

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA**

**NIVALDO FARIAS VIEIRA**

**Combinação da expressão dos miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210  
teciduais e plasmáticos com o CA 19-9 sérico no diagnóstico do  
adenocarcinoma pancreático**

Ribeirão Preto

2014

**NIVALDO FARIAS VIEIRA**

**Combinação da expressão dos miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210  
teciduais e plasmáticos com o CA 19-9 sérico no diagnóstico do  
adenocarcinoma pancreático**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção do grau de Doutor  
em Ciências Médicas, área de concentração  
Clínica Cirúrgica - opção Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos  
Santos

Ribeirão Preto  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Vieira, Nivaldo Farias**

Combinação da expressão dos miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210 teciduais e plasmáticos com o CA 19-9 sérico no diagnóstico do adenocarcinoma pancreático. Ribeirão Preto, 2014

115 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Santos, José Sebastião dos.

1. Adenocarcinoma de pâncreas, microRNAs, rastreamento de tumor, biomarcador

Nome: VIEIRA, Nivaldo Farias

Título: Combinação da expressão dos miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210 teciduais e plasmáticos com o CA 19-9 sérico no diagnóstico do Adenocarcinoma Pancreático

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.  
Área de concentração: Clínica Cirúrgica - opção Cirurgia.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Banca examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação Waldemar Barnsley Pessoa e da Fundação de Assistência, Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FAEPA).

Aos meus pais, Nivaldo e Marilene, origem e tronco de minha linda família  
E a minha família, quanta ousadia, quanta solidez, quanto amor.

A Maria Clara, dom precioso de Deus.  
Se eu tivesse podido inventar-te, jamais teria sido tão criativo e generoso.  
Obrigado, filha!

À minha Célia, a melhor metade de mim,  
Pelo entusiasmo, calor, diligência, amor, cuidado.  
Você tem sido o perfume mais suave e o tempero mais imprescindível em  
cada conquista de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Uma tese de Doutorado é uma longa viagem, com muitos percalços pelo caminho. Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de muitas pessoas às quais agradeço o apoio dado:

Muito especialmente, desejo agradecer ao meu orientador Prof. Doutor José Sebastião dos Santos, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo... um Muito Obrigado.

À minha família, em particular, aos meus pais, avós, irmãos, sobrinhos, primos e aos meus sogros e em especial Dr Paulo Machado, com sua insistente oração para que este trabalho chegasse ao cume.

À minha esposa, Célia Vieira, pela visão que enxerga mais, pelo passo mais acertado, pelas decisões mais apropriadas, pelas correções mais incentivadoras. Quando eu já não tinha mais fôlego, respirei de seus pulmões e fui adiante. As palavras não alcançam minha gratidão.

Ao Dr. Fábio Zola, expoente da oncologia nacional em sua geração. Lisonjeiramente posso chamá-lo irmão, e isso me enche de confiança e orgulho.

A Dra. Fernanda Peria, pilar histórico na estruturação da oncologia do Hospital da Clínicas da USP de Ribeirão Preto, grande amiga que soube acolher-me como ninguém. Sua intervenção foi sempre providencial e generosa.

Ao Dr. Leandro Colli, sempre participando ativamente do trabalho, desde sua concepção até o arremate final. A ciência vai adiante graças a doação sem medidas de cientistas como esse.

Aos Drs. Alexandre Jacome, Daniela Tirapelli, Rafael Kemp, Paulo Novaes, Fermino Neto, por dedicada presença neste trabalho.

A Fundação Waldemar Barnsley Pessoa pelo financiamento da pesquisa.

A cada paciente que suportou minha ausência do consultório em Sergipe neste período. Obrigado pelas renúncias e palavras de estímulo.

Aos meus amigos, meus colegas de trabalho, funcionários do laboratório de cirurgia experimental, meu profundo agradecimento. A todos os demais...

Todo mundo quer viver em cima da montanha, sem saber que a verdadeira  
felicidade está na forma de subir a escarpada.

Gabriel García Marquez

## RESUMO

VIEIRA, N.F. **Combinação da expressão dos miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210 teciduais e plasmáticos com o CA 19-9 sérico no diagnóstico do adenocarcinoma pancreático.** 2014. 122f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O diagnóstico diferencial, o tratamento e o prognóstico do adenocarcinoma de pâncreas (AP) ainda desafiam a prática clínica. O objetivo desse estudo é avaliar o papel da expressão dos microRNAs (miRNAs) -21, -23a, -100, -107, -181c e -210 teciduais e plasmáticos e, em combinação com o CA-19-9, no diagnóstico do AP. Foram utilizadas amostras de tecido (Grupo APt, n=18), de plasma (Grupo APp, n=13) e da região paratumoral (Grupo PPT, n=9) de pacientes com AP, do tecido pancreático de doadores cadáveres ou de pacientes submetidos à pancreatemia por trauma (Grupo PN, n=7) e do plasma de voluntários saudáveis (Grupo PC, n=6). Verificou-se a expressão do painel dos miRNAs selecionados em todos os grupos, mediante reação de cadeia de polimerase reversa (RT-PCR), bem como a concentração sérica do CA19-9 nos grupos APt e PN. No tecido, existe diferença na expressão do miRNA-21 ( $p=0,005$ ) e do miRNA-210 ( $p=0,008$ ) entre os grupos APt, PN e PPT; o miRNA-21 discrimina o grupo APt de PN e PPT e o miRNA-210 discrimina o grupo APt do PN. Na comparação dos grupos APt e PN, a acurácia do CA 19-9 sérico foi de 88% (AUC-ROC 0,95; 0,84 - 1): sensibilidade de 83% e especificidade de 100%, para o valor limiar de 37,0 ng/dl. No grupo APp há hiperexpressão do miR-181c (IC 95% 1,67 - 17,68;  $p<0,00001$ ) e do miR-210 (IC 95% 0,16 - 5,20;  $p=0,03$ ), em relação ao PC. A combinação da expressão dos miR-21 e -210 do tecido tumoral e dos valores séricos do CA19-9 tem acurácia de 100% no diagnóstico do AP. A acurácia do miR-181c no plasma (APp x PC) foi de 100%. Os achados revelam que a combinação da expressão de miRNAs teciduais e dos valores do CA19-9 aumenta a acurácia no diagnóstico do AP, mas a expressão de miRNA no plasma pode servir como um teste de diagnóstico não invasivo. Todavia, novos estudos são necessários para validar esses resultados, bem como para avaliar a utilidade desses biomarcadores e suas associações com a sobrevivência e a resposta à terapia do AP.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de pâncreas, microRNAs, rastreamento de tumor, biomarcador



## ABSTRACT

VIEIRA, N.F. **Combined expression of tissue and plasma miRs-21, -23a, -100, -107, -181C, and -210 with serum CA 19-9 in diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma.** 2014. 122p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Differential diagnosis, treatment and prognosis in pancreatic adenocarcinoma (PC) are still a challenge to clinical practice. The aim of the current study is to assess the role of select plasma and tissue microRNAs (miRs-21, -23a, -100, -107, -181c e -210) as biomarkers for the diagnosis of PC. Samples of plasma (APp Group, n=13), pancreatic tumors (APt Group, n=18) and peritumoral regions (PPT Group, n=9) were collected from patients during surgical procedure. The control group consisted of samples collected from patients submitted to pancreatic surgery for trauma or cadaveric donors (PN Group, n=7). Healthy volunteers donated blood for collection of normal plasma (PC Group, n=6). The relative abundances of six miRNAs were measured in all groups using real-time PCR, as well as serum CA 19-9 levels in Groups AP and PN, and difference was considered significant when  $p < 0.05$ . In tissue samples, there is a difference in the expression of miRNA-21 ( $p=0.005$ ) and miRNA-210 ( $p=0.008$ ) across groups APt, PN e PPT; miRNA-21 distinguishes group APt from PN and from PPT and miRNA-210 distinguishes group APt from PN. Serum CA 19-9 has an accuracy of 88% (AUC-ROC 0.95; 0.84 – 1), sensibility 83%, specificity 100%, at a cutoff of 37 ng/dl. In group APp there is overexpression of miR-181c (IC 95% 1.67 – 17.68;  $p < 0.00001$ ) and miR-210 (IC 95% 0.16 – 5,20;  $p=0.03$ ) in comparison to group PC. The combination of tissue expression of miR-21, -210 and serum CA 19-9 has 100% accuracy for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. The accuracy of plasmatic miR-181c (APp x PC) was also 100%. These findings suggest that the combination of tissue miRNAs and serum CA 19-9 can improve accuracy, but plasmatic miRNA expression can be used as a non-invasive diagnostic test for PC, although further studies are necessary to validate these results as well as to evaluate its utility as biomarker related to survival and response to therapy in pancreatic adenocarcinoma.

Keywords: Pancreatic adenocarcinoma, microRNA, biomarker, tumor screening

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mutações somáticas associadas ao AP.....	30
Figura 2-	Modelo geral da biogênese e função do miRNA.....	43
Figura 3-	MiRNAs associados a características clínico-patológicas no AP.....	46
Figura 4-	Gel de agarose 1,2%, com as bandas das subunidades 28S e 18S de RNA ribossômicos que demonstram a qualidade do RNA total...	60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Alterações dos miRNAs no adenocarcinoma pancreático e os genes que afetam.....	22
Quadro 2 - Sinais e sintomas mais frequentes ao diagnóstico de adenocarcinoma de pâncreas.....	35
Quadro 3 – MiRNAs estudados.....	56
Quadro 4 – Características demográficas, patológicas e de tratamento da coorte de pacientes com AP.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis de corte de CA 19-9 para o diagnóstico de câncer de pâncreas....	33
Tabela 2-	Medidas descritivas da expressão dos miRNAs nos grupos APt, PN e PPT.....	61
Tabela 3-	Estatística teste com valores críticos para discriminação do grupo APt de PN e PPT.....	61
Tabela 4 -	Medidas descritivas da expressão dos miRNAs nos grupos APp e PC....	62
Tabela 5 -	Análise ROC da abundância relativa dos miR-21, miR-23a, miR100, miR107, miR181c, miR210 entre os grupos APt, PN, PPT e PC.....	63
Tabela 6 -	Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs, do CA 19-9 e da combinação, na comparação dos grupos APt e PN.....	68
Tabela 7 -	Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação dos grupos APt e PPT.....	68
Tabela 8 -	Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação dos grupos PPT e PN.....	69
Tabela 9 -	Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação do plasma dos grupos APp e PC.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Curvas ROC – Ca 19-9, miRNA-21 e miRNA-210 – Grupo APt x Grupo PN.....	64
Gráfico 2-	Curva ROC – CA19-9 + miRNA21, CA 19-9 + miRNA210 e CA19-9+miRNA21+miRNA210 para os Grupos APt x Grupo PN.....	65
Gráfico 3-	Curva ROC - miRNA-181c e miRNA-210 – Grupo APp x Grupo PC.....	66
Gráfico 4 -	Curva ROC - miRNA-21 – Grupo APt x Grupo PPT.....	67

## LISTA DE SIGLAS

AP: Adenocarcinoma de pâncreas;  
CA 19-9: antígeno carboidrato 19-9;  
cDNA (*complementary DNA*): DNA complementar;  
c-MYC: oncogene celular da mielocitomatose;  
CT (*cycle threshold*): limite de detecção;  
DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*): dietilpirocarbonato;  
DNA (*deoxyribonucleic acid*): ácido desoxirribonucléico;  
EGFR: receptor do fator de crescimento endotelial;  
EUS-FNA: ultra-sonografia endoscópica – aspiração por agulha fina;  
GTP: Trifosfato de guanosina;  
HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;  
miRNA/miR: microRNA;  
ml: mililitro;  
mRNA (*messenger RNA*): RNA mensageiro;  
NIP: neoplasia intraepitelial pancreática;  
nm: nanômetros;  
nM: nanoMol;  
PANC-1: linhagem celular epitelial de carcinoma pancreático humano;  
PBS (*Phosphate buffered saline*): tampão fosfato salina;  
PCR (*polymerase chain reaction*): reação em cadeia da polimerase;  
qPCR (*quantitative PCR*): reação em cadeia da polimerase quantitativa;  
RISC (*RNA-induced silencing complex*): complexo silenciador induzido pelo RNA;  
RNA (*ribonucleic acid*): ácido Ribonucléico;  
RNase: Ribonuclease;  
RNAt: Ácido Ribonucléico transportador;  
RNM: Ressonância Nuclear Magnética;  
RNu: Ácido Ribonucléico nucleolar;  
SD (*standard deviation*): desvio padrão;  
TE: Tris EDTA;  
TGFβ (transforming growth factor beta): Fator de transformação de crescimento beta;  
US: ultrassonografia.

## LISTA DE GENES

ADAM9 (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 9): Domínio 9 da desintegrina e metaloproteinase A;

ARHGEF(Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor): Fator de Troca de nucleotídeo Guanina Rho;

Bcl2(B-Cell CLL/Lymphoma 2): célula B do Linfoma/LLC;

BTG2(B-Cell Translocation Gene 2): gene 2 da translocação da célula B;

BRCA2 (breast cancer 2, early onset): gene 2 do câncer de mama;

CDC 25 (cell division cycle 25): ciclo de divisão celular 25;

CDKs (cyclin-dependent kinases): quinases dependentes de ciclinas;

CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A): inibidor de quinase dependente de ciclina 2A;

CDH1(Cadherin 1): caderina 1;

EZH2(Enhancer Of Zeste Homolog 1): Potencializador do homólogo do Zeste1;

FANCC (Fanconi anemia, complementation group C): anemia de Fanconi, grupo de complementação C;

FANCG (Fanconi anemia, complementation group G): anemia de Fanconi, grupo de complementação G;

HMGA2 (high mobility group AT-hook 2): Grupo2 de alça proteica de alta mobilidade;

hMLH1 (human mutL homolog 1): homólogo humano do gene de reparo do DNA derivado da E. coli, o multL;

HSP70 (Heat Shock Protein 70kDa): proteína de choque do calor;

IGF1R(Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor): Receptor do fator 1 de crescimento semelhante a insulina;

K-RAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog): homólogo ao oncogene viral do sarcoma do rato Kirsten;

MT1-MMP(Metallothionein 1 matrix metalloproteinase): Metaloproteinase de matriz metalotioneína 1;

MUC4(mucin 4): Mucina 4;

MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog): homólogo ao oncogene viral v- myc de mielocitomatose;

NEDD4L (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like,

E3 ubiquitin protein ligase): proteína ligase ubiquitina E3, expressa no precursor da célula neural;

NOTCH1: Notch 1;

PDCD4 (programmed cell death 4): morte celular programada 4;

PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1): homeobox duodenal e pancreático;

RAS (v-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog): v-ras Harvey homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato;

ROBO1: roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila);

RRM(RNA binding motif protein): proteína motif de ligação do RNA;

SEL1L(sel-1 suppressor of lin-12-like): supressor sel-1 do lin-12-like;

SMAD (Mothers against decapentaplegic homolog): mães contra homólogo decapentaplégico;

SOCS6(suppressor of cytokine signaling 6): supressor da sinalização da citocina 1;

TGF $\beta$  (transforming growth factor beta): Fator de transformação de crescimento beta;

TGFBR2(transforming growth factor, beta receptor II): Receptor beta II do fator de crescimento transformante;

TIMP3(Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 3): Inibidor tissular da metaloproteinase 3;

TP53 (tumor protein p53): proteína tumoral p53;

ZEB1(zinc finger E-box binding homeobox 1): Homeobox 1 da ligação E-box do prolongamento com zinco.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>25</b>
2.1 FATORES DE RISCO PARA O ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS	25
2.2 ETIOPATOGENESE	28
2.3 CA 19-9 E O ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS	31
2.4 DIAGNÓSTICO	34
2.5 MODALIDADES TERAPÊUTICAS	36
2.6 BIOMARCADORES NO CÂNCER DE PÂNCREAS	41
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>49</b>
<b>4 OBJETIVO</b>	<b>51</b>
<b>5 PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
5.1 SELEÇÃO DE MIRNA	53
5.2 LOCAL DO ESTUDO	53
5.3 COLETA DE TECIDO	53
5.4 COLETA DE SANGUE	54
5.5 EXTRAÇÃO DO RNA TECIDUAL	54
5.6 EXTRAÇÃO DO RNA PLASMÁTICO	55
5.7 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	56
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>59</b>
6.1 CASUÍSTICA	59
6.2 EXTRAÇÃO DE RNA	59
6.3 PCR QUALITATIVO DE MIRNA TECIDUAL TUMORAL, PARATUMORAL E CONTROLE	60
6.4 PCR QUALITATIVO DE MIRNA PLASMÁTICO DE PACIENTES COM AP E CONTROLES	62
6.5 CURVAS ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC) PARA EXPRESSÃO DOS MICRORNAs NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS COM RESULTADOS CONSIDERADOS BONS E EXCELENTES: AUC (ÁREA SOB A CURVA) $\geq 0,8$	64
6.6 MEDIDAS DE DESEMPENHO PARA OS BIOMARCADORES	68
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>9 CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE A – TABELAS DAS CURVAS ROC</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE B-DADOS INDIVIDUAIS: CLÍNICOS E DOS miRNAs NOS GRUPOS APT, APP,PPT,PN E PC</b>	<b>112</b>

# *INTRODUÇÃO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de pâncreas (AP) é uma doença altamente letal e, embora seja responsável somente por 4% de todos os cânceres, representa a oitava causa de morte relacionada ao câncer (BOSETTI et al., 2012b; FERLAY, JACQUES et al., 2010). O desenvolvimento do AP poderia ser evitado através da detecção e tratamento precoces de lesões precursoras. Entretanto, a falta de métodos adequados de rastreamento impossibilita seu diagnóstico e conduta terapêutica em um estágio inicial. Desse modo, há um grande interesse na identificação de novos biomarcadores que supram essa deficiência no diagnóstico precoce do AP (YU et al., 2011; HAMADA, S.; SHIMOSEGAWA T, 2011; ZHAO et al., 2011).

O estudo da progressão do AP utilizando análises matemáticas dos dados de sequenciamento genético tumoral demonstrou que leva cerca de 10 anos entre a iniciação do AP e a capacidade de desenvolver metástases (CAMPBELL et al., 2010; YACHIDA et al., 2010). Assim, há oportunidade para detecção do AP desde suas mutações iniciais, reforçando a importância de se descobrirem e validarem métodos para rastreamento e diagnóstico precoce, preferencialmente com valor preditivo, para o AP.

Na prática clínica, a presença de perda de peso, icterícia, CA 19-9 >37 U/ml, acompanhada de dilatação da via biliar e massa na cabeça do pâncreas, são alterações que orientam a conduta terapêutica na maioria dos centros especializados, mas o exame anatomopatológico segue sendo o padrão-ouro na confirmação de malignidade. Por outro lado, as dificuldades de realização do estudo anatomopatológico das massas pancreáticas no pré-operatório, atribuídas às limitações do material tecidual obtido por biópsia percutânea ou por ecoendoscopia, podem expor pacientes a uma duodenopancreatectomia cefálica para doença inflamatória benigna (ABRAHAM *et al.*, 2003)

O antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9) é uma glico-proteína mucina associada ao AP que está relacionada ao grupo sanguíneo Lewis. A sensibilidade e a especificidade do CA 19-9 para o AP variam de 70-92% e 68-92%, respectivamente, mas estão diretamente relacionadas ao tamanho tumoral, e tem valor limitado nos tumores menores (CWIK et al., 2006; PLESKOW et al., 1989). Considera-se como limite da normalidade o nível sérico de 37U/mL. Para níveis séricos superiores a 200 U/mL sua especificidade supera os 95% (CASTELLANOS;

BERLIN; CARDIN, 2011; HATA et al., 2012). Seu valor no rastreamento é comprovadamente ineficaz, embora ainda seja o melhor biomarcador disponível na prática clínica para o AP.

O CA 19-9 pode estar elevado em outras neoplasias malignas, tais como câncer colorretal, ovariano, gástrico, hepático, bem como algumas condições benignas, como colangite aguda, cirrose hepática e pancreatite crônica (CASTELLANOS; BERLIN; CARDIN, 2011; SIMIANU et al., 2010)

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) geralmente é realizada durante a ultrassonografia endoscópica (USE) e permite a biópsia de massas tumorais, linfonodos e estudo do líquido ascítico (SAHANI et al., 2008). A USE-PAAF demonstra valor preditivo negativo entre 20% e 50% para o diagnóstico de malignidade, assim, uma biópsia negativa não exclui câncer. Sua sensibilidade é de 85% e a especificidade de 98% (ARDENGH; GOLDMAN; LIMA-FILHO, 2011; MAJUMDER; CHUBINEH; BIRK, 2012).

As taxas de complicações da PAAF é de cerca de 1,6% (VINCENT et al., 2011). Por outro lado, a biópsia do pâncreas guiada por agulha fina não pode ser usada rotineiramente para a detecção precoce ou rastreamento populacional para o AP (SINGH; SRINIVASAN, 2011), o que reforça a necessidade de identificação de bons biomarcadores, especialmente os obtidos por técnicas não-invasivas através do exame de fluídos corporais (REICHERT, 2011).

O escovado citológico é obtido durante o exame de colangiopancreatografia endoscópica retrógrada. Sua sensibilidade, que varia de 20% a 50%, é mais baixa que a USE-PAAF, atribuída à quantidade reduzida de células tumorais coletadas. Ao passo que sua especificidade é de 100%, semelhante a da USE-PAAF (NOVIS et al., 2010; PARSI et al., 2011).

Os microRNAs (miRNAs) são segmentos curtos e não codificantes de RNA que regulam a expressão de outros genes. Alterações nos miRNAs estão ligadas ao câncer, ora vistas como consequência, ora como causa. No entanto, deleções, ampliações e quebras cromossômicas em regiões que contém miRNAs desencadeiam aspectos específicos da tumorigênese como oncogênese, progressão, invasão, metástase e angiogênese. Mais de 50% dos miRNAs descritos estão localizados em regiões genômicas associadas com câncer ou pontos de fragilidade genômica (BLOOMSTON et al., 2007; SZAFRANSKA, et al., 2007).

A visão clássica do câncer como uma doença genética que afeta oncogenes e genes de supressão tumoral que codificam proteínas está agora expandindo para incluir os miRNAs. Os miRNAs podem, por si mesmos, agir como supressores tumorais quando suprimidos, como o miR-15a, miR16-1 e a família let-7 (TONG; NEMUNAITIS, 2008; TSANG; KWOK, 2008), ou como oncogenes, quando amplificados, no caso do miR-155, miR17-2 ou miR-21 (HABBE et al., 2009; HUANG et al., 2010; MEDINA; NOLDE; SLACK, 2010).

Ainda existem evidências de expressão tecidual distinta no número de miRNAs entre o pâncreas normal, a pancreatite crônica e o carcinoma pancreático (ZHU, Z. et al., 2009), bem como no plasma de pacientes com AP (WANG et al., 2009a).

Quadro 1 – Alterações dos miRNAs no adenocarcinoma pancreático e os genes que afetam.

miRNA	Expressão	Gene-alvo	Referência
miR-21	↑	PDCD4 e TIMP3	Du Rieu et al., 2010
miR-655	↑	ZEB1 e TGFBR2	Harazono et al., 2013
miR-150	↑	IGF1R	Farhana et al, 2013
miR-630	↑	IGF1R	Farhana et al, 2013
miR-155	↑	SEL 1L	Liu, Q. et al., 2013
miR-424-5p	↑	SOCS6	Wu, et al., 2013
miR-197	↑	p120 catenina	Hamada et al., 2013
miR-10a	↑	HOXA1	Ohuchida et al. 2012
miR-10b	↑	-	Nakata et al, 2011; Setoyama et al., 2011
miR-100	↑	IGF1R	Huang, J. et al., 2013
miR-301a	↑	Bim	Chen, Z. et al, 2012
miR-375	↑	-	Zhou et al, 2012
miR-218	↓	ROBO1	He et al. 2013; Li, C.H., 2013
miR-203	↓	EZH2	Xu et al., 2013
miR-1290	□	-	Li A. et al., 2013
miR-142-3p	↓	HSP70	Mackenzie et al. 2013
Let-7a	↓	RRM	BHUTIA et al., 2013
miR-221	↑	-	Kawaguchi et al., 2013
miR-211	□	-	Giovannetti et al., 2012
miR-34a	↓	NOTCH1	Xia et al. 2012
miR-143	↓	ARHGEF1, ARHGEF2, KRAS	Hu et al., 2012
miR-96	↓	-	Tanaka et al., 2013
miR-34b	↓	Smad3	Liu, C. et al., 2013
miR-101	↓	CDH1	Qazi, A.M. et al., 2012
miR-200	↓	MT1-MMP	Soubani, O. et al., 2012
miR-15b e miR-16	↓	Bcl2	Shen, J. et al., 2012
miR-31	↑□□↓	-	Laurila, E.M. S et al., 2012
miR-146	↓	Smad4	Du, J, et al., 2012
miR-193b	↓	-	Rosero, S. et al., 2010
miR-150	↓	MUC4	Srivastava, et al., 2011
miR-548d	↓	-	Heyn H., et al., 2012
miR-126	↓	ADAM9	Hamada S. et al., 2012
miR-34	↓	-	Liu, C. et al., 2013; Xia, J., et al. 2012
miR-132	↓	-	Zhang S. et al., 2011
miR-148a	↓	CDC25B	Liffers, et al., 2011

Os miRNAs podem ser identificados e quantificados não somente nos tecidos congelados, mas em tecidos fixados em parafina, ou em soro ou plasma. Esses marcadores moleculares minúsculos porém potentes já demonstraram ser eficientes na classificação do AP, na estratificação prognóstica, e como preditor de resposta ao tratamento quimioterápico. De forma quase constante, o miR-21, e menos frequentemente o miR-196, miR-217, miR10b e miR-155 parecem estar hiperexpressos no AP e serem indicativos de pior sobrevida global, pior resposta ao tratamento e maior risco de metástase (HWANG et al., 2010; PREIS *et al.*, 2011b; SCHULTZ et al., 2012).

O presente trabalho é motivado pela necessidade de identificar biomarcadores teciduais e plasmáticos, que possam contribuir com o diagnóstico e a melhor caracterização dos AP, mediante pesquisa de miRNAs, bem como a comparação da expressão desses miRNAs com o biomarcador atualmente mais empregado na prática clínica, o CA 19-9.

# *REVISÃO DA LITERATURA*

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente não existem meios para fazer o diagnóstico precoce e seguro do AP, nem de se estabelecer um tratamento curativo nos estádios mais avançados. Assim, a maioria dos pacientes (80%) apresenta-se com doença disseminada, o que resulta em baixa taxa de ressecção curativa e sobrevida, em média, de 4 a 6 meses. A sobrevida estimada em 5 anos é menor que 5% e, embora o AP não esteja entre os cânceres mais frequentes, é considerado uma das causas mais frequentes de morte relacionada ao câncer, com aproximadamente 28.000 mortes por ano nos EUA (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013) e 40.000 mortes por ano da Europa (FERLAY, J et al., 2013). Existe, portanto, uma necessidade da pesquisa de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico, para que se possa melhorar o manejo clínico do AP.

### 2.1 Fatores de risco para o adenocarcinoma de pâncreas

As causas exatas para o AP não são conhecidas, mas fatores como sexo, idade e raça parecem estar relacionados. Fatores modificáveis como tabagismo, obesidade, diabetes, risco ocupacional, dentre outros, aumentam o potencial de se adquirirem mutações genéticas que resultam no AP (IODICE et al., 2008).

#### 2.1.1 Sexo

O câncer de pâncreas é cerca de 30% mais frequente em homens do que em mulheres. Dados dos EUA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013), União Europeia (FERLAY, J et al., 2013), e de todo o mundo (FERLAY, JACQUES *et al.*, 2010) demonstram maior incidência e mortalidade para os homens em comparação com as mulheres. As diferenças observadas entre os sexos podem estar relacionadas aos diferentes estilos de vida como tabagismo, etilismo, dentre outros (HOEM; BACKMAN, 1999).

#### 2.1.2 Idade

A idade avançada é um dos fatores de risco mais importantes para a incidência e mortalidade do AP. O risco é mais baixo até a idade de 50 anos, mas aumenta subitamente a partir de então. Em análise retrospectiva, a taxa de incidência do AP vai de 1,2/100.000 em homens de 35-39 anos para 100,5/100.000



nos indivíduos com 85 anos ou mais (FERLAY, JACQUES et al., 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). A idade mediana ao diagnóstico é de 71 anos nos EUA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013) e 72 anos na Inglaterra (PARKIN, 2011), o que significa que metade dos pacientes terão a doença acima de 71/72 anos.

### *2.1.3 Tabagismo*

O tabagismo é o fator de risco mais importante para AP e estima-se que seja responsável por 20-30% de todos os casos (IODICE et al., 2008; PARKIN, 2011). Está associado a um risco duas vezes maior de câncer de pâncreas, e este risco declina após o período de cessação tabágica, atingindo o mesmo risco do não tabagista após 20 anos de abstinência (BOSETTI et al., 2012a).

O risco de AP aumenta com a duração e intensidade do hábito tabágico, explicando a incidência mais precoce do AP encontrada entre fumantes (BOSETTI et al., 2012a; LYNCH et al., 2009). Há aumento em 27% no risco de câncer de pâncreas a cada cinco cigarros fumados por dia (LEENDERS et al., 2012). O tabagismo passivo aumenta em 50% no risco de AP (VRIELING et al., 2010) e crianças que estão expostas a fumaça de cigarro diariamente possuem o dobro do risco de terem AP ao longo da vida (CHUANG et al., 2011).

### *2.1.4 Obesidade*

O risco de desenvolver o AP é cerca de 20% maior no obeso quando comparado ao indivíduo de peso normal (ARSLAN et al., 2010; BERRINGTON DE GONZALEZ; SWEETLAND; SPENCER, 2003). Estima-se que 12% dos casos de AP da Inglaterra sejam atribuídos a sobrepeso e obesidade (PARKIN, 2011). Os mecanismos envolvidos que explicam tais observações não estão claros, mas, provavelmente, a obesidade levaria a uma inflamação crônica, mediada por moléculas como TNF-alfa, IL-6, gerando um estresse oxidativo com disfunção mitocondrial e autofagia (GUKOVSKY et al., 2013).

### *2.1.5 Álcool*

Não existe evidência clara do efeito causal do álcool sobre o AP. Um discreto risco foi observado com o consumo maior que 30g de álcool por dia (GENKINGER et al., 2009). Uma meta-análise identificou aumento de 20-30% no risco de AP nas pessoas que consumiam três ou mais doses de álcool ao dia

(TRAMACERE et al., 2010). Entretanto, um grande estudo de caso-controle recente comprovou que não existe aumento no risco, mesmo quando o consumo é de 60g por dia ou mais de álcool, seja na forma de bebida destilada ou fermentada, como cerveja ou vinho (MICHAUD, 2010).

#### *2.1.6 Nível Socioeconômico*

O nível socioeconômico, medido por anos de educação, é inversamente proporcional a mortalidade por câncer de pâncreas (JEMAL et al., 2013). Ainda a baixa renda está associada a um aumento de 80% no risco de AP em homens brancos e a um risco ainda maior de 170% em negros norte-americanos, mesmo depois de controlar para fatores de viés como consumo de álcool, tabagismo e dieta (SILVERMAN et al., 2003).

#### *2.1.7 Raça*

A taxa de incidência e mortalidade varia de acordo com o grupo étnico. Nos EUA, a incidência mais alta é encontrada nos afro-americanos (incidência 15,3/100.000, mortalidade 13,8/100.000), seguido de taxas intermediárias nos brancos americanos (incidência 11,6/100.000, mortalidade 10,7/100.000), e as taxas mais baixas estão relacionadas aos americanos asiáticos (incidência 8,8/100.000, mortalidade 7,5/100.000) (AMERICAN CANCERSOCIETY, 2013).

#### *2.1.8 Dieta*

Diversos aspectos nutricionais vêm sendo associados ao AP. Alguma evidência sugere associação entre consumo de carne vermelha e embutidos e aumento do risco de AP (LARSSON; WOLK, 2012). De outro lado, a ingestão de folato, presente em frutas e vegetais frescos, teria valor de proteção contra o risco de desenvolver AP (JANSEN et al., 2013). Foi identificada associação entre a ingestão de refrigerantes e o desenvolvimento de AP, provavelmente por seu alto teor de açúcar, o que aumenta os níveis de insulina e promove obesidade e diabetes (GENKINGER et al., 2012).

#### *2.1.9 Diabetes*

O diabetes melitus tanto é fator de risco para o AP como um sinal precoce do aparecimento deste câncer. Ao diagnóstico de AP, cerca de 25% dos pacientes

estão diabéticos e outros 40% estão pré-diabéticos (CHARI et al., 2008). Os pacientes com diabetes apresentam aumento de risco para AP independente da duração do diabetes e este risco é maior para os que têm um pior controle glicêmico (HENRY; PRIZMENT; ANDERSON, 2013).

#### *2.1.10 Pancreatite*

Há forte associação entre pancreatite crônica e AP, e tal condição pode ser sinal precoce de AP (RAIMONDI et al., 2010). O aumento do risco é de seis vezes para os pacientes com pancreatite crônica e está relacionado com a duração e recidiva da pancreatite (RAIMONDI et al., 2010). O intervalo entre o diagnóstico da pancreatite e o aparecimento do câncer pode ser de 10 a 20 anos, porém apenas 4% dos pacientes com pancreatite crônica desenvolverão AP ao longo de suas vidas (LOWENFELS et al., 1993).

#### *2.1.11 Risco Genético*

Embora a maioria dos AP apareça de forma esporádica, cerca de 10% dos casos podem ser atribuídos a causas genéticas (PETERSEN, G. et al., 2006). Há três formas clínicas distintas de apresentação da predisposição genética:

- Síndromes de predisposição tumoral, que possuem fenótipo clínico diferente, porém possuem risco aumentado de AP: Peutz-Jeghers, Li-Fraumeni, síndrome do melanoma-carcinoma pancreático, síndrome do câncer de ovário e mama.
- Fibrose cística e pancreatite hereditária: risco aumentado de AP, possivelmente, em virtude da pancreatite crônica.
- Câncer de pâncreas familiar: dois ou mais parentes de primeiro grau, ou três parentes em qualquer grau com carcinoma de pâncreas numa família, e que não preencham critério de nenhuma outra síndrome genética conhecida (SCHNEIDER et al., 2011).

## **2.2 Etiopatogênese**

O AP é uma doença genética causada por mutações específicas, herdadas e adquiridas, de genes associados ao câncer. Os mecanismos envolvidos na tumorigênese foram mais esclarecidos após o sequenciamento dos éxons de

20.661 genes em 24 casos de adenocarcinomas ductais de pâncreas (JONES *et al.*, 2008). O mapeamento dos genes envolvidos nos mecanismos moleculares do AP deu nova compreensão sobre a agregação familiar da doença, a progressão das células a partir do ducto pancreático normal, as lesões precursoras não invasivas, culminando com o carcinoma invasivo (SINGH; SRINIVASAN, 2011).

A progressão de uma célula normal para o AP requer o acúmulo de uma série de mutações genéticas herdadas ou adquiridas. As mutações pontuais de ativação do oncogene KRAS são prevalentes no AP e resultam na estimulação de diversas vias, incluindo a via da proteína quinase ativada pelo mitógeno RAF e a via da fosfoinositidilquinase-3. Outras alterações genéticas incluem o encurtamento do telômero e a inativação de genes supressores tumorais como CDKN2A, TP53, e SMAD4, que codificam p16, p53, e SMAD4, respectivamente, e também contribuem para a progressão do câncer pancreático (YACHIDA *et al.*, 2010).

Os eventos genéticos podem se apresentar em diferentes estágios no desenvolvimento do AP, nas lesões precursoras histologicamente definidas como neoplasia intraepitelial pancreática (NIP), neoplasia mucinosa papilífera intraductal, ou neoplasia cística mucinosa. Cada lesão precursora representa uma via alternativa na formação do AP e possui eventos genéticos e apresentação únicos que controlam o seu desenvolvimento, conforme ilustrado na figura 1 (LOWERY; O'REILLY, 2012).

A maioria das alterações genéticas no AP representam mutações somáticas, presentes em múltiplas combinações, e podem ser divididas em três grandes categorias (COWAN; MAITRA, 2014):

- Mutação de ativação de oncogenes, como o KRAS.
- Inativação de genes supressores de tumores, como o p16/CDKN2A, TP53 e SMAD4.
- Inativação de genes de reparo do DNA, como o hMLH1 e MSH2.

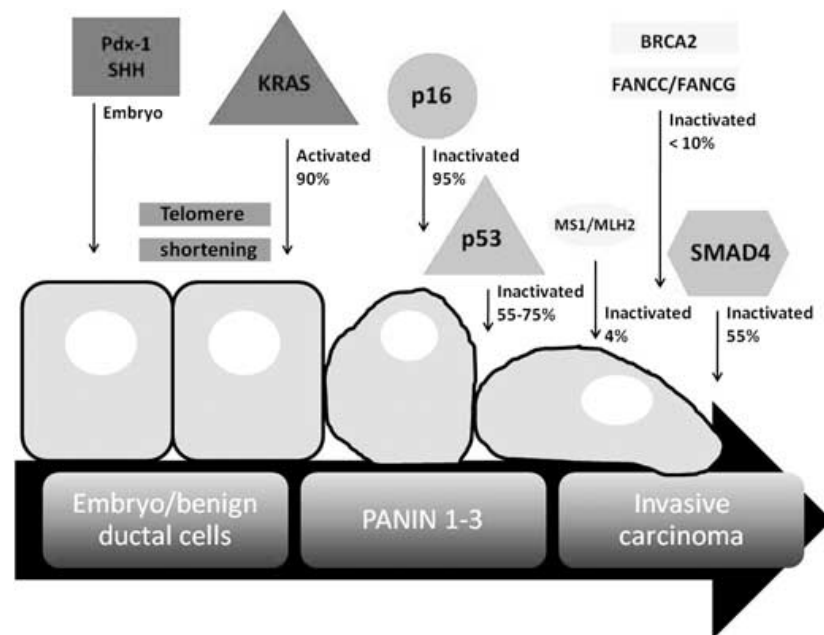


Figura 1 - Mutações somáticas associadas ao AP (Fonte: LOWERY; O'REILLY, 2012)

Dentre as mutações mais frequentes, está a ativação do KRAS, presente em mais de 90% dos pacientes com AP (JONES et al., 2008). Esta mutação parece ocorrer precocemente na carcinogênese do AP, uma vez que está presente nas lesões pancreáticas pré-malignas e sua prevalência aumenta a medida que aumenta o grau de displasia das lesões precursoras (WU et al., 2011).

A perda de função de genes supressores tumorais foi bem estudada no AP, e em mais da metade dos casos existe inativação de p16/CDKN2A, TP53 e SMAD4 (ROZENBLUM et al., 1997).

O gene p16/CDKN2A encontra-se no cromossomo 9p e sofreu inativação somática em praticamente todos os AP (mais que 94% de todos os casos), levando a perda de função do p16, o produto proteico do gene CDKN2A. A importância da inativação desse gene é por sua função no controle do ciclo celular desses tumores (COWAN; MAITRA, 2014).

Cerca de 80% dos pacientes com AP possuem inativação do gene TP53, que leva a perda da regulação da proliferação celular e da apoptose em resposta ao dano do DNA (JONES et al., 2008).

No cromossomo 18q localiza-se o gene SMAD4, inativado em aproximadamente 60% dos pacientes com AP e que possui participação fundamental na sequência de sinais intracelulares dos receptores de fator de

crescimento transformante beta (TGF $\beta$ ). Os casos de AP com perda de SMAD4 possuem maior risco de metástase a distância e pior prognóstico (BLACKFORD et al., 2009).

A análise de lesões pancreáticas intraductais estabeleceu a presença acumulativa das mesmas mutações genéticas do AP na chamada “neoplasia intraepitelial pancreática” (NIP). A medida que aumenta o número de mutações, aumenta o grau de displasia. A mutação do gene KRAS aparece primeiro no NIP-1, quando o gene p16/CDKN2A sofre mutação a lesão transforma-se em NIP-2, e por último a inativação do SMAD4 e do TP53 aparecem somente no grau mais alto de displasia, o NIP-3 (BLACKFORD et al., 2009).

Menos do que 10% dos pacientes com AP possuem inativação do gene BRCA-2, e constitui-se em uma das mais importantes causas de câncer pancreático familiar, pois as mutações do BRCA-2 são encontradas em até 17% dos pacientes com câncer de pâncreas familiar (RUSTGI, 2014).

Os genes de reparos do DNA, como hMLH1 e hMSH2 foram bem estudados por causa de sua importância na patogênese do câncer colorretal, particularmente na síndrome de câncer colorretal não-polipose, síndrome de Lynch (do inglês HNPCC, *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer Syndrome*). Os pacientes com HNPCC possuem mutações herdadas nos genes de reparo do DNA e um risco elevado de cânceres gastrointestinais, inclusive câncer pancreático (WILENTZ et al., 2000).

Os genes de reparo do DNA estão mutados em cerca de 4% dos AP e, quando presentes, conferem um aspecto histológico “medular” específico, o que facilita seu reconhecimento à microscopia. A presença desta mutação confere melhor prognóstico, embora sejam menos responsivos a quimioterapia baseada em 5-FU (RIBIC et al., 2003).

### **2.3 CA 19-9 e o adenocarcinoma de pâncreas**

O antígeno do câncer 19-9 (CA 19-9) é uma glicoproteína mucina que está relacionada com a proteína do grupo sanguíneo de Lewis. Este antígeno está presente em tecidos epiteliais do pâncreas, células dos ductos biliares, estômago, bexiga, cólon, endométrio, glândulas salivares, e próstata (STEINBERG, 1990). O suco pancreático normal, biliar (em condições benignas), e mesmo o fluido seminal também contêm CA 19-9 (STEINBERG, 1990). Níveis séricos podem estar

elevados tanto em indivíduos saudáveis quanto naqueles com condições benignas ou malignas (TEMPERO et al., 1987).

O CA 19-9 foi originalmente identificado por um anticorpo monoclonal em uma linhagem celular de câncer coloretal (KOPROWSKI et al., 1979; LOCKER et al., 2006), mas provou ser mais útil na avaliação do câncer pancreático. Este antígeno sialilado do grupo sanguíneo Lewis A é identificado através de um ensaio radioimunométrico (LOCKER et al., 2006), no entanto, cerca de 5% da população são antígeno Lewis A-B- e não produzem o antígeno CA 19-9, e nestes indivíduos tal ensaio não pode ser utilizado (LOCKER et al., 2006; TEMPERO et al., 1987).

O câncer de pâncreas é apenas uma das várias condições que podem causar níveis elevados de CA 19-9, e esse exame não é recomendado com teste de triagem (FREBOURG et al., 1988). A sua sensibilidade (68-93%) e especificidade (76-100%) são insuficientes para um rastreamento populacional adequado (STEINBERG, 1990).

A colestase decorrente de doença de ducto biliar, cirrose, ou pancreatite podem elevar falsamente os níveis de CA 19-9 e causar incerteza diagnóstica. A elevação do CA 19-9 se correlaciona com os níveis de fosfatase alcalina, e a determinação seriada dos níveis do CA 19-9 após o alívio de icterícia e/ou a utilização de níveis de corte mais altos em pacientes com icterícia podem ser necessários para excluir o câncer de pâncreas em pacientes com imagem normal na investigação por imagem (LOCKER et al., 2006).

O CA 19-9 é útil na avaliação da eficácia da terapia e pode ser medido no início do tratamento para a doença localmente avançada e metastática e a cada 1-3 meses durante o período de tratamento com a quimioterapia, a radioterapia e/ou outras terapias. A queda nos níveis de CA 19-9 ajuda a confirmar a eficácia de um regime terapêutico (SEUFFERLEIN et al., 2012).

Por outro lado, um aumento dos níveis CA 19-9 pode indicar a necessidade de alterar o regime de tratamento. Se o CA 19-9 aumentar durante o período de vigilância, a progressão da doença deve ser confirmada com o exame clínico, diagnóstico por imagem e/ou biópsia. No entanto, não existe consenso quanto à frequência com que o teste do CA 19-9 deve ser realizado, qual aumento é importante ou o período de tempo de elevação dos níveis de CA 19-9 considerado significativo (LOCKER et al., 2006).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor

preditivo negativo (VPN) do CA 19-9 para o diagnóstico de câncer de pâncreas é dependente do nível de corte (Tabela 1). Um nível normal é inferior a 37 U/mL, o que corresponde a uma sensibilidade de 81% (68% -93%), uma especificidade de 90% (76% -100%), VPP de 72%, e VPN de 96% (STEINBERG, 1990). Estudos também mostram que os níveis de CA 19-9 podem correlacionar-se com a carga tumoral, a recorrência da doença, e a resposta ao tratamento. Assim, o CA 19-9 é um marcador melhor para neoplasias pancreáticas avançadas do que para a doença em estágio inicial.

Tabela 1 - Níveis de corte de CA 19-9 para o diagnóstico de câncer de pâncreas

Corte (U/mL)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VVP (%)	VPN (%)
37	81	90	72	96
100	68	98	87	94
300	54	99	92	91
1000	41	99,8	97	89

Fonte: Steinberg, 1990.

Os valores elevados de CA 19-9 (isto é, maior do que 1000 U/mL) ao diagnóstico podem se correlacionar com tumores irresssecáveis ou neoplasias mais avançadas, embora esta avaliação pré-operatória de CA 19-9 não tem sido amplamente utilizada para estabelecer irresssecabilidade. Níveis elevados de marcador também podem ser utilizados para prever o desfecho clínico dos pacientes. A diminuição ou normalização dos níveis de CA 19-9 no pós-operatório se correlaciona com maior sobrevida. Por outro lado, o aumento dos níveis de marcadores no pós-operatório foram correlacionados com menor tempo de sobrevivência e aumento da recorrência da doença (FREBOURG et al., 1988).

Finalmente, o CA 19-9 pode ser utilizado para monitorar a resposta do tumor ao tratamento curativo com a cirurgia, com ou sem tratamentos adicionais como quimioterapia, radioterapia e/ou outras terapias alvo ou biológicos. A diminuição do CA 19-9 confirma a eficácia do regime terapêutico, enquanto que um nível estável ou crescente pode indicar a necessidade de mudança na terapia (STEINBERG, 1990).



## 2.4 Diagnóstico

As técnicas de imagem de rotina, tais como tomografia computadorizada ou ressonância magnética, podem não detectar o AP nas fases iniciais e nem diferenciar lesões benignas de malignas (REICHERT, 2011). Na prática clínica, a presença de perda de peso, icterícia, CA 19-9 >37 U/ml, acompanhada de alteração da via biliar e massa na cabeça do pâncreas, são alterações que orientam a conduta terapêutica na maioria dos centros especializados, porém o exame anatomopatológico segue sendo o padrão-ouro na confirmação de malignidade. Por outro lado, as dificuldades de realização do estudo anatomopatológico das massas pancreáticas no pré-operatório, atribuídas às limitações do material tecidual obtido por biópsia percutânea ou por ecoendoscopia, expõem pacientes a uma duodenopancreatectomia cefálica para doença inflamatória benigna (ABRAHAM et al., 2003).

A biópsia por agulha fina guiada por ultra-sonografia endoscópica (EUS-FNA) é uma modalidade minimamente invasiva para o diagnóstico pré-operatório do câncer de pâncreas e com taxas de complicações de cerca de 1,6% (VINCENT et al., 2011). Por outro lado, a biópsia do pâncreas guiada por agulha fina não pode ser usada rotineiramente para a detecção precoce ou rastreamento populacional para AP (SINGH;SRINIVASAN, 2011), o que reforça a necessidade de identificação de bons biomarcadores, especialmente os obtidos por técnicas não-invasivas através do soro ou plasma e que possibilitem o diagnóstico de carcinoma pancreático por meio de técnicas acuradas e menos invasivas (REICHERT, 2011).

### 2.4.1 Quadro clínico

A apresentação clínica do AP varia de acordo com sua localização anatômica. Aproximadamente 60-70% destes estão localizados na cabeça do pâncreas, enquanto 20-25% estão no corpo/cauda, e o restante envolve todo o órgão (MODOLELL; GUARNER; MALAGELADA, 1999). Comparado a outros tumores do corpo e cauda do órgão, o AP da cabeça do pâncreas apresenta-se mais comumente com icterícia, esteatorréia e perda de peso (BAKKEVOLD; ARNESJØ; KAMBESTAD, 1992; KALSER; BARKIN; MACINTYRE, 1985; PORTA et al., 2005).

Um estudo multi-institucional com 185 pacientes de AP identificou os sintomas mais frequentes ao diagnóstico (Quadro 1) (PORTA et al., 2005).

Quadro 2 – Sinais e sintomas mais frequentes ao diagnóstico de adenocarcinoma de pâncreas. (Fonte: Porta et al., 2005).

<b>Sinal</b>	<b>%</b>	<b>Sintoma</b>	<b>%</b>
Icterícia	55%	Astenia	86%
Hepatomegalia	39%	Perda de Peso	85%
Massa Hipocôndrio Direito	15%	Anorexia	83%
Caquexia	13%	Dor abdominal	79%
Massa epigástrica	9%	Colúria	59%
Ascite	5%	Icterícia	56%
		Náusea	51%
		Dor lombar	49%
		Diarréia	44%
		Vômito	33%
		Esteatorréia	25%
		Tromboflebite	3%

A abordagem diagnóstica e o tratamento do AP continuam a ser desafiadores. Embora o carcinoma do pâncreas possa ser tratado cirurgicamente na fase inicial, a maioria dos casos apresenta-se em um estágio avançado, com disseminação vascular do tumor e sua propagação para os linfonodos regionais (VINCENT et al., 2011).

Além disso, o diagnóstico diferencial de AP e massas pseudotumorais causadas por pancreatite crônica é muitas vezes difícil devido a características indistinguíveis nos exames de imagem e na apresentação clínica (SAITO et al., 2011), bem como no estudo anatomopatológico. Um estudo realizado em pacientes submetidos a duodenopancreatectomia por suspeita de malignidade no Hospital Johns Hopkins revelou em 10,6% de achados cirúrgicos não neoplásicos (maior parte pancreatite crônica) e 9,2% eram tumores benignos que tinham sido suspeitados de neoplasia maligna no pré-operatório, de forma a indicar a cirurgia radical (ABRAHAM et al., 2003).

As características clinicopatológicas determinadas após a duodenopancreatectomia (DP), incluindo o envolvimento linfonodal, o grau histológico, a invasão venosa e *status* da margem de ressecção, estabelecem estratificações de risco entre os pacientes com AP (VINCENT et al., 2011). Por outro lado, esses fatores por si só não representam toda a variabilidade

prognóstica observada no AP que influencia diretamente na sobrevida (RACHAGANI; KUMAR; BATRA, 2010). A histologia não tem sido suficiente para esclarecer as diferentes respostas que os pacientes apresentam ao mesmo esquema terapêutico. Existem ensaios que permitem prever a quimiosensibilidade *in vitro* de tumores a determinados agentes quimioterápicos, no entanto sua aplicabilidade clínica é limitada (LIAO, Q. et al., 2010).

A natureza sistêmica do AP é uma constatação frente à recorrência precoce após extensas ressecções da doença aparentemente localizada. Desta forma, a identificação de marcadores do AP no pré-operatório pode melhorar os critérios de estadiamento e de seleção dos pacientes para cirurgia em circunstâncias limítrofes de ressecção (VINCENT et al., 2011).

A análise molecular é claramente uma fonte de biomarcadores clinicamente úteis. Os tumores com características clínico-patológicas semelhantes podem conter diferenças moleculares que se associam à variação do comportamento clínico: isso foi claramente demonstrado no pâncreas e outros tipos de câncer, com subgrupos de tumores classificados baseando-se na expressão de genes (SINGH, 2011).

## **2.5 Modalidades terapêuticas**

### **2.5.1 Cirurgia**

A cirurgia constitui-se atualmente o único tratamento de potencial curativo para o AP, no entanto somente 15-20% dos pacientes são candidatos ao tratamento cirúrgico definitivo. Os métodos de imagem servem para discernir os pacientes mais adequados para ressecção com caráter curativo daqueles que poderão se beneficiar de algum procedimento cirúrgico paliativo (SAIF, 2011).

Quando a doença está limitada ao órgão e aos linfonodos peripancreáticos (estádio I-IIb), a cirurgia apresenta máximo potencial de cura. Outros tumores com envolvimento limitado de regiões peripancreáticas, como a veia mesentérica superior, a veia porta, a artéria mesentérica superior ou a artéria hepática podem também ser tecnicamente ressecáveis, porém o impacto na sobrevida ainda é controverso. No caso de estreitamento ou oclusão da veia mesentérica superior o tumor é considerado como limítrofe para ressecção e existem discussões sobre riscos e benefícios de cirurgia de ressecção tumoral combinada a enxertia vascular no mesmo tempo cirúrgico (BALCOM et al., 2001).

No entanto, aqueles que apresentam metástase no peritônio, fígado, omento ou qualquer sitio extra-abdominal não possuem indicação de ressecção cirúrgica, e não se beneficiarão de qualquer procedimento cirúrgico extenso (GOOIKER *et al.*, 2011).

Atualmente, os exames de imagem são inadequados em identificar os AP que são realmente ressecáveis, sobretudo pela baixa sensibilidade para doença metastática de pequeno volume, como metástase menor que 1 cm na superfície do fígado ou peritônio, que raramente é vista na tomografia computadorizada (TC), na ressonância nuclear magnética (RNM) ou na ultrassonografia abdominal (US). O emprego da laparoscopia como recurso de estadiamento aumenta a eficácia cirúrgica dos pacientes que não apresentam doença metastática aparente pelos exames de imagem pré-operatórios. Está indicado também nos pacientes com doença aparentemente localizada, porém tumores maiores que 3 cm, tumores de corpo ou cauda e com CA 19-9 elevado ( $> 100$  UI/ml) (KATZ *et al.*, 2008).

O procedimento cirúrgico considerado padrão na maior parte dos centros de tratamento do AP é a duodenopancreatectomia ou cirurgia de Whipple, e consiste na retirada da cabeça do pâncreas, duodeno, 15 cm proximais do jejuno, ducto biliar comum, vesícula biliar e gastrectomia parcial.

A morbi-mortalidade do procedimento de Whipple vem caindo com o passar do tempo e a modernização dos hospitais, passando de cerca de 15% na década de 1970, a menos de 4% nas grandes séries atuais (BALCOM *et al.*, 2001). A maior razão da melhora dos resultados foi apontada por uma meta-análise de 14 estudos e é o desenvolvimento de centros especializados no tratamento do AP, com cirurgiões e serviços de alto volume operatório específico nessa área de atuação. Houve uma correlação entre o volume cirúrgico do hospital, a mortalidade pós-operatória e a sobrevida global (GOOIKER *et al.*, 2011).

Os pacientes que se apresentem com obstrução biliar ao diagnóstico possuem maior risco de complicações perioperatórias e devem ter o ducto biliar drenado antes da cirurgia, de forma seletiva (SANTOS *et al.*, 2005, Qiu *et al.*, 2011). Deve haver uma ampla discussão sobre a via de drenagem biliar, já que hoje pode ser feita por via endoscópica, percutânea, laparoscópica ou por cirurgia convencional. Na presença de colangite, a preferência é por colocação de próteses expansíveis que descomprimam e drenem o conteúdo infectado enquanto a infecção é debelada (MOSS *et al.*, 2007).

### 2.5.2 Quimioterapia

Como somente uma minoria dos pacientes com AP apresentam doença ressecável ao diagnóstico, a maioria dos pacientes possui doença localmente avançada ou metastática, com sobrevida mediana variando de oito a 12 meses para aqueles com doença localizada, e três a seis meses para os que tem metástase ao diagnóstico (SAIF, 2011).

É consenso que todos os pacientes submetidos a ressecção cirúrgica com intuito curativo são candidatos a terapia adjuvante, mesmo aqueles com doença aparentemente localizada, como pT1pN0 (SEUFFERLEIN et al., 2012).

Há benefício na sobrevida global dos pacientes com AP que receberam quimioterapia adjuvante, e os dois agentes de impacto são gemcitabina e as fluoropirimidinas (LIAO, WEI-CHIH et al., 2013; YU et al., 2013). Uma meta-análise com nove estudos demonstrou que, quando comparado com observação, o risco relativo de morte foi de 0,65 (intervalo de confiança, IC, 95%, 0,49 – 0,84) para fluorouracil, de 0,59 (IC 95%, 0,41 – 0,83) para gemcitabina, após ajustados para fatores como envolvimento linfonodal (LIAO, WEI-CHIH et al., 2013).

Existe dúvida se haveria benefício em adicionar radioterapia a quimioterapia adjuvante aos pacientes com AP. Poucos estudos compararam diretamente quimioterapia com ou sem radioterapia como estratégia adjuvante. O estudo ESPAC-1 comparou em três braços o efeito de quimioterapia versus quimioterapia e radioterapia associados versus observação como tratamento adjuvante no AP. Após o ajuste para os fatores prognósticos mais importantes, a conclusão foi que quimioterapia adjuvante promove ganho de sobrevida, enquanto o acréscimo de radioterapia possui efeito deletério nesta população (NEOPTOLEMOS et al., 2004).

Os pacientes que não são candidatos a tratamento curativo devem receber terapia paliativa, e o principal objetivo deste tratamento não deve ser somente a redução das dimensões do tumor aos exames de imagem, uma vez que existem características de reação desmoplásica e inflamatória em torno do tumor (FREENY, 1989). Até a monitoramento dos marcadores séricos como o CA 19-9 ou CEA deve ser feito com prudência, visto que são notórias as limitações do uso desses marcadores, como sua não alteração em indivíduos com ausência do antígeno sanguíneo Lewis, intervalo variável para sua redução, mesmo com resposta clínica, não padronização da curva resposta clínica-marcador (BAUER et

al., 2013).

O mais importante para avaliar a eficiência de um esquema terapêutico paliativo é sua eficácia clínica, medida em variáveis como qualidade de vida e benefício clínico, que avaliam questões mais gerais como adequações as funções diárias, nível de satisfação com o tratamento, dor, grau de funcionalidade do paciente, entre outros (ALTER, 1996).

A mono-quimioterapia tem sido a principal forma de tratamento do AP metastático, ainda que não exista observação, entre os agentes ativos, de taxa de resposta superior a 10% e sobrevida mediana maior que seis a sete meses.

A razão para a refratariedade do AP aos agentes citotóxicos não está esclarecida, porém a hipótese mais aceita é que as mutações de inativação da função da proteína p16, que é responsável por 90% dos casos de AP, liberam a inibição transcricional do gene supressor tumoral do retinoblastoma (RB). Esta superexpressão do RB pode então permitir que as células escapem da apoptose induzida pela quimioterapia (PLATH et al., 2002).

A gemcitabina é o agente mais empregado para os pacientes com AP que não são candidatos a terapias mais agressivas. Trata-se de um análogo de nucleosídeo com semelhança estrutural a citarabina. Embora os estudos iniciais tenham sugerido baixa taxa de resposta, 6-11%, no tratamento em primeira linha como agente único (CARMICHAEL et al., 1996; CASPER et al., 1994), o benefício clínico foi observado mesmo na ausência de resposta por imagem (11 versus 27%) (ROTHENBERG et al., 1996), e sua aprovação hoje como primeira linha baseia-se somente no benefício clínico superior ao grupo tratado com placebo.

Os derivados das fluoropirimidinas, como o 5-FU, a capecitabina e o S-1 podem ser utilizados como monoterapia, com resposta clínica que varia de 2-25%, e boa aceitação geral. O perfil de efeitos colaterais inclui eritema acral-plantar (síndrome mão-pé), náusea e diarreia (SCHÜLLER et al., 2000; VAN RIJSWIJK et al., 2004).

Outros agentes quimioterápicos utilizados em monoterapia incluem antracíclicos (doxorubicina e epirrubicina) (WILS et al., 1985), estreptozocina, ifosfamida, taxanes (docetaxel e paclitaxel), camptotecinas (topotecano e irinotecano) (SAIF, 2011).

A combinação de agentes quimioterápicos contra o AP produz uma maior taxa de resposta, com maior toxicidade, porém nem sempre com a melhor

sobrevida que se esperaria após tal intensidade (VINCENT et al., 2011).

O esquema FOLFIRINOX (combinação de 5-FU, irinotecano e oxaliplatina) foi o primeiro esquema de poli-quimioterapia a conferir ganho de sobrevida a um selecionado grupo de pacientes com AP metastático ou irressecável. A comprovação está no estudo de fase III ACCORD 11, que comparou em 342 pacientes em ótimo estado clínico a combinação FOLFIRINOX versus gemcitabina monoterapia. O estudo precisou ser interrompido precocemente pois a diferença em sobrevida entre os dois grupos impediu a continuação do braço que recebia somente gemcitabina (taxa de resposta 32 versus 9%; sobrevida global 11,1 versus 6,8 meses) (CONROY et al., 2011).

A toxicidade foi maior no grupo de recebeu FOLFIRINOX, e é opinião corrente entre os especialistas que, embora seja o esquema de melhor taxa de resposta e sobrevida, não é de fácil manejo para o paciente debilitado que habitualmente frequenta os consultórios médicos fora dos protocolos de pesquisa. Hoje em dia, dentro do universo dos pacientes candidatos, o FOLFIRINOX é prescrito para somente 18% daqueles com índice de desempenho 1, e para 3% dos pacientes com índice de desempenho 2 segundo entrevista realizada a 370 oncologistas americanos, no ano de 2010 (BENDELL et al., 2011).

A segunda combinação com ganho de sobrevida é de gemcitabina associada a paclitaxel em nanopartículas estabilizadas com albumina (nab-paclitaxel). No estudo de fase III MPACT, com 861 pacientes sem tratamento prévio, a combinação de gemcitabina com nab-paclitaxel proporcionou uma maior taxa de resposta (23 versus 7%) e maior sobrevida global (8,5 versus 6,7 meses) em relação ao grupo que recebeu gemcitabina somente. O braço da combinação apresentou mais efeitos colaterais como neutropenia, neuropatia, diarreia e fadiga, porém de leve a moderada nos grupos estudados (VON HOFF et al., 2013).

Outros esquemas com poliquimioterapia utilizam sobretudo em combinação com gemcitabina, agentes como cisplatina, oxaliplatina, capecitabina, irinotecano ou 5-FU (STATHIS; MOORE, 2010). Em todos, o braço que recebe a combinação apresenta um ganho de sobrevida global marginal, quando efetivamente ocorre, e as custas de um aumento excessivo de toxicidade e deve ser oferecido para os pacientes que precisam de resposta rápida e que toleram os efeitos colaterais do esquema escolhido.

Das terapias de alvo molecular atualmente disponíveis para uso clínico, a

molécula contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o erlotinib, está aprovada em combinação com gemcitabina para uso em pacientes com AP avançado. O estudo de fase III canadense com 569 pacientes demonstrou melhora da sobrevida global no grupo que recebeu a combinação erlotinib e gemcitabina em comparação ao que recebeu gemcitabina isolada (6,2 *versus* 5,9 meses) mesmo se tal grupo não apresentou considerável número de respostas objetivas por imagem (MOORE et al., 2007).

## 2.6 Biomarcadores no câncer de pâncreas

A pesquisa para identificação de biomarcadores que possibilitem a detecção mais precisa do AP é uma necessidade, uma vez que os métodos utilizados em seu diagnóstico são invasivos, podem acarretar em morbidade ao paciente e a sobrevida e o prognóstico estão diretamente ligados ao estágio em que a doença é diagnosticada. Em consequência, o diagnóstico precoce permitiria uma maior taxa de ressecção completa com um melhor prognóstico.

Os miRNAs tem revelado um grande potencial como biomarcadores para diagnóstico do AP, bem como seu prognóstico. As neoplasias intraductais papilares (NIP) são lesões não invasivas, precursoras do AP. O aumento da expressão do miR-21 e do miR-155 no suco pancreático dos pacientes com NIP já foi demonstrado (HABBE et al., 2009).

Por outro lado, outros estudos ainda precisam confirmar o papel desses miRNA como biomarcadores de NIP. A superexpressão dos miR-205 e miR-21 precedem as alterações fenotípicas no ductos pancreáticos, tanto nas amostras de humanos quanto de ratos transgênicos que desenvolveram câncer (HUMEAU; TORRISANI; CORDELIER, 2013).

A superexpressão pode iniciar-se precocemente na transformação do tecido pancreático normal em maligno (JIAO *et al.*, 2012), o que reforça o emprego do miR-21 no diagnóstico precoce do AP. Finalmente, foram identificados nove miRNAs no conteúdo de um cisto pancreático que podem ser utilizados como biomarcadores para diferenciar a NIP, e prosseguir com ressecção, ou caracterizar um cisto não mucinoso e manter observação, com sensibilidade de 89% e especificidade de 100% (MATTHAEI et al., 2012).

De uma forma geral, os miRNAs podem ser identificados e quantificados não somente nos tecidos congelados, mas em tecidos fixados em parafina, ou em soro



ou plasma. Esses marcadores moleculares minúsculos porém potentes já demonstraram ser eficientes na classificação do AP, na estratificação prognóstica, e como preditor de resposta ao tratamento quimioterápico. De forma quase constante o miR-21, e menos frequentemente o miR-196, miR-217, miR10b e miR-155 parecem estar hiperexpressos no AP, e são indicativos de pior sobrevida global, pior resposta ao tratamento e maior risco de metástase (HWANG et al., 2010; PREIS et al., 2011b; SCHULTZ et al., 2012).

### 2.6.1 Biogênese do MicroRNA

Os microRNAs (miRNA) são moléculas de RNA de cadeia simples de cerca de 17-23 nucleotídeos de comprimento, que funcionam na regulação da expressão do gene, e estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo diferenciação, proliferação e apoptose (LYNAM-LENNON; MAHER; REYNOLDS, 2009). Evolutivamente, sua origem é do reino vegetal como forma de proteção ao material genético de interferências externas. O primeiro pequeno RNA não codificante identificado foi o lin-4, regulador do gene de controle do crescimento larval lin-14, no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (LEE, et al. 1993). Em 2000 foi identificado o primeiro miRNA em vertebrados, o let-7a (PASQUINELLI et al., 2000).

O processo de biogênese dos miRNAs é complexo e envolve componentes nucleares e citoplasmáticos (LU et al., 2005). Inicialmente, os miRNAs são produzidos na forma de um transcrito primário longo (pri-miRNA), de várias quilobases de extensão, pela RNA polimerase II. O pri-miRNA é processado, ainda no núcleo, por uma endonuclease RNase III, conhecida com Drosha, juntamente com seu cofator Pasha gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5, que utiliza GTP como co-fator (Figura 2) (KAI; PASQUINELLI, 2010).

No citoplasma, o pré-miRNA é processado por outra RNase III, *Dicer*, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado ao complexo multimérico *RISC* (do inglês, complexo silenciador induzido por RNA), que inclui as proteínas argonautas como principais componentes. A atividade da helicase faz com que apenas uma das fitas do duplex

de miRNA permaneça no complexo *RISC* para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo (ZHANG et al., 2007) (Figura 2).

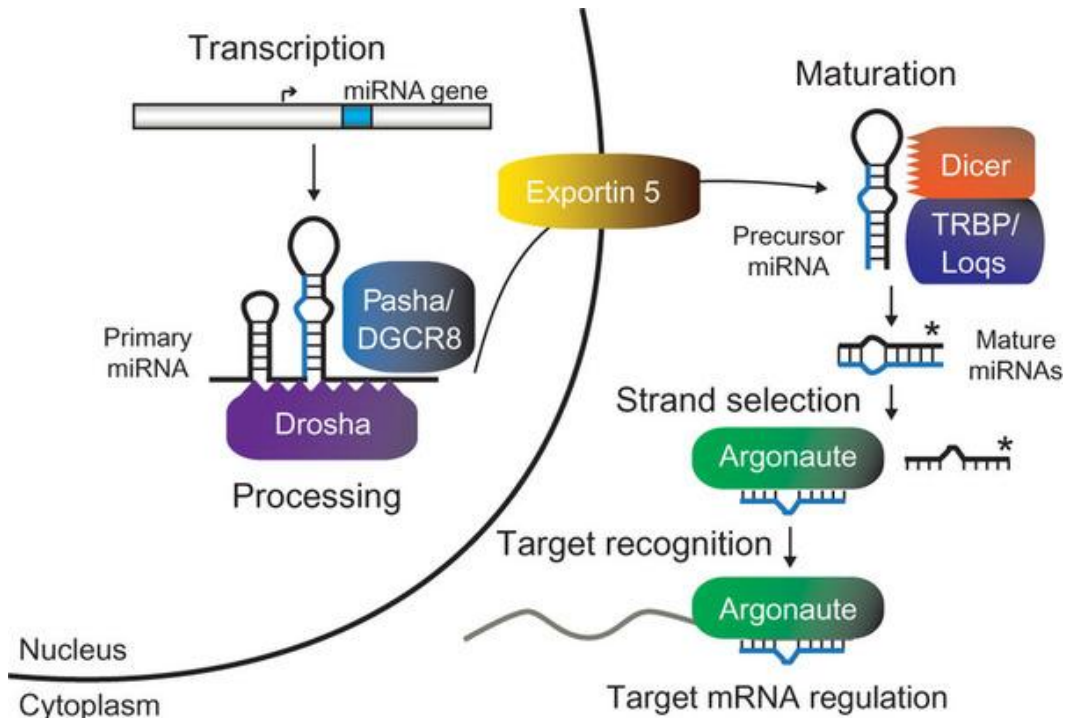


Figura 2 – Modelo geral da biogênese e função do miRNA (Fonte: KAI; PASQUINELLI, 2010)

Os miRNAs constituem tradicionalmente uma classe de reguladores negativos da transcrição gênica. Cada miRNA pode, por predições de bioinformática, regular até 300 genes diferentes, de acordo com a complementariedade do miRNA e a sequência do mRNA do gene (HSU et al., 2008). Para os miRNAs são conhecidos 2 mecanismos de ação: degradação do mRNA e inibição da sua tradução. O primeiro mecanismo ocorre quando há pareamento perfeito entre o miRNA e o gene alvo (HUTVÁGNER; ZAMORE, 2002) ou quando o pareamento imperfeito resulte em deadenilação do mRNA (ROUSH, 2006). O pareamento imperfeito pode interferir na inibição da tradução, através do bloqueio da inicialização, retirada de ribossomos e inibição de alongamento (PETERSEN, C. et al., 2006). O possível papel do miRNA como regulador positivo da transcrição gênica também já foi demonstrado (VASUDEVAN, 2011).

A expressão de miRNAs está desregulada nos tumores humanos e tem papel importante na oncogênese (BABASHAH; SOLEIMANI, 2011). Os miRNAs são classificados como supressores, quando inibem oncogenes ou genes de

apoptose, e oncomirs, quando promovem proliferação tumoral ao inibir genes/vias supressores tumorais (BABASHAH; SOLEIMANI, 2011).

A versão mais recente do registro miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) (18.0, lançada em novembro de 2011 e atualizada em junho 2013) lista 24.521 miRNAs maduros identificados em humanos. Estes miRNAs podem regular a expressão de mais de um terço dos genes humanos (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014).

O *cluster* miR-17-92, que contempla os miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a, miR-19a, miR-19b-1 e miR-92a-1, é a família oncogênica mais estudada, que é regulada pelo c-MYC e modula genes indutores de apoptose (DI LEVA; CROCE, 2010). Com o aumento da expressão do *cluster* miR-17-92, ocorre redução da apoptose com permissividade da proliferação tumoral.

Por outro lado, a família let-7 (let-7-a-1, a-2,a-3, b, c, d, e, f-1, f-2, g, i, miR-98) é a supressora tumoral mais estudada, capaz de regular oncogenes como a família RAS, CDC25a, CDK6, HMGA2 (JOHNSON et al., 2005; RICARTE-FILHO et al., 2009; TSANG; KWOK, 2008; AMERES et al., 2010). Desta forma, esta classe de reguladores tem grande potencial para aplicabilidade clínica, até mesmo em tratamentos. Recentemente, foi publicado um estudo clínico fase 1 que avaliou o uso de um miRNA sintético em pacientes com melanoma. Utilizando um nanocarreador sistêmico, como a transferrina, direcionado para células tumorais, foi observada uma redução na expressão de mRNA e proteína de um gene alvo do miRNA sintético em pacientes com melanoma (subunidade M2 da ribonucleotídeo redutase). Não houve relato de toxicidade, mas o estudo avaliou apenas 3 pacientes (DAVIS et al., 2010).

Com base no seu papel fundamental na regulação da expressão do gene, as alterações na expressão de miRNA estão fortemente associadas com o desenvolvimento e progressão de praticamente todos os tipos de câncer (WANG et al., 2009a). Alguns miRNAs são frequentemente alterados em diferentes tipos de tumores, mas também existem os padrões específicos de expressão para os diferentes cânceres (TONG; NEMUNAITIS, 2008). Geralmente, a hipo-expressão de miRNAs é mais frequente em células cancerosas do que sua hiperexpressão (DAVIS, MARK E et al., 2010). No entanto, há evidência de que existem miRNAs que são hipoexpressos nos tecidos normais, mas que estão aumentados no câncer (AMARAL et al., 2009).

Há estudos que verificaram os perfis de expressão de miRNA em vários órgãos humanos, além de comparar os tecidos normais *versus* cancerosos e indicaram a possibilidade de classificação de tumores em função dos padrões de expressão restritos a um órgão (CROCE, 2006; JOHNSON et al., 2005; VOLINIA et al., 2006; WEBER et al., 2006). Alguns estudos incluíram também o tecido pancreático, porém poucos possuem amostras com boa caracterização clínica e em tamanho satisfatório de modo a se identificarem biomarcadores reais que teriam ampla e irrestrita aplicabilidade clínica (RACHAGANI; KUMAR; BATRA, 2010).

Os estudos sobre a aplicação clínica de miRNAs como marcadores tumorais nos tecidos têm aumentado nos últimos anos, em função da possibilidade de diferenciar a origem tumoral, subtipo histológico, prognóstico e definir origem da metástase em investigação (CALIN, G. A; CROCE, 2006; JOHNSON et al., 2005; VOLINIA et al., 2006; WEBER et al., 2006).

Da mesma forma, a expressão diferencial de miRNA livre em plasma tem sido estudada para definir sua aplicação clínica, com a vantagem de não necessitar de métodos invasivos (BREMNES; SIRERA; CAMPS, 2005; KROH et al., 2010). No ano de 2008, foi demonstrado pela primeira vez a presença de miRNA livre em plasma de indivíduos normais, com alta estabilidade à degradação por causa de sua estrutura química (MITCHELL et al., 2008). Esse mesmo grupo demonstrou a origem tumoral de miRNA plasmático através de um modelo animal de camundongos injetados com cultura celular tumoral prostática humana. Foram identificados miRNAs humanos circulantes nos animais, não presentes antes da enxertia ou no grupo controle.

Outra evidência para o uso de miRNA em plasma como biomarcador é que pacientes portadores de neoplasia pulmonar apresentam mesma expressão relativa de miRNA comparando o tecido tumoral e o plasma de cada paciente (MITCHELL et al., 2008), sugerindo fidelidade da expressão tumoral em sangue periférico. Desde então, miRNAs plasmáticos específicos foram identificados para neoplasia de mama (ZHU et al., 2009), ovário (RESNICK et al., 2009), coloretal (LIU, MAO; CHEN, 2010), cabeça e pescoço (NAWROZ *et al.*, 1996) e pulmão (RABINOWITS et al., 2009).

Os miRNAs originários de câncer da próstata entram na circulação e podem ser biomarcadores auxiliares desse câncer (MITCHELL et al., 2008). Uma

abordagem semelhante foi utilizada para detectar miRNA no soro de pacientes com câncer de ovário (RESNICK et al., 2009). Ao se investigar a utilização de exossomos circulantes no diagnóstico de câncer foi constatado que o teor de miRNA de células de tumor de ovário e no exossomo circulante foi semelhante e pode ser usado para distinguir pacientes com câncer daqueles com doença benigna do ovário e de controles normais (ASLAM et al., 2009; RABINOWITS et al., 2009).

O tecido pancreático tumoral também apresenta certas características e a expressão aberrante de 100 precursores miRNA foi descrita no câncer pancreático ou desmoplasia, incluindo miRNAs previamente relatados em outros cânceres humanos (miR-155, miR-21, miR-221 e miR-222), bem como miR-376a e miR-301, relatados pela primeira vez na expressão diferencial deste câncer (LEE, E. J. et al., 2007), conforme apresentado na figura 3.

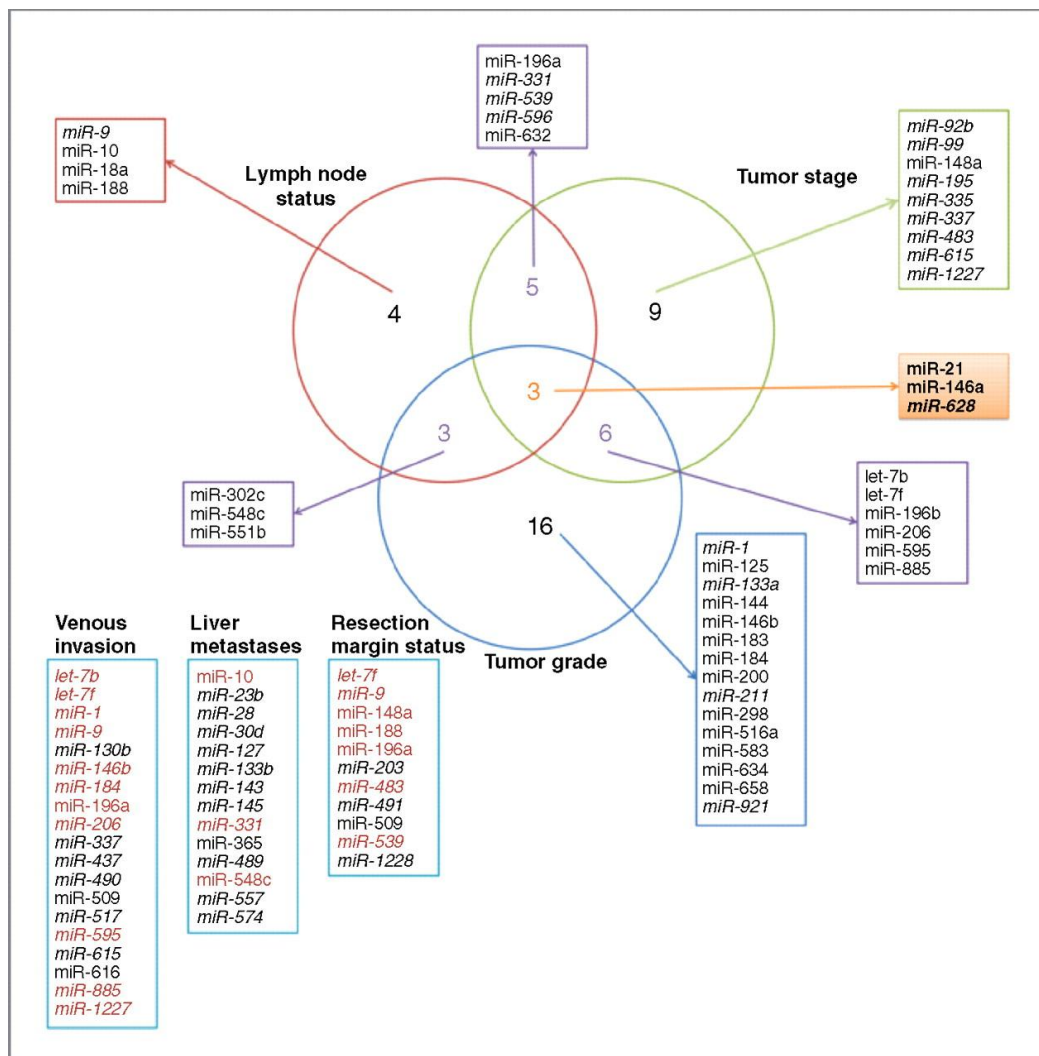


Figura 3 – MiRNAs associados a características clínico-patológicas no AP (Fonte: JAMIESON et al., 2012)

Na pesquisa do perfil de miRNAs de provável implicação na patogenia do AP foi demonstrada a superexpressão dos miR-21, miR-107, miR-100, miR-181c, miR-23a (HWANG et al., 2010; ROLDO et al., 2006; VOLINIA et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2010). O miR-21 apresenta relação com a agressividade da doença, metástase hepática, índice de proliferação celular e com o prognóstico do paciente. O miR-107 localiza-se no cromossomo 10 e regula a expressão de quinases dependentes de ciclina do carcinoma pancreático. Vários mecanismos de lesão e reparo tecidual induzido por hipóxia estão mediados pelo miR-23a. A hiperexpressão do miR-181c, está presente em humanos no cromossoma 19, em células com carcinoma gastrointestinal (ZHANG et al., 2007). O miRNA-100, localizado no cromossomo 11, está hipoexpresso em células-tronco de pâncreas (JUNG, 2011). Estudos com modelos de hipóxia, incluindo infarto do miocárdio, doença aterosclerótica, revelaram um hiperexpressão do miRNA 210 nessa condição. (DEVLIN et al., 2011)

Além de presente nos tecidos, os microRNAs têm sido encontrados também no soro, no plasma, e outros fluidos corporais, de uma forma estável, uma vez que é protegido da atividade de RNase endógena (em associação com *RISC*, livre no sangue ou nos exossomos – endossomas derivados de organelas). Desta forma, parece viável correlacionar a presença de miRNAs no sangue ou fluidos corporais com tecidos tumorais. Ademais, os miRNAs funcionam como reguladores de uma rede de genes, sendo assim diferentes dos outros biomarcadores porque têm um papel patogênico no processo da doença e não são subprodutos do estado de doença (LAWRIE et al., 2008).

A existência de miRNA na circulação e o potencial de miRNAs como marcadores não-invasivos de diagnóstico e suas aplicações promissoras na terapia e prognóstico das neoplasias está em processo de consolidação (BLOOMSTON et al., 2007). Entre 95 miRNAs selecionados, o miR-92 aparece como um marcador plasmático potencial para o câncer colorretal (HUANG et al., 2010). Para AP, os miR-21, miR-155 e miR-196a foram atribuídos como marcadores promissores na análise de tecidos tumorais. No entanto, não está estabelecido o quanto esta alteração dos miRNAs pode ser identificada no sangue de pacientes com AP e qual seu significado clínico, tanto para diagnóstico quanto para preditor de resposta ou prognóstico.

*JUSTIFICATIVA*

---

### **3 JUSTIFICATIVA**

Os microRNAs estão envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral e a verificação da expressão dos microRNAs no AP pode auxiliar na caracterização dos tumores e na definição de novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas. A identificação de biomarcadores séricos para diagnóstico do AP através da identificação de um perfil de expressão dos microRNAs pode contribuir ainda para melhorar o tratamento e definir o prognóstico dos pacientes.



*OBJETIVO*

---

#### 4 OBJETIVO

1. Comparar a expressão tecidual dos miRNAs 21, - 23a, -100, -107, -181c, -210 nos tumores, paratumores e pâncreas saudáveis.
2. Comparar a concentração plasmática dos miRNAs 21, - 23a, -100, -107, -181c, -210 e CA 19-9 em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pancreático e pessoas saudáveis.
3. Avaliar o desempenho dos miRNAs 21, - 23a, -100, -107, -181c, -210 e CA 19-9 como testes diagnósticos.

## *PACIENTES E MÉTODOS*

---

## 5 PACIENTES E MÉTODOS

### 5.1 Seleção de miRNA

A seleção dos miRNAs estudados foi obtida mediante análise dos estudos que descreveram a expressão de miRNAs no AP entre os anos de 2007 e 2010. Os trabalhos de interesse foram obtidos mediante acesso ao endereço eletrônico GEO (Gene Expression Omnibus - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) e a seleção dos miRNAs foi feita com auxílio do *software R Project* (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Nesse processo, oito trabalhos foram selecionados (BLOOMSTON et al., 2007a; DU RIEU et al., 2010; LEE, EUN JOO et al., 2007a; ROLDO et al., 2006; SZAFRANSKA, A E et al., 2007; SZAFRANSKA, ANNA E et al., 2008; VOLINIA et al., 2006; ZHANG, YUQING, 2010) com os seguintes miRNAs identificados por PCR quantitativa: miR-21, miR-107, miR-100, miR-181c, miR-210 e miR-23a.

### 5.2 Local do estudo

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Biologia Molecular dos Departamentos de Cirurgia e Anatomia e de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

A coleta dos fragmentos de tumor e tecido pancreático normal que serviram como amostras foram realizadas pela equipe do Serviço de Cirurgia e Endoscopia do Sistema Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e do Centro de Medicina Legal – CEMEL, nos anos de 2008 a 2012.

O trabalho foi realizado com amostras do biorepositório aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos (Processo 4910/2008, aprovado em 30/03/2009).

### 5.3 Coleta de Tecido

Foram utilizadas amostras de 18 pacientes com AP (Grupo APt) tratados no Hospital das Clínicas da FMRP-USP entre abril de 2008 a agosto 2012: 6 provenientes de ressecção duodenopancreática e 12 obtidas mediante biópsia com agulha de *tru cut* durante tratamento cirúrgico paliativo visando a derivação biliar e gástrica. Dos pacientes submetidos a ressecção duodenopancreática também

retirou-se tecido pancreático adjacente ao tumor, Grupo PPT (n=9). As amostras de tecido pancreático normal, Grupo PN (n=7), foram obtidas de ressecção cirúrgica por trauma ou coletadas de cadáveres e acondicionadas no biorepositório do laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental) da FMRP-USP.

#### **5.4 Coleta de Sangue**

Foram colhidos 10ml de sangue para separação do plasma no período pré-operatório dos pacientes com AP, Grupo APp (n=13). Como controle para estudo da expressão dos miRNAs séricos foram colhidos 10ml de sangue de indivíduos saudáveis, Grupo PC (n=6), bem como foi colhido sangue dos doadores de tecido normal, Grupo PN (n=7) para avaliar concentração sérica de CA 19-9.

#### **5.5 Extração do RNA tecidual**

Após a microdissecção das amostras por um patologista, utilizou-se o método de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para obtenção do RNA tecidual. Ao fragmento tumoral microdissecado ou à amostra de tecido pancreático normal foram adicionados 250ml de PBS autoclavado e os fragmentos foram submetidos ao fragmentador de tecidos Polytron PT 2100 (Kinematica, Lucerne, Switzerland). Após homogeneização do tecido, foram adicionados 750ml de TRIzol® Reagent, 200ml de clorofórmio e 10ml de glicogênio (20mg/ml), agitando vigorosamente por 15 segundos e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) das amostras foi transferida para outro tubo de microcentrífuga estéril de 1,5ml e a precipitação do RNA realizada com a adição de 500ml de isopropanol 100% gelado sob leve homogeneização, seguido de incubação *overnight* a -70°C.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o isopropanol foi removido e o precipitado lavado com 1ml de etanol 75% gelado e centrifugado novamente. Após a remoção do etanol, o precipitado foi deixado em repouso para secagem e posteriormente re-suspenso em 15ml de água estéril tratada previamente com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, St. Louis, MO, USA). A quantificação do RNA foi realizada pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) em comprimento de

onda de 260 nm, considerando que 1 unidade de DO260 equivale a 40mg/ml de RNA. A integridade das amostras foi também verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5%.

### **5.6 Extração do RNA plasmático**

Utilizou-se o kit miRNeasy (QIAGEN) (BLOOMSTON et al., 2007), realizando-se algumas modificações necessárias em seu método. Inicialmente, adicionou-se 4,0ml (4000µl) de TRIzol e 400ul de plasma em um falcon de polipropileno de 15ml, para ser resistente ao TRIzol. Em seguida, o material foi deixado em repouso por 5min em temperatura ambiente e adicionou-se 800µl de clorofórmio (proporção 1:5 com a quantidade de TRIzol inicial), misturando vigorosamente por 30 segundos.

Após deixar o material em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000g a 4°C. Ao final da centrifugação havia um sistema de 3 fases: incolor=RNA, branco=DNA, vermelho=proteína. A fase incolor foi transferida para outro falcon de 15ml, adicionou-se 1,5 vezes o volume conseguido da fase incolor de etanol 100% e a amostra foi agitada vigorosamente. Em seguida, adicionou-se 700µl da solução na coluna do Kit, centrifugando a >8000g por ao menos 15s.

O líquido resultante foi descartado e repetido o passo anterior com o que restou da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. No momento seguinte, foi adicionado 700µl de Tampão RWT (Buffer RWT do Kit) em cada coluna, centrifugando também a >8000g por ao menos 15s, sempre descartando o líquido resultante. Adicionou-se 500µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a >8000g por ao menos 15s e descartando o líquido resultante. Na sequência, adicionou-se 500µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a >8000g, desta vez por 2min, descartando, o líquido resultante. Centrifugou-se com o máximo da centrífuga por 1 minuto, descartando líquido resultante. Trocou-se coletor da coluna e adicionou-se 30ul de água RNA-free. Centrifugou-se a >8000g por 1min e transferiu-se para um Eppendorf o líquido resultante, congelando-o a -80°C imediatamente. A qualidade do RNA plasmático foi avaliada do mesmo modo do RNA tecidual.

### 5.7 PCR em tempo real (qPCR)

A transcrição reversa foi realizada pela enzima MultiScribe™ e kit *High capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems): 1,5µl de 10x Buffer, 0,15µl 100nM dNTP, 0,75µl de primer específico para cada um dos microRNAs analisados, 1,0µl de *MultiScribe™* a 50U/µl, 4,16µl de H<sub>2</sub>O DEPC, 5 ng de RNA e inibidor de RNase 0,19µl. As reações ciclaram a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min, segundo protocolos fornecidos pelo fabricante.

Foram estudados 6 miRNAs (miR-21, miR-23a, miR-100, miR-107, miR-181c e miR-210,) e dois controles endógenos para análise tecidual (RNU-24 e RNU-48). Para a análise plasmática, o referencial utilizado foi o miR-16, conforme dados publicados previamente (WANG et al., 2009a; WONG et al., 2008). O quadro 3 identifica das sondas utilizadas.

Quadro 3 – MiRNAs estudados

MiRNA	ID Ensaio
miR-21	002438
miR-23a	002439
miR-100	002142
miR-107	000443
miR-181c	002333
miR-210	000512
RNU-24	001001

ID Ensaio: identificação do ensaio de qPCR Taqman™ da Life Technologies

Os experimentos foram realizados em duplicata com 2,5µl cDNA diluído 1:4, 5,0µl Master Mix (Applied BioSystems), 2,0µl H<sub>2</sub>O RNase Free e 0,5µl da sonda específica de cada miRNA, com termociclagem 40x ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. Utilizou-se do aparelho *Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System*.

A análise da expressão foi realizada através do *software* QPCR (Pabinger et al, 2009), e regressão linear do *software* LingRegPCR (RAMAKERS et al, 2003) para cálculo da eficiência de cada reação. O QPCR é um *software* em linguagem Java que permite armazenar, manejar e analisar dados de qPCR em larga escala.

De modo automático, o QPCR padroniza o mesmo nível de fluorescência para calcular o CT (ciclo que a amostra alcança o nível de fluorescência comum), calcula a eficiência da reação, separando os miRNAs dos controles endógenos, as amostras controles das de interesse e calcula a expressão relativa. A expressão relativa de cada miRNA (*fold change*) foi calculada pela razão entre a mediana da expressão deste gene no grupo tumoral e a mediana no grupo normal.

## 5.8 Análise Estatística

Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a homogeneidade ou não entre os grupos APt, PPT e PN. Valores de p menores que 0,05 evidenciam que pelo menos um dos grupos se diferencia dos demais. A verificação das diferenças entre os grupos foi feita utilizando o pós teste de Dunn para comparações múltiplas, com nível de significância de 0.05.

Para comparar os grupos APp e PC foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes. Valores p menores que 0.05 evidenciam não igualdade entre os grupos comparados.

Foram construídas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada miRNA. Um limiar foi estabelecido a partir da máxima sensibilidade com a máxima especificidade para obtenção das acurácias. As combinações entre os miRNAs e o CA 19-9 foram feitas utilizando a regressão logística. Os valores de sensibilidade e de especificidade e áreas sob a curva (AUC) para cada ponto de corte das variáveis de interesse foram calculadas, assim como as medidas de desempenho dos testes de acordo com pontos de corte definidos.

Para a combinação do CA19-9, miRNA21, miRNA181c e miRNA210 foram construídas combinações lineares entre as variáveis, de tal maneira que se resultaram em novas variáveis: CA19-9\_miRNA21\_miRNA210 (Grupo APt x Grupo PN), CA19-9\_miRNA21 (Grupo APt x Grupo PN), CA19-9\_miRNA210 (Grupo APt x Grupo PN) e miRNA21\_miRNA210 (Grupo APt x Grupo PN), miRNA210\_miRNA181c (Grupo APp x Grupo PC), construindo-se as curvas ROC a partir dos novos valores. Todas as análises foram feitas no software R version 3.0.1.



## *RESULTADOS*

---

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Casuística

A maioria dos pacientes era do sexo masculino (10 pacientes) e com idade acima de 60 anos (15 pacientes). A maior parte tinha estadiamento avançado, com 9 pacientes T3-T4 e 9 com metástase a distância. A cirurgia foi realizada com intuito curativo em 6 pacientes (Quadro 4).

Quadro 4 – Características demográficas, patológicas e de tratamento da coorte de pacientes com AP

<b>Característica</b>		<b>N = 18</b>
<b>Demográfica</b>		
<b>Sexo</b>	Masculino / Feminino	10/8
<b>Idade</b>	>60/≤60	15/3
<b>Patológica</b>		
<b>Estadiamento</b>	<T3	9
	T3-T4	9
	Linfonodo acometido	4
	Metástase a distância	11
<b>TNM</b>	I	1
	Ila	2
	IIb	2
	III	2
	IV	11
<b>Exame Clínico</b>		
<b>Antecedentes</b>	Qualquer antecedente familiar de câncer	7
<b>Perda de Peso</b>	> 5kg	12
	≤5kg	6
<b>Icterícia</b>	Presente	12
<b>Tratamento e Prognóstico</b>		
<b>Cirurgia</b>	Duodenopancreatectomia	6
	Anastomose Biliodigestiva	10
	Laparotomia Exploradora	2
<b>Quimioterapia</b>	Adjuvante	2/6
	Paliativa	8/12

### 6.2 Extração de RNA

A quantificação do RNA extraído das amostras de tecido pancreático normal foi de ( $X \pm SD$ )  $17,6 \pm 2,6$  ug/mL e a razão DO260/DO280 de  $1,77 \pm 0,07$ ; nos paratumores de  $7,9 \pm 2,5$  ug/mL com razão DO260/DO280 de  $1,85 \pm 0,06$ ; nos tumores de  $4,9 \pm 6,2$  ug/mL com razão DO260/DO280 de  $1,75 \pm 0,17$ . A viabilidade

do RNA nas amostras de tecido também foi demonstrada pela visualização das bandas 18S e 28S em gel de agarose 1,2% (Figura 4).

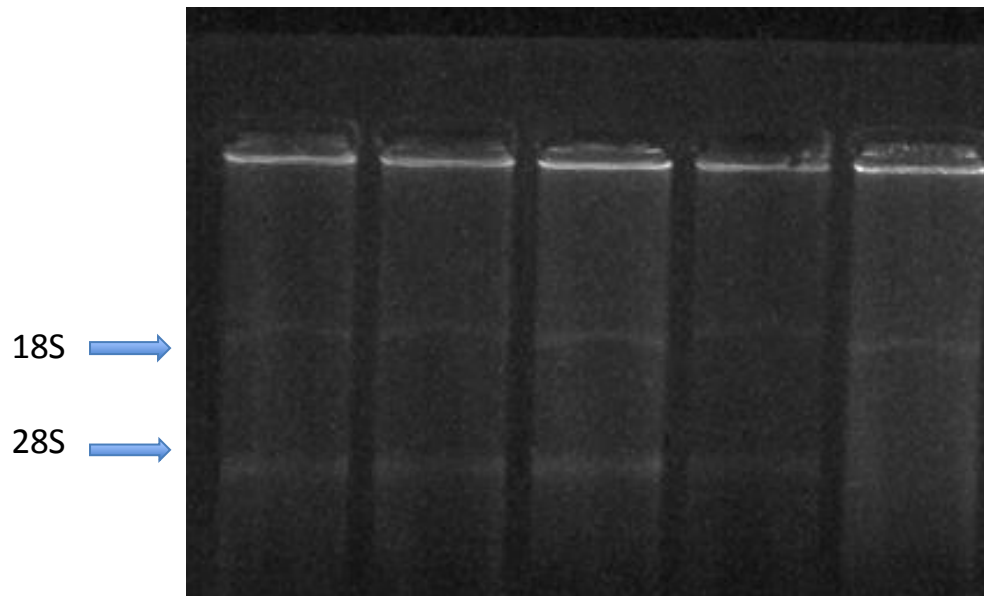


Figura 4 –Gel de agarose 1,2%, com as bandas das subunidades 28S e 18S de RNA ribossômicos que demonstram a qualidade do RNA total.

A quantificação do RNA plasmático extraído dos pacientes com AP foi de ( $X \pm SD$ )  $13,0 \pm 6,1$  ng/mL e nos controles normais de  $39,3 \pm 11,6$  ng/mL.

### 6.3 PCR qualitativo de miRNA tecidual tumoral, paratumoral e controle

Dentre os 6 miRNAs estudados, houve diferença na expressão mediana do miRNA -21 (2,4) no grupo APt, em relação aos grupos PPT (0,86) e PN (0,87) ( $p=0,005$ ) e do miRNA -210 (5,43) no grupo APt, em relação aos grupos PPT (0,77) e PN (0,99) ( $p=0,008$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Medidas descritivas da expressão dos miRNAs nos grupos APt, PN e PPT.

	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo	P valor
<b>miR-100</b>						
APt (n=18)	0.002068	0.007592	0.052270	0.125700	1.97700	0.1052
PPT (n=9)	0.006362	0.049420	0.257200	0.625600	0.950100	
PN (n=7)	0.009894	0.147200	0.426800	1.02400	4.2200	
<b>miR-107</b>						
APt (n=18)	0.000	1.172	2.936	6.063	93.630	0.07755
PPT (n=9)	0.2032	0.5639	0.8114	1.9260	3.8600	
PN (n=7)	0.3688	0.6752	0.9733	1.3230	1.6610	
<b>miR-181c</b>						
APt (n=18)	0.0352	0.0589	0.2042	0.3396	3022.00	0.2832
PPT (n=9)	0.04889	0.13270	0.18840	0.50700	30.98	
PN (n=7)	0.1337	0.2956	0.3735	0.4428	5.0160	
<b>miR-21</b>						
APt (n=18)	0.2705	1.1310	2.4010	6.2050	2298.00	0.005705
PPT (n=9)	0.2361	0.6272	0.8640	1.4460	3.0260	
PN (n=7)	0.1546	0.2321	0.8799	1.0250	3.4520	
<b>miR-210</b>						
APt (n=18)	0.000	2.144	5.432	14.990	171.60	0.008729
PPT (n=9)	0.4250	0.4676	0.7721	3.7480	1000.00	
PN (n=7)	0.3331	0.4128	0.9911	1.2020	2.4470	
<b>miR-23a</b>						
APt (n=18)	0.000005	0.000025	0.000150	0.001325	22.3700	0.2479
PPT (n=9)	0	0.0000164	0.0000624	0.0001050	0.0010230	
PN (n=7)	0	6.0e-06	3.6e-05	6.1e-05	7.00	

p-valor: teste de Kruskal-Wallis.

Na análise comparativa, através do pós-teste de Dunn, o miRNA-21 discrimina o grupo APt de PN e PPT e o miRNA-210 discrimina o grupo APt do PN (Tabela 3).

Tabela 3 – Estatística teste com valores críticos para discriminação do grupo APt de PN e PPT

	Diferença Observada	Diferença Crítica	Diferença
<b>miR-21</b>			
APt – PPT	10.08	9.73	Verdadeira
APt - PN	11.99	10.61	Verdadeira
PPT – PN	1.91	12.01	Falsa
<b>miR-210</b>			
APt – PPT	7.47	9.73	Falsa
APt - PN	12.92	10.61	Verdadeira
PPT- PN	5.45	12.01	Falsa

Pós-teste de Dunn (95%):

#### 6.4 PCR qualitativo de miRNA plasmático de pacientes com AP e controles

No grupo APp há hiperexpressão do miR-181c (IC 95% 1,67 - 17,68;  $p < 0,00001$ ) e do miR-210 (IC 95% 0,16 - 5,20;  $p = 0,03$ ) em relação ao PC (Tabela 4).

Tabela 4 – Medidas descritivas da expressão dos miRNAs nos grupos APp e PC

	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo	Valor p
<b>miR-100</b>						
APp (n=13)	0.0318	0.3662	3.6550	7.9150	519.60	0.467
PC (n=6)	0.3641	0.6743	1.0640	1.5480	4.07	
<b>miR-107</b>						
APp (n=13)	0.5599	0.7853	1.2830	2.0960	20.17	0.3676
PC (n=6)	0.3489	0.7085	1.04	1.3480	3.9110	
<b>miR-181c</b>						
APp (n=13)	2.031	2.791	6.167	15.040	23.080	<0.0001
PC (n=6)	0.4452	0.5887	1.0030	1.1030	1.6430	
<b>miR-21</b>						
APp (n=13)	0.02092	0.24100	2.90600	4.24200	43.88	0.3229
PC (n=6)	0.1409	0.4609	1.0160	1.3140	3.1470	
<b>miR-210</b>						
APp (n=13)	0.4923	1.3840	3.6280	5.7210	15.81	0.03649
PC (n=6)	0.4974	0.7630	1.0010	1.4550	2.0330	
<b>miR-23a</b>						
APp (n=13)	0.04941	0.15730	0.58920	13.17	205.00	0.8983
PC (n=6)	0.10	0.5175	1.1360	4.9460	8.8220	

#### 6.5 Abundância Relativa dos miR-21, -23a, -100, -107, -181c, -210 entre os grupos AP, PN, PPT, APp, PC

A tabela 5 mostra, por meio da análise ROC (Receiver Operating Characteristic) a abundância relativa dos miR-21, -23a, -100, -107, -181c, -210 entre os grupos APt x PN, APt x PPT, PPT x PN, APt x PC. Em grifo estão as comparações cujos AUC  $\geq 0,70$ , considerados como com associação de moderada a forte.

Tabela 5 - Análise ROC da abundância relativa dos miR-21, miR-23a, miR100, miR107, miR181c, miR210 entre os grupos APt, APp, PN, PPT e PC

miRNA	Grupos Comparados	AUC	Intervalo de confiança 95%	
			Limite inferior	Limite Superior
miR-21	<b>*APt x PN</b>	<b>0,85</b>	<b>0,65</b>	<b>0,98</b>
	<b>*APt x PPT</b>	<b>0,80</b>	<b>0,62</b>	<b>0,94</b>
	PPT x PN	0,42	0,14	0,74
	APp x PC	0,65	0,38	0,88
miR-23a	APt x PN	0,69	0,44	0,92
	APt x PPT	0,64	0,42	0,85
	PPT x PN	0,60	0,30	0,88
	APp x PC	0,47	0,23	0,74
miR-100	<b>*APt x PN</b>	<b>0,73</b>	<b>0,48</b>	<b>0,92</b>
	<b>*APt x PPT</b>	<b>0,70</b>	<b>0,47</b>	<b>0,89</b>
	PPT x PN	0,59	0,27	0,87
	APp x PC	0,61	0,36	0,85
miR-107	<b>*APt x PN</b>	<b>0,75</b>	<b>0,54</b>	<b>0,92</b>
	<b>*APt x PPT</b>	<b>0,71</b>	<b>0,50</b>	<b>0,89</b>
	PPT x PN	0,52	0,24	0,84
	APt x PC	0,64	0,33	0,92
miR-181c	<b>*APt x PN</b>	<b>0,72</b>	<b>0,52</b>	<b>0,90</b>
	APt x PPT	0,49	0,26	0,71
	PPT x PN	0,65	0,36	0,92
	<b>*APp x PC</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
miR-210	<b>*APt x PN</b>	<b>0,88</b>	<b>0,73</b>	<b>1</b>
	<b>*APt x PPT</b>	<b>0,72</b>	<b>0,47</b>	<b>0,93</b>
	PPT x PN	0,35	0,09	0,67
	<b>*APp x PC</b>	<b>0,80</b>	<b>0,59</b>	<b>0,97</b>

\*Comparações com AUC  $\geq$  0,70, considerados como associação de moderada a forte pela metodologia ROC.

## 6.6 Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para expressão do CA19-9 e dos miRNAs com AUC (área sob a curva) $\geq 0,8$

### 6.6.1 Concentração sérica do CA 19-9 e expressão dos microRNAs nos Grupos APt e PN

O gráfico 1 representa a curva ROC (Receiver Operating Characteristic), para as seguintes variáveis:

- CA 19-9 do grupo APt em comparação ao grupo PN, onde AUC-ROC é de 0,95 (IC 95%; 0,84 – 1), com sensibilidade de 89% e especificidade de 100%, para o valor de corte de 16,20 (Tabela 1, Apêndice A).

- miRNA-21, do grupo APt em comparação ao grupo PN, onde AUC-ROC é de 0,85 (IC 95%; 0,65 – 0,98), com sensibilidade de 78% e especificidade de 86%, para o valor de corte de 1,03 (Tabela 2, Apêndice A).

-miRNA-210 do grupo APt em comparação ao grupo PN, onde AUC-ROC é de 0,88 (IC 95%; 0,73 – 1), com sensibilidade de 72% e especificidade de 100%, para o valor de corte de 2,45 (Tabela 3, Apêndice A).

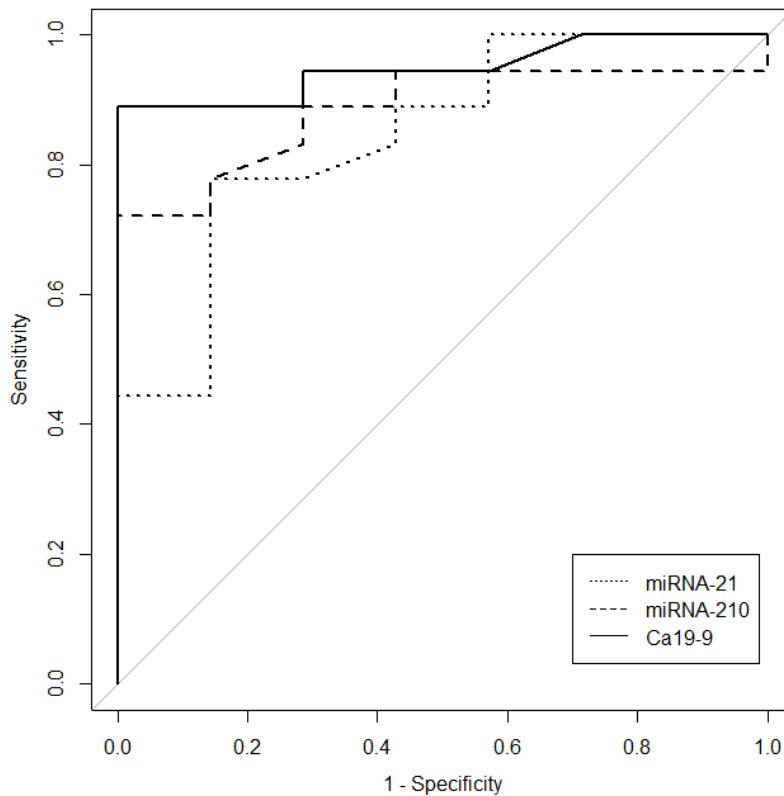


Gráfico 1 –Curvas ROC – Ca 19-9, miRNA-21 e miRNA-210 – Grupo APt x Grupo PN

O gráfico 2 representa a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), para as seguintes variáveis:

- combinação CA19-9 + miRNA21, do grupo APt em comparação ao grupo PN, onde AUC-ROC é de 0,95 (IC 95%, 0,86 – 1), com sensibilidade de 89% e especificidade de 100%, para o corte de 2,80 (Tabela 4, Apêndice A).

- combinação CA19-9 + miRNA210, do grupo APt em comparação ao grupo PN, onde AUC-ROC é de 0,99 (IC 95%, 0,95 – 1), com sensibilidade de 94% e especificidade de 100%, para o corte de 1,81 (Tabela 5, Apêndice A).

- combinação CA19-9+miRNA21+miRNA210, do tecido tumoral do grupo APt em comparação ao grupo normal PN, onde AUC-ROC é de 1 (IC 95%, 1 – 1), com sensibilidade de 100% e especificidade de 100%, para o corte de 13,22 (Tabela 6, Apêndice A).

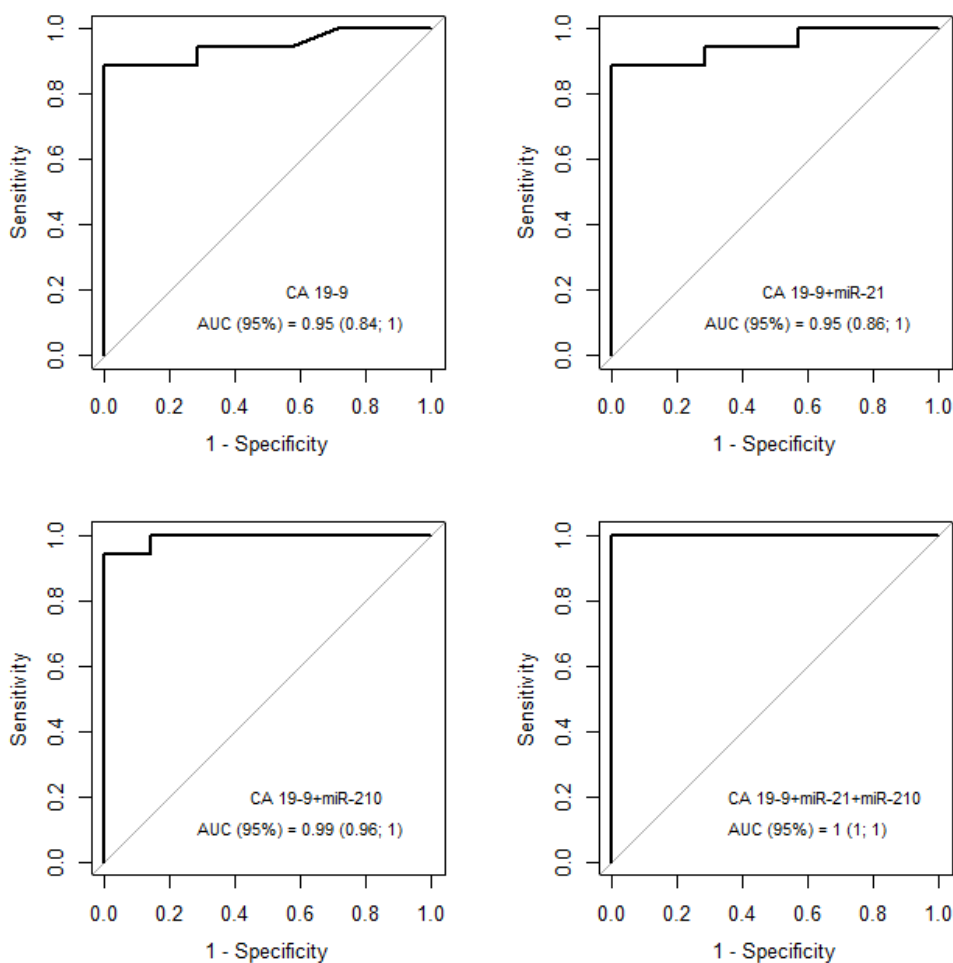


Gráfico 2– Curva ROC – CA19-9 + miRNA21, CA 19-9 + miRNA210 e CA19-9+miRNA21+miRNA210 para os Grupos APt x Grupo PN.



### 6.6.2 Expressão dos microRNAs nos grupos APp e PC

O gráfico 3 representa a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), para as variáveis:

- expressão do miRNA-210, no plasma do grupo APp na comparação com o grupo PC, onde AUC-ROC = 0,80 (IC 95%; 0,59 – 0,97), com sensibilidade de 69% e especificidade de 83%, para o valor de corte de 1,99 (Tabela 8, Apêndice A).

- expressão do miRNA-181c do grupo APp em comparação com o do grupo PC, onde AUC-ROC é de 1 (IC 95%; 1 – 1), com sensibilidade de 100% e especificidade de 100%, para o valor de corte de 2,03 (Tabela 7, Apêndice A).

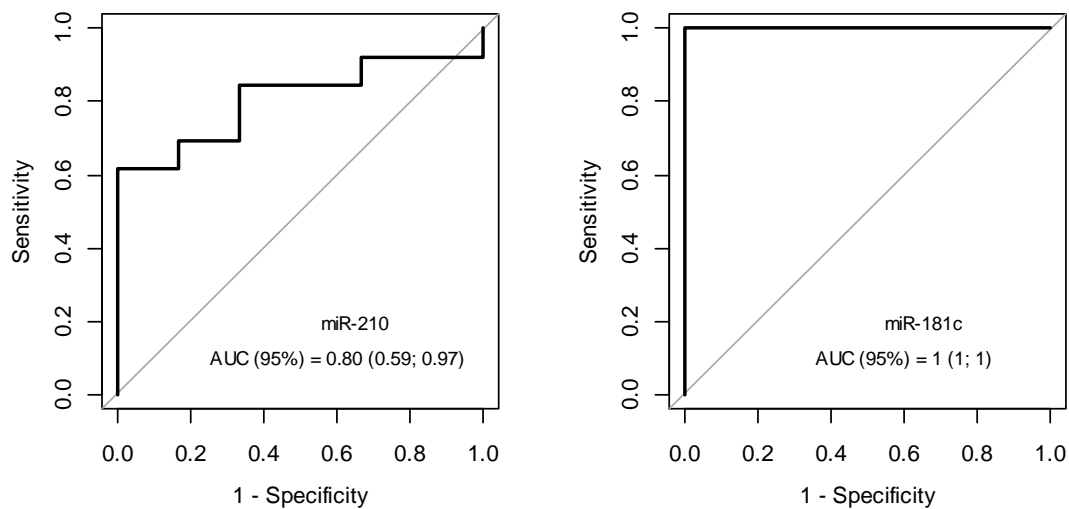


Gráfico 3. Curva ROC - miRNA-181c e miRNA-210 – Grupo APp x Grupo PC.

### 6.6.3 Expressão dos microRNAs nos grupos APt e PPT

O gráfico 4 representa a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), para o miRNA21, do grupo APt, em comparação ao grupo PPT, onde AUC-ROC = 0,80 (IC 95%, 0,62 – 0,94), com sensibilidade de 83% e especificidade de 67%, para o valor de corte de 1,00 (Tabela 10, Apêndice A).

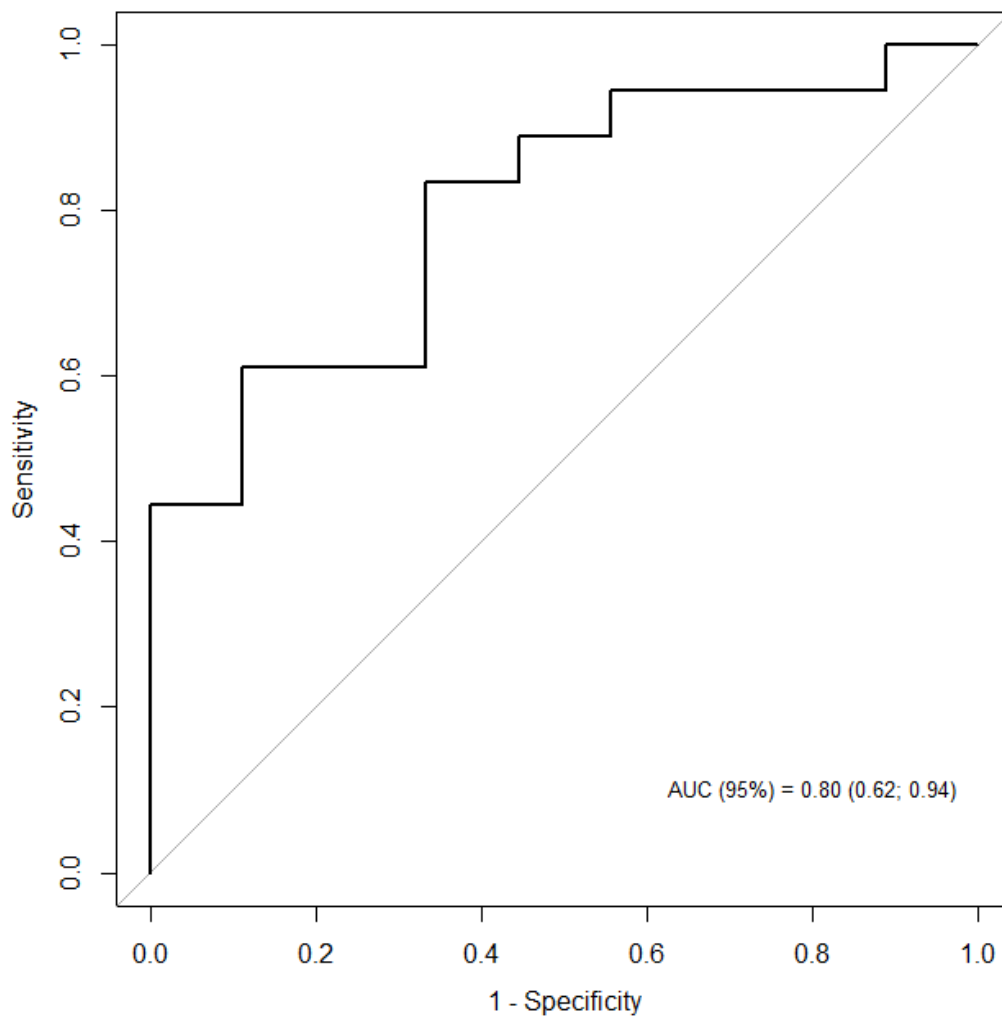


Gráfico 4. Curva ROC - miRNA-21 – Grupo APt x Grupo PPT.

## 6.7 Medidas de Desempenho para os Biomarcadores

Quando se compararam os grupos APt e PN, dois miRNAs apresentaram melhor desempenho: o miR-21, com sensibilidade de 77% (IC 95%, 0,51 – 0,92), especificidade de 71% (IC 95%, 0,30 – 0,95) e acurácia de 76% e o miR-210 com sensibilidade de 72% (IC 95%, 0,46 – 0,89), especificidade de 85% (IC 95%, 0,42 – 0,99) e acurácia de 76% (tabela 6). A combinação do CA 19-9 com os miR-21 e miR-210 atinge acurácia de 100%.

Tabela 6 – Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs, do CA 19-9 e da combinação, na comparação dos Grupos APt e PN.

Teste	Corte	Sensibilidade	Especificidade	RV Positiva	RV Negativa	Acurácia
miRNA-100	0,02	0.61 (0.36; 0.81)	0.28 (0.05; 0.70)	0.85 (0.47; 1.55)	1.36 (0.36; 5.02)	52%
miRNA-107	1,06	0.72 (0.46; 0.89)	0.57 (0.20; 0.88)	1.68 (0.68; 4.15)	0.48 (0.18; 1.29)	68%
miRNA-181c	0,18	0.55 (0.31; 0.77)	0.14 (0; 0.58)	0.64 (0.38; 1.08)	3.11 (0.47; 20.52)	44%
miRNA-21	1,03	0.77 (0.51; 0.92)	0.71 (0.30; 0.95)	2.72 (0.82; 9.01)	0.31 (0.11; 0.83)	76%
miRNA-210	2,44	0.72 (0.46; 0.89)	0.85 (0.42; 0.99)	5.05 (0.80;31.73)	0.32 (0.14; 0.72)	76%
miRNA-23a	0,000052	0.66 (0.41; 0.85)	0.57 (0.20; 0.88)	1.55 (0.62; 3.88)	0.58 (0.23; 1.45)	64%
Ca19-9	16,20	0.88 (0.63; 0.94)	0.85 (0.42; 0.99)	6.22 (1.00; 38.47)	0.12 (0.03; 0.49)	88%
Ca19-9	37	0.83 (0.57; 0.95)	1 (0.56; 0.99)	-	0.16 (0.05; 0.46)	88%
CA19-9+m21+m210	13,22	1 (0.78; 0.99)	1 (0.56; 0.99)	-	0	100%
CA19-9+miRNA21	2,8	0.88 (0.63; 0.98)	1 (0.56; 0.99)	-	0.11 (0.03; 0.4)	92%
CA19-9+miRNA210	1,81	0.94 (0.70; 0.99)	1 (0.56; 0.99)	-	0.05 (0.008; 0.37)	96%

Na comparação dos grupos APt e PPT, o miR-21 apresenta o melhor desempenho, com sensibilidade de 83% (IC 95%, 0,57 – 0,95), especificidade de 55% (IC 95%, 0,22 – 0,84) e acurácia de 74% (Tabela 7).

Tabela 7 –Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação dos grupos APt e PPT

Teste	Corte	Sensibilidade	Especificidade	RV Positiva	RV Negativa	Acurácia
miRNA-100	0,05	0.55 (0.31; 0.77)	0.33 (0.09; 0.69)	0.83 (0.44; 1.54)	1.33 (0.46; 3.84)	48%
miRNA-107	0,89	0.77 (0.51; 0.92)	0.55 (0.22; 0.84)	1.75 (0.80; 3.78)	0.40 (0.14; 1.13)	70%
miRNA-181c	0,15	0.61 (0.36; 0.81)	0.33 (0.09; 0.69)	0.91 (0.50; 1.65)	1.16 (0.39; 3.47)	52%
<b>miRNA-21</b>	<b>1,00</b>	<b>0.83 (0.57; 0.95)</b>	<b>0.55 (0.22; 0.84)</b>	<b>1.87 (0.87; 4.00)</b>	<b>0.30 (0.09; 0.98)</b>	<b>74%</b>
miRNA-210	3,74	0.61 (0.36; 0.81)	0.66 (0.30; 0.91)	1.83 (0.67; 4.95)	0.58 (0.27; 1.22)	63%
miRNA-23a	0,0000624	0.61 (0.36; 0.81)	0.44 (0.15; 0.77)	1.10 (0.55; 2.19)	0.87 (0.34; 2.22)	56%

Não foi identificado nenhum miRNA com acurácia adequada para discriminação dos grupos PPT e PN (tabela 8).

Tabela 8 – Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação dos grupos PPT e PN

Teste	Corte	Sensibilidade	Especificidade	RV Positiva	RV Negativa	Acurácia
miRNA-100	0,27	0.44 (0.15; 0.77)	0.28 (0.05; 0.70)	0.62 (0.26; 1.48)	1.94 (0.52; 7.19)	38%
miRNA-107	0,97	0.33 (0.09; 0.69)	0.42 (0.11; 0.80)	0.58 (0.18; 1.79)	1.55 (0.58; 4.11)	38%
miRNA-181c	0,37	0.33 (0.09; 0.69)	0.42 (0.11; 0.80)	0.58 (0.18; 1.79)	1.55 (0.58; 4.11)	38%
miRNA-21	0,78	0.66 (0.30; 0.91)	0.42 (0.11; 0.80)	1.16 (0.52; 2.57)	0.77 (0.22; 2.73)	56%
miRNA-210	0,99	0.44 (0.15; 0.77)	0.42 (0.11; 0.80)	0.77 (0.29; 2.05)	1.29 (0.46; 3.65)	44%
miRNA-23a	0,0000517	0.55 (0.22; 0.84)	0.57 (0.20; 0.88)	1.29 (0.46; 3.65)	0.77 (0.29; 2.05)	56%

No plasma, a elevação do miR-181c acima do corte de 2,03 tem sensibilidade de 100% (IC 95%, 0,71 – 0,99) e especificidade de 100% (IC 95%, 0,51 – 0,99), com acurácia de 100% para a discriminação entre o plasma do grupo APp e do grupo PC (tabela 9).

Tabela 9 – Medidas de desempenho da expressão dos miRNAs na comparação do plasma dos grupos APp e PC

Teste	Corte	Sensibilidade	Especificidade	RV Positiva	RV Negativa	Acurácia
miRNA-100	1,79	0.61 (0.32; 0.84)	0.83 (0.36; 0.99)	3.69 (0.58; 23.25)	0.46 (0.21; 1.00)	68%
miRNA-107	0,76	0.92 (0.62; 0.99)	0.50 (0.13; 0.86)	1.84 (0.81; 4.17)	0.15 (0.01; 1.19)	79%
<b>miRNA-181c</b>	<b>2,03</b>	<b>1.00 (0.71; 0.99)</b>	<b>1.00 (0.51; 0.99)</b>	-	<b>0</b>	<b>100%</b>
miRNA-21	1,35	0.61 (0.32; 0.84)	0.66 (0.24; 0.94)	1.84 (0.55; 6.19)	0.57 (0.23; 1.40)	63%
miRNA-210	1,98	0.69 (0.38; 0.89)	0.83 (0.36; 0.99)	4.15 (0.66; 25.77)	0.36 (0.15; 0.89)	74%
miRNA-23a	0,59	0.46 (0.20; 0.73)	0.33 (0.05; 0.76)	0.69 (0.30; 1.56)	1.61 (0.46; 5.57)	42%

*DISCUSSÃO*

---

## 7 DISCUSSÃO

As limitações para obtenção de material tecidual suficiente por biópsia percutânea ou por ecoendoscopia para estudo anatomopatológico das massas pancreáticas, mais a necessidade de aprofundar a caracterização dos AP frente à heterogeneidade de respostas às terapêuticas vigentes justificam a pesquisa de biomarcadores, sobretudo nos fluídos corporais, que possam facilitar a prática clínica. As dificuldades para definição do diagnóstico etiológico das massas pancreáticas ainda expõem pacientes a uma duodenopancreatectomia cefálica para doença inflamatória benigna (ABRAHAM et al., 2003), o que reflete, em algumas circunstâncias, as dificuldades para estabelecer diagnóstico diferencial entre AP e as massas inflamatórias pancreáticas.

No presente estudo, adotando como pressuposto que os miRNAs -21, - 23a, -100, -107, -181c e -210 podem estar hiperexpressos nos tecidos de AP (BLOOMSTON et al., 2007b; DU RIEU et al., 2010; FRAMPTON; GIOVANNETTI; et al., 2014; GIOVANNETTI et al., 2010; KHAN et al., 2013; LEE, EUN JOO et al., 2007b; ROLDO et al., 2006; SZAFRANSKA, A E et al., 2007; VOLINIA et al., 2006; ZHANG, YUQING et al., 2009), verificou-se a expressão desses miRNAs no tecido tumoral, na região paratumoral e no tecido pancreático obtido de doadores cadáveres e de trauma pancreático.

Adicionalmente, com o interesse em estudar a possível associação entre a hiperexpressão dos miRNAs teciduais e no plasma, verificou-se também a expressão plasmática desse painel de miRNAs nos mesmos pacientes com AP e comparou-se com a expressão no plasma de sujeitos saudáveis. A opção por não utilizar o plasma controle do doador de tecido é a possibilidade de alteração dos miRNAs séricos em situações de resposta inflamatória e infecciosa (politrauma, cirurgia, circunstância da morte encefálica) (DAVIS, BRANDI N; HATA, 2009; LIU, NAI-KUI; XU, 2011). A partir destas quantificações definiu-se valor significativo dos miRNAs selecionados no tecido, no plasma e na concentração sérica do CA 19-9, que pudesse discriminar as amostras positivas e negativas para AP.

O AP é uma doença que se apresenta, na maioria das vezes, em estágio avançado ao diagnóstico, mas a prática clínica não dispõe de biomarcadores que possam discriminar sujeitos doentes de saudáveis. O CA 19-9 é o marcador mais

utilizado na prática clínica, possui sensibilidade de 70-80%, mas a especificidade inferior a 50% para os pacientes com AP para valores de 40U/ml (FREBOURG *et al.*, 1988). Os níveis de CA 19-9 relacionam-se com o tamanho e o estágio do AP e, portanto, trata-se de meio ineficaz para diagnóstico da doença precoce, estágios em que o prognóstico é consideravelmente melhor (LIU, JIANQIANG *et al.*, 2012).

Na última década foram estudados outros biomarcadores para o AP como o CEA, CA 242 (NI *et al.*, 2005), CA 125 (RESNICK *et al.*, 2009), MUC-1 (GOLD *et al.*, 2006), MMP-9 (JOERGENSEN; BRÜNNER; DE MUCKADELL, 2010), Lectinas (ZHAO *et al.*, 2007), REG4 (TAKAYAMA *et al.*, 2010), osteopontina (KOOPMANN *et al.*, 2004), mutação do K-Ras (MARCHESE *et al.*, 2006), metilação gênica (MATSUBAYASHI *et al.*, 2006), dentre outros, na tentativa melhorar os recursos para obtenção do diagnóstico e prognóstico. No entanto, a concentração sérica do CA 19-9 ainda permanece como o marcador mais utilizado na prática clínica (GOONETILLEKE; SIRIWARDENA, 2007).

A concentração sérica de CA 242, Ca 50 e CEA aumenta a especificidade diagnóstica do CA 19-9 para o AP, porém com baixa sensibilidade (LIAO, QUAN *et al.*, 2007), enquanto o CA 125 aumenta a sensibilidade, porém com baixa especificidade (CWIK *et al.*, 2006). As mutações do K-Ras combinadas ao CA 19-9 também podem aumentar a sensibilidade diagnóstica para o AP (DIANXU *et al.*, 2002).

A concentração sérica do CA 19-9, no grupo AP, do presente estudo, com AUC-ROC de 0,95 (IC 95%; 0,84 – 1), apresentou sensibilidade de 89% e especificidade de 100%, para o valor de 16,20 U/l, com acurácia de 88%, que foi superada apenas pela expressão sérica do miR-181c com AUC-ROC de 1 (IC 95%; 1 – 1), com sensibilidade de 100% e especificidade de 100%, para o valor de 2,03 X e, portanto, acurácia de 100%. O resultado é promissor, mas deve ser considerado com cautela em função da amostra pequena e composta por 67% de pacientes com AP em estágio avançado.

No grupo APt, do presente estudo, em comparação ao grupo PPT e o PN, o miR-21 estava hiperexpresso, conforme já registrado previamente na literatura (FRAMPTON; GIOVANNETTI; *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2013). A hiperexpressão tumoral do miR-21 está associada à quimioresistência e a indução *in vitro* de hipoeexpressão do miR-21 em cultura de células proporciona maior sensibilidade a gemcitabina (PAIK *et al.*, 2013; PARASRAMKA *et al.*, 2013).

O miR-21 também foi estudado como alvo terapêutico em cultura de células tratadas por lentivírus, em modelos *in vivo* e, foi observado que quando a expressão do miR-21 era reduzida havia maior quantidade de células em apoptose (SICARD et al., 2013). O miR-21, dentre o painel estudado, apresentou acurácia de 76% para discriminar pacientes com APt dos PN, o que faria sua concomitante hiperexpressão plasmática um interessante biomarcador, não apenas para diagnóstico, mas para estabelecer tratamento e prognóstico.

No entanto, no presente estudo, não se observou a associação entre hiperexpressão do miR-21 no tecido e no plasma dos pacientes com AP, diferentemente do resultado registrado em outra pesquisa que detectou miR-21, 2 a 20x elevado no plasma em 31 dos 49 pacientes com AP (WANG, JIN et al., 2009b). Esta diferença entre estudos pode ser atribuída ao número de pacientes, mas também a diferenças entre as populações estudadas (estadiamento da doença, diferenças étnicas, geográficas, dentre outras). A expressão gênica pode variar entre populações normais (STOREY, et al., 2007), bem como em pacientes com o mesmo tumor, mas de populações diferentes (MARTIN et al., 2009).

Tomando como base a frequência e consistência entre estudos de microarray, uma meta-análise e revisão sistemática (n=70) identificou uma meta-assinatura no tecido do AP para seu reconhecimento: hiperexpressão dos miR-21, 23a, 31, 100, 143, 155 e 221, com hipoexpressão dos miR-148a, 217 e 375. Além disso foi validado no tecido a hiperexpressão dos miR-21 e miR-31 e a hipoexpressão do miR-375 como fatores independentes de mau prognóstico (MA et al., 2013).

No presente estudo, o miR-23a não apresentou alteração na expressão nos grupos comparados, tanto no tecido, quanto no plasma, contrariando igualmente outros achados (FRAMPTON; GIOVANNETTI; et al., 2014; PIEPOLI et al., 2012). A diferença entre os achados descritos pode ser explicada, pela distinção entre população estudada (menor e de diferente perfil étnico), pela presença de uma subpopulação de células denominadas de *Cancer Stem Cells* (CSCs) com características específicas, tais como: capacidade de auto-renovação e com potencial de diferenciação em populações heterogêneas ilimitadas de células cancerosas que causam resistência aos tratamentos e recidiva tumoral sendo um promissor alvo no tratamento do AP (BAO et al., 2013).



Ainda, o material utilizado para as análises podem não representar a população, ou parte dela, com um perfil de expressão diferente. O processo de microdissecção pode influenciar os resultados nesta situação visto que alguns centros adotam procedimentos e equipamentos diferentes com uma precisão maior na definição do material oncológico.

A expressão sérica de quatro miRNAs (miR-21, -210, -155, -196a) especificamente envolvidos na etiopatogênese do carcinoma de pâncreas já foi relatada (WANG *et al.*, 2009a). Dentre os quatro miRNAs analisados, o aumento da expressão do miR-21 nas células cancerosas está associado a inibição da apoptose e aquisição de propriedades invasivas, mediadas pelos efeitos inibitórios na expressão em dois genes supressores tumorais, o PTEN e o PDCD4 (STEELE *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2014).

O aumento da expressão do miR-210, por outro lado, é regulado pelo fator 1-alfa-dependente induzido por hipóxia, de modo a produzir efeitos nos genes de reparo do DNA e afetar a instabilidade genômica (DEVLIN *et al.*, 2011). O papel funcional do miR-155 foi baseado nas observações de que reprime a função da proteína pro-apoptótica TP53INP1, responsável por aumentar a tumorigenicidade das células de câncer de pâncreas *in vivo*. Por estar hiperexpresso em cerca de 80% das lesões precursoras NIP, o miR-155 também é considerado um marcador de neoplasia pancreática precoce (HABBE *et al.*, 2009).

Existe hiperexpressão tecidual do miR-210 nos pacientes com AP, quando comparado aos controles normais (PAPACONSTANTINO *et al.*, 2013). A mesma hiperexpressão é observada em modelos animais pela transfecção do gene do KRAS (YABUSHITA *et al.*, 2012).

Os miR-21 e -210 podem ser isolados nas fezes de pacientes com AP, porém não servem para diferenciá-los dos indivíduos normais ou dos portadores de pancreatite crônica. A expressão fecal diferencial dos miRNAs 216a, -196a, -143 e -155 ajuda a diferenciar pacientes com AP em relação aos indivíduos normais ou dos portadores de pancreatite crônica (LINK *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes com hiperexpressão tecidual de miRNA-210 foram encontrados no trabalho anglo-italiano em que, através de análises de bioinformática, foram identificados os miRNAs mais importantes da tumorigênese de linhagens celulares do AP (PANC-1 e MIA PaCa-2) e em amostras de tumor de pacientes com AP.

Os resultados do presente estudo corroboram tais achados, em que o miR-210 esteve hiperexpresso na amostra estudada, tanto no tecido tumoral quanto no plasma. Também quando se comparou o tecido tumoral e a região paratumoral, identificou-se hiperexpressão de miR-210. A persistência de diferença entre tumor e paratumor sugere que o aumento deste miR-210 é originado do tumor e não de reação do micro ambiente tumor – paratumor.

Por meio da técnica de microarray, foram rastreados 42 miRNAs que apresentavam expressão diferencial no plasma de pacientes com AP em relação ao grupo controle. Foram selecionados oito miRNAs para o estudo de validação, pela técnica de RT-PCR, e destes três apresentaram hiperexpressão no plasma de portadores de AP em comparação a sujeitos normais (miR-885, , miR -22, miR-642b). Não houve hiperexpressão dos miR-21 e miR-210, nos casos de AP, porém nos controles normais, contrariando os outros estudos com os mesmos microRNAs (GANEPOLA *et al.*, 2014). Neste estudo não foi encontrada hiperexpressão dos miR-21, miR-210 nos casos de AP, porém a expressão destes miRNAs foi constada no grupo controle constituído por indivíduos normais, o que sugere uma possível assinatura específica dos miRNAs e os fatores ambientais associados a localização geográfica que causam alteração gênicas e genotípicas, estão entre as hipóteses que podem justificar os conflitos de resultados.

O miR-181c está descrito como hiperexpresso em neuroblastomas primários, enquanto sua expressão é reduzida nas lesões metastáticas (LI *et al.*, 2014). No casos de câncer de mama, a expressão tecidual de miR-181c, em conjunto com o miR-520d, -302, 376b, -30, -3p, apresentou acurácia de 100% para as pacientes portadoras do fenótipo her-2/neu positivas (LOWERY, AOIFE J *et al.*, 2009). Em estudo de pacientes com câncer gástrico foi verificada hiperexpressão de miR-181c, tanto no tecido quanto sérico, quando comparado a indivíduos portadores de úlcera gástrica ou a gastrite crônica (CUI *et al.*, 2013).

No presente estudo, o miR-181c esteve hiperexpresso no plasma dos pacientes com AP, em comparação aos controles normais, com acurácia de 100% para distinguir uma amostra de plasma de um paciente com AP daquela de um sujeito normal. Trata-se de achado inédito na literatura, abrindo possibilidades de estudo do miRNA-181c como biomarcador eficaz e menos invasivo para diagnóstico do AP.

Um aspecto importante é a ausência da hiperexpressão do miR-181c no tecido tumoral. Assim, pode-se especular que a expressão do miR-181c está associada a subpopulação de *Cancer Stem Cells*, atualmente implicada na resistência ao tratamento, recidiva e metástase em diversos tipos de tumores, inclusive em AP (BAO et al 2013). Os miRNAs desempenham um papel-chave na regulação de características e funções das CSCs e também são expressos de forma distinta na subpopulação de células-tronco do AP com amplas implicações na compreensão desta doença e perspectivas de avanços na terapia com alvo em células-tronco (BAO et al., 2013; JUNG et al., 2011).

Assim, um estudo com culturas primárias de pacientes com diagnóstico de AP visando a comparação da expressão do miR-181c na subpopulação de CSCs se faz necessário, assim como estudos funcionais para elucidar o seu papel no AP.

O resultado obtido nesse estudo, com casuística pequena, onde a maioria dos pacientes apresentavam tumores avançados, deve ser visto com reservas e indica a necessidade de estudos multicêntricos com maior diversidade populacional e padronização dos testes do miRNA no plasma.

No presente estudo, quando a concentração do CA 19-9 foi adicionada aos miRNAs que estiveram hiperexpressos, houve aumento da acurácia, sugerindo que este somatório poderá agregar valor para o diagnóstico diferencial e o estudo de respostas ao tratamento do AP.

A expressão alterada de cerca de 100 miRNAs já foi identificada em tecido de AP. Os miRNAs de utilidade para triagem clínica, planejamento e avaliação do tratamento deveriam ser identificados em amostras de sangue e depois confirmados, mediante avaliação da bile, do suco pancreático ou tecido obtido por exames endoscópico (BLOOMSTON et al., 2007a; FRAMPTON; CASTELLANO; et al., 2014; GREITHER, THOMAS et al., 2010; KHAN et al., 2013; MA et al., 2013; OUYANG et al., 2013; SZAFRANSKA, ANNA E et al., 2008; XU et al., 2014).

O estadiamento do AP tem associação com a expressão dos miRNAs. O miRNA -132 está hiperexpresso em pacientes com estadiamento IV, enquanto os miRNA-155 and -181b estão hipoexpressos. Todavia, há miRNAs que se expressam de maneira similar entre os estágios IV e I-III do AP (COTE et al., 2014).

Os miRNAs -10b, -21 e -155 são importantes na biologia do AP (BLOOMSTON et al., 2007a; GREITHER, T. et al., 2010; OUYANG et al., 2013;

PREIS et al., 2011a; SZAFRANSKA, A E et al., 2007). No entanto, o miR-21, como observado também no presente estudo, não serve como um bom biomarcador no plasma, na bile e no suco pancreático (COTE et al., 2014).

Dessa forma, os mecanismos de regulação da liberação dos miRNAs para a circulação são complexos, não podem ser generalizados para todos os miRNAs e não estão claramente delineados. Os miRNAs -10b e -21 são abundantes nas células do AP e também estão presentes em fibroblastos associados ao câncer; por outro lado, o miRNA-155 localiza-se nas células CD45 + T, dentro do microambiente do tumor pancreático, e não está presente nas células do AP (PREIS et al., 2011b; SEMPERE et al., 2010). Portanto, a expressão de um determinado miRNA nas células do AP ou do microambiente do tumor pancreático não necessariamente determina a sua utilidade como um biomarcador periférico.

Dessa forma, os achados desse estudo revelam que a combinação da expressão de miRNAs no tecido tumoral e dos valores do CA19-9 aumenta a acurácia no diagnóstico do AP, mas a expressão miRNA-181c no plasma pode servir como um teste de diagnóstico não invasivo para o AP. Novos estudos são necessários para validar a acurácia diagnóstica deste achado, bem como para avaliar a sua utilidade como biomarcador que se correlaciona com a sobrevivência e a resposta à terapia do AP.

*CONCLUSÃO*

---

## **9 CONCLUSÃO**

A amostra populacional de conveniência estudada e os métodos empregados permitem concluir que a combinação da expressão do miRNA-21 e do miRNA-210 no tecido tumoral e dos valores séricos do CA19-9 aumenta a acurácia no diagnóstico do AP, mas a expressão miRNA-181c no plasma pode servir como um teste de diagnóstico não invasivo e representa alternativa a ser explorada na caracterização desses tumores.

## *REFERÊNCIAS*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Susan C *et al.* Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all “chronic pancreatitis”? *The American journal of surgical pathology*, v. 27, n. 1, p. 110–20, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502933>>. Acesso em: 8 mar. 2012.

ALTER, C L. Palliative and supportive care of patients with pancreatic cancer. *Seminars in oncology*, v. 23, n. 2, p. 229–40, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623059>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

AMARAL, Fernando Colbari *et al.* MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 94, n. 1, p. 320–3, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840638>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

AMERES, Stefan L *et al.* Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, v. 328, n. 5985, p. 1534–9, 18 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2902985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jun. 2011.

ARSLAN, Alan A *et al.* Anthropometric Measures, Body Mass Index and Pancreatic Cancer: a Pooled Analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *arch intern med*, v. 170, n. 9, p. 791–802, 2010.

ASLAM, M I *et al.* MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer. *The British journal of surgery*, v. 96, n. 7, p. 702–10, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526617>>. Acesso em: 6 dez. 2011.

BABASHAH, Sadegh; SOLEIMANI, Masoud. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *European Journal of Cancer*, v. 47, n. 8, p. 1127–1137, maio 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804911001079>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

BAKKEVOLD, K E; ARNESJØ, B; KAMBESTAD, B. *Carcinoma of the pancreas and papilla of Vater--assessment of resectability and factors influencing resectability in stage I carcinomas. A prospective multicentre trial in 472 patients. European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology.* [S.l.: s.n.], 1992.

BALCOM, J H *et al.* Ten-year experience with 733 pancreatic resections: changing indications, older patients, and decreasing length of hospitalization. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, v. 136, n. 4, p. 391–8, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296108>>. Acesso em: 24 fev. 2014.



BAO, Bin *et al.* Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*, v. Chapter 14, p. Unit 14.25, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3733496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BAUER, Todd M *et al.* Carbohydrate antigen 19-9 is a prognostic and predictive biomarker in patients with advanced pancreatic cancer who receive gemcitabine-containing chemotherapy: a pooled analysis of 6 prospective trials. *Cancer*, v. 119, n. 2, p. 285–92, 15 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786786>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

BENDELL, J.C. *et al.* Immediate impact of the FOLFIRINOX phase III data reported at the 2010 ASCO Annual Meeting on prescribing plans of American oncology physicians for patients with metastatic pancreas cancer (MPC). *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 4S, p. 286, 2011.

BERRINGTON DE GONZALEZ, A; SWEETLAND, S; SPENCER, E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *British journal of cancer*, v. 89, n. 3, p. 519–23, 4 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2394383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BLACKFORD, Amanda *et al.* SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 15, n. 14, p. 4674–9, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

BLOOMSTON, Mark *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 297, n. 17, p. 1901–8, 2 maio 2007a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473300>>. Acesso em: 22 dez. 2013.

BLOOMSTON, Mark *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 297, n. 17, p. 1901–8, 2 maio 2007b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473300>>.

BOSETTI, C *et al.* Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104574>>.

BOSETTI, Cristina *et al.* Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Molecular carcinogenesis*, v. 51, n. 1, p. 3–13, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162227>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

BREMNES, Roy M; SIRERA, Rafael; CAMPS, Carlos. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, v. 49, n. 1, p. 1–12, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949585>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

CALIN, George a; CROCE, Carlo M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*, v. 6, n. 11, p. 857–66, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945>>. Acesso em: 4 jul. 2011.

CAMPBELL, Peter J *et al.* The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, v. 467, n. 7319, p. 1109–13, 28 out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3137369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

CARMICHAEL, J *et al.* Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer*, v. 73, n. 1, p. 101–5, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

CASPER, E S *et al.* Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Investigational new drugs*, v. 12, n. 1, p. 29–34, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7960602>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

CHARI, Suresh T *et al.* Temporal Association with Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology*, v. 134, n. 1, p. 95–101, 2008.

CHUANG, Shu-Chun *et al.* Exposure to environmental tobacco smoke in childhood and incidence of cancer in adulthood in never smokers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer causes & control : CCC*, v. 22, n. 3, p. 487–94, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21279734>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

CONROY, Thierry *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*, v. 364, n. 19, p. 1817–25, 12 maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561347>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

COTE, Gregory a *et al.* A Pilot Study to Develop a Diagnostic Test for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Differential Expression of Select miRNA in Plasma and Bile. *The American journal of gastroenterology*, p. 1–11, 28 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25350767>>. Acesso em: 29 out. 2014.

COWAN, Robert W; MAITRA, Anirban. Genetic progression of pancreatic cancer. *Cancer Journal*, v. 20, n. 1, p. 80–4, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445769>>.

CUI, Mei-Hua *et al.* Upregulation of microRNA 181c expression in gastric cancer tissues and plasma. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 14, n. 5, p. 3063–6, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803080>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CWIK, Grzegorz *et al.* Cancer antigens 19-9 and 125 in the differential diagnosis of pancreatic mass lesions. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, v. 141, n. 10, p. 968–73; discussion 974, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043274>>. Acesso em: 4 mar. 2014.

DAVIS, Brandi N; HATA, Akiko. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS*, v. 7, p. 18, 2009.

DAVIS, Mark E *et al.* Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, v. 464, n. 7291, p. 1067–70, 15 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2855406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2012.

DEVELOPMENT CORE TEAM, R. *R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. , 2011

DEVLIN, Cecilia *et al.* miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB life*, v. 63, n. 2, p. 94–100, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360638>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

DI LEVA, Gianpiero; CROCE, Carlo M. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in molecular medicine*, v. 16, n. 6, p. 257–67, jun. 2010.

DIANXU, Feng *et al.* A prospective study of detection of pancreatic carcinoma by combined plasma K-ras mutations and serum CA19-9 analysis. *Pancreas*. [S.l: s.n.], 2002.

DOS SANTOS, José Sebastião *et al.* Effect of preoperative endoscopic decompression on malignant biliary obstruction and postoperative infection. *Hepato-gastroenterology*, v. 52, n. 61, p. 45–7, [S.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15782991>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

DU RIEU, Maël Chalret *et al.* MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clinical chemistry*, v. 56, n. 4, p. 603–12, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093556>>. Acesso em: 22 out. 2011.

FERLAY, J *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, v. 49, n. 6, p. 1374–403, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485231>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

FERLAY, Jacques *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 127, n. 12, p. 2893–917, 15 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

FRAMPTON, Adam E; GIOVANNETTI, Elisa; *et al.* A microRNA meta-signature for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Expert review of molecular diagnostics*, 28 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575833>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

FRAMPTON, Adam E; CASTELLANO, Leandro; *et al.* MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology*, v. 146, n. 1, p. 268–77.e18, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120476>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

FREBOURG, T *et al.* The evaluation of CA 19-9 antigen level in the early detection of pancreatic cancer. A prospective study of 866 patients. *Cancer*, v. 62, n. 11, p. 2287–90, 1 dez. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3179943>>. Acesso em: 21 out. 2014.

FREENY, P C. Radiologic diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Radiologic clinics of North America*, v. 27, n. 1, p. 121–8, jan. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2535684>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

GANEPOLA, Ganepola Ap *et al.* Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of pancreatic cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*, v. 6, n. 1, p. 22–33, 15 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3936193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

GENKINGER, Jeanine M *et al.* Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 18, n. 3, p. 765–76, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2715951&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

GENKINGER, Jeanine M *et al.* Coffee, tea, and sugar-sweetened carbonated soft drink intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of 14 cohort studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 21, n. 2, p. 305–18, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

GIOVANNETTI, Elisa *et al.* MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the

modulation of gemcitabine activity. *Cancer research*, v. 70, n. 11, p. 4528–38, 1 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460539>>. Acesso em: 22 out. 2011.

GOLD, David V *et al.* New MUC1 serum immunoassay differentiates pancreatic cancer from pancreatitis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 24, n. 2, p. 252–8, 10 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344318>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

GOOIKER, G A *et al.* Systematic review and meta-analysis of the volume-outcome relationship in pancreatic surgery. *The British journal of surgery*, v. 98, n. 4, p. 485–94, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21500187>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

GOONETILLEKE, K S; SIRIWARDENA, A K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, v. 33, n. 3, p. 266–70, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097848>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

GREITHER, T. *et al.* Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *International Journal of Cancer*, v. 126, n. 1, p. 73–80, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.24687/full>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

GREITHER, Thomas *et al.* Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *International Journal of Cancer*, v. 126, p. 73–80, 2010.

GUKOVSKY, Ilya *et al.* Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, v. 144, n. 6, p. 1199–209.e4, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622129>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

HABBE, Nils *et al.* MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer biology & therapy*, v. 8, n. 4, p. 340–6, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2692997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HASHIMOTO, Yutaka *et al.* Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 5, p. 777–84, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080834>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

HENRY, Sarah A; PRIZMENT, Anna E; ANDERSON, Kristin E. Duration of Diabetes and Pancreatic Cancer in a Case-Control Study in the Midwest and the Iowa Women ' s Health Study ( IWHS ) Cohort. *JOP: Journal of the pancreas*, v. 14, n. 3, p. 243–249, 2013.

HERREROS-VILLANUEVA, Marta *et al.* Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 418, p. 22–9, 15 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305796>>. Acesso em: 3 jan. 2014.

HOEM, D; BACKMAN, Pia Lena. Review . Other risk factors for pancreatic cancer : Hormonal aspects. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, v. 10, n. supplement 4, p. 131–135, 1999.

HSU, Sheng-Da *et al.* miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic acids research*, v. 36, n. Database issue, p. D165–9, jan. 2008.

HUANG, Zhaohui *et al.* Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 127, n. 1, p. 118–26, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876917>>.

HUMEAU, Marine; TORRISANI, Jérôme; CORDELIER, Pierre. miRNA in clinical practice: pancreatic cancer. *Clinical biochemistry*, v. 46, n. 10-11, p. 933–6, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23570860>>. Acesso em: 3 jan. 2014.

HUTVÁGNER, György; ZAMORE, Phillip D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, v. 297, n. 5589, p. 2056–60, set. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/297/5589/2056.short>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

HWANG, Jin-Hyeok *et al.* Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS one*, v. 5, n. 5, p. e10630, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 jul. 2011.

IODICE, Simona *et al.* Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*, v. 393, n. 4, p. 535–45, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193270>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

JAMIESON, Nigel B *et al.* MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 18, n. 2, p. 534–45, 15 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114136>>. Acesso em: 16 jan. 2014.

JANSEN, Rick J *et al.* Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*, v. 44, n. 2, p. 152–61, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620017>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

JEMAL, Ahmedin *et al.* Selected cancers with increasing mortality rates by educational attainment in 26 states in the United States, 1993-2007. *Cancer causes & control: CCC*, v. 24, n. 3, p. 559–65, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729932>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

JIAO, Long R *et al.* MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PloS one*, v. 7, n. 2, p. e32068, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3284550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

JOERGENSEN, Maiken Thyregod; BRÜNNER, Nils; DE MUCKADELL, Ove B Schaffalitzky. Comparison of circulating MMP-9, TIMP-1 and CA19-9 in the detection of pancreatic cancer. *Anticancer research*, v. 30, n. 2, p. 587–92, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332475>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

JOHNSON, Steven M *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, v. 120, n. 5, p. 635–47, 11 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766527>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

JONES, Siân *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, v. 321, n. 5897, p. 1801–6, 26 set. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2848990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 fev. 2014.

JUNG, Dawoon E *et al.* Differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells. *Pancreas*, v. 40, n. 8, p. 1180–7, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785383>>.

KAI, Zoya S; PASQUINELLI, Amy E. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nature structural & molecular biology*, v. 17, n. 1, p. 5–10, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051982>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

KALSER, M H; BARKIN, J; MACINTYRE, J M. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer*, v. 56, p. 397–402, 1985.

KATZ, Matthew H G *et al.* Borderline resectable pancreatic cancer: the importance of this emerging stage of disease. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 206, n. 5, p. 833–46; discussion 846–8, maio 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1072751507019813>>. Acesso em: 23 fev. 2014.

KHAN, Sheema *et al.* Targeting microRNAs in pancreatic cancer: Microplayers in the big game. *Cancer Research*. [S.l.: s.n.], 2013

KOOPMANN, Jens *et al.* Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a*

publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 13, n. 3, p. 487–91, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006928>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

KOPROWSKI, H *et al.* Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic cell genetics*, v. 5, n. 6, p. 957–71, nov. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/94699>>. Acesso em: 4 mar. 2014.

KOZOMARA, Ana; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, v. 42, n. 1, p. D68–73, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/42/D1/D68>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

KROH, Evan M *et al.* Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 50, n. 4, p. 298–301, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146939>>. Acesso em: 29 fev. 2012.

LARSSON, S C; WOLK, A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *British journal of cancer*, v. 106, n. 3, p. 603–7, 31 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3273353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

LAWRIE, Charles H *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, v. 141, n. 5, p. 672–5, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318758>>. Acesso em: 19 jun. 2011.

LEE, Eun Joo *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 120, n. 5, p. 1046–54, 1 mar. 2007a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2680248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

LEE, Eun Joo *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 120, n. 5, p. 1046–54, 1 mar. 2007b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2680248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

LEE, R C; FEINBAUM, R L; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 843–54, 3 dez. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>>.

LEENDERS, Max *et al.* Plasma cotinine levels and pancreatic cancer in the EPIC cohort study. *International journal of cancer. Journal international du cancer*,



v. 131, n. 4, p. 997–1002, 15 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953524>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

LI, Yong *et al.* MiR-181c modulates the proliferation, migration, and invasion of neuroblastoma cells by targeting Smad7. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, v. 46, n. 1, p. 48–55, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345480>>. Acesso em: 8 out. 2014.

LIAO, Q. *et al.* Assessment of pancreatic carcinoma cell chemosensitivity using a three-dimensional culture system. *Chin Med J*, v. 123, n. 30772526, p. 1871–1877, 2010. Disponível em: <<http://www.cmj.org/periodical/PDF/201072038922800.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

LIAO, Quan *et al.* Combined detection of serum tumor markers for differential diagnosis of solid lesions located at the pancreatic head. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, v. 6, p. 641–645, 2007.

LIAO, Wei-Chih *et al.* Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *The lancet oncology*, v. 14, n. 11, p. 1095–103, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035532>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

LINK, Alexander *et al.* Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e42933, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3414456&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

LIU, Jianqiang *et al.* Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 131, n. 3, p. 683–91, 1 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21913185>>. Acesso em: 16 jan. 2014.

LIU, Mao; CHEN, Huiping. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, v. 37, n. 6, p. 347–58, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621017>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

LIU, Nai-Kui; XU, Xiao-Ming. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders. *Physiological genomics*, v. 43, p. 571–580, 2011.

LOCKER, Gershon Y *et al.* ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 24, n. 33, p. 5313–27, 20 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060676>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

LOWENFELS, Albert B *et al.* Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *The New England journal of medicine*, v. 328, n. 20, p. 1433–7, 20 maio 1993. Disponível em:

<<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199305203282001>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

LOWERY, Aoife J *et al.* MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, v. 11, n. 3, p. R27, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 set. 2014.

LOWERY, M a; O'REILLY, E M. Genomics and pharmacogenomics of pancreatic adenocarcinoma. *The pharmacogenomics journal*, v. 12, n. 1, p. 1–9, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186617>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

LU, Jun *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, v. 435, n. 7043, p. 834–8, 9 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944708>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

LYNAM-LENNON, Niamh; MAHER, Stephen G; REYNOLDS, John V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 84, n. 1, p. 55–71, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046400>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

LYNCH, Shannon M *et al.* Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *American journal of epidemiology*, v. 170, n. 4, p. 403–13, 15 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2733861&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 jan. 2014.

MA, Ming-Zhe *et al.* Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, v. 32, n. 1, p. 71, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289824>>. Acesso em: 2 mar. 2014.

MARCHESE, Rodolfo *et al.* Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutations in circulating DNA. *Pancreas*, v. 32, n. 2, p. 171–7, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552337>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

MATSUBAYASHI, Hiroyuki *et al.* DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer research*. [S.l: s.n.], 2006.

MATTHAEI, Hanno *et al.* miRNA biomarkers in cyst fluid augment the diagnosis and management of pancreatic cysts. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 18, n. 17, p. 4713–24, 1 set. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3547600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

MEDINA, Pedro P; NOLDE, Mona; SLACK, Frank J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*, v. 467, n. 7311, p. 86–90, 2 set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693987>>. Acesso em: 22 jul. 2011.

MICHAUD, Dominique S. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer causes & control: CCC*, v. 21, n. 8, p. 1213–1225, 2011.

MITCHELL, Patrick S *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 30, p. 10513–8, 29 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2492472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MODOLELL, I; GUARNER, L; MALAGELADA, J R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 10 Suppl 4, p. 82–84, 1999.

MOORE, Malcolm J *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 25, n. 15, p. 1960–6, 20 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17452677>>. Acesso em: 23 fev. 2014.

MOSS, Alan C *et al.* Malignant distal biliary obstruction: a systematic review and meta-analysis of endoscopic and surgical bypass results. *Cancer treatment reviews*, v. 33, n. 2, p. 213–21, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157990>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

MOSTERT, Bianca *et al.* Diagnostic applications of cell-free and circulating tumor cell-associated miRNAs in cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*, v. 11, n. 3, p. 259–75, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463236>>.

NAWROZ, H *et al.* microsatellite alterations in serum dna of head and neck cancer patients. *Nature medicine*, 1996. Disponível em: <<http://www.nature.com/nm/journal/v2/n9/abs/nm0996-1035.html>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

NEOPTOLEMOS, John P *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*, v. 350, n. 12, p. 1200–10, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028824>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

NI, X G *et al.* The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical*

*oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, v. 31, n. 2, p. 164–9, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15698733>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

OUYANG, H *et al.* microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- $\beta$  actions. *Oncogene*, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096486>>.

PAIK, Woo Hyun *et al.* Chemosensitivity induced by down-regulation of microRNA-21 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by indole-3-carbinol. *Anticancer research*, v. 33, n. 4, p. 1473–81, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564788>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

PAPACONSTANTINO, Ioannis G *et al.* Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas*, v. 42, n. 1, p. 67–71, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850622>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

PARASRAMKA, Mansi A *et al.* Garcinol sensitizes human pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine in association with microRNA signatures. *Molecular nutrition & food research*, v. 57, n. 2, p. 235–48, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293055>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

PARKIN, D M. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British journal of cancer*, v. 105 Suppl, n. S2, p. S2–5, 6 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

PASQUINELLI, A E *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, v. 408, n. 6808, p. 86–9, nov. 2000.

PETERSEN, CP; BORDELEAU, ME; PELLETIER, Jerry. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell*, v. 21, n. 4, p. 533–42, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276506000773>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

PETERSEN, Gloria M *et al.* Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 15, n. 4, p. 704–10, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614112>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

PIEPOLI, Ada *et al.* Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers. *PloS one*, v. 7, n. 3, p. e33663, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3316496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

PLATH, Thomas *et al.* Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 94, n. 2, p. 129–42, 16 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792751>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

PLESKOW, D K *et al.* Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer. *Annals of internal medicine*, v. 110, n. 9, p. 704–9, 1 maio 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2930108>>. Acesso em: 4 mar. 2014.

PORTA, Miquel *et al.* Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, v. 7, p. 189–197, 2005.

PREIS, Meir *et al.* MicroRNA-10b Expression Correlates with Response to Neoadjuvant Therapy and Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 17, p. 5812–5821, 2011a.

PREIS, Meir *et al.* MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 17, n. 17, p. 5812–21, 1 set. 2011b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167031&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

RABINOWITS, Guilherme *et al.* Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clinical lung cancer*, v. 10, n. 1, p. 42–6, jan. 2009.

RACHAGANI, Satyanarayana; KUMAR, Sushil; BATRA, Surinder K. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer letters*, v. 292, n. 1, p. 8–16, 1 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3229224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 fev. 2012.

RAIMONDI, Sara *et al.* Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, v. 24, n. 3, p. 349–58, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510834>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

REICHERT, Maximilian. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 12, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225990/>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

RESNICK, Kimberly E *et al.* The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic oncology*, v. 112, n. 1, p. 55–9, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18954897>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

RIBIC, Christine M *et al.* Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England journal of medicine*, v. 349, n. 3, p. 247–57, 17 jul. 2003. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

RICARTE-FILHO, Júlio Cezar Marques *et al.* Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer 1. *Translational Oncology*, v. 2, n. 4, p. 236–241, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956384>>.

ROLDO, Claudia *et al.* MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 24, n. 29, p. 4677–84, 10 out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966691>>. Acesso em: 12 ago. 2011.

ROTHENBERG, M L *et al.* A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 7, n. 4, p. 347–53, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805925>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

ROUSH, SF. Micromanagement: a role for microRNAs in mRNA stability. *ACS Chemical Biology*, v. 1, n. 3, p. 132–4, abr. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb600138j>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

ROZENBLUM, E *et al.* Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research*, v. 57, n. 9, p. 1731–4, 1 maio 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135016>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

RUSTGI, Anil K. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes & development*, v. 28, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24395243>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

SAIF, Muhammad Wasif. Pancreatic neoplasm in 2011: an update. *JOP: Journal of the pancreas*, v. 12, n. 4, p. 316–21, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737886>>.

SAITO, Yoshimasa *et al.* MicroRNAs in Hepatobiliary and Pancreatic Cancers. *Frontiers in genetics*, v. 2, n. September, p. 66, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3268619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

SCHNEIDER, Ralph *et al.* German national case collection for familial pancreatic cancer (FaPaCa): ten years experience. *Familial cancer*, v. 10, n. 2, p. 323–30, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207249>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

SCHÜLLER, J *et al.* Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 45, n. 4, p. 291–7, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755317>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

SCHULTZ, Nicolai a *et al.* Prognostic microRNAs in cancer tissue from patients operated for pancreatic cancer--five microRNAs in a prognostic index. *World journal of surgery*, v. 36, n. 11, p. 2699–707, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851141>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

SEMPERE, Lorenzo F. *et al.* Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered microRNA expression in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, v. 16, p. 4246–4255, 2010.

SEUFFERLEIN, T *et al.* Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 23 Suppl 7, p. vii33–40, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997452>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

SICARD, Flavie *et al.* Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 21, n. 5, p. 986–94, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481326>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

SIEGEL, Rebecca; NAISHADHAM, Deepa; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 63, n. 1, p. 11–30, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335087>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

SILVERMAN, D T *et al.* Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*, v. 14, n. 1, p. 45–54, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500045>>.

SINGH, Puneet; SRINIVASAN, Radhika. Major Molecular Markers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Roles in Screening, Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Pancreas*, v. 40, n. 5, p. 644–52, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673535>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

SOCIETY, American Cancer. *Cancer facts & figures 2013*. . atlanta: [s.n.], 2013. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cancer+facts+&+figures+2010#0>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

STATHIS, Anastasios; MOORE, Malcolm J. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 7, n. 3, p. 163–72, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101258>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

STEELE, Colin W. *et al.* *Clinical Potential of MicroRNAs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Pancreas*. [S.l: s.n.], 2011

STEINBERG, W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American journal of gastroenterology*, v. 85, n. 4, p. 350–5, abr. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183589>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

SUN, Tao *et al.* Aberrant MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Researches and Clinical Implications. *Gastroenterology research and practice*, v. 2014, p. 386561, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4034662&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

SZAFRANSKA, A E *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, v. 26, n. 30, p. 4442–52, 28 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237814>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

SZAFRANSKA, Anna E *et al.* Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical chemistry*, v. 54, n. 10, p. 1716–24, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719196>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

TAKAYAMA, Reiko *et al.* Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology*, v. 45, n. 1, p. 52–9, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789838>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

TEMPERO, M A *et al.* Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Cancer research*, v. 47, n. 20, p. 5501–3, 15 out. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3308077>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

TONG, A W; NEMUNAITIS, J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer gene therapy*, v. 15, n. 6, p. 341–55, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369380>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

TRAMACERE, Irene *et al.* Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 126, n. 6, p. 1474–86, 15 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816941>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

TSANG, Wing Pui; KWOK, Tim Tak. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, v. 13, n. 10, p. 1215–22, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758960>>. Acesso em: 2 mar. 2012.



VAN RIJSWIJK, R E N *et al.* Weekly high-dose 5-fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic carcinoma: a phase II study of the EORTC GastroIntestinal Tract Cancer Cooperative Group. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, v. 40, n. 14, p. 2077–81, set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341982>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

VASUDEVAN, Shobha. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, nov. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wrna.121/full>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

VINCENT, Audrey *et al.* Pancreatic cancer. *Lancet*, v. 378, n. 9791, p. 607–20, 13 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620466>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

VOLINIA, Stefano *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 7, p. 2257–61, 14 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VON HOFF, Daniel D. *et al.* Results of a randomized phase III trial (MPACT) of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone for patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas with PET and CA19-9 correlates. *J Clin Oncol*, v. 31, n. Suppl, 2013.

VRIELING, Alina *et al.* Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 126, n. 10, p. 2394–403, 15 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19790196>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

WANG, Jin *et al.* MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 2, n. 9, p. 807–13, set. 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723895>>. Acesso em: 2 jan. 2014.

WANG, Jin *et al.* MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 2, n. 9, p. 807–13, set. 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723895>>. Acesso em: 1 mar. 2012.

WEBER, Frank *et al.* A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 91, n. 9, p. 3584–91, set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822819>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

WILENTZ, R E *et al.* Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *The American journal of pathology*, v. 156, n. 5, p. 1641–51, maio 2000. Disponível em:

em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1876921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

WILS, J *et al.* Phase II study of epirubicin in advanced adenocarcinoma of the pancreas. *European journal of cancer & clinical oncology*, v. 21, n. 2, p. 191–4, fev. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3857181>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

WONG, Thian-Sze *et al.* Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 14, n. 9, p. 2588–92, maio 2008.

WU, Jian *et al.* Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 52, p. 21188–93, 27 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

XU, Lijian *et al.* hsa-miR-141 downregulates TM4SF1 to inhibit pancreatic cancer cell invasion and migration. *International Journal of Oncology*, v. 44, p. 459–466, 2014.

YABUSHITA, Setsuko *et al.* Circulating microRNAs in serum of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreas*, v. 41, n. 7, p. 1013–8, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513294>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

YACHIDA, Shinichi *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, v. 467, n. 7319, p. 1114–7, 28 out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3148940&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

YU, Zhong *et al.* Gemcitabine Adjuvant Therapy for Resected Pancreatic Cancer: A Meta-analysis. *American journal of clinical oncology*, 7 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934134>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

ZHANG, Wenyong; DAHLBERG, J.E.; TAM, Wayne. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *The American journal of pathology*, v. 171, n. 3, p. 728, set. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1959494/>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

ZHANG, Yuqing. Profiling of 95 MicroRNAs in Pancreatic Cancer Cell Lines and Surgical Specimens by Real Time PCR Analysis. *World journal of surgery*, v. 33, n. 4, p. 698–709, 2010.

ZHANG, Yuqing *et al.* Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World journal of surgery*, v. 33, n. 4, p. 698–709, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933040&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

ZHAO, Jia *et al.* Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. *Journal of proteome research*, v. 6, n. 5, p. 1864–74, maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428079>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

ZHU, Weizhu *et al.* Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC research notes*, v. 2, p. 89, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 jun. 2011.

ZHU, Zheng *et al.* Genetic variation of miRNA sequence in pancreatic cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, v. 41, n. 5, p. 407–413, 2009. Disponível em: <<http://abbs.oxfordjournals.org/content/41/5/407.short>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

# ***APÊNDICE A***

---

## APÊNDICE A – TABELAS DAS CURVAS ROC

Tabela 1. Resultados da curva ROC – Ca19-9 – APt x PN.

Ca 19-9	Sensibilidade	Especificidade
0	1	0
2,50	0,94	0,43
3,07	0,94	0,57
8,65	0,94	0,71
10,50	0,89	0,71
10,90	0,89	0,86
16,20	0,89	1
27	0,83	1
39,60	0,78	1
40	0,72	1
49	0,67	1
83	0,61	1
376	0,56	1
1000	0	1

Tabela 2 - Resultados da curva ROC – miRNA-21– APt x PN

miRNA-21	Sensibilidade	Especificidade
0,15463	1	0
0,19670	1	0,14
0,26754	1	0,29
0,27048	1	0,43
0,79433	0,94	0,43
0,87985	0,89	0,43
0,92982	0,89	0,57
1,01317	0,83	0,57
1,01317	0,78	0,71
1,03649	0,78	0,86
1,09617	0,72	0,86
1,23399	0,67	0,86
1,39854	0,61	0,86
1,73445	0,56	0,86
2,06157	0,50	0,86
2,74000	0,44	0,86
3,45161	0,44	1
3,70708	0,39	1
5,09922	0,33	1
5,98206	0,28	1
6,27935	0,22	1
12,26396	0,17	1
21,06077	0,11	1
105,51758	0,06	1
2298,45211	0	1

Tabela 3 - Resultados da curva ROC – miRNA-210– Grupo APt x Grupo PN

miRNA-210	Sensibilidade	Especificidade
0	1	0
0,33311	0,94	0
0,37483	0,94	0,14
0,45081	0,94	0,29
0,99108	0,94	0,43
1,11275	0,94	0,57
1,14348	0,89	0,57
1,18959	0,89	0,71
1,25965	0,83	0,71
1,25965	0,78	0,86
1,91714	0,72	0,86
2,44704	0,72	1
2,82265	0,67	1
3,40457	0,61	1
4,23595	0,56	1
4,50968	0,50	1
6,35501	0,44	1
6,68838	0,39	1
7,13254	0,33	1
9,36509	0,28	1
16,86158	0,22	1
24,71586	0,17	1
28,62726	0,11	1
42,48875	0,06	1
171,62775	0	1

Tabela 4. Resultados da curva ROC – CA19-9+miRNA21 – Grupo APt x Grupo PN

CA19-9+miRNA-21	Sensibilidade	Especificidade
-2,09	1	0
-1,97	1	0,14
-1,74	1	0,29
-1,71	1	0,43
-1,67	0,94	0,43
-0,99	0,94	0,57
-0,75	0,94	0,71
-0,32	0,89	0,71
-0,30	0,89	0,86
2,80	0,89	1
3,32	0,83	1
3,51	0,78	1
4,54	0,72	1
7,26	0,67	1
40,02	0,61	1
109,07	0,56	1
109,20	0,50	1
109,27	0,44	1
109,32	0,39	1
109,67	0,33	1
109,91	0,28	1
110,12	0,22	1
111,16	0,17	1
127,38	0,11	1
509,00	0	1



Tabela 5. Resultados da curva ROC – CA19-9+miRNA210 – Grupo APt x Grupo PN

CA19-9+miRNA-210	Sensibilidade	Especificidade
-13,65	1	0
-12,99	1	0,14
-10,75	1	0,29
-9,57	1	0,43
-8,23	1	0,57
-5,71	1	0,71
0,06	1	0,86
0,49	0,94	0,86
1,81	0,94	1
22,44	0,89	1
33,65	0,83	1
58,03	0,78	1
118,59	0,72	1
128,41	0,67	1
217,71	0,61	1
273,06	0,56	1
279,37	0,50	1
279,74	0,44	1
6	0,39	1
291,13	0,33	1
295,54	0,28	1
306,79	0,22	1
362,57	0,17	1
425,03	0,11	1
1184,16	0	1

Tabela 6. Resultados da curva ROC – CA19-9+miRNA21+miRNA210 –Grupo APt x  
Grupo PN

CA19-9 miRNA-21 miRNA-210	Sensibilidade	Especificidade
-1942,97	1	0
-1866,31	1	0,14
-1588,00	1	0,29
-1363,95	1	0,43
-1187,58	1	0,57
-891,50	1	0,71
-13,23	1	0,86
13,22	1	1
14,22	0,94	1
27,23	0,89	1
2962,46	0,83	1
4565,27	0,78	1
7899,73	0,72	1
16298,23	0,67	1
17067,81	0,61	1
30986,64	0,56	1
34312,76	0,50	1
34443,12	0,44	1
34957,72	0,39	1
36076,12	0,33	1
36664,16	0,28	1
38341,73	0,22	1
46358,57	0,17	1
53891,42	0,11	1
164820,45	0	1

Tabela 7. Resultados da curva ROC – miRNA-181c – Grupo APp x Grupo PC

miRNA-181c	Sensibilidade	Especificidade
0,44518	1	0
0,47598	1	0,17
0,92683	1	0,33
1,07895	1	0,50
1,11163	1	0,67
1,64311	1	0,83
2,03077	1	1
2,26549	0,92	1
2,45807	0,85	1
2,79108	0,77	1
3,03233	0,69	1
4,04931	0,62	1
6,16703	0,54	1
6,60645	0,46	1
7,03000	0,38	1
15,03784	0,31	1
18,79237	0,23	1
19,86250	0,15	1
23,07766	0	1

Tabela 8. Resultados da curva ROC – miRNA-210 – Grupo APp x Grupo PC.

miRNA-210	Sensibilidade	Especificidade
0,49231	1	0
0,49743	0,92	0
0,69618	0,92	0,17
0,86548	0,92	0,33
0,96335	0,85	0,33
1,03805	0,85	0,50
1,17844	0,85	0,67
1,38350	0,77	0,67
1,59353	0,69	0,67
1,98932	0,69	0,83
2,03274	0,62	0,83
2,49809	0,62	1
3,62762	0,54	1
5,57154	0,46	1
5,59049	0,38	1
5,72083	0,31	1
6,24337	0,23	1
14,15976	0,15	1
15,81010	0	1

Tabela 9. Resultados da curva ROC – miRNA210+miRNA181c – Grupo APp x Grupo PC.

miRNA210 miRNA181c	Sensibilidade	Especificidade
-143,45	1	0
-120,59	1	0,17
-94,45	1	0,33
-89,92	1	0,50
-71,92	1	0,67
-19,19	1	0,83
19,43	1	1
21,14	0,92	1
24,23	0,85	1
52,13	0,77	1
75,29	0,69	1
107,70	0,62	1
111,07	0,54	1
335,45	0,46	1
441,94	0,38	1
1097,01	0,31	1
1277,59	0,23	1
1617,45	0,15	1
1808,29	0	1

Tabela 10 - Resultados da curva ROC – miRNA-21 – Grupo APt x Grupo PPT

miRNA-21	Sensibilidade	Especificidade
0,23614	1	0
0,27048	0,94	0,11
0,37381	0,94	0,22
0,62716	0,94	0,33
0,78774	0,94	0,44
0,79433	0,89	0,44
0,86400	0,89	0,56
0,92982	0,83	0,56
1,00564	0,83	0,67
1,01317	0,78	0,67
1,09617	0,72	0,67
1,23399	0,67	0,67
1,39854	0,61	0,67
1,44566	0,61	0,78
1,45784	0,61	0,89
1,73445	0,56	0,89
2,06157	0,50	0,89
2,74000	0,44	0,89
3,02567	0,44	1
3,70708	0,39	1
5,09922	0,33	1
5,98206	0,28	1
6,27935	0,22	1
12,26396	0,17	1
21,06077	0,11	1
105,51758	0,06	1
2298,45211	0	1



**APÊNDICE B – Dados individuais: clínicos e dos miRNAs nos grupos  
APt, APp, PPT, PN e PC**

Tabela 1 – Dados Clínicos dos pacientes

ID TESE	NOME	IDADE	SEXO	PERDA _PESO	CIRURGIA	EC	CA 19-9
<b>1</b>	ACS	61	<b>1</b>	0	1	4	>1000
<b>2</b>	ACR	82	1	0	1	3	>1000
<b>3</b>	ACR	70	<b>0</b>	0	1	2	88,8
<b>4</b>	ARC	72	<b>0</b>	1	2	4	>1000
<b>5</b>	AJC	72	0	1	2	4	>1000
<b>6</b>	AMS	50	<b>0</b>	0	2	3	15,5
<b>7</b>	EA	66	<b>0</b>	1	1	<b>2</b>	>1000
<b>8</b>	GD	74	0	1	1	1	3,1
<b>9</b>	HCO	56	<b>1</b>	0	1	<b>3</b>	>1000
<b>10</b>	IDSC	77	<b>1</b>	0	1	2	<b>39,6</b>
<b>11</b>	JBA	64	<b>1</b>	1	2	3	40
<b>12</b>	JAS	76	1	0	2	4	83
<b>13</b>	JB	<b>69</b>	<b>0</b>	1	2	4	>1000
<b>15</b>	JHM	<b>58</b>	<b>0</b>	1	2	4	27
<b>16</b>	JVS	<b>55</b>	<b>0</b>	0	2	4	10,5
<b>17</b>	LAN	55	<b>0</b>	1	1	1	307
<b>18</b>	LCBS	<b>39</b>	<b>0</b>	1	2	2	49
<b>19</b>	MAAP	<b>63</b>	<b>1</b>	1	2	4	376
<b>20</b>	MAMM	<b>62</b>	<b>1</b>	0	1	<b>2</b>	<b>10,3</b>
<b>21</b>	MB	67	0	1	1	1	2,5
<b>22</b>	OBB	<b>78</b>	<b>1</b>	1	2	4	>1000
<b>23</b>	OGS	<b>85</b>	<b>0</b>	1	2	2	>1000
<b>24</b>	RAB	<b>72</b>	<b>1</b>	1	1	4	>1000
<b>26</b>	RAPD	41	1	1	1	3	>1000
<b>27</b>	SPC	62	0	1	2	4	>1000
<b>28</b>	VHM	72	1	0	1	2	>1000

**LEGENDA:**

<b>SEXO:</b>	<b>PERD_PESO</b>	<b>Cirurgia</b>
Masc -0	<=5KG - 0	Ressecável - 1
Fem -1	5KG> - 1	Não - 2



Tabela 2 –Valores dos miRNAs nos grupos APt, PPT, e PN

		<b>miR-100</b>	<b>miR-107</b>	<b>miR-181c</b>	<b>miR-21</b>	<b>miR-210</b>	<b>miR-23a</b>
<b>13</b>	APt	0,054273783	4,762117805	0,330503227	12,26395636	171,6277461	2,07E-04
<b>18</b>	APt	0,004082001	0,434126293	0,058097877	1,096172136	4,509679049	7,40E-06
<b>24</b>	APt	0,540708923	18,48663383	2,156231241	105,5175801	28,62725981	7,61E-04
<b>7</b>	APt	0,084907307	79,20677582	0,226806114	1,398539608	6,355011979	4,04E-05
<b>19</b>	APt	0,006824535	3,224140371	0,061389364	2,061567868	6,688375155	0,001458704
<b>23</b>	APt	0,293808343	93,62919535	0,171019728	6,279347208	1,189587656	3,12E-04
<b>27</b>	APt	0,003086663	1,510003079	0,045385052	3,707077095	16,86158292	1,11E-05
<b>1</b>	APt	0,088401169	3,616083461	0,244438277	5,099221703	4,235950825	1,93E-05
<b>16</b>	APt	0,138077815	2,647840657	0,048740803	1,233991229	24,7158576	0,014197447
<b>10</b>	APt	0,050264533	1,723426349	0,342591898	5,982061472	7,132544239	7,01E-05
<b>15</b>	APt	0,028252666	6,496182846	0,23910882	21,06076949	42,4887474	5,70E-05
<b>22</b>	APt	1,976540992	0	3021,579732	2298,452108	0	9,23E-04
<b>5</b>	APt	0,006174211	4,403823395	0,055215349	0,270482919	1,917136093	5,11E-06
<b>4</b>	APt	0,53899952	0	176,5153801	1,734451236	3,404571118	0,113211973
<b>11</b>	APt	0,061296965	85,46017735	0,554854247	2,74	1,112751097	0,007093073
<b>2</b>	APt	0,009894346	1,062501707	0,133680796	1,013172475	1,259651693	1,20E-05
<b>21</b>	APt	0,00206777	0,557407114	0,035237605	0,794327746	2,822650516	22,37183413
<b>12</b>	APt	0,018525096	1,499065106	0,181593384	0,929821282	9,365093821	9,38E-05
<b>28</b>	PPT	0,257249335	0,563908285	0,188402261	0,236141548	0,772132388	3,57E-05
<b>9</b>	PPT	0,950105798	2,146540999	0,547345312	1,005637353	0,425046096	9,75E-05
<b>7</b>	PPT	0,367736426	3,860430785	0,50702341	3,025673901	6,573691591	1,05E-04
<b>8</b>	PPT	0,095581785	0,203160167	0,05246853	1,445663146	999,99	0,001022909
<b>2</b>	PPT	0,049417678	0,260933094	0,13273117	0,627163433	3,747930217	3,19E-04
<b>21</b>	PPT	0,041352194	0,811354315	30,98437546	0,864000281	3,296687982	1,97E-06
<b>26</b>	PPT	0,625611968	0,896239763	0,152029575	0,787743022	0,579701734	0
<b>20</b>	PPT	0,778625987	1,92619505	0,240210041	1,457835344	0,467572812	6,24E-05
<b>3</b>	PPT	0,00636224	0,725958958	0,048892704	0,373812351	0,427437522	1,64E-05
C1	PN	0,009894346	1,062501707	0,133680796	1,013172475	1,259651693	1,20E-05
C2	PN	0,479091704	1,660521527	0,480604087	3,451611101	2,447036042	5,17E-05
C3	PN	1,56956932	0,973292165	0,373482503	0,879852618	1,143480438	1,01E-07
C4	PN	4,220373446	0,840524855	0,342692185	0,196702755	0,374826154	6,999829263
C5	PN	0,426759024	1,584468687	0,405052638	0,154630209	0,991081516	0
C6	PN	0,270606506	0,509893783	0,248511155	1,036486652	0,450814624	7,08E-05
C7	PN	0,023705654	0,368797275	5,015976635	0,26754419	0,333109533	3,60E-05

Tabela 3 – Valores dos miRNAs no plasma dos grupos APP, PC

ID TESE	miR-23 2-ddCT	miR-21 2-ddCT	miR-210 2-ddCT	miR-100 2-ddCT	miR-107 2-ddCT	miR-181c 2-ddCT
<b>24</b>	13,1674128	14,0237473	5,571535557	7,115548644	3,542701715	15,03783529
<b>6</b>	0,049406683	0,020923239	0,49230524	0,031787977	0,775527583	2,030767392
<b>1</b>	0,157295576	2,149870858	5,720832086	1,791136143	1,011152081	6,60644889
<b>10</b>	0,180603781	0,177415013	1,383502259	0,181976618	0,55990346	2,265492948
<b>15</b>	0,589188019	0,241040922	1,989319496	0,495609243	1,015823673	7,030001514
<b>13</b>	9,939684092	2,905627979	6,243370145	8,31159294	1,282981173	23,07765933
<b>22</b>	0,093551202	0,203506954	2,498089213	0,066227536	0,761781945	2,458068295
<b>5</b>	204,9957231	43,88329651	15,81010452	519,642277	20,17015129	6,167026305
<b>23</b>	0,216194241	5,341333628	0,865481568	6,247049667	1,526047639	19,86249567
<b>9</b>	0,105381973	0,342660072	1,1784373	0,366192716	1,350084775	2,791082947
<b>17</b>	15,99944549	3,525065342	5,590491011	10,91488481	2,095871113	4,049306928
<b>21</b>	6,923972525	3,710336411	3,627624177	3,654882434	0,785291398	3,032326287
<b>8</b>	56,58116591	4,242309861	14,15976091	7,91546991	8,513781117	18,79236845
Controle 1	6,03665771	3,146613538	1,038049327	4,070130353	0,693371287	0,926828941
Controle 2	0,597040208	0,838539122	0,963345358	0,665460528	0,348867232	1,11162871
Controle 3	1,674929068	0,140890867	1,593528697	0,364079395	1,326753174	0,445184417
Controle 4	8,822270527	1,192550202	2,032739017	1,588951401	3,910627171	1,078947749
Controle 5	0,491052779	1,35406782	0,69617649	1,426742521	1,354678027	1,643105369
Controle 6	0,100012345	0,335015558	0,497433302	0,700897314	0,753719697	0,475980706
	0,518658439	2,861152332	3,625096244	3,435621363	1,23335535	6,149265105