE, WOLF A, CRANE CH. Cancer of the Pancreas. In: DEVITA VT, LAWRENCE TS, ROSEMBERG SA, editors. Cancer Principles & Practice of

- Oncology. 2001. p. 961–89.
8. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2015;16(14):5619–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320426>
 9. Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012;9(2):77–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22183185
 10. Ahn DH, Bekaii-Saab T. Ampullary cancer: an overview. *Am Soc Clin Oncol Educ B* [Internet]. 2014;112–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24857067>
 11. Askew J, Connor S. Review of the investigation and surgical management of resectable ampullary adenocarcinoma. *HPB* [Internet]. 2013;15(11):829–38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458317>
 12. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;371(11):1039–49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25207767>
 13. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 28 [cited 2019 Jan 31];467(7319):1114–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09515>
 14. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10039):73–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26830752>

15. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol* [Internet]. 2008 Jun 2 [cited 2019 Feb 5];19(10):1727–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515795>
16. Carrera S, Sancho A, Azkona E, Azkuna J, Lopez-Vivanco G. Hereditary pancreatic cancer: related syndromes and clinical perspective. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2017 Dec 28 [cited 2019 Feb 5];15(1):9. Available from: <http://hccpjournals.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13053-017-0069-6>
17. Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, et al. Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2019 Feb 5];6(2):166–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658419>
18. Petersen GM. Familial Pancreatic Adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Feb 5];29(4):641–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226902>
19. Bunting SF, Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013 Jul 13 [cited 2019 Feb 5];13(7):443–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760025>
20. Yamaguchi J, Yokoyama Y, Kokuryo T, Ebata T, Nagino M. Cells of origin of pancreatic neoplasms. *Surg Today* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2019 Feb 6];48(1):9–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00595-017-1501-2>
21. Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, et al. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Curr Mol Med* [Internet]. 2013;13(3):340–51. Available

- from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331006>
22. Laurent L, Sefrioui D, Bignon A-L, Parzy A, Sidali S, Hassine M, et al. CA19.9 decrease >15% is a predictor of favourable outcome in patients treated for advanced pancreatic carcinoma: analysis of two independent cohorts. *HPB* [Internet]. 2018 Nov 19 [cited 2019 Feb 13]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30466797>
 23. Cid-Arregui A, Juarez V. Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015;21(31):9297–316. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309356>
 24. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(32):11182–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25170203>
 25. Collins MA, di Magliano M. Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer. *Front Physiol* [Internet]. 2013;4:407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478710>
 26. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2016 Mar 24 [cited 2018 Dec 17];531(7592):47–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909576>
 27. Puleo F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* [Internet]. 2018 Dec [cited 2018 Dec 17];155(6):1999–2013.e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30165049>

28. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over.' Trends Cell Biol [Internet]. 2000;10(4):147–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740269>
29. Parsons BL, Meng F. K-RAS mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer. Biomark Med [Internet]. 2009;3(6):757–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477713>
30. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. Annu Rev Pathol [Internet]. 2008;3:157–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039136>
31. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi 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 [Internet]. 2003;10(1):21–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469138>
32. Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, et al. Immunohistochemically Detected Expression of 3 Major Genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) Strongly Predicts Survival in Patients With Resectable Pancreatic Cancer. Ann Surg [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 Nov 12];258(2):336–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470568>
33. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. In: Progress in molecular biology and translational science [Internet]. 2016 [cited 2018 Nov 12]. p. 241–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27865459>
34. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2016 May 2 [cited 2019 Feb

- 13];6(5):a026062. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141080>
35. Makohon-Moore A, Iacobuzio-Donahue CA. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(9):553–65. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444064>
36. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* [Internet]. 2011 Apr 3 [cited 2018 Dec 17];17(4):500–3. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nm.2344>
37. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Oct 7 [cited 2018 Dec 17];47(10):1168–78. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343385>
38. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2016;531(7592):47–52. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/nature16965>
39. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2017 Aug 14 [cited 2019 Feb 5];32(2):185–203.e13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28810144>
40. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat*

- Med [Internet]. 2011;17(4):500–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460848>
41. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2017;32(2):185–203.e13.
 42. Collisson EA, Bailey P, Chang DK, Biankin A V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Feb 4 [cited 2019 Feb 6]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30718832>
 43. Consortium IHGS. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2019 Feb 5];409(6822):860–921. Available from: <http://www.nature.com/articles/35057062>
 44. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2019 Feb 5];458(7235):223–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07672>
 45. Minatel BC, Martinez VD, Ng KW, Sage AP, Tokar T, Marshall EA, et al. Large-scale discovery of previously undetected microRNAs specific to human liver. *Hum Genomics* [Internet]. 2018;12(1):16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29587854>
 46. Weng W, Li H, Goel A. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Feb 5];1871(1):160–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30599187>
 47. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* (80-) [Internet].

- 2005 Sep 2 [cited 2019 Feb 5];309(5740):1559–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141072>
48. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 6 [cited 2019 Feb 5];489(7414):101–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955620>
 49. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, et al. RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* (80-) [Internet]. 2007 Jun 8 [cited 2019 Feb 5];316(5830):1484–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510325>
 50. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. In: *Advances in experimental medicine and biology* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 5]. p. 3–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573892>
 51. Fadaka AO, Ojo BA, Adewale OB, Esho T, Pretorius A. Effect of dietary components on miRNA and colorectal carcinogenesis. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2018 Nov 12];18(1):130. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30202241>
 52. Huang S, Tan X, Huang Z, Chen Z, Lin P, Fu SW. microRNA biomarkers in colorectal cancer liver metastasis. *J Cancer* [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 13];9(21):3867–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30410589>
 53. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Jan 31];11(7):537–61.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532838>

54. Tanase CP, OGREZEANU I, BADIU C, Tanase CP, OGREZEANU I, BADIU C. MicroRNAs. Mol Pathol Pituit Adenomas [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2019 Jan 31];91–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158306000081>
55. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell [Internet]. 2004;116(2):281–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>
56. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. Curr Opin Genet Dev [Internet]. 2005;15(4):410–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979303>
57. Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. NONCODING RNAS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Annu Rev Neurosci [Internet]. 2006 Jul 21 [cited 2019 Feb 5];29(1):77–103. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112839>
58. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer – A brief overview. Adv Biol Regul [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Nov 13];57:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294678>
59. Thomas MJ, Fraser DJ, Bowen T. Biogenesis, Stabilization, and Transport of microRNAs in Kidney Health and Disease. Noncoding RNA [Internet]. 2018;4(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30400314>
60. Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. Oncotarget [Internet]. 2017 Dec 5 [cited 2019 Jan 31];8(63):107167–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29291020>

61. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Aug 16 [cited 2019 Feb 2];15(8):509–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649>
62. Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015;112(10):E1106-15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713380>
63. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Apr 28 [cited 2019 Feb 2];33(8):2697–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15891114>
64. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* [Internet]. 2004;23(20):4051–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372072>
65. Iorio M V, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2012;4(3):143–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22351564>
66. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2014 Nov 2 [cited 2019 Feb 2];15(11):1444–55. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/15384047.2014.955442>
67. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*

- [Internet]. 2011 Nov [cited 2019 Feb 5];93(11):1897–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21712066>
68. Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Oct 26 [cited 2019 Feb 2];28(2):328–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964270>
 69. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* [Internet]. 2005;435(7043):834–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944708>
 70. Hirschberger S, Hinske LC, Kreth S. MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer. *Cancer Lett*. 2018;431(May):11–21.
 71. Moutinho-Ribeiro P, Macedo G, Melo SA. Pancreatic Cancer Diagnosis and Management: Has the Time Come to Prick the Bubble? *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2019 Feb 6];9:779. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30671023>
 72. Liyanage T, Masterson AN, Oyem HH, Kaimakliotis H, Nguyen H, Sardar R. Plasmoelctronic-Based Ultrasensitive Assay of Tumor Suppressor microRNAs Directly in Patient Plasma: Design of Highly Specific Early Cancer Diagnostic Technology. *Anal Chem* [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2019 Feb 6];91(3):1894–903. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b03768>
 73. Nuzhat Z, Kinhal V, Sharma S, Rice GE, Joshi V, Salomon C, et al. Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 7 [cited 2019 Feb 6];8(10):17279–91. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13973>

74. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* [Internet]. 2008;3(9):e3148. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773077>
75. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006;6(11):857–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945>
76. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2009;28(3–4):369–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012925>
77. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(7):2257–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461460>
78. Iorio M V, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009;27(34):5848–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884536>
79. COWLAND JB, HOTHER C, GRØNBAEK K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2019 Feb 2];115(10):1090–106. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_775.xml.x
80. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2008;18(10):505–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774294>
81. Büssing I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* [Internet]. 2008 Sep [cited 2019 Feb 2];14(9):400–

9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674967>
82. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* [Internet]. 2005;120(5):635–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766527>
83. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6:19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688245>
84. Song J, Bai Z, Zhang J, Meng H, Cai J, Deng W, et al. Serum microRNA-21 levels are related to tumor size in gastric cancer patients but cannot predict prognosis. *Oncol Lett* [Internet]. 2013;6(6):1733–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260069>
85. Giulietti M, Occhipinti G, Principato G, Piva F. Identification of candidate miRNA biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma by weighted gene co-expression network analysis. *Cell Oncol*. 2017;40(2):181–92.
86. Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggensbach JA, Morrison CD, et al. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn* [Internet]. 2008;10(5):415–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687792>
87. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* [Internet]. 2009;33(4):698–709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19030927>
88. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from

- normal pancreas and chronic pancreatitis. JAMA [Internet]. 2007;297(17):1901–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473300>
89. Zhao G, Zhang JG, Shi Y, Qin Q, Liu Y, Wang B, et al. MiR-130b is a prognostic marker and inhibits cell proliferation and invasion in pancreatic cancer through targeting STAT3. PLoS One [Internet]. 2013;8(9):e73803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040078>
 90. Patel K, Kollory A, Takashima A, Sarkar S, Faller D V, Ghosh SK. MicroRNA let-7 downregulates STAT3 phosphorylation in pancreatic cancer cells by increasing SOCS3 expression. Cancer Lett [Internet]. 2014;347(1):54–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491408>
 91. Sun Y, Zhang T, Wang C, Jin X, Jia C, Yu S, et al. MiRNA-615-5p functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting AKT2. PLoS One [Internet]. 2015;10(4):e0119783. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25856297>
 92. Tan MH, Nowak NJ, Loo R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. Cancer Invest [Internet]. 1986 [cited 2019 Jan 21];4(1):15–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3754176>
 93. Kyriazis AA, Kyriazis AP, Sternberg CN, Sloane NH, Loveless JD. Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma Capan-2 in tissue culture and the nude mouse. Cancer Res [Internet]. 1986 Nov 1 [cited 2019 Jan 21];46(11):5810–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3019537>
 94. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine

- pancreas. *Int J cancer* [Internet]. 1975 May 15 [cited 2019 Jan 21];15(5):741–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1140870>
95. Tautz D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS* [Internet]. 1993 [cited 2019 Feb 2];67:21–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400689>
 96. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009;55(4):611–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619>
 97. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
 98. 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* [Internet]. 2018;46(D1):D360–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29194489>
 99. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* [Internet]. 2010;26(1):139–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>
 100. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009;37(Web Server issue):W305-11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465376>

101. Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martínez-Ledesma E, Martínez-Torteya A, Chacolla-Huaringa R, Rodriguez-Barrientos A, et al. SurvExpress: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. Cho WCS, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Sep 16 [cited 2019 Feb 8];8(9):e74250. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0074250>
102. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. Br J Cancer [Internet]. 2014 Sep 12 [cited 2019 Feb 2];111(6):1021–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117809>
103. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V. In vitro cell migration and invasion assays. J Vis Exp [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2019 Feb 2];(88). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962652>
104. Stratford JK, Bentrem DJ, Anderson JM, Fan C, Volmar KA, Marron JS, et al. A Six-Gene Signature Predicts Survival of Patients with Localized Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Hanash SM, editor. PLoS Med [Internet]. 2010 Jul 13 [cited 2019 Feb 8];7(7):e1000307. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000307>
105. Ma MZ, Kong X, Weng MZ, Cheng K, Gong W, Quan ZW, et al. Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. J Exp Clin Cancer Res [Internet]. 2013;32:71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289824>
106. Visani M, Acquaviva G, Fiorino S, Bacchi Reggiani ML, Masetti M, Franceschi E, et al. Contribution of microRNA analysis to characterisation of pancreatic

- lesions: a review. *J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Nov [cited 2019 Feb 6];68(11):859–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26314585>
107. Guo J, Feng Z, Huang Z, Wang H, Lu W. MicroRNA-217 Functions as a Tumour Suppressor Gene and Correlates with Cell Resistance to Cisplatin in Lung Cancer. *Mol Cells* [Internet]. 2014 Sep 30 [cited 2019 Feb 6];37(9):664–71. Available from: <http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2014.0121>
 108. Chen D, Zhang D, Lu Y, Chen L, Zeng Z, He M, et al. microRNA-217 inhibits tumor progression and metastasis by downregulating EZH2 and predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2015 May 10 [cited 2019 Feb 6];6(13):10868–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869101>
 109. Zhang Q, Yuan Y, Cui J, Xiao T, Jiang D. MiR-217 Promotes Tumor Proliferation in Breast Cancer via Targeting DACH1. *J Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 6];6(2):184–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653720>
 110. Zhao W-G, Yu S-N, Lu Z-H, Ma Y-H, Gu Y-M, Chen J. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Feb 6];31(10):1726–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675343>
 111. Azevedo-Pouly ACP, Sutaria DS, Jiang J, Elgamal OA, Amari F, Allard D, et al. miR-216 and miR-217 expression is reduced in transgenic mouse models of pancreatic adenocarcinoma, knockout of miR-216/miR-217 host gene is

- embryonic lethal. *Funct Integr Genomics*. 2017;17(2–3):203–12.
112. Liu P, Yang H, Zhang J, Peng X, Lu Z, Tong W, et al. The lncRNA MALAT1 acts as a competing endogenous RNA to regulate KRAS expression by sponging miR-217 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2019 Feb 6];7(1):5186. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28701723>
 113. Yonemori K, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Osako Y, Koshizuka K, et al. The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the microRNA-216 cluster. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(41):70097–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050264><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5642539>
 114. An Y, Wu X, Chen W, Cai H, Hu J, Wu B, et al. MiR-216b inhibits pancreatic cancer cell progression and promotes apoptosis by down-regulating KRAS. 2018 [cited 2019 Feb 3]; Available from: <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.72564>
 115. Liu Y, Zhang Y, Zheng Z, Li K, Wu X, Du Q, et al. MicroRNA - 216b reduces growth, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by directly targeting p- associated coiled- coil containing protein kinase 1. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Feb 23 [cited 2019 Feb 3];15(5):6745–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29616134>
 116. You Y, Tan J, Gong Y, Dai H, Chen H, Xu X, et al. MicroRNA-216b-5p Functions as a Tumor-suppressive RNA by Targeting TPT1 in Pancreatic Cancer Cells. *J Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 3];8(14):2854–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28928875>
 117. Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer*

- [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 2];7(10):1233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390598>
118. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, et al. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2012;25(12):1609–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878649>
 119. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2007;120(5):1046–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17149698>
 120. Xia J, Guo X, Yan J, Deng K. The role of miR-148a in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2014;140(9):1451–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659367>
 121. Zhang R, Li M, Zang W, Chen X, Wang Y, Li P, et al. MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2. *Tumour Biol* [Internet]. 2014;35(1):837–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975374>
 122. Liffers ST, Munding JB, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, Nambiar S, et al. MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest* [Internet]. 2011;91(10):1472–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709669>
 123. Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, et al. Role of miRNAs in Immune Responses and Immunotherapy in Cancer. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. 2018 Dec 22 [cited 2019 Feb 7]; Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.22725>

124. Yang D, Tao J, Li L, Kedei N, Tóth ZE, Czap A, et al. RasGRP3, a Ras activator, contributes to signaling and the tumorigenic phenotype in human melanoma. *Oncogene* [Internet]. 2011 Nov 23 [cited 2019 Feb 7];30(45):4590–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602881>
125. Nagy Z, Kovács I, Török M, Tóth D, Vereb G, Buzás K, et al. Function of RasGRP3 in the formation and progression of human breast cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2019 Feb 7];13(1):96. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-96>
126. Qiu W, Xia X, Qiu Z, Guo M, Yang Z. RasGRP3 controls cell proliferation and migration in papillary thyroid cancer by regulating the Akt-MDM2 pathway. *Gene* [Internet]. 2017 Oct 30 [cited 2019 Feb 7];633:35–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864115>
127. Zeng X, Hu Z, Wang Z, Tao J, Lu T, Yang C, et al. Upregulation of RASGRP3 expression in prostate cancer correlates with aggressive capabilities and predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2014 Jun 14 [cited 2019 Feb 3];17(2):119–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418912>
128. Zhang Z, Ma M, Hu R, Xu B, Zong L, Wei H, et al. RasGRP3, a Ras guanyl releasing protein 3 that contributes to malignant proliferation and aggressiveness in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2019 Feb 7];45(7):720–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1440-1681.12926>
129. Peng Y-P, Zhu Y, Zhang J-J, Xu Z-K, Qian Z-Y, Dai C-C, et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive

- natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2013 Oct 20 [cited 2019 Feb 7];11(1):262. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138752>
130. Han B, Mao F, Zhao Y, Lv Y, Teng Y, Duan M, et al. Altered NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 Expression on Circulating NK Cells Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *J Immunol Res* [Internet]. 2018 Sep 3 [cited 2019 Feb 7];2018:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/6248590/>
 131. Ma Y, Gong J, Liu Y, Guo W, Jin B, Wang X, et al. MicroRNA-30c promotes natural killer cell cytotoxicity via up-regulating the expression level of NKG2D. *Life Sci* [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2019 Feb 7];151:174–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002432051630162X?via%3Dihub>
 132. Korniluk A, Kamińska J, Kiszło P, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V. Lectin adhesion proteins (P-, L- and E-selectins) as biomarkers in colorectal cancer. *Biomarkers* [Internet]. 2016 Nov 9 [cited 2019 Feb 8];22(7):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775438>
 133. Choudhary D, Hegde P, Voznesensky O, Choudhary S, Kopsiaftis S, Claffey KP, et al. Increased expression of L-selectin (CD62L) in high-grade urothelial carcinoma: A potential marker for metastatic disease. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Feb 8];33(9):387.e17-387.e27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618296>
 134. Pasero C, Olive D. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunol Lett* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2019 Feb 8];151(1–2):71–5. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247813000102?via%3Dihub>

135. M'Hidi H, Thibault M-L, Chetaille B, Rey F, Bouadallah R, Nicollas R, et al. High Expression of the Inhibitory Receptor BTLA in T-Follicular Helper Cells and in B-Cell Small Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2019 Feb 8];132(4):589–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762537>
136. Liu J, Li J, He M, Zhang G-L, Zhao Q. Distinct Changes of BTLA and HVEM Expressions in Circulating CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. *J Immunol Res* [Internet]. 2018 Jul 18 [cited 2019 Feb 8];2018:1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30116751>