

BÁRBARA ALEMAR BESERRA

**MICRORNAS EM ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO:
Novos Biomarcadores de Diagnóstico e Prognóstico**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**MICRORNAS EM ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO:
Novos Biomarcadores de Diagnóstico e Prognóstico**

BARBARA ALEMAR BESERRA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Ashton Prolla
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, março de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico através do edital Genoprot (nº 559814/2009-7). Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos em projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob os registros de nº 11-0510 e nº 10-0162.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e a todos os
pacientes com doenças
pancreáticas.

AGRADECIMENTOS

À Professora Patricia Ashton Prolla, por vários motivos: por ter me recebido tão bem em seu grupo, por aceitar minha proposta de uma nova linha de pesquisa no laboratório e, finalmente, por me acompanhar e apoiar em todas as difíceis etapas deste processo. Sua gentileza e carinho com seus alunos fazem toda diferença.

À Professora Úrsula Matte, por suas observações e sugestões sempre tão pertinentes e espirituosas, e por estar sempre disposta a ajudar. Obrigada pela paciência e pelos conselhos.

À minha família. Meu esposo, Fernando Temes, por seu amor, carinho e paciência em todas as horas; por ser meu melhor amigo e me acompanhar em cada passo. Por me apoiar sempre, até demonstrando interesse por coisas tão “estranhas” quanto os microRNAs. E a minha ‘filha’ Maya, que sempre participa dos meus momentos de estudo, seja comendo um artigo, lambendo o computador ou simplesmente dormindo comportadamente ao meu lado.

À minha mãe, por ter plantado em mim o sonho, a perseverança e a esperança. Por me apoiar incondicionalmente nesta caminhada.

Ao meu pai, meu maior exemplo de trabalho, força e superação. Meu sonho se tornou o seu, e aprendemos muitas coisas juntos. Afinal, o modo pouco importa - o que importa é que se saiba amar. E nosso amor vai além de tudo.

Aos meus anjos: Vóvis, Dinda e Tio Chico. Sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigada por entenderem, apoiarem e aceitarem essa ‘loucura de cientista’ ao longo de toda esta jornada. Vocês são exemplos de vida, de respeito, trabalho e carinho.

Aos meus irmãos, Luca Alemar e Pedro Elias. Melhor que vocês dois, impossível. Sou muito grata por ter vocês na minha vida.

À minha nova e não menos querida família, Temes. Cada um de vocês, Papa Aristeu, Mama Yara, Bruna, Sérgio e Jivago, tem um papel muito especial na minha vida. Obrigada por terem paciência e aceitarem minha ausência em vários momentos. Fico feliz em poder compartilhar os frutos destes momentos com vocês agora. Por vocês, sou uma 'cariúcha' de coração.

Aos meus grandes velhos amigos: Isabelle Mazza, Daniel Torres, Thais Borges e Claudia Granja. Obrigada por fazer o Rio de Janeiro ficar mais perto! À Juliane Menezes, por me ensinar tanto desde o início. E à Mariana Souza e Valquíria Lobão, minhas amigas-irmãs pra vida toda.

Aos meus grandes novos amigos: Gabriel Macedo, Mariana Kiehl, Juliana Giacomazzi, Patrícia Izetti e Diego Paskulin. Vocês transformam o LMG em um lugar cheio de animação, curiosidade científica e motivação. Obrigada por todos os cafés, conselhos e risadas (que não foram poucas..).

À todos os participantes do grupo Genoprot, pela perseverança nessa caminhada. Um agradecimento muito especial ao Dr. Alessandro Osvaldt, pelo incansável trabalho com os pacientes. E à Cleandra Gregório, pela sua inestimável ajuda.

À todos os integrantes do Laboratório de Medicina Genômica.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia, em especial à Tuany di Domenico, por nos cederem gentilmente sua estrutura.

Ao Laboratório de Pesquisa Cardiovascular, em especial à Nidiane Martinelli, por muitas vezes ser minha fonte de reagentes, informações e dicas. Obrigada por compartilhar a experiência de vocês!

Aos queridos funcionários da UAMP, Patrícia Koehler e Jeferson Beck, pela paciência com tantos 'abre-e-fecha' de ultrafreezers, e por toda ajuda.

Aos órgãos que fomentaram este estudo: CNPq e FIPE-HCPA, pelos recursos destinados ao projeto; e à Capes, pela bolsa de mestrado.

"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."

Issac Newton

SUMÁRIO

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO	1
I.1 Epidemiologia do adenocarcinoma ductal pancreático	2
I.2 Aspectos clínicos do adenocarcinoma ductal pancreático	2
I.3 Fatores de risco para adenocarcinoma ductal pancreático	6
I.4 Biologia do adenocarcinoma ductal pancreático	8
I.5 Biomarcadores em câncer de pâncreas	12
I.6 microRNAs	13
I.7 A biogênese dos microRNAs	14
I.8 microRNAs em câncer	16
I.9 microRNAs e adenocarcinoma ductal pancreático	19
I.10 microRNAs circulantes	24
CAPÍTULO II JUSTIFICATIVA	28
CAPÍTULO III OBJETIVOS	31
III.1 Objetivo Geral	32
III.2 Objetivos Específicos	32
CAPÍTULO IV MANUSCRITO 1	33
miR-21 and miR-34a are overexpressed in serum of patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	33
CAPÍTULO V MANUSCRITO 2	61
microRNA expression in saliva of patients with	61
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	61
CAPÍTULO VI DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO VII CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO VIII PERSPECTIVAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRV1 - **A**croosomal vesicle protein **1**
ADP – **A**denocarcinoma **D**uctal **P**ancreático (**PDAC** – **P**ancreatic **D**uctal **A**denocarcinoma)
AKT - v-**akt** murine thymoma viral oncogene
AUC - **A**rea under (ROC) curve
BCL2 - **B**-cell CLL/lymphoma **2**
BRCA2 - **B**reast **c**ancer type **2** susceptibility protein
CDKN2 - **C**yclin-**d**eendent **k**inase inhibitor **2A**
CEA – Antígeno Carcinoembriônico (**C**arcinoembryonic **a**ntigen)
CI – Intervalo de confiança (**C**onfidence **I**nterval)
DNA – Ácido Desoxirribonucleico (**D**eoxyribonucleic **A**cid)
DPM1 - **D**olichyl-**p**hosphate **m**annosyltransferase polypeptide **1**
EGF – Fator de crescimento epidermal (**E**pidermal **g**rowth **f**actor)
EGFR – Receptor do Fator de crescimento epidermal (**E**pidermal **g**rowth **f**actor receptor)
eIF4 - **E**ukaryotic initiation factor **4**
EMT – Transição epitélio-mesenquimal (**E**pithelial-**m**esenchymal **t**ransition)
GDP – Guanosina Difosfato (**G**uanosine **d**iphosphate)
GTP – Guanosina Trifosfato (**G**uanosine-5'-**t**riphosphate)
HNPCC - Câncer colorretal hereditário não polipose (**H**ereditary **N**on **P**olyposis **C**olorectal **C**ancer)
ISH - **I**n **s**itu hybridization
KRAS - v-Ki-ras2 **K**irsten **r**at **s**arcoma viral oncogene homolog
LLC – Leucemia Linfocítica Crônica (**CLL** - **C**hronic **L**ymphocytic **L**eukemia)
MBD3L2 - **M**ethyl-CpG **b**inding **d**omain protein **3**-like **2**
MMP-7 - **M**atrix **m**etalloproteinase-**7**
mRNA – RNA mensageiro (**m**essenger **R**NA)
NIPan – **N**eoplasias **I**ntraepiteliais **P**ancreáticas (**PanIN** – **P**ancreatic **I**ntraepithelial **N**eoplasia)
NIPM – **N**eoplasias **I**ntraductais **P**apilíferas **M**ucinosas (**IPMN** - **I**ntraductal **p**apillary **m**ucinous **n**eoplasm)
OR – **O**dds **R**atio
PCR – Reação em Cadeira de Polimerase (**P**olimerase **C**hain **R**eaction)
qRT-PCR – PCR quantitativo por transcrição reversa (**q**uantitative **R**everse **T**ranscription **P**CR)
RB – **R**etinoblastoma
RNA – Ácido Ribonucleico (**R**ibonucleic **a**cid)
ROC - **R**eceiver **o**perating **c**haracteristic
SMAD4 - **S**MAD family member **4**
TGF – Fator de Transformação do Crescimento (**T**ransforming **g**rowth **f**actor)
UTR - **U**ntranslated region
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial (**V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor)
ZEB1/2 - **Z**inc finger **E**-box binding homeobox **1/2**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação TNM de tumores malignos	4
Tabela 2. Fatores de risco para câncer de pâncreas.....	7
Tabela 3. microRNAs frequentemente desregulados em ADP.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do câncer pancreático.....	8
Figura 2. Alterações nas vias de sinalização celular no processo de carcinogênese do adenocarcinoma ductal pancreático.....	11
Figura 3. Biogênese dos microRNAs.....	15
Figura 4. miRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor. .	18

RESUMO

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma doença rara, mas possui uma taxa de incidência muito próxima à taxa de letalidade. Parte da alta mortalidade do ADP se deve ao diagnóstico difícil (muitas vezes somente possível com análise de tecido pancreático) e tardio da doença, que geralmente acontece com o tumor já em estágio avançado. Assim, a descoberta de biomarcadores não-invasivos surge como uma possibilidade de diagnóstico mais seguro e, de preferência, precoce. Recentemente descobriu-se que os microRNAs (miRNAs - pequenos RNAs não-codificantes, envolvidos na iniciação e na manutenção de tumores, incluindo o ADP) são estáveis em amostras circulantes, e a diferença em seus níveis de expressão pode discriminar com acurácia a presença ou ausência de determinadas doenças. Neste estudo, nós avaliamos a expressão de seis miRNAs (miR-21, -34a, -155, -196a, -200b e -376a) escolhidos de acordo com dados prévios da literatura, em amostras de soro e saliva de pacientes com e sem ADP, e também em tecido tumoral e não-tumoral de pacientes com ADP. Esta avaliação comparativa teve como objetivo verificar a presença de biomarcadores de diagnóstico, e possivelmente de prognóstico, neste perfil. Os níveis de expressão foram mensurados através de quantificação relativa, por PCR quantitativo em tempo real. Embora os níveis de expressão tenham se mostrado elevados em todas as amostras de tecido tumoral em relação ao tecido não-tumoral, esta diferença não foi significativa. Isso pode ser explicado pelo pequeno tamanho amostral, pela heterogeneidade tumoral e tecidual e pela ampla variabilidade de expressão dos miRNAs. Em amostras de soro, miR-21 e miR-34a foram significativamente mais expressos em pacientes com ADP e ambos foram capazes de discriminar pacientes com e sem doença com sensibilidade e especificidades clinicamente aceitáveis. Nosso estudo mostrou ainda que existe uma correlação forte e positiva entre os níveis de expressão destes dois miRNAs em amostras de soro e tecido, embora o mecanismo responsável por esta correlação seja desconhecido. A ausência de correlação de miR-21 e de miR-34a, quando analisados individualmente em amostras de soro e tecido pareadas, sugere que diferentes mecanismos regulam a expressão destes miRNAs em diferentes tecidos. Nas amostras de saliva, de modo geral, os níveis de miRNA foram muito baixos, e mesmo os miRNA detectáveis não apresentaram valores de expressão significativamente diferentes entre casos e controles. Tais achados sugerem que os miRNAs escolhidos neste estudo não são biomarcadores salivares adequados para diagnóstico, embora seja necessário uma confirmação destes dados em uma série maior de casos.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a rare disease, whose incidence rates are very close to mortality rates. Part of the high mortality of PDAC is due to its difficult (often only possible with pancreatic tissue analysis) and late diagnosis, when disease is at an advanced stage. Thus, the discovery of noninvasive diagnostic biomarkers emerges as a possibility to perform a safe diagnosis, preferably early in the disease course. Recently, microRNAs (miRNAs - small non-coding RNAs involved in tumors initiation and maintenance, including PDAC) were discovered as stable molecules in circulating samples. Several studies have shown that the difference in their expression levels between cases and controls can accurately discriminate the presence or absence of certain diseases. In this study, we evaluated the expression levels of six miRNAs (miR-21, -34a, -155, -196a, -200b and -376a), chosen according to previous literature data, in serum and saliva samples from patients with and without PDAC, and also in non-tumoral and tumoral tissue. The aim of our study was to investigate the presence of diagnostic and/or prognostic biomarkers. Expression levels were measured by relative quantification using real-time quantitative PCR. Although expression levels were increased in tumor tissues, this difference did not reach significance. This can be explained by the small sample size and the heterogeneity of tumor and tissue, beyond the already described wide variability in miRNAs expression levels. In serum, miR-21 and miR-34a were significantly more expressed in samples from patients with ADP and both were able to distinguish patients with and without disease with clinically acceptable sensitivity and specificity. Our study also showed that there is a strong positive correlation between the expression levels of these two miRNAs in serum and tissue. However, the mechanism related to this correlation remains unknown. The absence of correlation between each miR-21 and miR-34a individually, when matched serum and tissue samples were compared, indicates that different mechanisms regulate the expression of these miRNAs in different body compartments. In saliva samples, generally, miRNA levels were very low, and no difference in miRNA expression levels was seen between cases and controls. These findings suggest that the chosen miRNAs are not adequate as diagnostic biomarkers in saliva, although these findings require confirmation in a larger series of cases.

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

I.1 Epidemiologia do adenocarcinoma ductal pancreático

No Brasil, as doenças neoplásicas são a segunda causa de mortalidade (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2004). Entre as neoplasias, o câncer de pâncreas é um tipo incomum, respondendo por apenas 2% de todos os novos casos e por 4% de todas as mortes relacionadas ao câncer (INCa, 2012). O tumor pancreático mais comum e também o de pior prognóstico é o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), que corresponde a 90% dos casos de câncer de pâncreas e possui uma taxa de incidência muito próxima à taxa de letalidade, tornando-o a 4ª causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos (Siegel *et al.*, 2012) e a 9ª no Brasil (INCa, 2003). Nos Estados Unidos, a taxa de incidência de câncer pancreático é de aproximadamente 9/100.000 habitantes (Warshaw *et al.*, 1992), e a estimativa para o ano de 2013 é que 45.220 pessoas desenvolvam a doença, das quais 38.460 devem evoluir a óbito (American Cancer Society, 2013). No Brasil não há um registro preciso da incidência do câncer de pâncreas em todas as regiões, entretanto a estimativa da taxa de mortalidade pela doença é de 2,7 a cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2003). Já no Rio Grande do Sul, no ano de 2010, a taxa de mortalidade chegou a 7,66 a cada 100.000 habitantes, sendo considerada a maior no país (DataSus, 2010).

I.2 Aspectos clínicos do adenocarcinoma ductal pancreático

Diversos motivos tornam o ADP tão letal. O primeiro deles é a provável disseminação precoce de células derivadas do tumor na corrente sanguínea, por vezes ainda antes de se observar uma microinvasão tecidual, demonstrada em estudos animais realizados por Rhim e colaboradores (2012). Segundo, a doença geralmente é muito agressiva, caracterizada por uma progressão muito rápida e efeitos sistêmicos importantes, como perda de peso e astenia significativas, muitas vezes tornando o paciente inapto à cirurgia ou mesmo ao tratamento não-cirúrgico (Li *et al.*, 2004). E terceiro, o adenocarcinoma ductal pancreático é resistente à maioria das formas de tratamento desenvolvidas até hoje. Várias hipóteses podem explicar essa observação, entre elas a baixa

vascularização tumoral, que dificulta o acesso de drogas quimioterápicas ao tumor (Olive *et al.*, 2009). Outras razões que agravam o quadro clínico dos pacientes são metástases frequentes, dificuldades de ressecção cirúrgica do tumor e alta incidência de recidivas. Essas características, aliadas à biologia tumoral agressiva, fazem com que a sobrevida livre de doença em 5 anos seja muito baixa: apenas 6% dos casos (Siegel *et al.*, 2012). A sobrevida média pós-diagnóstico é de 4 a 6 meses. Nos casos ressecáveis, a sobrevida livre de doença em 5 anos é de 20%, e o tempo médio de sobrevida é de 13 a 20 meses após a cirurgia (Neuzillet *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os pacientes frequentemente apresentam sintomas inespecíficos no início da doença ou são mesmo assintomáticos até estágios avançados da doença, fazendo com que o diagnóstico seja muito tardio, quando poucas opções terapêuticas estão disponíveis. Segundo estimativas da National Cancer Data Base (2010) dos Estados Unidos, aproximadamente 56% dos casos de câncer de pâncreas são diagnosticados quando a doença está nos estágios III e IV (veja tabela 1 para definições de estágio TNM), ou seja, quando o tumor já envolve estruturas adjacentes ou a doença é metastática, respectivamente. Em ambos os casos, não há possibilidade de ressecção cirúrgica, e a doença é considerada incurável. A apresentação de sintomas depende da localização do tumor, bem como do estágio da doença. Para tumores localizados na cabeça do pâncreas, que são os mais frequentes, e para os de corpo do pâncreas, os sintomas geralmente são consequências da compressão de estruturas adjacentes: ducto biliar, nervos celíaco e mesentérico, ducto pancreático e duodeno. Pacientes com tumores localizados na cauda do pâncreas apresentam sintomas menos específicos, como dor abdominal, e mais frequentemente apresentam queixas que são relacionadas à doença metastática no momento do diagnóstico (Li *et al.*, 2004; Hidalgo, 2010).

Tabela 1. Classificação TNM de tumores malignos¹

Estádio T (Tumor primário)	
Tx	Tumor primário não pode ser acessado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado ao pâncreas e ≤ 2cm
T2	Tumor limitado ao pâncreas e > 2cm
T3	Tumor se estende além do pâncreas sem envolvimento do plexo celíaco ou artéria mesentérica superior
T4	Tumor se estende além do pâncreas e envolve o plexo celíaco ou artéria mesentérica superior

Estágio N (Linfonodos regionais)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser acessados
N0	Ausência de metástase nos linfonodos regionais
N1	Presença de metástase nos linfonodos regionais

Estágio M (Metástase à distância)	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Grupamento por Estádios				
Estádio 0	Tis	N0	M0	Localizado
Estádio IA	T1	N0	M0	Localizado
Estádio IB	T2	N0	M0	Localizado
Estádio IIA	T3	N0	M0	Localmente invasivo
Estádio IIB	T1 - 3	N1	M0	Localmente invasivo
Estádio III	T4	Qualquer N	M0	Irressecável
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	Irressecável

¹ União Internacional Contra o Câncer (UICC) - 6ª edição (2004)

A dificuldade de diagnóstico é resultado não só da inespecificidade dos sintomas, mas também das limitações metodológicas relacionadas. Embora atualmente existam técnicas para a identificação do ADP, a maior parte dos exames de imagem disponíveis – ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética - é ineficaz para a detecção do ADP em fase precoce, uma vez que não são confiáveis para a identificação de tumores menores do que 1 a 2 cm. A ecoendoscopia é o método de imagem mais preciso na identificação de pequenas massas pancreáticas, identificando até 96% dos

casos de ADP, mesmo quando as lesões possuem apenas 1 cm. (Osvaldt *et al.*, 2008). Mas infelizmente, este é um exame de alto custo, não disponível em todos os serviços de saúde, nem mesmo para indivíduos de alto risco, de forma que, mesmo quando existentes, as ferramentas diagnósticas não estão acessíveis. Além disso, em alguns casos de doença avançada, os exames de imagem podem apresentar resultados insatisfatórios ou inconclusivos, sendo então necessários procedimentos altamente invasivos como uma laparotomia exploratória para possibilitar a determinação do estadiamento e as decisões terapêuticas futuras (Hidalgo, 2010; Mayo *et al.*, 2009).

Com todas essas dificuldades, um método de rastreamento ideal para diagnóstico precoce do câncer de pâncreas seria um biomarcador sanguíneo com alta acurácia, que identificasse a doença em estágios iniciais de forma minimamente invasiva e que tivesse baixo custo. Atualmente, o único biomarcador com utilidade clínica é o antígeno de superfície CA19-9, útil no monitoramento da doença e na detecção precoce de recaída em pacientes já diagnosticados com ADP. O CA19-9, no entanto, possui limitações importantes, como a não-especificidade para câncer de pâncreas e sua ausência em pacientes que são negativos para o antígeno de Lewis *a* ou *b* (e que correspondem a 10% dos pacientes com ADP), os quais não sintetizam CA19-9 mesmo em estágios avançados da doença. Assim, embora útil no monitoramento da doença, este biomarcador é ineficaz na identificação de pacientes com ADP (Harsha *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, importantes avanços na compreensão da biologia molecular da doença, bem como em diagnóstico, estadiamento e tratamento de pacientes com tumores primários do pâncreas tem sido apresentados. No entanto, progressos mínimos foram feitos em prevenção e diagnóstico precoce, bem como no tratamento de pacientes com doença avançada. Um estudo feito por Steinberg (1990) mostrou que se o câncer de pâncreas for detectado quando o tumor tiver menos do que 2 cm e ainda estiver em estágio I, a taxa de sobrevivência em 5 anos sobe para 37%. Assim, o desenvolvimento de estratégias eficazes de rastreamento do tumor permitiria a detecção do câncer pancreático em estágios precoces e tratáveis, resultando em uma melhora global do prognóstico.

I.3 Fatores de risco para adenocarcinoma ductal pancreático

A natureza letal do câncer de pâncreas e o fato de que a maior parte dos pacientes se apresenta com doença em estágio avançado tem direcionado os esforços científicos da área para o rastreamento de indivíduos com maior predisposição ao desenvolvimento da doença, como aqueles já diagnosticados com neoplasias intraepiteliais pancreáticas (NIPan) ou neoplasias intraductais papilíferas mucinosas (NIPM), possibilitando a identificação e tratamento da doença em uma fase precursora e curável (Vincent *et al.*, 2004).

Alguns fatores de risco para ocorrência do ADP estão claramente estabelecidos. O primeiro deles é a idade. Sabe-se que este tipo tumoral raramente ocorre antes dos 45 anos, sendo que aproximadamente 80% dos casos são diagnosticados entre 60 e 80 anos de idade. Outro fator de risco importante é o sexo: a ocorrência da doença é maior em homens, em uma proporção de 2 homens cada mulher afetada. Esta diferença, no entanto, desaparece com a idade. Aparentemente, gênero e idade não influenciam a sobrevida global. Há apenas dois estudos que mostram uma diferença significativa, com pior prognóstico para pacientes acima dos 70 anos (Neuzillet *et al.*, 2011).

Sabe-se também que muitos fatores ambientais influenciam no desenvolvimento da doença. O risco mais consistentemente reportado é tabagismo. Tabagistas tem uma chance de 2 a 3 maior de desenvolver ADP, quando comparados com não-fumantes. Há estudos limitados sobre o consumo de álcool, de café e aspirina. Alguns estudos tem mostrado um aumento da incidência de câncer de pâncreas entre pacientes com histórico de diabetes ou pancreatite crônica; também há evidências, ainda menos conclusivas, de que a cirrose, o sobre-peso e dietas ricas em colesterol estejam associadas com um aumento na incidência da doença (Batty *et al.*, 2009; Landi *et al.* 2009; Lowenfels *et al.*, 2006).

Outro fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de pâncreas é a história familiar. Várias síndromes genéticas estão associadas com um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pâncreas, incluindo pancreatite hereditária, câncer colorretal hereditário não-polipomatoso (HNPCC, do inglês *Hereditary Non Polyposis Colorectal Câncer* ou Síndrome

de Lynch), síndrome de Peutz-Jeghers entre outras (Tabela 2) (Li *et al.*, 2004). As bases genéticas destas associações permanecem desconhecidas, embora já se saiba, por exemplo, que em pacientes de um subgrupo de alto risco, existam mutações em genes de reparo do DNA, como *BRCA2*.

Tabela 2. Fatores de risco para câncer de pâncreas (adaptado de Li *et al.*, 2004).

Fatores demográficos

Idade

Gênero

Origem étnica

Fatores genéticos e condições clínicas

História familiar de câncer de pâncreas

Pancreatite hereditária

Câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC)

Ataxia-telangiectasia

Síndrome de Peutz-Jeghers

Câncer de mama hereditário

Pancreatite crônica

Diabetes mellitus

Deficiência no metabolismo de carcinógenos e em vias de reparo de DNA

Estilo de vida e fatores ambientais

Tabagismo

Exposições ocupacionais

Dieta pobre em frutas e vegetais

Métodos de preparo de alimentos

I.4 Biologia do adenocarcinoma ductal pancreático

Nos últimos anos, o nosso conhecimento da patogênese do câncer pancreático tem avançado significativamente, devido ao melhor entendimento da biologia molecular da doença. Como muitas outras neoplasias malignas, o adenocarcinoma ductal pancreático é o resultado do sucessivo acúmulo de alterações genéticas, especialmente em três grandes famílias de genes: oncogenes, genes supressores de tumor, e genes de reparo (manutenção) ao DNA. Acredita-se que o acúmulo de alterações nestes genes ocorra em uma ordem relativamente previsível. Assim, com base nos perfis genéticos e histológicos, foi desenvolvido um modelo de progressão que envolve as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (NIPan), e a transformação do ducto pancreático normal, passando por displasias de baixo grau (NIPan 1A e 1B) até displasia de alto grau (NIPan 2 e 3) e finalmente adenocarcinoma ductal pancreático (Hubran *et al.*, 2000) (Figura 1).

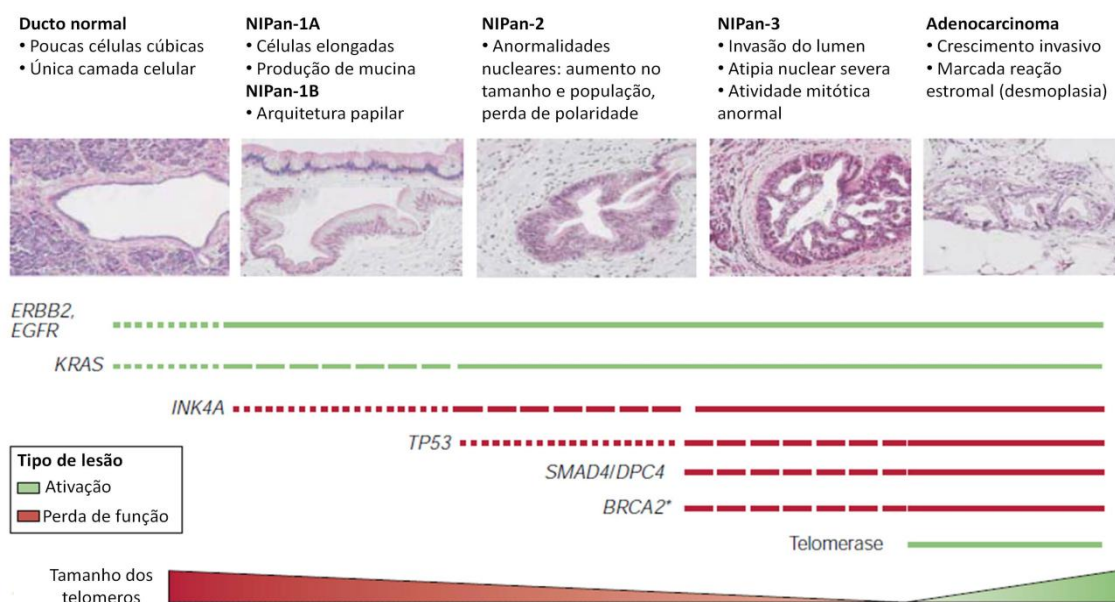


Figura 1. Modelo de progressão do câncer pancreático (adaptado de Bardeesy e DePinho, 2002).

As lesões precursoras, NIPan-1A e -1B, são caracterizadas pelo crescimento das células ductais com uma abundante produção de mucina e, no caso da NIPan-1B, a arquitetura papilar substitui a arquitetura plana. Além da

presença de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, essas lesões são caracterizadas pela ativação da via de sinalização autócrina do fator de crescimento epidermal, ou EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*), com a superexpressão de ligantes como o fator de transformação do crescimento, TGF- α (do inglês, *Transforming Growth Factor*) e de receptores como o receptor de EGF, EGFR. Com a progressão das lesões, as células adquirem alterações nucleares moderadas (NIPan-2) ou mesmo severas, com mitoses anormais e invasão do lúmen (NIPan-3) (Schneider *et al.*, 2005).

Mutações ativadoras de *KRAS* são as primeiras alterações genéticas detectadas durante a progressão das NIPans, e sua frequência aumenta com a progressão da doença, sendo encontrada em quase 100% dos adenocarcinomas ductais pancreáticos. As diferentes isoformas codificadas por este gene estão envolvidas em diversas vias ativadas por receptores de membrana. Através da ligação GTP/GDP, são capazes de ativar vias canônicas de sinalização celular, como proliferação e sobrevivência. Assim, nas células onde *KRAS* está mutado, as cascatas de sinalização permanecem constitutivamente ativadas, independente da presença do ligante, conferindo assim um fenótipo maligno a estas células. No ADP, os tumores com mutações em *KRAS* costumam ser mais agressivos e exibir resposta parcial ou muito pobre às terapias padrão. Dessa forma, este perfil tumorigênico específico tem se configurado como um dos principais alvos de estudo para desenvolvimento de novas terapias (Bardeesy e DePinho, 2002; Schneider *et al.*, 2005).

Da mesma forma, de 80 a 95% dos tumores apresentam perda de função do gene supressor de tumor *CDKN2A*, causada por mutação, deleção ou hipermetilação de seu promotor. Como este gene é responsável pela transcrição de dois supressores de tumor distintos, INK4 e ARF, sua perda de função resulta no distúrbio de duas importantes vias de sinalização: retinoblastoma (RB) e p53 (Rozenblum *et al.*, 1997). Essa alteração surge, mais frequentemente, no final do processo de carcinogênese associado ao ADP (Bardeesy e DePinho, 2002).

O gene supressor de tumor *TP53*, conhecido como “guardião do genoma”, encontra-se mutado em 50-75% dos tumores do tipo ADP (Rozenblum *et al.*, 1997). As células mutantes são irresponsáveis aos *checkpoints* de controle de dano ao DNA, e evadem os mecanismos de

apoptose, contribuindo para a instabilidade genômica. Isso explica as frequentes aneuploidias e os complexos rearranjos cromossômicos observados nestes tumores, bem como a grande heterogeneidade intratumoral. A ocorrência de mutação em *TP53* é considerada um evento tardio na carcinogênese do ADP (Harada *et al.*, 2002).

Estudos citogenéticos de tumores pancreáticos demonstraram que a dinâmica dos telômeros também contribui para a instabilidade genômica vista no ADP. Embora a reativação da telomerase seja crucial para a imortalização das células tumorais, é possível que em um período transiente anterior à imortalização, o encurtamento e disfunção dos telômeros contribua para a carcinogênese facilitando a formação de rearranjos cromossômicos (Maser e DePinho, 2002).

Mutações herdadas no gene *BRCA2* são tipicamente associadas à Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, mas também representam um risco significativo de desenvolvimento de câncer de pâncreas. A proteína *brca2* é necessária para a manutenção da estabilidade genômica através da regulação dos processos de recombinação homóloga e reparo ao DNA. Conseqüentemente, a perda de função deste gene resulta no acúmulo de alterações cromossômicas letais. Essas mutações são um evento tardio na carcinogênese do ADP (Goggins *et al.*, 2000).

Outra alteração encontrada com frequência neste tipo tumoral é a perda de função de *SMAD4/DPC4*, que codifica um importante componente da via de sinalização TGF- β . Esta molécula inibe o crescimento da maioria das células epiteliais normais, tanto pelo bloqueio da transição G1 \rightarrow S, quanto através da promoção da apoptose. As respostas celulares ao TGF- β são, em parte, *SMAD4* dependentes, e por esta razão os adenocarcinomas pancreáticos mostram certa resistência ao TGF- β . Sabe-se que *SMAD4* encontra-se em uma região que está deletada em aproximadamente 30% dos casos de ADP, e sua ausência pode predizer menor sobrevida (Luttges *et al.*, 2001; Bardeesy e DePinho, 2002).

Estudos recentes mostraram que as bases moleculares e genéticas do câncer de pâncreas são de extrema complexidade. As alterações mais comumente encontradas nos tumores podem ser organizadas de acordo com sua relação com diferentes vias de sinalização, embora nem todos os tumores

tenham alterações em todas as vias (Figura 2). Estas modificações têm sido associadas com a agressividade do tumor e prognóstico, e especula-se que algumas delas possam ser úteis para o rastreamento da doença. Alguns estudos sugerem que os níveis de expressão de Akt fosforilada (uma proteína envolvida na via de Ras), por exemplo, estão associados com melhor ou pior prognóstico em pacientes com ADP ressecável. Outros marcadores também tem sido reportados como preditores independentes de prognóstico em ADP, como a expressão de p16, MMP-7 e VEGF. Ainda assim, muitos aspectos biológicos que controlam o adenocarcinoma de pâncreas são desconhecidos, e ainda não há um marcador único capaz de prever o prognóstico, ou mesmo capaz de indicar a presença do tumor precocemente (Jones *et al.*, 2008).

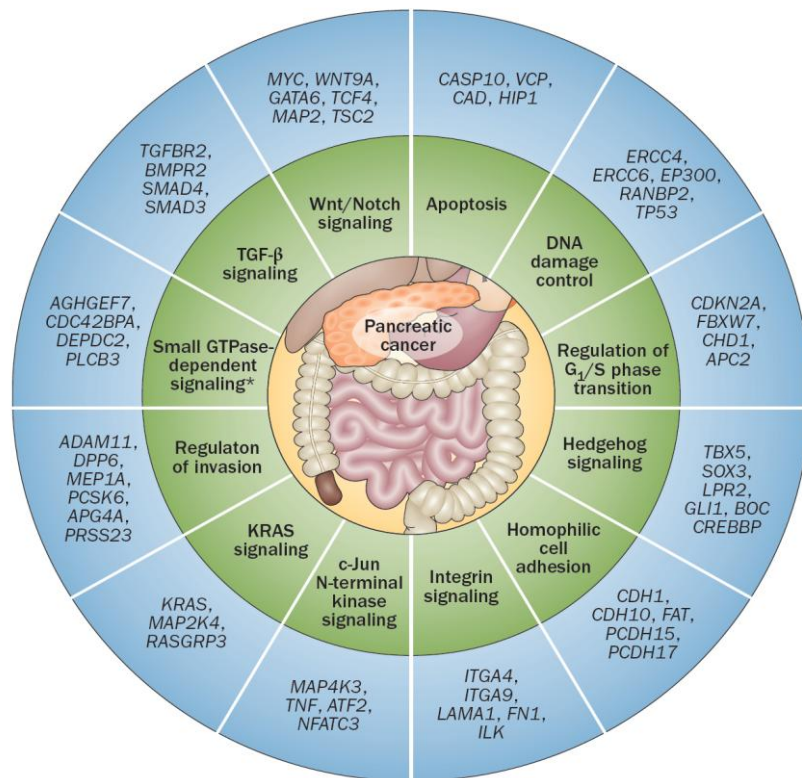


Figura 2. Alterações nas vias de sinalização celular no processo de carcinogênese do adenocarcinoma ductal pancreático (Samuel e Hudson, 2012)

I.5 Biomarcadores em câncer de pâncreas

Em face da pouca sensibilidade dos exames de imagem e da grande gama de possíveis complicações decorrentes dos exames em tecido pancreático disponíveis atualmente, muitos esforços tem sido feitos no sentido de identificar biomarcadores para a detecção precoce e o rastreamento efetivo do câncer de pâncreas através de métodos precisos e minimamente invasivos. Atualmente, os biomarcadores tumorais utilizados clinicamente na detecção e monitoramento do ADP são marcadores plasmáticos: o antígeno carcinoembriogênico (CEA) e o antígeno carboidrato relacionado ao grupo sanguíneo Lewis (CA19-9).

O CA19-9 foi descoberto em 1981, em estudos de rastreamento de câncer colorretal, mas se mostrou mais eficiente em câncer de pâncreas. Apesar do amplo uso deste marcador, sua sensibilidade (70 – 90%) e especificidade (68 – 91%) (Goonnetilleke e Siriwardena, 2007) não satisfazem as necessidades clínicas atuais. As principais limitações no uso do CA19-9 incluem sua frequente elevação (acima do valor basal de 37kU/l) em condições não-malignas como pancreatite e icterícia obstrutiva, além da sua pobre correlação com a doença em estágios mais precoces. Além disso, este marcador pode ter níveis elevados em pacientes com cirrose e colangite, bem como em pacientes com outras neoplasias do trato gastrointestinal e hepatobiliar, como câncer gástrico, colorretal, do esôfago e ducto biliar. Por fim, como já mencionado, aproximadamente 10% da população geral não produz o antígeno, e tais pessoas não seriam rastreadas pelo método (Herrerros-Villanueva, 2013).

O CEA é uma glicoproteína que foi descoberta em 1965, como um marcador para câncer de colon mas, assim como o CA19-9, mostrou-se melhor marcador para câncer de pâncreas. Este marcador possui sensibilidade e especificidade de 54% e 79%, respectivamente. Seu uso é limitado pelo fato de se mostrar elevado em diversos tipos tumorais, como tumores da mama, estômago e colorretais. Por outro lado, o CEA é o marcador com maior acurácia para identificação de lesões mucinosas císticas do pâncreas (Goonnetilleke e Siriwardena, 2007). Dentre as lesões mucinosas, as NIPM são consideradas uma via de carcinogênese independente para adenocarcinoma

pancreático, sendo uma lesão detectada de forma frequente em exames de imagem em pacientes assintomáticos, mas com potencial maligno incerto (LaFemina *et al.*, 2013).

I.6 microRNAs

Em 1993, o grupo de pesquisa coordenado por Victor Ambros descobriu, em *Caenorhabditis elegans*, a existência de um gene que codifica um pequeno RNA não-codificante, e junto com estudos realizados pelo grupo de Gary Ruvkun demonstrou-se que esse pequeno RNA era capaz de regular a tradução de proteínas através da ligação na posição 3'UTR e inibição de RNAs mensageiros (Lee *et al.*, 1993, Wightman *et al.*, 1993). Nos anos seguintes, com a descoberta de outros genes que também codificavam pequenos RNAs em diversas espécies, cunhou-se o termo micro-RNAs (também chamados de miRNAs ou miRs), que engloba todos os pequenos RNAs com características semelhantes (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lee e Ambros, 2001).

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes de fita simples, de 18 a 25 nucleotídeos de tamanho, resultantes de uma sequência de clivagens enzimáticas a partir de uma molécula precursora. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes codificadores de miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, e os transcritos possuem *cap* e cauda poli(A). Embora alguns miRNA de origem animal sejam produzidos individualmente, a partir de unidades de transcrição separadas, muitos miRNAs são produzidos a partir de unidades de transcrição que geram mais de um produto: uma única unidade de transcrição pode conter agrupamentos de diferentes miRNAs, ou até mesmo pode codificar um miRNA e uma proteína. Neste último caso, a organização da sequência codificadora é feita de tal modo que a sequência do miRNA fique contida em um íntron (Bartel, 2004).

A organização genômica dos miRNAs é bastante diversa e representa 1 a 4% do genoma humano, estimando-se que existam mais de 880 genes codificadores de microRNAs em mamíferos. Uma vez que comumente um microRNA se liga ao seu alvo através de complementaridade imperfeita de bases, a identificação de mRNAs-alvo tem sido cada vez mais complexa. Muitos estudos indicam que a porção 5' (sequência *seed*) do miRNA é crucial

para a estabilidade e o carregamento correto da molécula no complexo miRISC, e isso também possui uma importância funcional. Por este motivo, as ferramentas de bioinformática para predição de alvos levam em consideração essencialmente esta sequência, que corresponde aos nucleotídeos 2 a 8. Estudos resultantes dessas análises mostram que um único microRNA pode regular negativamente até 200 mRNAs, com funções completamente distintas. Como consequência de seus múltiplos alvos, os microRNAs desempenham um importante papel nos mais diversos eventos celulares, como proliferação celular, diferenciação e apoptose (Ruan *et al.*, 2009; Esquela-Kercher e Slack, 2006).

Por fim, estima-se que os miRNAs regulem aproximadamente 30% de todos os transcritos gênicos. Acredita-se que a maior parte dos microRNAs (70%) está localizada em introns e éxons, e os 30% restantes estejam localizados em regiões intergênicas (Rachagani *et al.*, 2010). Atualmente, a principal base de dados de miRNA contabiliza 2042 diferentes miRNAs em humanos (miRBase versão 19.0).

I.7 A biogênese dos microRNAs

Após a transcrição do miRNA pela RNA polimerase, o próximo passo na biogênese é a clivagem do precursor. O transcrito primário, ou pri-miRNA, é formado por algumas centenas a milhares de nucleotídeos, organizados em uma região central *stem*, em que dois segmentos de RNA com bases complementares (pelo pareamento Watson-Crick) são pareados. Esta sequência é flanqueada de um lado por outras bases não pareadas, e de outro lado pela região *loop*, onde os pares de base não são complementares, de forma a constituírem alças circulares. Esse pri-miRNA é clivado no núcleo pelo complexo enzimático formado pela RNase III Drosha e proteínas associadas do Microprocessador, que cliva ambas as fitas, liberando a região não pareada, e mantendo apenas as regiões *stem* e *loop*, gerando assim um pre-miRNA. Este pre-miRNA, de aproximadamente 70 nucleotídeos, será ativamente transportado para o citoplasma via Exportina-5. Uma vez no citoplasma, é realizada a clivagem do pre-miRNA pelo complexo enzimático RNase III Dicer/Argonata, que remove a alça terminal (estrutura *loop*), resultando na

formação de um duplex de miRNA de aproximadamente 22-23 pb de tamanho (microRNA:microRNA* duplex). Esse duplex de miRNA é separado em duas fitas simples por uma helicase, e uma destas fitas será preservada, constituindo assim o miRNA maduro, enquanto a fita complementar sofrerá degradação. Algumas evidências sugerem que a escolha entre as fitas está relacionada à termoestabilidade das extremidades de cada uma das fitas (Bartel, 2004).

O miRNA maduro, que pode possuir de 18 a 25 nucleotídeos, é então incorporado a um complexo de silenciamento induzido por RNA (miRISC), que o guiará até a região 3'UTR do RNAm alvo, desencadeando assim os possíveis processos de regulação deste RNAm. A biogênese dos microRNAs está representada esquematicamente na figura 3.

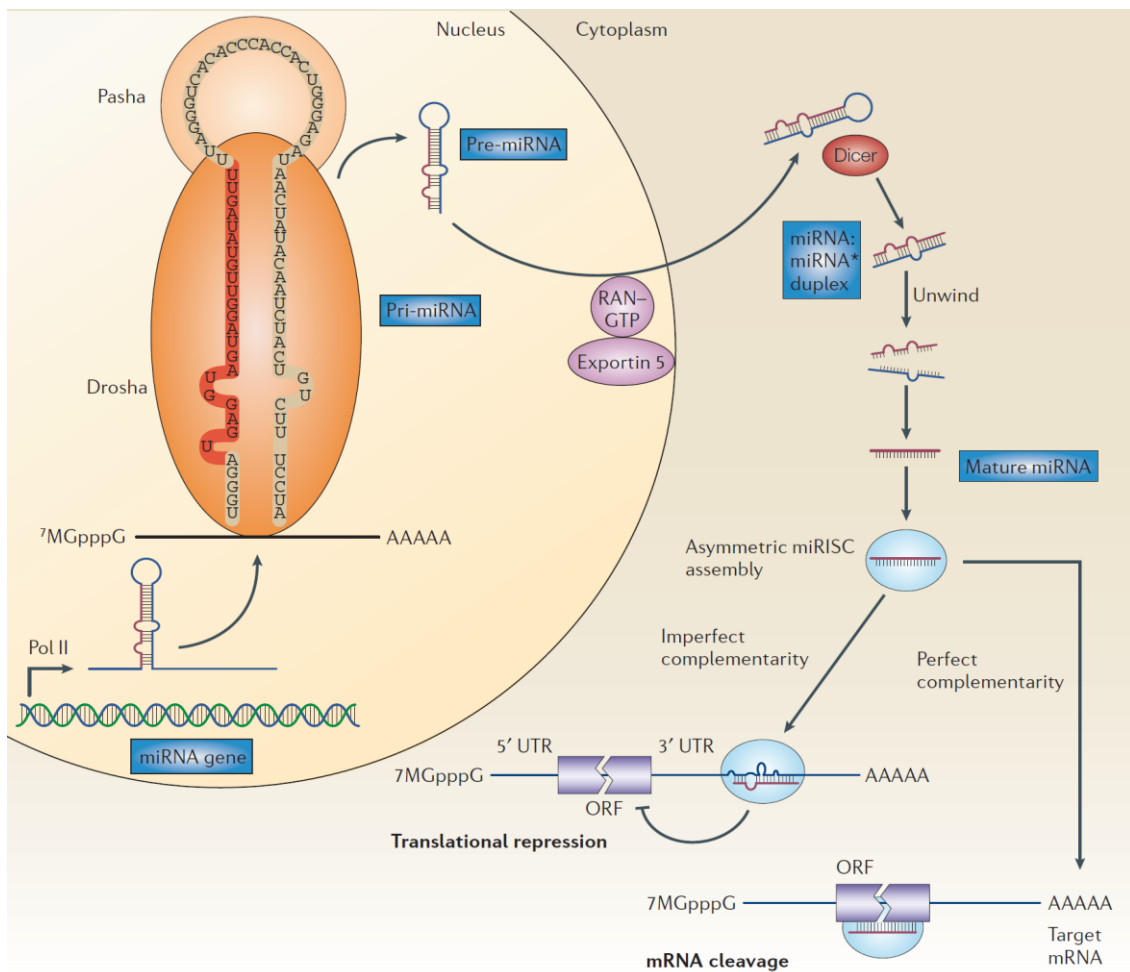


Figura 3. Biogênese dos microRNAs (Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

O complexo miRNA e RISC (miRISC) regula a expressão gênica por meio de dois mecanismos pós-transcricionais: a degradação do mRNA e repressão da tradução do RNAm. O que determina um ou outro mecanismo é a complementaridade entre as bases do miRNA e do RNAm. Se a complementaridade entre o RNAm e o miRNA for parcial, haverá a repressão do processo de tradução. Se a complementariedade for total, haverá a degradação do mRNA, o que é mais comumente encontrado em plantas (Bartel, 2004; Esquela-Kercher e Slack, 2006).

Os mecanismos de ação do complexo RISC ainda não foram completamente elucidados, mas evidências sugerem que a repressão pode ocorrer durante o início da tradução ou mesmo após este evento. A competição entre miRISC e eIF4 pela ligação à extremidade 5' do mRNA, a deadenilação da cauda poli-A e o bloqueio da associação entre as unidades ribossomais 60S e 40S promovidos pelo complexo miRISC são bons exemplos de mecanismos de repressão inicial. Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem: dissociação prematura dos ribossomos, diminuição da taxa ou parada no alongamento protéico e degradação do polipeptídeo nascente (Carthew e Sontheimer, 2009; Nilsen, 2007).

1.8 microRNAs em câncer

Os genes de miRNAs estão frequentemente localizados em regiões genômicas associadas ao câncer e em pontos de quebra cromossômica, bem como em regiões de frequente perda de heterozigosidade, sugerindo um envolvimento dos miRNAs na iniciação e na progressão de diversos tumores humanos (Rachagani *et al.*, 2010).

A associação entre miRNAs e câncer foi proposta pela primeira vez em 2002, em um estudo envolvendo leucemia linfocítica crônica (LLC) e a deleção cromossômica 13q14. A LLC é o subtipo leucêmico mais comum em adultos, e é atribuída à deleção 13q14 em mais de 50% dos casos. Além disso, vários outros tipos de câncer, incluindo linfomas, mieloma múltiplo e câncer de próstata, tem sido associados a esta deleção. Apesar de todos os esforços nesse sentido, nenhum gene conhecido que pudesse estar fortemente associado à ocorrência de LLC foi encontrado na região deletada. No entanto,

foi visto que dois miRNAs, miR-15 e miR-16, localizados nesta região, encontravam-se sub-expressos em 68% os casos de LLC (Calin *et al.*, 2002). Outro estudo demonstrou que miR-15 e miR-16 regulam negativamente a expressão da proteína antiapoptótica Bcl2. Logo, a ausência destes miRNAs em LLC é um dos fatores responsáveis pela aquisição do fenótipo maligno (Cimino *et al.*, 2005).

Em um elegante trabalho de 2005, Lu e colaboradores demonstraram, através de experimentos de *microarray*, que os perfis de expressão de miRNAs refletiam a classificação das malignidades humanas, como o grau de diferenciação tumoral e o tipo de neoplasia. Desde então, vários outros estudos tem demonstrado que alguns miRNAs estão associados à diferentes etapas do processo de carcinogênese tumoral, atuando como oncogenes, enquanto outros atuam como supressores de tumor, regulando negativamente oncogenes. A figura 4 mostra como um miRNA pode funcionar como um oncogene ou como um supressor de tumor. Em tecidos normais (figura 4a), o funcionamento adequado da transcrição, processamento e ligação do miRNA às sequencias complementares resultam em taxas balanceadas de crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular. Quando um miRNA atua como um supressor de tumor e existe um desbalanço na sua biogênese (seja na sua transcrição ou nos passos subsequentes) levando a uma redução ou eliminação do miRNA, a formação de tumores acontece como consequência da não-repressão da produção de oncoproteínas (figura 4b). Uma vez em abundância, essas proteínas são responsáveis pela aquisição do fenótipo maligno das células, com aumento da proliferação, capacidade de invasão, evasão da apoptose e aumento da angiogênese. Os miRNAs que atuam como supressores de tumor podem ter sua expressão diminuída como consequência de deleções, silenciamento epigenético ou até mesmo perda de expressão de fatores transcripcionais. Também por falhas em algum ponto da biogênese, os microRNAs que atuam como oncogenes tem sua expressão aumentada em tecidos tumorais. Isso resulta na redução ou mesmo na eliminação da expressão de genes supressores de tumor, levando à progressão tumoral (figura 4c). O aumento nas taxas de expressão de miRNAs pode acontecer em razão da amplificação de seu gene, de um promotor constitutivamente ativo ou

mesmo por causa do aumento da estabilidade da molécula (Esquela-Kercher e Slack, 2006).

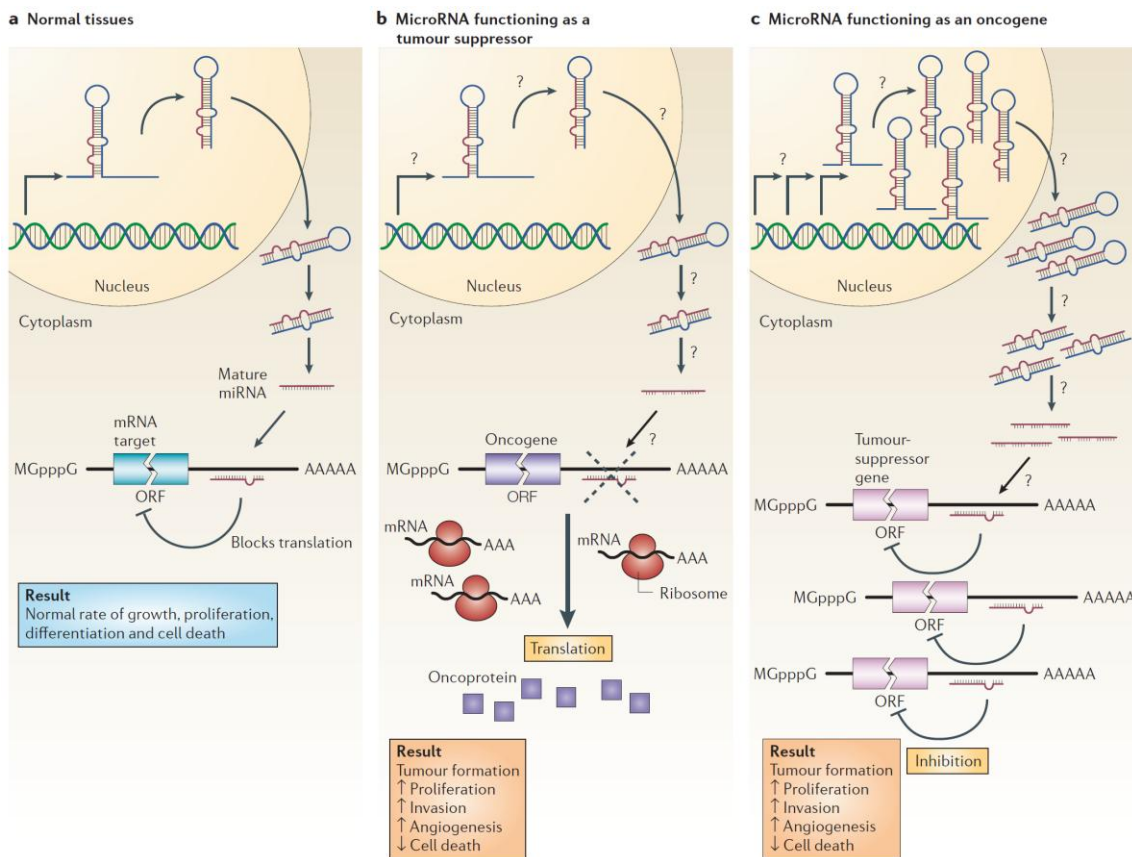


Figura 4. microRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor (Esquela-Kercher e Slack, 2006).

Em um estudo de 2009, Ruan e colaboradores consideram os miRNAs como os “novos reguladores dos *hallmarks* do câncer”, uma vez que estão envolvidos na regulação de genes com papel crucial em todas as etapas da tumorigênese, como apoptose, proliferação celular, angiogênese, resposta imune, invasão e metástases, instabilidade genômica e metabolismo. Acredita-se que, restaurando a expressão de miRNAs super- ou sub-expressos nas células tumorais, seja possível promover a diferenciação celular e recuperar o fenótipo benigno nestas células. No entanto, a compreensão dos mecanismos exatos de interação de miRNAs com oncogenes e genes supressores de tumor ainda é deficiente. Análises de expressão de miRNAs demonstram que os perfis de expressão estão correlacionados com todos os aspectos do desenvolvimento tumoral, desde sua classificação, diagnóstico e progressão, até a estimativa de prognóstico e resposta ao tratamento (Ruan *et al.*, 2009).

I.9 microRNAs e adenocarcinoma ductal pancreático

No câncer de pâncreas, como já mencionado anteriormente, um importante desafio é a busca de biomarcadores que possibilitem o diagnóstico da doença, especialmente em sua fase mais precoce, e que possam indicar os estágios da doença e/ou o prognóstico do paciente.

Estudos recentes revelam que o perfil de expressão de miRNAs é muito mais informativo no que diz respeito a patologia molecular do que os perfis de expressão de RNAm. Nos últimos anos, diversas abordagens tem sido utilizadas para quantificar os miRNAs, incluindo *cDNAarrays*, hibridização *in situ* (ISH) e PCR quantitativo em tempo real. A identificação de alterações de perfis de expressão de miRNA em câncer de pâncreas poderá contribuir para um melhor entendimento da sua biologia tumoral, qualificar o diagnóstico do ADP (categorizando claramente a presença ou ausência e ainda o estágio da doença), além de contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos para definir prognóstico e intervenções terapêuticas. Assim, é possível que o monitoramento do perfil de expressão dos miRNAs seja uma ferramenta que, além de diagnosticar, permita o acompanhamento da progressão da doença (Sempere e Kauppinen, 2009).

O primeiro estudo detalhado envolvendo câncer de pâncreas e miRNAs foi publicado em 2006, por Lee e colaboradores, utilizando o método qRT-PCR *array*. A análise do perfil de expressão de 201 precursores de miRNA (correspondendo a 222 miRNAs maduros) mostrou que um grupo de 100 microRNAs eram diferencialmente expressos, quando comparados tecidos tumorais e normais. Entre os mais expressos, destacaram-se os microRNAs -155, -21, -221, -424, -301 e -100, sendo que três miRNAs eram específicos das células tumorais, miR-221, -376a e -301, não estando presentes no estroma, ácinos ou ductos.

Em 2007, Bloomston e colaboradores, utilizando a técnica padrão-ouro (qRT-PCR), demonstraram que era possível distinguir corretamente tecidos saudáveis daqueles com adenocarcinoma ductal pancreático e pancreatite crônica utilizando um painel de expressão de miRNAs. Vinte e um miRNAs com expressão elevada e 4 miRNAs com expressão reduzida em tumores foram

capazes de discernir corretamente tecidos tumorais e saudáveis em 90% dos casos. Um segundo painel, com 15 miRNAs superexpressos e 8 subexpressos, foi capaz de discernir tecidos tumorais daqueles com pancreatite crônica com 93% de acurácia. Um subgrupo de 6 miRNAs foi capaz de distinguir pacientes com maior e menor sobrevida, em um grupo de pacientes com metástase regional (linfonodo positivos). Finalmente, ficou demonstrado que a alta expressão de miR-196a prediz uma menor sobrevida (26,5 meses em casos com baixa expressão, contra 14,3 meses em casos com superexpressão). Esse estudo demonstrou ser possível a utilização de miRNAs como ferramenta diagnóstica e prognóstica, mas destacou que esses achados deveriam ser validados em outras populações. (Bloomston, 2007).

Zhang e colaboradores (2009) analisaram um painel de 95 miRNAs, escolhidos com base em suas potenciais funções relacionadas à biologia do câncer, desenvolvimento celular e apoptose. As análises foram feitas em amostras de tecido tumoral de pacientes com ADP, linhagens celulares de ADP, e em amostras de tecido de pacientes com pancreatite crônica e pacientes saudáveis. O estudo buscava encontrar um padrão único de expressão para ADP e alvos moleculares relevantes para futuras investigações e para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e busca de novas estratégias terapêuticas. Os resultados mostraram que existe uma grande diversidade entre os perfis de expressão de cada tumor/amostra, reiterando o conceito de medicina personalizada. No entanto, além de revelar novos miRNAs ainda não reportados em ADP, o estudo destacou um painel de 8 miRNA, cuja expressão diferia muito dos demais e de uma forma consistente entre diferentes amostras, sendo eles: miR-196a, -190, -186, -221, -222, -200b, -15b e -95. A tabela 3 apresenta alguns miRNAs com expressão desregulada no câncer de pâncreas, revelados por diversos estudos com tecido tumoral e/ou linhagens celulares.

Tabela 3. microRNAs frequentemente desregulados em Adenocarcinoma Ductal Pancreático (adaptado de Papaconstantinou *et al.*, 2012).

microRNA	Efeito da alteração na expressão
Super-expressos	
miR-21	Agressividade Metástases hepáticas Resistência a gencitabina
miR-221	Resistência a gencitabina
let-7	Tumorigênese
miR-155	Tumorigênese
miR-10/10b	Resistência a terapia neoadjuvante
miR-146	Tumorigênese
miR-223	Tumorigênese
miR-200a/b/c	Tumorigênese Aumento na proliferação e invasão
miR-203	Pior prognóstico
miR-17-5p	Aumento na proliferação e invasão
miR-27a	Crescimento tumoral
miR-132	Tumorigênese
miR-212	Tumorigênese
miR-196	Pior prognóstico
Sub-expressos	
miR-217	Crescimento tumoral e invasão
miR-96	Crescimento tumoral e invasão
miR-34/34a	Tumorigênese
miR-143	Tumorigênese
miR-145	Tumorigênese
miR-216	Tumorigênese
miR-107	Agressividade tumoral
miR-29a/b	Aumento na proliferação
miR-103	Aumento na proliferação
miR-320	Aumento na proliferação
miR-20a	Capacidade metastática
miR-148a	Tumorigênese
miR-142-5p	Resistência a gencitabina
miR-204	Resistência a gencitabina

O miRNA mais extensivamente estudado em câncer de pâncreas é o miR-21, que também tem sido associado a muitas outras neoplasias. Considerando que o câncer de pâncreas é notoriamente resistente à quimio e radioterapia, e que o tratamento adjuvante não é muito efetivo e está associado a uma importante toxicidade, encontrar um marcador preditivo de sensibilidade às terapias é de extrema utilidade. Neste contexto, Moriyama e colaboradores (2009) analisaram as taxas de proliferação, invasão e quimiorresistência de células pancreáticas transfectadas com o precursor ou com o inibidor de miR-21. As células transfectadas com o precursor de miR-21 apresentaram significativo aumento da taxa de proliferação, invasão e resistência à gencitabina, quando comparadas com as células controle não transfectadas. Em contraste, as células que receberam inibidores de miR-21 tiveram a proliferação, invasão e quimiorresistência à gencitabina diminuídos, demonstrando o envolvimento deste miRNA com aspectos importantes da tumorigênese e resposta terapêutica.

Nesta mesma linha, Hwang e colaboradores (2010) realizaram um estudo para avaliar potenciais preditores de resposta ao tratamento quimioterápico adjuvante. Os resultados mostraram que pacientes com ADP cujos tumores tem baixos níveis de expressão de miR-21 (reportado como altamente expresso em células de tumores do pâncreas) apresentam melhores respostas ao tratamento adjuvante. Dillhoff e cols. (2008), demonstraram que apesar de não haver correlação da expressão de miR-21 com tamanho tumoral, diferenciação, presença ou ausência de linfonodos positivos ou estágio T, havia uma forte associação entre níveis de expressão e prognóstico: pacientes linfonodo-negativos com altos níveis de expressão de miR-21 tiveram pior prognóstico (menor sobrevida; 15,2 meses), quando comparados aqueles com baixos níveis de expressão (sobrevida de 27,7 meses).

O miR-34a, que está frequentemente subexpresso em linhagens celulares de ADP, é um importante componente da via de p53, funcionando como um supressor de tumor (Chang *et al.*, 2007; Tarasov *et al.* 2007; Hermeking, 2010). Sabe-se que existem diversos mecanismos responsáveis pela redução nos níveis de expressão de miR-34a, como a supressão de p53 (Chang *et al.*, 2007), a deleção da região genômica responsável por sua transcrição (1p36) (Calhoun *et al.*, 2006) e a metilação aberrante do seu promotor (Lodygin *et al.*,

2008). Em um modelo celular de ADP (linhagens MiaPaCa2 e BxPc3) deficiente em p53, a transfecção de miR-34a foi capaz de restaurar a função supressora de tumor de p53 e inibir a expressão de Bcl-2, diminuindo assim as taxas de crescimento celular e invasão, induzindo apoptose e parada no ciclo celular (Ji, 2009). Estudos posteriores mostraram que pacientes cuja expressão tecidual de miR-34a é alta, apresentam melhor prognóstico após ressecção cirúrgica, com maior sobrevida do que os pacientes com baixos níveis de miR-34a (Jamieson *et al.*, 2012).

A superexpressão do miR-155 é um evento frequente em uma grande variedade de tumores além do câncer de pâncreas, como linfomas, tumores de mama, pulmão, cólon e tireóide (Eis *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006). Este miRNA é conhecido por ter um importante papel pró-tumorigênico e um estudo de Kent e colaboradores (2009) demonstrou níveis elevados deste miRNA em 11 de 21 linhagens de ADP. O miR-155 regula negativamente o gene induzido por estresse TP53INP1, cuja expressão em baixos níveis está correlacionada com a progressão tumoral (Kent *et al.*, 2009). Em 2010, Ryu e colaboradores demonstraram que a alteração na expressão do miR-155 é um evento precoce na patogênese do ADP, uma vez que o aumento da expressão se inicia ainda na NIPan-2 (Ryu *et al.*, 2010), lesão sabidamente precursora do ADP, como já mencionado. Neste mesmo ano, Greither e colaboradores mostraram que a alta expressão de miR-155 está correlacionada a menor sobrevida em pacientes com ADP.

O miR-196a também parece ter um papel importante no ADP. Em 2007, Szafranska e colaboradores mostraram que o miR-196a estava praticamente ausente em células de tecido pancreático normal e de pancreatite crônica, mas havia um aumento de até 14 vezes em sua expressão em ADP e linhagens tumorais pancreáticas. Estudos adicionais do mesmo grupo revelaram que a expressão deste miRNA aumentava a medida em que a doença progredia, desde as NIPans até o ADP (Szafranska *et al.*, 2008). Além disso, uma correlação foi vista entre os níveis de expressão tecidual de miR-196a e sobrevida (Bloomston, 2007), como mencionado anteriormente.

Outro miRNA diferencialmente expresso no ADP é o miR-200b. Em um estudo de 2009 que avaliou a expressão de 95 miRNAs no ADP, miR-200b foi um dos que apresentou níveis mais elevados de expressão em ADP, estando

superexpresso em aproximadamente 70% dos casos, e em até 43 vezes no tecido tumoral em relação ao tecido não-tumoral (Zhang *et al.*, 2009). A família miR-200 tem como alvo dois fatores de transcrição, ZEB1 e ZEB2, que são reguladores negativos de E-caderina, cujos baixos níveis são fundamentais para a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial to mesenchymal transition*), um evento que garante mobilidade às células e é essencial para a formação de metástases em tumores epiteliais.

Por fim, a associação de miR-376a com câncer foi descrita primeiramente em 2006, em um estudo que mostrava sua expressão aumentada em até 7 vezes em tecidos pancreáticos tumorais, e sua expressão se mostrou específica de células tumorais, não sendo vista em ácinos ou células estromais (Lee *et al.*, 2006). Anos mais tarde esse aumento de expressão foi observado também em ratos, em um estudo que evidenciou que os níveis plasmáticos de microRNAs poderiam refletir os eventos tumorais em andamento (Yabushita *et al.*, 2012).

I.10 microRNAs circulantes

Considerando a baixa disponibilidade de amostras de tecido para análise diagnóstica e prognóstica, a descoberta de biomarcadores em amostras de fácil acesso se mostra como uma potencial solução para a questão do diagnóstico e definição de prognóstico, que são muitas vezes difíceis de estabelecer em câncer de pâncreas. Em 2008, dois estudos demonstraram a existência de miRNAs no soro e plasma, realçando seu potencial como biomarcadores minimamente invasivos, tanto para diagnóstico quanto para definição de prognóstico (Lawrie *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). Neste mesmo ano, Mitchell e colaboradores, em estudos com câncer de próstata, demonstraram que os miRNAs circulantes tem origem no tecido tumoral, sendo protegidos da alta atividade RNase endógena por mecanismos até então desconhecidos. Desde então, diversos trabalhos tem mostrado a utilidade de microRNAs circulantes como biomarcadores nos mais diversos tipos tumorais (Albulescu *et al.*, 2011). Hoje sabe-se que os miRNAs presentes no soro e plasma estão protegidos por estruturas maiores, como microvesículas, exossomos, corpos apoptóticos ou pela proteína Argonata2 (Kosaka *et al.*,

2010; Arroyo *et al.*, 2011). No entanto, os mecanismos secretórios e as funções biológicas dos miRNAs extracelulares ainda precisam ser melhor esclarecidos.

Em adenocarcinoma ductal pancreático, o primeiro estudo analisando miRNAs circulantes foi realizado por Wang e colaboradores (2009), mostrando que um painel de 4 miRNAs descritos pela literatura como superexpressos no tecido tumoral de pacientes com ADP (miR-21, -210, -155 e -196a) também eram detectáveis no plasma, sendo capazes de distinguir pacientes com e sem câncer com sensibilidade e especificidade de 64% e 89%, respectivamente. Utilizando amostras de soro, Kong e colaboradores (2011) ampliaram este painel para 7 miRNAs (miR-21, -155, -196a, -181a, -181b, -221 e -222), e apenas os três primeiros miRNAs obtiveram sucesso em classificar corretamente pacientes com e sem ADP. Neste mesmo trabalho, demonstrou-se também a capacidade do miR-196a na predição de prognóstico de pacientes com ADP: pacientes com altos níveis deste miRNA não tinham possibilidade de ressecção cirúrgica (estágios III e IV), enquanto pacientes com baixos níveis apresentavam a doença em fase inicial (estágios I e II). Além disso, observou-se uma correlação entre os níveis de miR-196a e tempo de sobrevivência dos pacientes, uma vez que pacientes com altos níveis de miR-196a sobreviviam em média 6,1 meses, em comparação com sobrevivência média de 12 meses em pacientes com baixos níveis de expressão deste miRNA.

Ainda em 2011, pela primeira vez em ADP um estudo avaliou os níveis de expressão de miRNAs tanto em amostras de tecido quanto em amostras circulantes do mesmo paciente. Morimura e colaboradores descreveram a expressão dos miRNAs da família miR-17-92 em tecido e plasma de pacientes com ADP e em controles sem doença. O trabalho demonstrou que a expressão diferencial do miR-18a era capaz de distinguir os dois grupos de indivíduos, com e sem doença.

Por fim, em 2012, uma análise genômica de larga escala foi realizada em amostras de soro de pacientes com ADP, na tentativa de identificar um perfil único de expressão de miRNAs nesse tipo de amostra. No total, apenas 44 e 19 miRNAs se mostraram super- e subexpressos, respectivamente. Surpreendentemente, nem todos os miRNAs apontados pelo estudo como diferencialmente expressos coincidiram com os miRNAs já reportados por outros estudos em amostras circulantes de pacientes com câncer de pâncreas.

E ainda, destes miRNAs com expressão alterada, somente 7 (miR-20a, -21, -24, -25, -99a, -185 e -191) apresentavam níveis de expressão significativamente diferentes entre casos e controles. O estudo mostrou ainda que pacientes com altos níveis de miR-21 exibiam uma menor taxa de sobrevivência, quando comparados a pacientes com baixos níveis de expressão. Com estes resultados, os autores utilizaram o painel de 7 miRNAs para avaliar um grupo de 55 pacientes com suspeita de ADP. Os pacientes foram acompanhados por até 7 meses, e o painel demonstrou ter uma precisão na capacidade de diagnóstico dos pacientes de 83,6%, o que é significativamente maior do que a precisão do CA19-9 (56,4%) e do CEA (36,4%), que foram avaliados nestas mesmas amostras (Liu *et al.*, 2012).

Além do plasma e soro, alguns autores tem buscado biomarcadores de diagnóstico e prognóstico na saliva. Oferecendo vantagens como facilidade e segurança durante a coleta e sendo uma opção totalmente não-invasiva, a saliva tem apresentado um alto potencial para monitoramento de doenças sistêmicas. Assim como o sangue, a saliva é formada por um complexo conjunto de enzimas, hormônios, anticorpos, fatores de crescimento, etc. Algumas moléculas entram na saliva a partir do sangue, e outras através das células, seja de forma transcelular (difusão passiva ou transporte ativo intracelular) ou paracelular (ultrafiltração extracelular). Assim, a maior parte dos componentes do sangue também está presente na saliva, fazendo deste material biológico um reflexo tão bom quanto o soro para a análise de variações hormonais, nutricionais e metabólicas (Lee e Wong, 2009).

Diversos estudos tem evidenciado que biomarcadores salivares são úteis no diagnóstico de diferentes tipos de câncer, como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Franzmann *et al.*, 2005), câncer oral (Li *et al.*, 2004) e câncer de mama (Streckfus *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2008). Em 2010, um estudo feito por Zhang e colaboradores revelou que RNAs mensageiros presentes na saliva são capazes de diferenciar pacientes com câncer de pâncreas, pancreatite crônica e pacientes saudáveis. O estudo, feito através de uma análise de perfil transcriptômico, mostrou que 4 mRNAs (KRAS, MBD3L2, ACRV1 e DPM1) se destacaram, funcionando como um painel para discriminar pacientes com e sem câncer com sensibilidade e especificidade de 90% e 95%, respectivamente, demonstrando assim o poder

discriminatório de biomarcadores tumorais na saliva. Além disso, estudos recentes tem enfatizado a possibilidade de detecção de miRNAs em amostras salivares e sua utilização como biomarcadores (Park *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2011). Até o momento, nenhum outro estudo foi publicado utilizando saliva de pacientes com ADP como fonte de biomarcadores.

CAPÍTULO II JUSTIFICATIVA

Atualmente, os casos suspeitos de ADP são primariamente identificados com base em estudos de imagem, por não existirem biomarcadores sensíveis e específicos o suficiente para complementar e/ou substituir a avaliação diagnóstica por imagem. Todos os casos necessitam de confirmação histológica, o que pode ser difícil, já que a obtenção do tecido suspeito não raro requer múltiplas biópsias guiadas por radiologia ou ecoendoscopia, ou ainda intervenção cirúrgica extensa devido a localização retroperitoneal do pâncreas. Além disso, frequentemente há uma interpretação errônea dos exames de imagem, e as lesões neoplásicas são confundidas com aquelas provocadas por pancreatite crônica ou outras patologias benignas. Todas essas questões demonstram a importância de encontrar novos marcadores moleculares que facilitem o diagnóstico e o acompanhamento da doença. A procura por novas estratégias de diagnóstico, no entanto, é um desafio pela ampla heterogeneidade tumoral, sendo este assunto extensivamente estudado.

Com o intuito de possibilitar a detecção efetiva e criar possibilidades para a promoção efetiva do rastreamento de ADP em grupos de risco, métodos não-invasivos para obter amostras clínicas com valor diagnóstico tem sido alvo de especial interesse, uma vez que possibilitam a descoberta de marcadores transcriptômicos que traduzam o estado clínico do paciente. Tais abordagens são muito promissoras no estabelecimento de um método de rastreamento que identifique pacientes com lesões precursoras de ADP (em risco para o desenvolvimento tumoral), ou mesmo pacientes assintomáticos, com uma doença ainda em estágios curáveis.

Além disso, a estratificação de pacientes em grupos de risco de acordo com fatores prognósticos ainda é muito limitada no contexto do câncer pancreático, diferente do que acontece em tumores como câncer de mama e próstata. Isso dificulta, por exemplo, a escolha de medidas terapêuticas, cirúrgicas e quimioterápicas. Considerando todos os achados da literatura e as necessidades práticas no manejo do adenocarcinoma ductal de pâncreas, este estudo visa comparar a expressão de miRNAs em indivíduos com ADP e controles saudáveis e, nos pacientes, verificar se os níveis da expressão estão particularmente associados a algum aspecto clínico da doença, o que poderia

servir de base para o desenvolvimento de um ensaio que auxilie na previsão da existência e do comportamento tumoral.

Os miRNAs se configuram, potencialmente, como excelentes biomarcadores para câncer, uma vez que sua expressão é frequentemente desregulada em tal doença e parece ser tecido-específica. Além disso, é sabido que alguns fluidos corpóreos, tais como plasma, soro e saliva contém quantidades detectáveis de miRNAs, que circulam de maneira livre e estável, oriundos de diversos tecidos e órgãos. Encontra-se aqui, portanto, uma potencial ferramenta para o acompanhamento da doença: os miRNAs em fluidos circulantes poderiam ser biomarcadores com as características necessárias para satisfazer a necessidade de se ter um teste não-invasivo, específico e sensível, capaz de auxiliar no diagnóstico precoce no acompanhamento da evolução do ADP.

CAPÍTULO III OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

Avaliar comparativamente a expressão de miRNAs em diferentes materiais biológicos de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático e controles sem doença, e verificar a presença de biomarcadores de diagnóstico, bem como a associação de determinado perfil de expressão com características clínicas específicas nos pacientes.

III.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de expressão de um painel de miRNAs, selecionados de acordo com sua já descrita função no ADP, em amostras circulantes - soro e saliva de pacientes com e sem adenocarcinoma ductal pancreático, com a finalidade de identificar biomarcadores de diagnóstico não-invasivo;
- Avaliar os níveis de expressão destes miRNAs em amostras de soro e avaliar sua correlação com os níveis de expressão deste mesmo painel no tecido pancreático;
- Comparar o perfil de expressão obtido em cada grupo de amostras (tecido, soro e saliva) com os dados clínicos (idade, sexo, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral, localização do tumor) do grupo de pacientes com ADP, a fim de verificar a existência de marcadores de prognóstico neste perfil.

CAPÍTULO IV MANUSCRITO 1

**miR-21 and miR-34a are overexpressed in serum of patients with
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma**

(Formatado para submissão ao periódico *PLOS ONE*)

**miR-21 and miR-34a are overexpressed in serum of patients with
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma**

Bárbara Alemar Beserra^{1,2,*}, Patricia Izetti Ribeiro^{1,2}, Cleandra Gregório², Gabriel de Souza Macedo^{1,2}, Alessandro Berch Osvaldt³, Ursula da Silveira Matte^{1,4} and Patricia Ashton-Prolla^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Grupo de Vias Biliares e Pâncreas – Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

4 Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

***Corresponding Author**

Bárbara Alemar Beserra

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental

Laboratório de Medicina Genômica (2º andar)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre

Brazil

e-mail: barbara.alemar@gmail.com

Tel.: +55 51 3359-7661

Abstract

Background: Since Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most deadly cancers and PDAC diagnosis often requires surgical procedures, circulating microRNAs appear as potential and minimally invasive diagnostic biomarkers.

Methods: We analyzed the expression levels of six miRNAs (miR-21, -34a, -155, -196a, -200b and -376a) whose expression has been described as deregulated in PDAC. Tumoral and adjacent non-tumoral tissues (n = 26 and 10, respectively) as well as serum (n = 24) samples of PDAC patients and 9 healthy controls were obtained. miRNA expression levels were measured by quantitative real-time PCR (TaqMan MicroRNA Assays).

Results: Although all miRNAs showed higher expression levels in PDAC tissues, this difference did not reach significance. However, miR-196a expression in tumoral tissues was very high and although not significant, the difference in expression was able to discriminate PDAC and non-tumoral tissues (AUC = 0.712; $P = 0.052$). In serum, a significant difference between groups was observed for the expression of miR-21 and miR-34a ($P < 0.001$ and $P = 0.001$). Both miRs accurately discriminated the two groups, with AUC for miR-21 and miR-34a of 0.894 ($P = 0.001$) and 0.865 ($P = 0.002$), respectively. Spearman's correlation and Kappa tests confirmed that there is a positive correlation between expression levels of miR-21 and miR-34a, both in serum ($r_s = 0.681$; $P < 0.001$; kappa = 0.477; $P = 0.022$) and in tissue samples ($r_s = 0.845$; $P < 0.001$; kappa = 0.846; $P < 0.001$).

Conclusion: Serum miR-21 and miR-34a are potentially useful diagnostic biomarkers of PDAC and their expression appears to be correlated, both in pancreatic tissue and serum. Further studies in a larger subset of patients should be undertaken to confirm these findings and to investigate the mechanisms that regulate miRNA expression in pancreatic cancer.

Keywords: Serum biomarkers; microRNAs; miR-21; miR-34a; Pancreatic ductal adenocarcinoma

Introduction

Among cancers, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is relatively uncommon, accounting for 3% of all new cases. However, it is responsible for up to 6% of all cancer-related deaths. In the USA, 43,920 new diagnoses and 37,390 PDAC-related deaths were estimated for the year 2012 (Siegel *et al.*, 2012). Several PDAC-associated features make it such a devastating and lethal disease: early dissemination of tumor derived cells in the blood stream (Rhim *et al.*, 2012), substantial morbidity associated with disease progression which often renders the patient unsuitable for surgery or even non-surgical disease-specific treatments (Li *et al.*, 2004) and widespread tumor resistance to most forms of treatment developed to date, as a consequence of the poor tumor vascularization (Olive *et al.*, 2009).

Early stage pancreatic cancer is usually a clinically silent disease, which only becomes apparent after tumor invasion of surrounding tissues or metastatic seeding of distant organs. Thus, diagnosis usually occurs late in the course of the disease, when the only curative treatment, surgical resection, is less effective or even unviable (Vincent *et al.*, 2004). In addition, accurate non-invasive diagnostic tools are not readily available, thus rendering the definitive diagnosis of PDAC or its precursor lesions very difficult without a surgical procedure (Hidalgo, 2010; Mayo *et al.*, 2009).

The molecular basis of PDAC carcinogenesis has been intensively investigated during the last decade (for an excellent review, see Samuel and Hudson, 2012) and several differentially expressed genes have been identified in the disease (Jones *et al.*, 2008). However, only a few molecules have been assayed as diagnostic biomarkers in the clinic. Conventional serum tumor markers, such as CEA (carcinoembryonic antigen) and CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9) have been used in the diagnosis and to monitor disease progression but unfortunately lack sufficient sensitivity and specificity (Harsha *et al.*, 2009).

microRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs, of approximately 22 nucleotides in length, with important regulatory roles in all cell types, by targeting mRNAs for cleavage or translational repression (Bartel, 2004). In the past few years, several studies have shown that miRNAs are

directly involved in the development of virtually all tumor types and are able to discriminate tissues with different biological behaviours, including neoplastic and non-neoplastic tissues (Lu *et al.*, 2005). In pancreatic tumors, abnormal expression patterns of miRNAs have been investigated by several research groups and some miRNAs with specific oncogenic and tumor suppressor function have been identified, including miR-221, -21, -181a, -155 and -196a (Bloomston *et al.*, 2007), miR-216, -217 and -375 (Szafranska *et al.*, 2007) and many others (Lee *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Kent *et al.*, 2009).

In addition to tissue expression, miRNAs have recently been detected in serum and plasma samples of patients with different cancers (Lawrie *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). In 2008, studying human prostate cancer, Mitchell and collaborators demonstrated that circulating miRNAs originate from cancer tissues and are protected from endogenous RNase activity by unknown mechanisms. To date, evidence from different studies indicates that circulating miRNAs are frequently encountered in different diseases and are protected by exosomes, apoptotic bodies, microvesicles or by the Argonaute2 protein (Kosaka *et al.*, 2010; Arroyo *et al.*, 2011; Gallo *et al.*, 2012). This knowledge has led to intense investigation of their potential use as minimally invasive cancer biomarkers (Wong *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Morimura *et al.*, 2011).

In the present study, we have assessed five miRNAs (miR-21, miR-155, miR-196a, miR-200b and miR-376a) with a previously reported oncogenic function in PDAC and one tumor-suppressor miRNA (miR-34a) directly involved in the p53 pathway, which is frequently downregulated in PDAC. The aim of our study was to investigate the potential role of these miRNAs, in serum and tissue, as diagnostic and/or prognostic biomarkers in PDAC.

Material and Methods

Patients and controls

A consecutive series of 31 patients with incident PDAC were recruited for this study in the setting of tertiary care hospital in Southern Brazil. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of Hospital de Clínicas de

Porto Alegre under protocol numbers 11-0510 and 10-0162. All of the participants were recruited only after providing written informed consent.

Inclusion criteria for PDAC patients were recent pathology-proven diagnosis and no history of previous or current chemotherapeutic or radiotherapeutic treatments. For those patients submitted to surgical intervention, definitive tumor stage was established on the basis of operative findings and staging exams. For patients with inoperable tumors, staging was determined from ultrasound, computed tomography and/or magnetic resonance imaging data, as well as from histological evaluation of biopsy samples. Tumors were staged according to the International Union Against Cancer (UICC) tumor-node-metastasis classification (Sobin & Wittekind, 2002).

Serum samples were also obtained from controls (n=9), ascertained from the hospital's radiology and urology departments. This group included individuals without any clinical evidence of pancreatic disease and with a normal recent (within a twelve month period from the recruitment date) abdominal computed tomography scan. By review of medical records, healthy controls also did not have any clinical evidence of other malignancies. For tissue analysis, normal adjacent pancreatic tissues from PDAC patients were used as controls (n=10). Histopathological review was performed in 8 of these 10 control samples and confirmed the sole presence of normal pancreatic tissue in all.

Sample collection, processing and miRNA extraction

Blood samples were collected using Vacutainer (BD®) tubes without addition of anticoagulants and processed immediately. After a coagulation time of 30 min at room temperature, serum was completely separated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min at room temperature. The supernatant serum was recovered and stored at -80°C until miRNA isolation. All samples were thawed on ice and the miRNA fraction was obtained of 500 µl of serum using the mirVana PARIS kit (Ambion), and eluted into 70 µl of pre-heated (95°C) RNase-free water, according to the manufacturer's instructions.

Tissue samples were identified and separated immediately after surgical excision, transported in liquid nitrogen and stored at -80°C until miRNA isolation. Frozen tissues were first pulverized in a stainless steel mortar and

pestle. miRNA purification was done using a mirVana PARIS kit (Ambion), and resulting miRNAs eluted into 100 µl of pre-heated RNase-free water, according to the manufacturer's instructions. All miRNA samples were purified using the DNFree kit (Ambion), to avoid DNA contaminants. RNA quantity and purity was determined using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific).

Histopathological analyses of PDAC patients and adjacent pancreatic tissue

For histopathological analyses, samples from the tumor and macroscopically normal pancreatic tissue were selected by the pathologist and surgeon during the surgical procedure. Tissue samples of the 26 patients included in this study were obtained from 8 duodenopancreatectomies (30.8%), 4 pancreatic biopsies (15.4%) and 14 laparotomies (53.8%). For all samples, an immediately adjacent portion to that used for miRNA purification was excised, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. The histological analysis was performed by a pathologist.

miRNA detection

miRNAs were quantified in duplicates by qRT-PCR using human TaqMan MicroRNA Assay kits (Applied Biosystems), using the following assays IDs: 000397 (miR-21), 000426 (miR-34a), 002623 (miR-155), 241070_mat (miR-196a), 002251 (miR-200b) and 000565 (miR-376a). The reverse transcription reaction was carried out using a TaqMan MicroRNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems) in 15 µl reactions, containing 5 µl of purified miRNA, 0.15 µl 100mM dNTPs, 1 µl Multiscribe reverse transcriptase (50U/µl), 1.5 µl 10x reverse transcription buffer, 0.19 µl RNase inhibitor (20U/µl), 3 µl gene specific primer and 4.16 µl nuclease-free water. For synthesis of cDNA, reaction mixes were incubated at 16°C for 30 min, at 42°C for 30 min and at 85°C for 5 min, and then held at 4°C. After this procedure, 1.00 µl cDNA solution was amplified using 5 µl of Taqman 2x Universal Master Mix with no AmpErase UNG (Applied Biosystems), 0.5 µl of gene specific primers/probe and 3.5 µl nuclease-free water, in a final volume of 10 µl. Quantitative PCR was run on a StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems). The reaction mix was incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min.

The cycle threshold (Ct) values were automatically calculated using the StepOne 2.2.2 Software (Applied Biosystems).

The expression of miRNAs was normalized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Tissue-derived samples were normalized using a small nucleolar RNA, RNU-48, as the endogenous control, as recommended by TaqMan MicroRNA Assay manufacturer (Wong *et al.*, Application Note n° 127AP11-01, Applied Biosystems). Due to lack of a universal endogenous control for serum samples, normalization for these was done using a synthetic exogenous control, cel-miR-39 from *C. elegans* (Qiagen, catalogue number MSY0000010), which was spiked into each serum sample as an internal control in a 50pM concentration. This miRNA was chosen because of the lack of sequence homology to human miRNAs and absence of empiric hybridization to human miRNA probes, as previously described (Mitchell *et al.* 2008; Li *et al.*, 2012).

Clinical variables

Clinical data (age at diagnosis, gender, tumor TNM classification, tumor localization and differentiation grade) were obtained from patient interviews and review of medical records.

Statistical analyses

Considering the non-parametric characteristic of our samples, Mann-Whitney test was used to evaluate differences in miRNAs expression between cases and controls. Fisher's exact and Continuity correction Chi-square tests were used to determine if there was a significant association between the relative serum miRNAs levels and a given clinical feature. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were used to assess the feasibility of using serum miRNA concentrations as diagnostic tools for detecting PDAC. The cutoff point for assessing sensitivity and specificity was established by obtaining the division between these two values. Univariate logistic regression was used to determine the odds ratios and 95% confidence intervals. The Spearman correlation test was used to measure correlations between quantitative variables and Kappa statistics was used to measure the agreement between categories. All tests of statistical significance

were two-sided and P values of <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software version 18.0 (IBM).

To perform univariate logistic and Kappa tests, we categorized absolute expression values, considering all samples above the median as “high” and all below the median as “low”. We also categorized the following clinical features: differentiation grade (moderate/well differentiated vs. poorly differentiated); tumor localization (pancreatic head vs. non-head); T stage (T1/T2 vs. T3/T4) and TNM stage (I/II vs. III/IV).

Results

Clinical features of patients and controls

A total of 31 PDAC patients and 9 control individuals were recruited for the study. Tissue samples were available from 26 patients and blood samples from 24. Eighteen patients provided both tissue and peripheral blood samples. Clinical features of the PDAC patients (age, gender, TNM classification, tumor localization and differentiation grade) are summarized in Table 1. No significant difference was observed in age at recruitment and gender between the individuals included in the case and control groups for the serum analyses ($P = 0.458$ and $P = 0.499$, respectively) and between these groups for the tissue analysis as well ($P = 0.274$ and $P = 0.303$, respectively).

miRNAs expression profiles in pancreatic tissue

Expression levels of the six PDAC-associated miRNAs (miR-21, -34a, -155, -196a, -200b and -376a) were assessed in tissue samples from 24 PDAC patients and in histopathological normal pancreatic tissue of 10 PDAC patients. All miRNAs showed higher expression levels in PDAC when compared to the normal adjacent pancreatic tissue, although this difference did not reach significance for any of the miRNAs investigated (Figure S1). Significant variability in expression levels was observed for all miRNAs. For miR-155, -196a and -200b, there was substantial overexpression in the PDAC group with fold-changes of 3.69, 20.65 and 2.21 but no significant difference in the comparison of expression with the non-tumoral tissue (P -values of 0.546, 0.053

and 0.903, respectively). For miR-21, -34a and -376a, expression levels were not as increased (fold change 2.02, 1.14 and 1.77, respectively) and as observed with the other miRNAs, no statistically significant difference when compared to controls ($P = 0.794, 0.126, 0.286$, respectively). Since miR-196a expression in tumoral tissues was very high (> 20 fold change) and difference between groups reached borderline significance, we assessed its ability to discriminate normal from tumoral tissues using ROC analysis. Results from this analysis showed a satisfactory AUC value of 0.712 (95% CI, 0.52 – 0.89; $P = 0.052$). For all other miRs, ROC analysis yielded unsatisfactory results (Table S1).

miRNAs expression profiles in serum

Expression levels of the six PDAC-associated miRNAs were compared in 24 serum samples from patients with PDAC and 9 control individuals. A significant difference between groups was observed for the expression of miR-21 and miR-34a ($P < 0.001$ and $P = 0.001$), corresponding to an average fold change of 11.59 and 7.73 increased expression in PDAC samples, respectively. Although the expression of miR-200 and miR-376 was also increased in cases, (average fold change of 2.80 and 1.13) this difference did not reach significance ($P = 0.203$ and $P = 0.379$). Expression levels of miR-155 and miR-196a were almost undetectable in serum from PDAC patients and controls, with high Ct values and a great variability among all individuals. Comparison of the expression levels between groups for these miRNAs also did not reach significance ($P = 0.179$ and $P = 0.084$) (Figure 1).

The ability of each miRNA to discriminate PDAC from control samples in serum was further assessed by ROC analysis. Both miR-21 and miR-34a accurately discriminated the two groups, as seen in Figure 2. The areas under the curve (AUC) for miR-21 and miR-34a were 0.894 [95% confidence interval (CI), 0.78 – 1.0; $P = 0.001$] and 0.865 (95% CI, 0.71 – 1.0; $P = 0.002$), respectively. Using the optimal cut-off point, sensitivity and specificity of miR-21 were 82.6% and 77.8%, and for miR-34a, 91.3% and 77.8%, respectively. AUC, sensitivity and specificity obtained for the other miRNAs in serum were not suitable for diagnostic purposes (Table S1).

Correlation analyses between miR-21 and miR-34a

Since miR-21 and miR-34a clearly showed a different expression profile between PDAC cases and controls in serum, we decided to verify a possible correlation between expression values of these two miRNAs. Spearman correlation test confirmed that there was a moderate correlation for expression levels of the two miRNAs ($r_s = 0.681$; $P < 0.001$) (Figure 3) in serum. We further analyzed correlation between expression levels of miR-21 and miR-34a in pancreatic tissues, and results were similar, showing a positive and strong correlation ($r_s = 0.845$; $P < 0.001$). We then used Kappa coefficient statistics to assess whether there is an agreement between miR-21 and miR-34a expression. In serum, the analysis showed a moderate agreement (kappa = 0.477; $P = 0.022$) and in tissues, an almost perfect agreement (kappa = 0.846; $P < 0.001$) between miR-21 and miR-34a expression levels. When we assessed miR-21 and miR-34a separately, for a correlation of each of them between PDAC tissues and serum, no correlation was found (Spearman r_s values of 0.373, $P = 0.128$ for miR-21 and $r_s = 0.159$, $P = 0.541$ for miR-34a).

Association analyses between miRNA expression and clinical features in PDAC patients

We investigated possible associations of miRNA expression levels in serum and tissues with age at PDAC diagnosis, sex, tumor grade and localization and TNM stage. In serum samples, the first association observed, although borderline significant, was between miR-200 expression and tumor grade: 88.9% of patients with low-miRNA values had a moderate or well differentiated histological grade, whereas 60% of patients with high-miRNA values had a poor differentiated tumor [$P = 0.057$, Odds-ratio (OR) = 12 (95% CI, 1.05 – 136.8)]. This same miRNA had a significant association with tumor localization: all patients with high-miRNA values had tumors localized in the pancreatic head ($P = 0.029$; see Table S2 for OR and 95% CI information).

With respect to T stage, 83.3% of patients with high-miR-34a values and 87.5% of patients with high miR-196a values had T3/T4 stages, but the association analysis did not reach significance ($P = 0.193$; OR = 4.16; 95% CI, 0.60 – 28.6 for miR-34a and $P = 0.282$; OR = 7.0; 95% CI, 0.56 – 86.30 for miR-

196a). In addition, and consistent with these findings, 83% of patients with high levels of miR-34a showed unresectable disease, but again, this association was not statistically significant ($P = 0.089$; OR = 6.0; 95% CI, 0.87 – 41.2) (Figure 4). Further details about ORs, P - values and 95% CIs, are summarized in Table S2. No significant associations of miRNA expression levels in pancreatic tissue and clinical features related to disease outcome were observed in this study, although, as in serum, the majority of patients with high miR-34a expression levels presented advanced disease (84.6% in T3/T4 stages and 76.9% TNM III or IV stages, respectively). Further details about ORs, P - values and 95% CIs, are summarized in Table S3.

Discussion

Previous studies have demonstrated that miRNAs are aberrantly expressed and directly involved in PDAC development (Lee *et al.*, 2006; Bloomston *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Most of them focused on tissue expression, and only very few studies investigated biomarkers in peripheral fluids that could contribute to non-invasive diagnosis in suspected PDAC cases.

Although several studies, in different cancer types, have shown that circulating miRNA can correctly discriminate cancer-affected and -unaffected individuals, (Resnick *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Heneghan *et al.*, 2010) only a few studies have investigated circulating miRNAs as potential diagnostic biomarkers in PDAC. Wang *et al.*, (2009) were the first to demonstrate that a panel of four miRNAs (miR-21, -210, -155 and -196a) could distinguish PDAC patients and controls in plasma samples, with a sensitivity and specificity of 64% and 89%, respectively. Kong *et al.*, demonstrated that three miRNAs (miR-21, -155 and -196a) were able to discriminate PDAC patients and healthy controls, and indicated miR-196a as a potential prognostic biomarker (Kong *et al.*, 2011). Finally, high throughput expression analysis of miRNAs in serum of PDAC patients using Illumina sequencing technology showed newly deregulated miRNAs in these samples (Liu *et al.*, 2012). To our knowledge, only one study effectively compared miRNA expression levels in tissue and peripheral body fluids (in this case, plasma). The study was focused on the

miR-17 – 92 cluster and proposed miR-18 as a good biomarker of disease and recurrence (Morimura *et al.*, 2011).

In the present case-control study, we sought to identify, among six miRNAs previously shown as involved in pancreatic carcinogenesis, potential diagnostic and prognostic biomarkers. In tissue samples, all six miRNA's expression levels were higher in PDAC when compared to non-tumoral pancreatic tissue, although the difference did not reach significance for any of the miRNAs studied. We identify three potential explanations for these non-significant results. The first is sample size. Since this study was designed to include incident cases, and PDAC is a relatively rare tumor, the number of cases we were able to recruit within the study period of 3 years was limited. Second, miRNA expression has been described as highly variable, and third, pancreatic normal tissues and PDAC tumors are known for its significant heterogeneity. Kent *et al.* (2009), for instance, have discussed that non-neoplastic pancreatic tissue is composed of a myriad of different cell types, including pancreatic duct cells, from which adenocarcinoma arises, cells of the stroma, acini and infiltrating inflammatory cells, which can also contribute with different miRNA expression profiles. In fact, conflicting results in miRNA expression data are not infrequent among studies that have described miRNA expression in pancreatic tissue. MiR-21, for example, has been reported in PDAC at fold changes of 15.7 (Lee *et al.* 2006), 3.08 (Bloomston *et al.* 2007) and in ranges as wide as 1.95-6888.62 (Zhang *et al.*, 2009). MiR-34a expression levels have also shown conflicting results between different studies in pancreatic cell lines and PDAC tissue (Szafranska *et al.* 2007; Bloomston *et al.* 2007; Kent *et al.* 2009; Ji *et al.* 2009). Although downregulation of miR-34a expression in PDAC is an expected result in pancreatic cancer, due to common inactivation of p53 (which positively regulates miR-34a) and other mechanisms (Calhoun *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007), in other tumors miR-34a is consistently overexpressed (Dutta *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

An important finding from our tissue experiments was the observation of extreme overexpression of miR-196a in PDAC when compared to non-tumoral tissue. Although difference between groups reached only borderline significance, ROC analysis demonstrated a potential role for the use of this miRNA as an additional diagnostic marker in PDAC, and further studies should

be undertaken in a larger sample size to confirm these results. Our results are consistent with previous reports from literature, which showed miR-196a virtually absent in non-tumoral pancreatic cells but significantly overexpressed in PDAC cells (fold change = 14) (Szafranska *et al.*, 2007). Other studies have also shown that miR-196a expression increases with disease progression, with lower expression observed in precursors lesions (i.e. pancreatic intraepithelial neoplasia) than in PDAC (Szafranska *et al.*, 2008). Moreover, tissue miR-196a expression levels have been correlated with survival rates in PDAC: patients with high miR196a levels had poor survival when compared to those with low expression (14.3 months vs 26.5 months, respectively) (Bloomston *et al.*, 2007). Thus, our findings reinforce a potential role of miR-196 as a diagnostic and prognostic biomarker in tissue PDAC samples.

In serum, two circulating miRNAs, miR-21 and miR-34a, clearly discriminated PDAC patients and controls with acceptable sensitivity and specificity. The potential use of miR-21 as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer in plasma was first described by Wang *et al.* in 2009 and recently, it was also described in serum (Kong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Thus, our results reinforce the previous findings that circulating miR-21 are observed in PDAC patients and its expression levels are sufficiently increased to allow the use of this information as an additional tool for diagnosis. On the other hand, circulating miR-34a had not been described before in any pancreatic disease. Thus, our findings of significantly increased expression in serum of PDAC patients, suggests that miR-34a could be used, in addition to miR-21 as a non-invasive tool in diagnosis. Finally, our results also indicated a strong correlation in expression of these two miRNAs, both in pancreatic tissues and in serum, suggesting that their overexpression may be regulated by related mechanisms. What remains to be determined is whether the mechanism associated with increased circulating miR-21 and -34a in PDAC patients is directly related to their expression in tissue or if it is an independent event. The absence of a clear correlation between expression of each of these two miRNAs in tissue and serum, as observed in this series of cases, suggests that different mechanisms regulate miRNA expression in different compartments. In line with this observation, a very comprehensive study by Wulfken *et al.* (2011) that assessed miRNA expression in tissue and serum of renal cell carcinoma

patients found that although 109 miRNAs were circulating in higher levels in serum, only 36 of them showed increased expression levels in the tumor. Thus, it is likely that different mechanisms are at play in the regulation of miRNA expression in distinct body compartment.

We conclude that serum miR-21 and miR-34a are potentially useful diagnostic biomarkers of PDAC and their expression appears to be correlated, both in pancreatic tissue and serum. Further studies in a larger subset of patients should be undertaken to confirm these findings and to investigate the mechanisms that regulate miRNA expression in pancreatic cancer.

Acknowledgements: This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES and Fundo de Incentivo à Pesquisa - FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant #10-0162 and #11-0510). Patricia Ashton-Prolla, Ursula Matte and Alessandro Bersch Osvaldt are investigators of CNPq. Barbara Alemar received a grant from CAPES. We thank our colleagues from Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares, Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Nefrologia and Unidade de Análises Moleculares e Proteínas from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their laboratory assistance.

Table 1 Pancreatic cancer patients characteristics

Variables	Serum (n= 24)	Tissue (n= 26)
Age (years)		
Mean	62 (43 - 85)	65 (43 - 85)
< 65	13 (54%)	11 (42%)
≥ 65	11 (46%)	15 (58%)
Sex		
Male	12 (50%)	14 (54%)
Female	12 (50%)	12 (46%)
Histologic grade¹		
Poor	4 (17%)	3 (11,5%)
Moderate to poor	3 (12%)	3 (11,5%)
Moderate	12 (50%)	14 (54%)
Well	1 (4%)	2 (8%)
NI	4 (17%)	4 (15%)
Localization		
Head	19 (79%)	22 (84,5%)
Body/tail	4 (17%)	3 (11,5%)
Uncinate process	1 (4%)	1 (4%)
T stage¹		
T1	1 (4%)	0 (0%)
T2	6 (25%)	6 (23%)
T3	4 (17%)	7 (27%)
T4	13 (54%)	13 (50%)
N stage¹		
Nx	3 (12%)	2 (8%)
N0	8 (34%)	8 (31%)
N1	13 (54%)	16 (62%)
M stage¹		
M0	16 (66%)	17 (65,5%)
M1	8 (34%)	9 (34,5%)
Stage¹		
IA	1 (4%)	0 (0%)
IB	1 (4%)	1 (4%)
IIA	1 (4%)	1 (4%)
IIB	5 (20%)	6 (23%)
III	8 (34%)	9 (34,5%)
IV	8 (34%)	9 (34,5%)

¹ These are according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) 6th edition - TNM staging system for pancreatic cancer

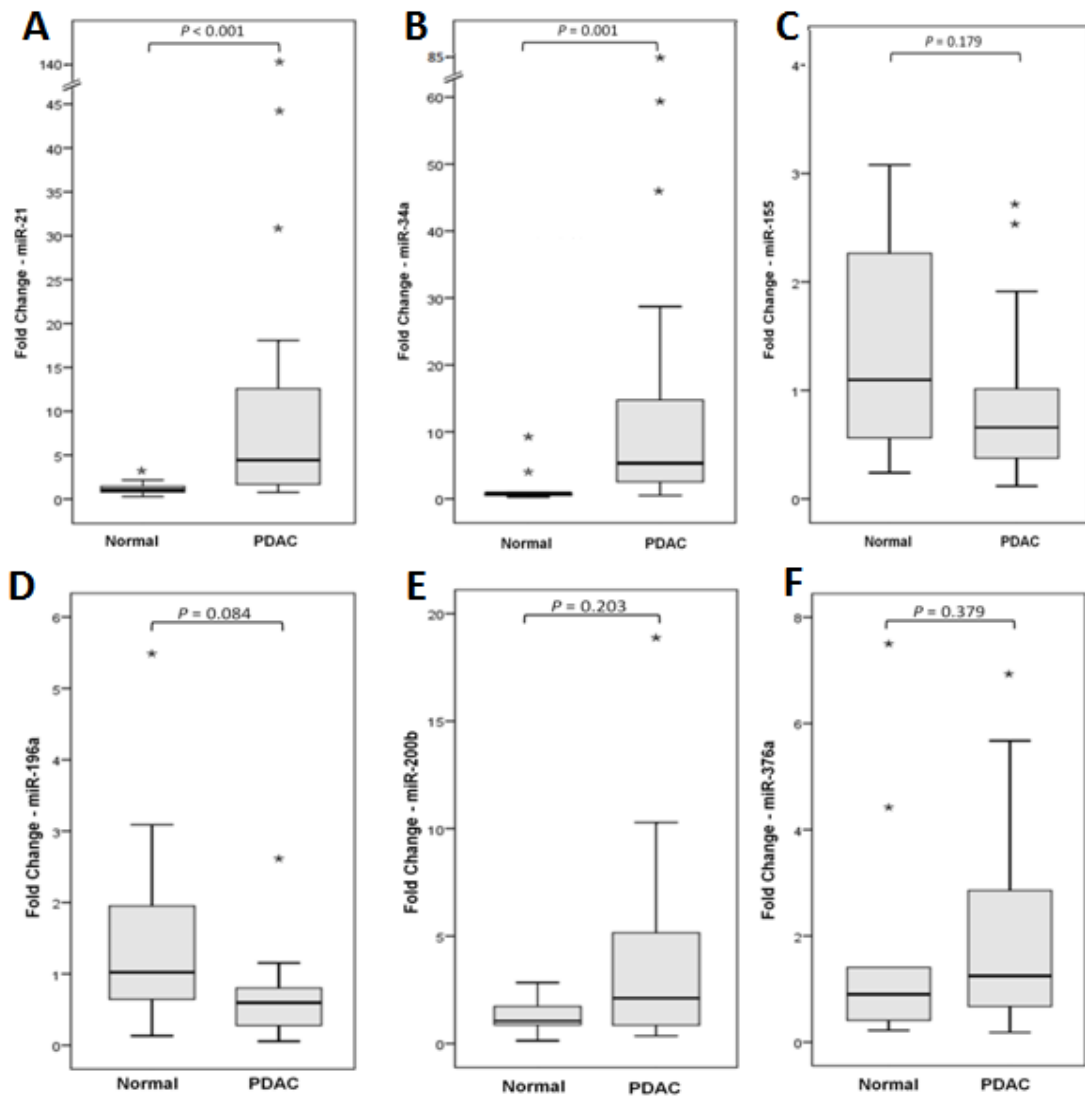


Figure 1. Relative fold change of six miRNAs in the serum of pancreatic adenocarcinoma patients and healthy controls. A, miR-21; B, miR-34a; C, miR-155; D, miR-196a; E, miR-200b; F, miR-376a.

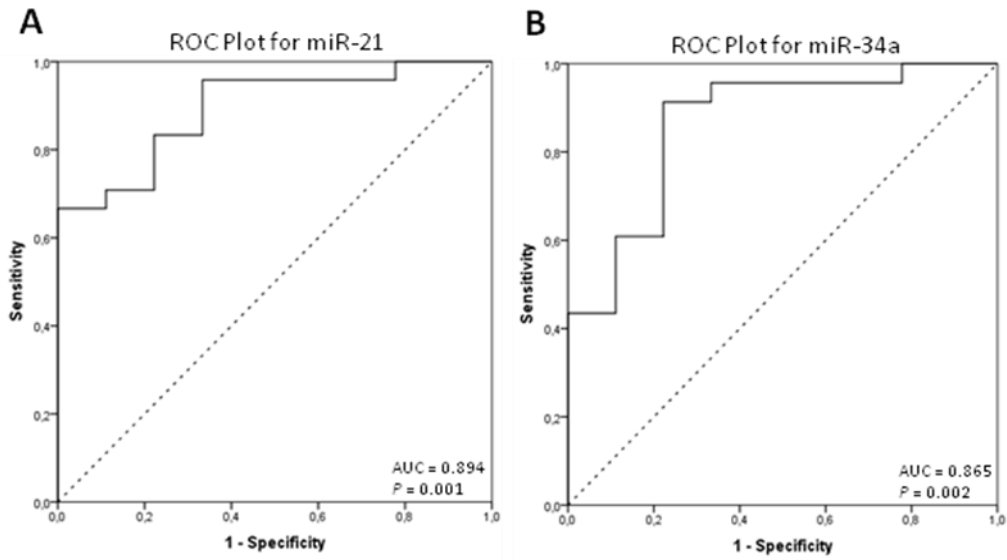


Figure 2. ROC curves of serum levels of miR-21 and miR-34a. A, miR-21; B, miR-34a.

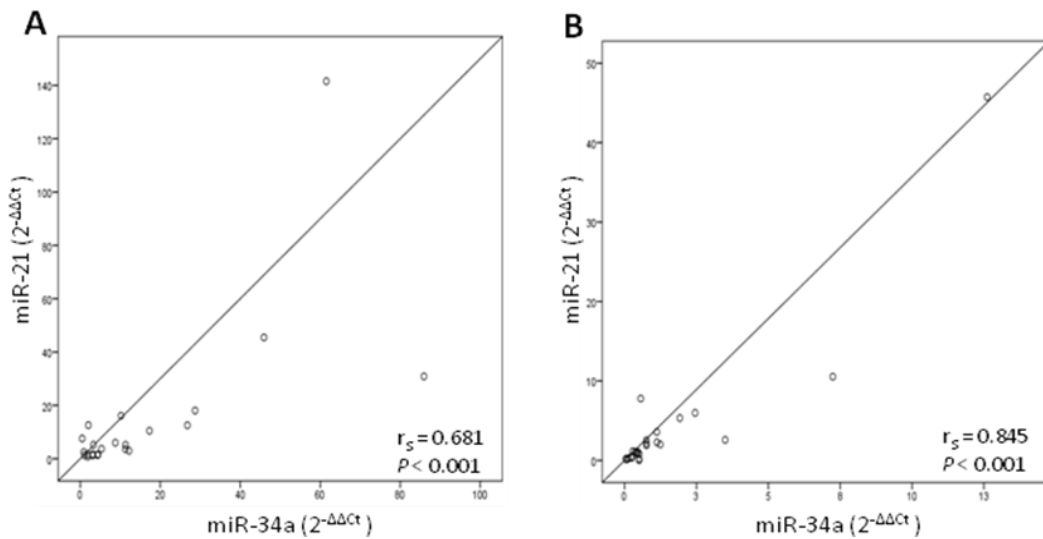


Figure 3. Spearman' correlation between miR-21 and miR-34a relative levels in A, serum samples and B, tissue samples.

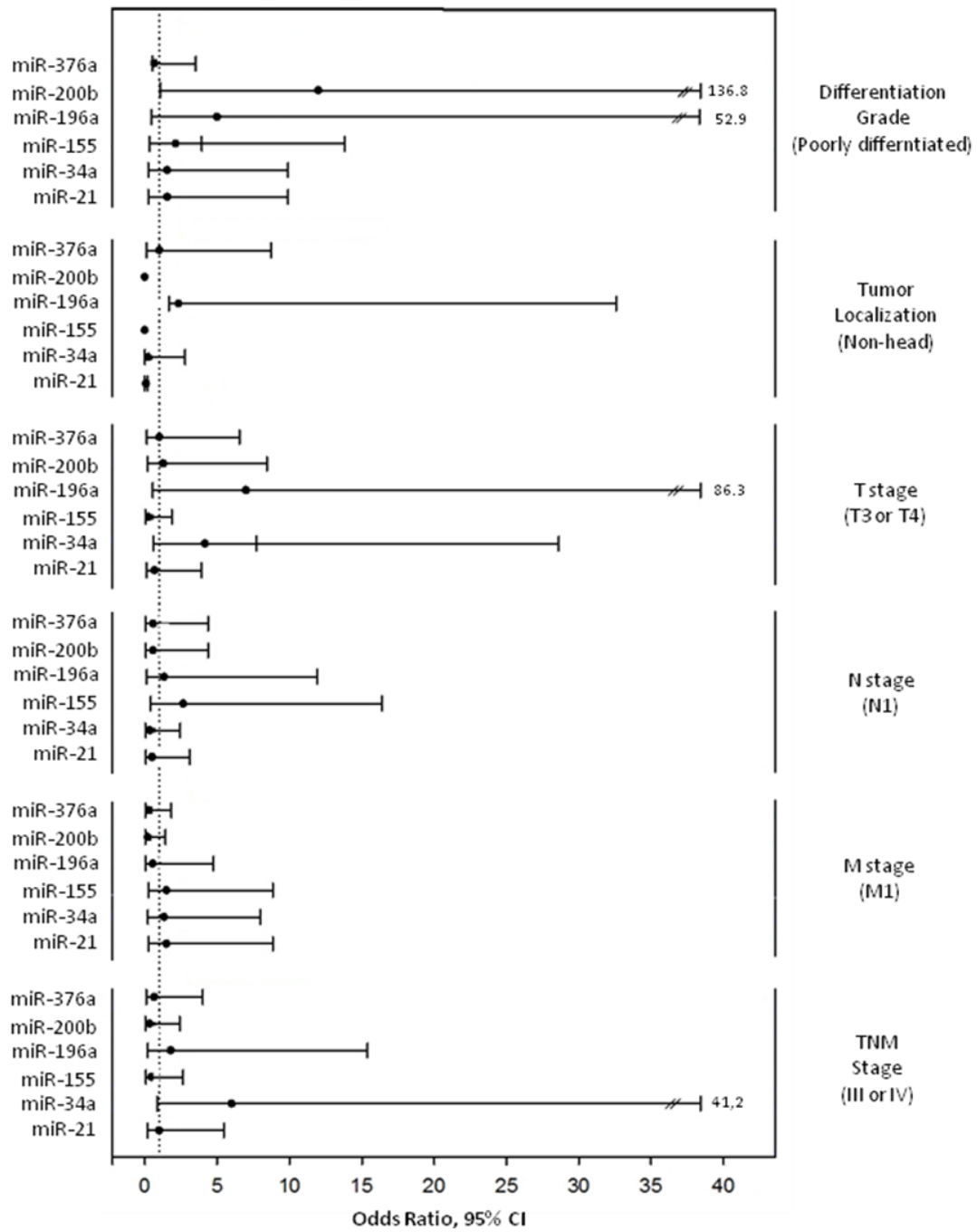


Figure 4. Odds ratio and 95% Confidence intervals of high-miRNA (above median) levels in serum of PDAC patients among different clinical features.

Supplementary Information

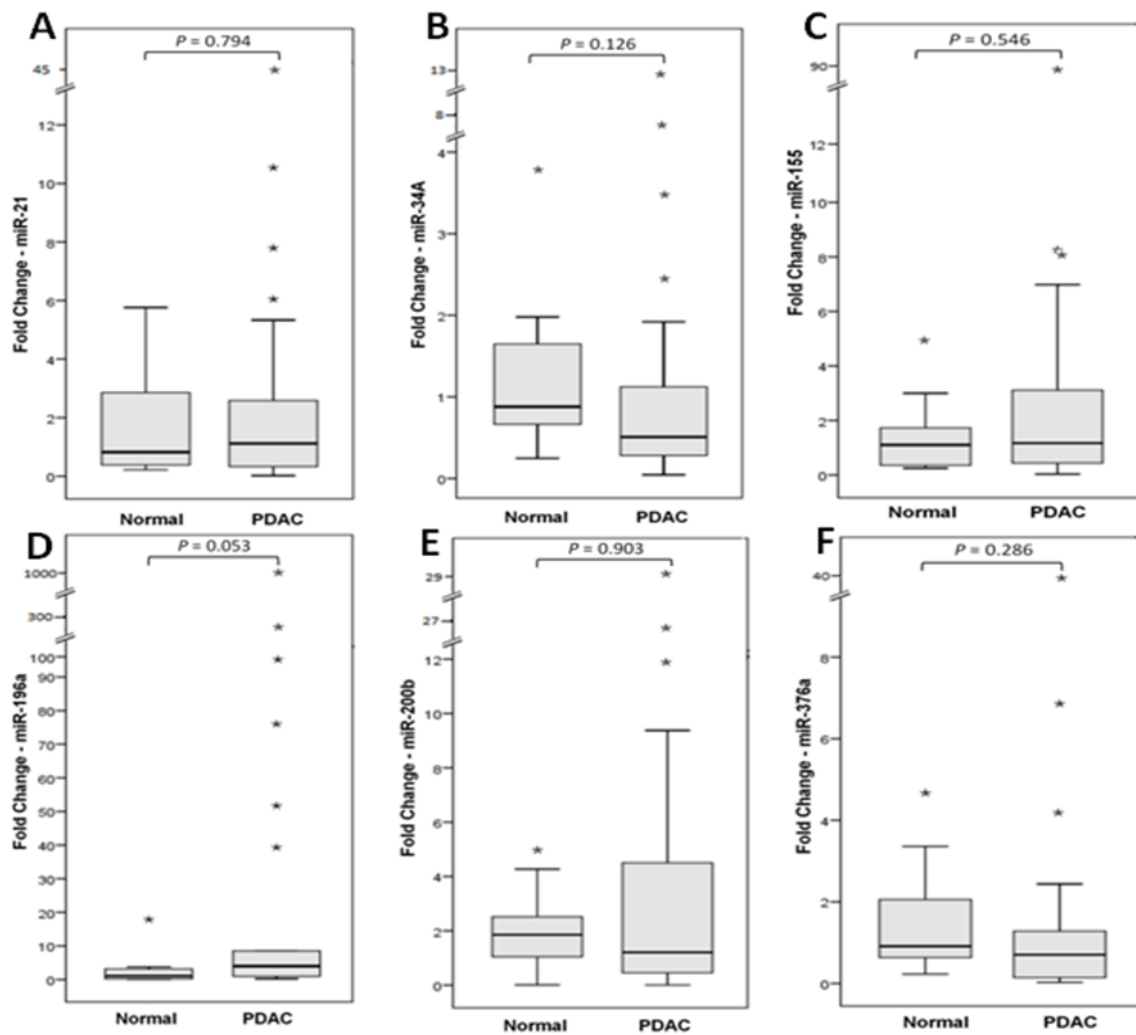


Figure S1. Relative fold change of six miRNAs in the pancreatic adenocarcinoma tissue and non-tumoral adjacent tissue. A, miR-21; B, miR-34a; C, miR-155; D, miR-196a; E, miR-200b; F, miR-376a.

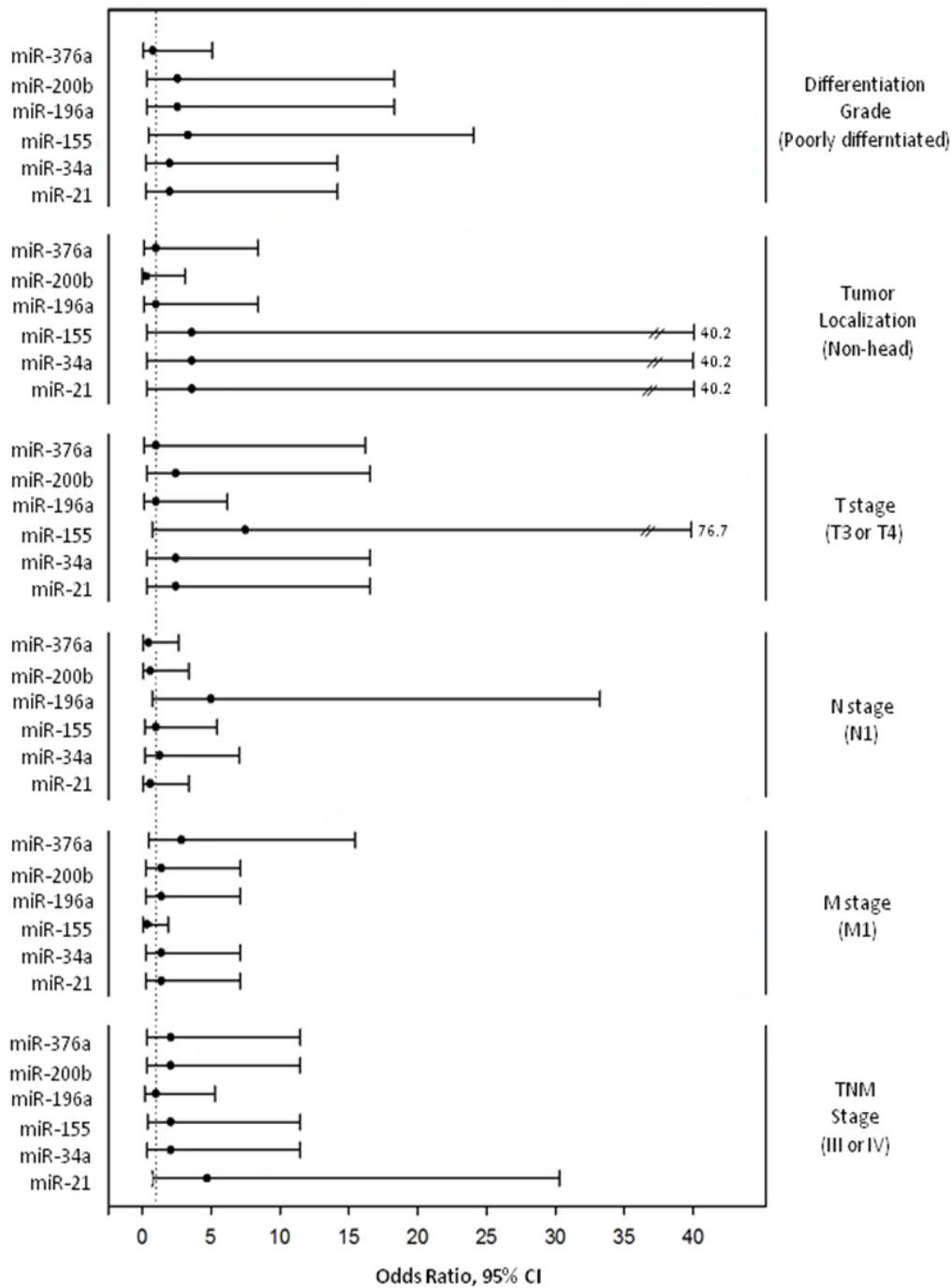


Figure S2. Odds ratio and 95% Confidence intervals of high-miRNA (above median) levels in PDAC tissue samples among different clinical features.

Table S1. Area under the curve (AUC), *P* - values and 95% Confidence Intervals (CI) of miRNA levels in serum and tissue samples.

Serum samples			
	AUC	<i>P</i> - value	95% CI
miR-21	0.894	0.001	0.782 - 1.00
miR-34a	0.865	0.002	0.719 - 1.00
miR-155	0.343	0.169	0.114 - 0.572
miR-196a	0.286	0.079	0.055 - 0.514
miR-200b	0.652	0.192	0.456 - 0.847
miR-376a	0.606	0.301	0.370 - 0.842
Tissue samples			
	AUC	<i>P</i> - value	95% CI
miR-21	0.531	0.778	0.324 - 0.738
miR-34a	0.669	0.120	0.487 - 0.852
miR-155	0.569	0.525	0.380 - 0.759
miR-196a	0.712	0.052	0.527 - 0.896
miR-200b	0.485	0.888	0.288 - 0.681
miR-376a	0.381	0.274	0.195 - 0.567

Table S2. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) of high-miRNA levels among different clinical features in serum samples. “” means that confidence intervals were not calculated because one cell on Chi-square test was empty**

Serum samples				
miRNA	Odds Ratio	95% CI		Feature
miR-21	1.56	0.24	9.91	Differentiation grade (Poorly differentiated)
miR-34a	1.56	0.24	9.91	
miR-155	2.13	0.33	13.81	
miR-196a	5.00	0.47	52.96	
miR-200b	12.00	1.05	136.80	
miR-376a	0.65	0.53	3.53	
miR-21	0.09	*		Tumor localization (Non-head)
miR-34a	0.24	0.02	2.78	
miR-155	0.00	*		
miR-196a	2.33	1.67	32.58	
miR-200b	0.00	*		
miR-376a	1.00	0.11	8.73	
miR-21	0.67	0.11	3.93	T stage (T3 or T4)
miR-34a	4.16	0.60	28.62	
miR-155	0.28	0.04	1.87	
miR-196a	7.00	0.56	86.32	
miR-200b	1.28	0.20	8.43	
miR-376a	1.00	0.15	6.53	
miR-21	0.51	0.08	3.10	N stage (N1)
miR-34a	0.34	0.04	2.45	
miR-155	2.66	0.43	16.39	
miR-196a	1.33	0.14	11.92	
miR-200b	0.58	0.07	4.38	
miR-376a	0.58	0.07	4.38	
miR-21	1.50	0.25	8.84	M stage (M1)
miR-34a	1.33	0.22	7.98	
miR-155	1.50	0.25	8.84	
miR-196a	0.55	0.06	4.75	
miR-200b	0.20	0.03	1.42	
miR-376a	0.27	0.04	1.85	
miR-21	1.00	0.18	5.46	TNM stage (III or IV)
miR-34a	6.00	0.87	41.21	
miR-155	0.46	0.08	2.65	
miR-196a	1.80	0.21	15.40	
miR-200b	0.35	0.05	2.40	
miR-376a	0.65	0.10	4.00	

Table S3. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) of high-miRNA levels among different clinical features in tissue samples.

Tissue samples				
miRNA	Odds Ratio	95% CI		Feature
miR-21	2.00	0.28	14.19	Differentiation grade (Poorly differentiated)
miR-34a	2.00	0.28	14.19	
miR-155	3.33	0.46	24.05	
miR-196a	2.57	0.36	18.32	
miR-200b	2.57	0.36	18.32	
miR-376a	0.78	0.11	5.10	
miR-21	3.60	0.32	40.23	Tumor localization (Non-head)
miR-34a	3.60	0.32	40.23	
miR-155	3.60	0.32	40.23	
miR-196a	1.00	0.12	8.42	
miR-200b	0.27	0.02	3.10	
miR-376a	1.00	0.12	8.42	
miR-21	2.44	0.36	16.54	T stage (T3 or T4)
miR-34a	2.44	0.36	16.54	
miR-155	7.50	0.73	76.77	
miR-196a	1.00	0.16	6.20	
miR-200b	2.44	0.36	16.54	
miR-376a	1.00	0.16	16.20	
miR-21	0.60	0.10	3.40	N stage (N1)
miR-34a	1.28	0.23	7.05	
miR-155	1.00	0.18	5.46	
miR-196a	5.00	0.75	33.21	
miR-200b	0.60	0.10	3.40	
miR-376a	0.47	0.08	2.65	
miR-21	1.40	0.27	7.13	M stage (M1)
miR-34a	1.40	0.27	7.13	
miR-155	0.35	0.06	1.89	
miR-196a	1.40	0.27	7.13	
miR-200b	1.40	0.27	7.13	
miR-376a	2.85	0.52	15.47	
miR-21	4.71	0.73	30.27	TNM stage (III or IV)
miR-34a	2.08	0.38	11.48	
miR-155	2.08	0.38	11.48	
miR-196a	1.00	0.19	5.28	
miR-200b	2.08	0.37	11.48	
miR-376a	2.08	0.37	11.48	

References

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, *et al.* (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *PNAS* 108: 5003–5008

Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell Reviews* 116: 281 – 297

Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, *et al.* (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297: 1901 – 1908

Calhoun ES, Hucl T, Gallmeier E, West KM, Arking DE, *et al.* (2006) Identifying Allelic Loss and Homozygous Deletions in Pancreatic Cancer without matched Normals Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res* 66: 7929 : 7928

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, *et al.* (2007) Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell* 26: 745 – 752

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, *et al.* (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18: 997 – 1006

Dutta KK, Zhong Y, Liu YT, Yamada T, Akatsuka S, Hu Q, *et al.* (2007) Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent. *Cancer Sci.* 98: 1845-52

Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE* 7: 1 – 5

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math J, Larkin J, *et al.* (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregional sequencing. *N Engl J Med* 366: 883 – 891

Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, *et al.* (2009) A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Medicine* 6: 1 – 6

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, *et al.* (2010) Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg.* 251: 499-505

Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605 – 1617

Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Meng Y, *et al.* (2009) MicroRNA-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS ONE* 4: 1 -13

Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, López-Romero P, Tan AC, *et al.* (2009) A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 8: 2013 – 2024

Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, *et al.* (2011) Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 56: 602 – 609

Kosaka N, Iguchi H, Ochiga T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science* 101: 2087 - 2092.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, *et al.* (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 141: 672 – 675

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR *et al.* (2006) Expression profile identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120: 1046 – 1054

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzesse (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049 – 1057

Li Y, Kowdley KV. (2012) Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem.* 431: 69 – 75

Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, *et al.* (2012) Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clinical Chemistry* 58: 610 – 618

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25: 402 – 408

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature Letters* 435: 834 – 838

Mayo SC, Austin DF, Sheppard BC, Mori M, Shipley DK, *et al.* (2009) Evolving preoperative evaluation of patients with pancreatic cancer: does laparoscopy have a role in the current era? *J Am Coll Surg* 208:87-95

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS* 105: 10513 – 10518

Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura, *et al.* (2011) Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 105: 1733 – 1740

Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, *et al.* (2009) Micro-RNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 8: 1067 – 1074

Olive KO, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, *et al.* (2009) Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* 324: 1457 – 1461

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, *et al.* (2009) The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic Oncology* 112: 55 –59

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, *et al.* (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148: 349 – 361

Samuel N and Hudson TJ (2012) The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9: 77 – 87

Shmittgen TD and Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3: 1101 – 1108

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer Statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10 – 29

Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, *et al.* (2007) Micro-RNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26: 4442 – 4452

Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon SG, Luttges J, *et al.* (2008) Analysis of MicroRNAs in Pancreatic Fine-Needle Aspirates Can Classify Benign and Malignant Tissues. *Clinical Chemistry* 54: 1716–1724

Sobin LH and Wittekind C (Editors) TNM Classification of Malignant Tumors – 6th Edition. John Wiley & Sons – 2002.

Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, *et al.* (2009) Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 4: e5532

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049 – 1057

Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, *et al.* (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2: 807 – 813

Wang M, Zhang P, Li Y, Liu G, Zhou B, *et al.* (2012) Quantitative analysis by stem-loop real-time PCR revealed the microRNA-34a, microRNA-155 and miRNA-200c overexpression in human colorectal cancer. *Med Oncol* 29: 3113 – 3118

Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. Application Note: Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using TaqMan MicroRNA Assays. Applied Biosystems.

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, *et al.* (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS ONE* 6: 1 – 7

Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, *et al.* (2009) Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 33: 698 – 709

CAPÍTULO V MANUSCRITO 2

microRNA expression in saliva of patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

(Formatado para submissão ao periódico *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*- Section: "Null Results in Brief")

**microRNA expression in saliva of patients with
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma**

Bárbara Alemar Beserra^{1,2,*}, Patricia Izetti Ribeiro^{1,2}, Cleandra Gregório², Alessandro Berch Osvaldt³, Ursula da Silveira Matte^{1,4} and Patricia Ashton-Prolla^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Grupo de Vias Biliares e Pâncreas – Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

4 Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

***Corresponding Author**

Bárbara Alemar Beserra

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental

Laboratório de Medicina Genômica (2º andar)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre

Brazil

e-mail: barbara.alemar@gmail.com

Tel.: +55 51 3359-7661

ABSTRACT

Background: Since pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is one of the most deadly forms of cancer and its diagnosis often requires surgical intervention, salivary microRNAs could be used as non-invasive diagnostic biomarkers.

Methods: We analyzed the expression levels in saliva of six miRNAs (miR-21, -34a, -155, -196a, -200b and -376a) previously reported in PDAC. miRNA expression was assessed in 10 PDAC patients and 10 controls by quantitative real-time PCR using TaqMan MicroRNA Assays.

Results: Expression levels of all miRNAs studies were very low, and in some, undetectable. There was no significant difference in miRNA expression levels between PDAC and controls.

Conclusion: Although this study may be limited by small sample size, our results suggest that the miR-21, -34a, -155, -196a, -200b and -376a are not significantly nor differentially expressed in saliva. Thus, they are probably not suitable for use as non-invasive biomarkers for the diagnosis of PDAC.

KEYWORDS

Salivary biomarkers; microRNA; pancreatic ductal adenocarcinoma.

Introduction

Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer, corresponding to 90% of all cases. It is also the most aggressive form, with incidence rates close to mortality rates (Siegel *et al.*, 2012). PDAC is usually a silent disease until very late in its course and accurate diagnosis in early stages is difficult to establish. The definitive diagnosis of PDAC is often times only attained through surgical procedures (Hidalgo, 2010; Mayo *et al.*, 2008).

In the past few years, several studies have shown that microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides in length, have important regulatory roles in all cell types, by targeting mRNAs for cleavage or translational repression (Bartel, 2004). In cancer, miRNA are involved both in the development and maintenance of tumors (Lewis *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005).

Considering the need of a non-invasive and accurate method to diagnose PDAC, especially in early stages of the disease, saliva has been suggested as an advantageous sample for use in easy, safe and non-invasive diagnostic assays (Lee and Wong, 2009) and biomarkers of health and disease have been actively sought in saliva. Correspondence of proteins and other molecules in saliva and blood have supported this search (Zimmermann and Wong, 2008) and several salivary biomarkers which provide diagnostic information about cancer have been already identified, including diagnostic biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma (Franzmann *et al.*, 2005) and breast cancer (Streckfus *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2008). Recently, Zhang and cols. (2010) demonstrated that salivary messenger-RNAs (KRAS, MBD3L2, ACRV1 and DPM1) could correctly distinguish pancreatic cancer patients and healthy controls with a sensitivity and specificity of 90% and 95%, respectively. The expression of several miRNAs in saliva has been demonstrated in normal individuals by Patel *et al.* in 2011 and differential expression of selected miRNAs in saliva from oral cancer patients was described by Park *et al.* in 2009.

In this proof-of-concept study, we investigated five miRNAs (miR-21, miR-155, miR-196a, miR-200b and miR-376a) reported to have a potential oncogenic function (Lee *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009) and one miRNA

directly involved in regulation of the p53 pathway (miR-34a), which is downregulated in PDAC (Kent *et al.*, 2009). The aim of our study was to determine whether these miRNAs, previously associated with PDAC in pancreatic tissue samples, could be detected in saliva and if their expression differed significantly between saliva of pancreatic cancer patients and healthy controls.

Material and Methods

Patients and samples

The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (Hospital de Clinicas de Porto Alegre), under registration numbers 11-0510 and 10-0162. Written informed consent was obtained from all patients for the use of their salivary samples.

Inclusion criteria for the case group (PDAC patients) were: recent diagnosis and no previous chemo or radiotherapy treatment. For patients who underwent surgery, definitive tumor stage was established on the basis of operative findings and accessory exams. For those patients unsuitable for surgical treatment, tumors were staged by means of ultrasonography, computed tomography and/or magnetic resonance imaging, as well as histological evaluation of the biopsy sample. The tumors were staged according to the International Union Against Cancer (UICC) tumor-node-metastasis classification (Sobin & Wittekind, 2002). Criteria for recruitment of individuals to the control group included absence of clinical symptoms of pancreatic disease and recent normal abdominal computed tomography scan, excluding any systemic or malignant disease.

All saliva samples were collected from subjects before any therapeutic procedure. Donors were not allowed to eat, drink, smoke or perform oral hygiene 1 hour prior to collection. Whole saliva was collected between 9 and 11 a.m. and preserved using the RNA Oragene kit RE-100 (DNA Genotek Inc.), according to the manufacturer's instructions. miRNA purification was done using a mirVana PARIS kit (Ambion), starting from 500 µl of saliva and eluting the extracted material into 70 µl of pre-heated RNase-free water, according to the manufacturer's instructions for liquid samples. All miRNA samples were

purified using the DNFree kit (Ambion) to avoid DNA contaminants. All samples were quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

miRNA detection

miRNA expression was quantified in duplicates by qRT-PCR using human TaqMan MicroRNA Assay kits [Applied Biosystems; assay IDs 000397 (miR-21), 000426 (miR-34a), 002623 (miR-155), 241070_mat (miR-196a), 002251 (miR-200b) and 000565 (miR-376a)]. The reverse transcription reaction was carried out using a TaqMan MicroRNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems), following as indicated by the supplier. After reverse transcription, 1.00 μ l cDNA solution was amplified using 5 μ l of Taqman 2x Universal Master Mix with no AmpErase UNG (Applied Biosystems), 0.5 μ l of gene specific primers/probe and 3.5 μ l nuclease-free water, in a final volume of 10 μ l. Quantitative PCRs were run on a StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems). The reaction mix was incubated as recommended by the manufacturer. The expression of miRNAs was normalized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak *et al.*, 2001; Schmittgen *et al.*, 2008). Due to lack of a universal endogenous control for liquid samples, normalization was done using a synthetic exogenous control, cel-miR-39 from *C. elegans* (Qiagen, catalogue number MSY0000010), which was spiked into each salivary sample as an internal control at a 50pM concentration. This miRNA was chosen because of a lack of sequence homology to human miRNAs and absence of empiric hybridization to human miRNA probes, and its use has been described previously (Mitchell *et al.* 2008; Li *et al.*, 2012).

Clinical variables

Clinical data (age at recruitment and PDAC diagnosis, gender, tumor TNM classification, tumor localization and differentiation grade) were obtained from patient interviews and review of medical records.

Statistical analyses

Considering the non-parametric characteristic of our samples, Mann-Whitney test was used to evaluate differences in miRNAs expression between

cases and controls. All statistical significance tests were two-sided and P -values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software version 18.0 (IBM). Some analyses were performed excluding outliers values. Outliers are defined as any value point more than 1.5 interquartile ranges, below the first quartile or above the third quartile.

Results

Clinical Samples

In total, 20 subjects were recruited for this study, including 10 patients with newly diagnosed PDAC and 10 controls. No significant difference was observed in age at recruitment and gender between the individuals included in the case and control groups ($P = 0.179$ and $P = 0.370$, respectively).

Comparison of the expression levels of five of the six PDAC-associated miRNAs (miR-21, -34a, -155, -200b and -376a) between salivary samples of patients with PDAC and healthy controls did not reach significance (Table 1). Mir-196a expression was significantly higher in the control group ($P = 0.024$), but expression levels were heterogeneous and often almost undetectable. Among controls, one sample showed no miR-196a expression and 3 showed Ct values higher than 35, which could be considered inexistent. Among cases, 7 of the 10 samples showed Ct values higher than 35 and one sample was also undetectable. On the other hand, a few samples ($n=2$) in the control group showed extreme miR-196a expression levels, which were clear outliers. When the Mann-Whitman test was performed dismissing these outliers, the comparison lost significance ($P = 0.091$). Overall, miRNAs showed a very low copy number per sample, which is reflected in the overall high Ct values, as shown in Table 2.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to interrogate the presence of miRNA in salivary samples of PDAC patients and their ability to discriminate these from individuals without pancreatic disease. Our results showed that

although some of the six miRNAs are present in salivary samples, they are detectable at very low rates. Even when detected at sufficient levels, as occurs with miR-21 - a highly expressed miRNA in PDAC tissue, plasma and serum samples (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2011) - they were not able to distinguish samples from PDAC and controls. Thus, they were not able to comply with two important features every diagnostic biomarker should have: significant quantity that allows robust diagnosis in a given sample and sufficient specificity to allow its use in clinical applications.

Although this study may be limited by small sample size, our results, produced with good quality saliva samples and a highly accurate and sensitive detection method, suggest that miR-21, miR34a, miR-155, miR-196a, miR-200b and miR-376a are not significantly nor differentially expressed in saliva. Thus, they are probably not suitable for use as non-invasive biomarkers for the diagnosis of PDAC.

Acknowledgements: This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES and Fundo de Incentivo à Pesquisa - FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant #10-0162 and #11-0510). Patricia Ashton-Prolla, Ursula Matte and Alessandro Bersch Osvaldt are investigators of CNPq. Barbara Alemar received a grant from CAPES. We thank our colleagues from Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares, Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Nefrologia and Unidade de Análises Moleculares e Proteínas from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their laboratory assistance.

Table 1. Fold change values in PDAC cases and healthy controls. When a group presented some outlier values, mean fold change were calculated first considering this values, and then dismissing the outlier values, to evaluate the real difference between the two groups.

miRNA	Considering Outliers values?	Fold change cases Mean (min - max)	Number of outliers (cases)	Fold change controls Mean (min - max)	Number of outliers (controls)	P - value
miR-21	Yes	13.79 (0.14 - 113.9)	1	*	*	0.842
	No	2.63 (0.14 - 10.9)	*	2.38 (0.03 - 5.73)	*	
miR-34a	Yes	*	*	1.98 (0.05 - 5.73)	1	0.769
	No	1.95 (0.08 - 6.27)	*	1.51 (0.05 - 2.76)	*	
miR-155	Yes	1.16 (0.008 - 7.35)	2	*	*	0.079
	No	0.13 (0.08 - 0.68)	*	1.65 (0.03 - 3.52)	*	
miR-196a	Yes	*	*	2.72 (0.04 - 10.62)	2	0.024
	No	0.43 (0.006 - 1.41)	*	0.98 (0.04 - 2.32)	*	
miR-200b	Yes	11.48 (0.015 - 90.36)	1	*	*	0.720
	No	2.71 (0.015 - 9.18)	*	1.60 (0.12 - 3.92)	*	
miR-376a	Yes	*	*	*	*	0.604
	No	1.43 (0.07 - 4.45)	*	4.58 (0.07 - 19.17)	*	

“*” indicates that there is no outlier in this group.

Table 2. Ct values in PDAC cases and controls

miRNA	Group	Minimum Ct	Maximum Ct	Mean Ct	Median Ct	SD
miR-21	Cases	20.53	28.14	25.14	25.55	2.56
	Controls	24.16	30.06	26.54	26.24	2.05
miR-34a	Cases	25.01	33.35	28.92	29.33	2.46
	Controls	25.56	35.15 ^{1*}	28.94	28.39	2.90
miR-155	Cases	20.01	36.68 ^{2*}	33.13	32.61	2.13
	Controls	29.42	32.42	31.06	31.82	1.34
miR-196a	Cases	31.79	38.66 ^{7*}	35.53	36.25	2.21
	Controls	29.93	36.02 ^{3*}	33.71	34.34	2.19
miR-200b	Cases	25.66	33.75	28.68	27.89	2.69
	Controls	26.85	35.65 ^{1*}	29.91	28.91	2.81
miR-376a	Cases	31.31	37.08 ^{4*}	28.68	27.89	2.69
	Controls	32.94	36.86 ^{3*}	34.52	34.06	1.44

*The superscript numbers indicate how many samples had Ct values > 35.

References

Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell Reviews* 116: 281 – 297

Brooks MI, Jianghua W, Li Y, Zhang R, Elashoss D, *et al.* (2008) Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Mol Med Report.* 1: 375–378

Franzmann EJ, Reategui EP, Carraway KL, Hamilton KL, Weed DT, *et al.* (2005) Salivary Soluble CD44: A Potential Molecular Marker for Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14: 735 – 739

Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605 – 1617

Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, *et al.* (2011) Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 56: 602 – 609

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR *et al.* (2006) Expression profile identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120: 1046 – 1054

Lee YH e Wong DT (2009) Saliva: an emerging biofluid for early detection of disease. *Am J Dent* 22: 241 – 248

Li Y, Kowdley KV. (2012) Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem.* 431: 69 – 75

Livak KJ e Shmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25: 402 – 408

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature Letters* 435: 834 – 838

Mayo SC, Austin DF, Sheppard BC, Mori M, Shipley DK, *et al.* (2009) Evolving preoperative evaluation of patients with pancreatic cancer: does laparoscopy have a role in the current era? *J Am Coll Surg* 208:87-95

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS* 105: 10513 – 10518

Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic BA, *et al.* (2009) Salivary microRNA: discovery, characterization and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Research* 15: 5473 – 5477

Patel RS, Jakymiw A, Yao B, Pauley BA, Carcamo WC, *et al.* (2011) High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Archives of Oral Biology* 56: 1506 – 1513

Shmittgen TD e Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3: 1101 – 1108

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer Statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10 – 29

Sobin LH and Wittekind C (Editors) TNM Classification of Malignant Tumors – 6th Edition. John Wiley & Sons – 2002.

Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, *et al.* (2000) The Presence of Soluble c-erbB-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma: A preliminary Study. *Clinical Cancer Research* 6: 2363–2370

Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, *et al.* (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2: 807 – 813

Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, *et al.* (2010) Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 138: 949 – 957

Zimmermann BG e Wong DT (2008) Salivary mRNA targets for cancer diagnostics. *Oral Oncol* 44: 425 – 429

CAPÍTULO VI DISCUSSÃO

A discussão específica referente aos resultados obtidos no presente trabalho encontra-se nos manuscritos apresentados nos Capítulos IV e V. Neste capítulo serão mencionados aspectos mais gerais referentes ao tema retomando questões não discutidas anteriormente. No entanto, alguma sobreposição de conteúdo é inevitável.

Muitos estudos tem mostrado que os miRNAs estão diretamente envolvidos na patogênese do adenocarcinoma ductal pancreático, e sua expressão aberrante e desregulada sido demonstrada em amostras de tecido pancreático tumoral (Lee *et al.*, 2006; Bloomston *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009), em comparação com tecido pancreático não-tumoral. No entanto, considerando a baixa disponibilidade deste tipo de material para análises diagnósticas e prognósticas, a descoberta de biomarcadores em amostras de fácil acesso seria de grande valor para otimizar o diagnóstico deste tumor e, se permitisse diagnóstico em estágios precoces da doença, seria ainda mais relevante. Os primeiros estudos que demonstraram a existência de miRNAs circulantes foram publicados em 2008, utilizando amostras de soro e plasma. Os resultados foram positivos, demonstrando algumas diferenças de expressão entre indivíduos com e sem câncer, reforçando assim o potencial dos miRNAs como ferramenta diagnóstica minimamente invasiva (Lawrie *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2008). Neste mesmo ano, em um estudo com tumores malignos da próstata, demonstrou-se que os miRNAs circulantes se originavam no tumor, mas os mecanismos que os mantinham protegidos contra a atividade de RNases endógenas na circulação permaneciam desconhecidos (Mitchell *et al.*, 2008). Estudos recentes revelaram que os miRNAs presentes no soro e plasma são protegidos da atividade RNase endógena por vários mecanismos, como por exemplo pelo encapsulamento em corpos apoptóticos, exossomos, vesículas de HDL (lipoproteína de alta densidade) e principalmente pela sua associação com proteínas da família Argonauta (Kosaka *et al.*, 2010; Arroyo *et al.*, 2011; Gallo *et al.*, 2012; Vickers *et al.*, 2011).

Os mecanismos secretórios responsáveis pela liberação dos miRNAs na circulação são ainda desconhecidos e não está comprovado que todos tumores secretam, efetivamente, miRNAs. Uma primeira hipótese sugere que os

miRNAs sejam liberados através de um processo celular seletivo, pelo menos em alguns tipos de tumor. Opiniões alternativas defendem que todos os miRNAs encontrados na circulação são sub-produtos da atividade e morte celular. De fato, evidências recentes sugerem que ambas as teorias podem estar corretas (Turchinovich *et al.*, 2012). Existe ainda uma terceira possibilidade: uma parcela dos miRNAs circulantes poderia ser derivada de células sanguíneas, e é possível que miRNAs circulantes associados ao tumor sejam originadas de imunócitos provenientes do microambiente tumoral ou ainda de algum outro mecanismo de resposta imunológica mediado pelo tumor, de forma que a desregulação de miRNAs circulantes pode ser uma importante conexão entre imunidade e câncer (Ma *et al.*, 2012).

Muitos estudos, em diferentes tipos tumorais, tem demonstrado que a expressão diferencial de miRNAs circulantes é suficiente para discriminar pacientes com e sem câncer (Resnick *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2009; Heneghan *et al.* 2010). A investigação de miRNAs circulantes em ADP é bastante recente, e há poucos dados disponíveis na literatura. O primeiro estudo com pacientes diagnosticados com ADP (Wang *et al.*, 2009) demonstrou que a análise da expressão de um painel de quatro miRNAs em amostras de plasma identificava corretamente casos e controles sem doença. Apesar de ter ampliado o painel de miRNAs investigados para sete, o estudo seguinte viu diferença significativa em apenas três miRNAs, e demonstrou, pela primeira vez em ADP, a utilidade de um miRNA circulante como biomarcador de prognóstico (Kong *et al.*, 2011). Recentemente, Liu e colaboradores (2012), utilizando uma plataforma de análise em larga escala, avaliou diferenças de expressão de miRNA em amostras de soro de casos com ADP e controles saudáveis. Este estudo revelou novos miRNAs com expressão desregulada, embora seus achados não tenham sido completamente compatíveis com os dados dos estudos anteriores. Esta heterogeneidade nos resultados, mesmo quando os mesmos miRNAs são avaliados em diferentes estudos não é incomum. Ela pode ser explicada, em parte, pela grande diferença entre os protocolos utilizados, e reforça a necessidade de uma padronização de metodologias para possibilitar a comparação entre diferentes estudos. A distribuição de diferentes miRNAs extracelulares em uma determinada amostra dependerá do protocolo utilizado no processamento da amostra (soro, plasma

ou saliva). Dependendo das velocidades e tempos de centrifugação, por exemplo, diferentes compartimentos circulantes contendo miRNA serão isolados, uma vez que cada estrutura protetora associada com diferentes miRNAs tem pesos diferentes (Turchinovich *et al.*, 2012). As diferenças nos tamanhos amostrais, a amplitude de variação nos níveis de expressão dos miRNAs e a heterogeneidade da doença, quando somadas, também contribuem para as diferenças entre os estudos. Apenas um estudo em câncer de pâncreas comparou efetivamente os níveis de expressão de miRNA circulante e em tecido tumoral dos mesmos pacientes. Este estudo avaliou a expressão dos miRNAs da família miR-17-92, e demonstrou que o miRNA-18a pode ser um bom biomarcador de diagnóstico e prognóstico (Morimura *et al.*, 2011).

No presente estudo nós avaliamos seis miRNAs, escolhidos de acordo com dados prévios da literatura em que se observou alguma associação positiva destes com ADP, dos quais cinco são descritos como superexpressos em tecidos tumorais pancreáticos (miR-21, -155, -196a, -200b e -376a) e um é frequentemente descrito como subexpresso (miR-34a). Embora a expressão de todos os miRNAs estudados tenha sido maior no tecido pancreático tumoral do que no tecido não-tumoral adjacente, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Diversas razões podem explicar esses achados. O tamanho amostral é uma limitação e, apesar de todos os esforços, é um problema comum em pesquisas com doenças raras. A alta heterogeneidade não só do tumor, como também do tecido pancreático que contém, além das células ductais (que dão origem ao ADP), ácinos, estroma e células inflamatórias em abundância (Kent *et al.*, 2009), embasa a justificativa para achados distintos entre diferentes grupos de pesquisa. De fato, não há uma concordância absoluta sobre os níveis de expressão de miRNAs entre os estudos já publicados, e muitos deles relatam diferenças significativas, inclusive para alguns miRNAs avaliados pelo nosso estudo, como o miR-21 e o miR-34a (Lee *et al.* 2006; Bloomston *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009; Szafranska *et al.* 2007; Bloomston *et al.* 2007; Kent *et al.* 2009; Ji *et al.* 2009).

A heterogeneidade intratumoral tem sido alvo de intensas investigações, e sabe-se que tal característica dos tumores tem um importante papel inclusive na resistência a drogas e falhas no tratamento, uma vez que parte das

descobertas científicas e mesmo as decisões terapêuticas são baseadas na análise de apenas um fragmento do tumor. Em um elegante estudo publicado em 2012, Gerlinger e colaboradores analisaram biópsias múltiplas de carcinomas renais metastáticos de quatro pacientes diferentes. O estudo mostrou que 63 a 69% de todas as mutações somáticas encontradas tinham uma distribuição heterogênea no tumor, não sendo encontradas em todas as regiões analisadas, demonstrando que uma única biópsia tumoral revela apenas uma mínima parcela de todas as alterações genéticas presentes em um tumor.

Em amostras de soro, nosso estudo demonstrou que tanto miR-21 e miR-34a são capazes de distinguir corretamente pacientes com e sem ADP, com sensibilidade e especificidade bastante satisfatórias. O miR-21 já havia sido descrito como bom biomarcador circulante em ADP em amostras de plasma (Wang *et al.*, 2009) e, mais recentemente, em amostras de soro (Kong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Por outro lado, o miR-34 nunca havia sido descrito em amostras circulantes e, como demonstramos, existe uma significativa correlação entre os níveis de miR-21 e de miR-34a, tanto no soro quanto em tecido tumoral de pacientes com ADP. Tal correlação, no entanto, não foi vista quando comparamos amostras de tecido e soro do mesmo paciente para cada um dos dois miRNAs separadamente. Ou seja, embora os níveis de expressão de miR-21 e miR-34 pareçam estar correlacionados entre si tanto no tecido pancreático quanto no soro, quando cada um dos miRNA é avaliado separadamente nos dois tecidos pareados, não se observa uma correlação. Uma revisão da literatura nos mostra que outros investigadores já demonstraram que miRNAs circulantes diferencialmente expressos não apresentavam níveis de expressão similares no tecido, quando comparadas diferentes amostras biológicas do mesmo paciente. Um estudo realizado com amostras de pacientes com carcinoma renal mostrou que, quando comparadas amostras de soro e tecido de cada indivíduo, com a finalidade de identificar novos biomarcadores de diagnóstico tecido-específico, apesar de uma média de 109 miRNAs se mostrarem diferencialmente expressos no soro, apenas 36 deles apresentavam expressão equivalente no tecido (Wulfken *et al.*, 2011). Resultado similar também foi encontrado em um estudo com linhagens celulares, que mostrou que a liberação de miRNAs não necessariamente

reflete a abundância vista na célula de origem, e que alguns miRNAs encontrados em altos níveis no meio extracelular por vezes apresentavam valores de expressão menores nas células de origem. O estudo também apresentou evidências que reforçam a teoria de que miRNAs podem ser seletivamente liberados pelas células, e destaca ainda que os miRNAs extracelulares devem ser considerados independentes da abundância vista nas células/tecido de origem, quando analisados como biomarcadores de doença (Pigati *et al.*, 2010).

Uma vez que nosso estudo é o primeiro a comparar a expressão de miRNAs em soro e tecido tumoral pancreático de amostras pareadas, e também é o primeiro a descrever miR-34a como potencial biomarcador de diagnóstico em soro, é importante que estas análises sejam repetidas em outras séries e com um número maior de pacientes. Além disso, estudos adicionais devem ser realizados para melhorar a nossa compreensão acerca dos mecanismos de regulação da expressão de miRNAs em diferentes compartimentos.

CAPÍTULO VII CONCLUSÕES

Considerando os miRNAs por nós avaliados e os resultados encontrados no presente estudo, podemos concluir que:

- a. Os miRNAs miR-34a, -155, -196a, -200b e -376a estão presentes em níveis muito baixos em amostras de saliva, tanto de pacientes com ADP quanto de pacientes sem doença pancreática.
- b. Não há diferença de expressão significativa dos miRNAs miR-21, -34a, -155, -196a, -200b e -376a em amostras de saliva, quando comparadas amostras de pacientes com ADP e controles sem doença pancreática.
- c. Há diferença significativa dos níveis de expressão de miR-21 e miR-34a em amostras de soro entre pacientes com e sem ADP ($P < 0.001$ e $P = 0,001$, respectivamente), indicando que estes possam ser biomarcadores de diagnóstico não-invasivo do ADP.
- d. Há uma correlação positiva entre os níveis de expressão de miR-21 e miR-34a, tanto em amostras de soro ($P_{rs} < 0,001$; $P_{kappa} = 0,022$) quanto em amostras de tecido ($P_{rs} < 0,001$; $P_{kappa} < 0,001$).
- e. Não foi observada associação significativa entre os níveis de expressão dos miRNA miR-21, -34a, -155, -196a, -200b e -376a e características clínicas do grupo de pacientes incluídos neste estudo, quando analisadas amostras de tecido.
- f. A expressão de miR-200b em amostras de soro apresentou uma associação significativa com a localização ($P = 0,029$) e limítrofe com o grau de diferenciação do tumor ($P = 0,057$).
- g. Devido à reconhecida heterogeneidade tumoral e à grande variabilidade na expressão dos miRNAs, tamanhos amostrais maiores e análises equivalentes em séries distintas devem ser realizadas para

validar os achados deste estudo e confirmar o poder de discriminação dos miRNAs de indivíduos com e sem ADP.

- h. Diferentes mecanismos que regulam a expressão de miRNAs podem estar atuando em diferentes compartimentos do corpo, sendo necessários estudos adicionais para melhor entendimento dos determinantes de expressão de miRNAs.

CAPÍTULO VIII PERSPECTIVAS

Como perspectivas e sugestões de análises adicionais destacamos as seguintes:

- Aumentar o tamanho amostral do grupo de amostras de tecido, e incluir amostras de tecido pancreático normal (de pacientes sem nenhuma doença pancreática);
- Aumentar o tamanho amostral do grupo de amostras de soro, especialmente em relação aos controles sem doença pancreática;
- Comparar a sensibilidade e especificidade diagnóstica do miR-21 e miR34a no soro com o marcador atualmente utilizado, CA19-9;
- Investigar se os níveis de expressão de miR-21 e miR-34a estão alterados em outras doenças incluídas no diagnóstico diferencial do ADP, como por exemplo, pancreatite crônica;
- Investigar se os níveis de expressão de miR-21 e miR-34a discriminam pacientes com e sem lesões precursoras do ADP, como NIPM e NIPan;
- Investigar os possíveis mecanismos através dos quais os níveis de expressão de miR-21 e miR34a se correlacionam; através de estudos *in vitro* com inibidores de miRNA.

Referências Bibliográficas

Albulescu R, Neagu M, Albulescu L, Tanase C (2011) Tissue and soluble miRNAs for diagnostic and therapy improvement in digestive tract cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 11: 101 - 20.

American Cancer Society (2013). Disponível em:<http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-key-statistics>. (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Ardengh JC, Coelho N, Osvaldt AB (2008) Câncer de pâncreas em fase inicial: é possível identificá-lo através dos instrumentos científicos e propedêuticos atualmente disponíveis? *Arquivos de Gastroenterologia* 45: 169 - 177

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, *et al.* (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *PNAS* 108: 5003–5008

Bardeesy N e DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* 2: 897 – 909

Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell Reviews* 116: 281 – 297

Batty GD, Kivimaki M, Morrison D, *et al.* (2009) Risk factors for pancreatic cancer mortality: extended follow-up of the original Whitehall Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:673-5.

Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, *et al.* (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297: 1901 – 1908

Brooks MI, Jianghua W, Li Y, Zhang R, Elashoss D, *et al.* (2008) Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Mol Med Report.* 1: 375–378

Calhoun ES, Hucl T, Gallmeier E, West KM, Arking DE, *et al.* (2006) Identifying Allelic Loss and Homozygous Deletions in Pancreatic Cancer without matched Normals Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res* 66: 7929 : 7928

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, *et al.* (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 99: 15524–15529

Carthew RW e Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642 – 655

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, *et al.* (2007) Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell* 26: 745 – 752

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, *et al.* (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18: 997 – 1006

DataSus (2010). Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10rs.def>> (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M (2008) MicroRNA-21 is Overexpressed in Pancreatic Cancer and a Potential Predictor of Survival. *J Gastrointest Surg* 12:2171–2176

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, *et al.* (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3627–3632

Esquela-Kerscher A e Slack FJ (2006) Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6: 259 – 269

Franzmann EJ, Reategui EP, Carraway KL, Hamilton KL, Weed DT, *et al.* (2005) Salivary Soluble CD44: A Potential Molecular Marker for Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14: 735 – 739

Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE* 7: 1 – 5

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math J, Larkin J, *et al.* (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregional sequencing. *N Engl J Med* 366: 883 – 891

Goggins M, Hruban RH, Kern SE (2000) BRCA2 Is Inactivated Late in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Evidence and Implications. *American Journal of Pathology* 156: 1767 – 1771

Goonetilleke KS, Siriwardena AK (2007) Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 33: 266 – 270

Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, *et al.* (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer.* 126: 73-80

Harada T, Okita K, Shiraishi K, Kusano N, Kondoh S, *et al.* (2002) Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Research* 62: 835 – 839

Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, *et al.* (2009) A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Medicine* 6: 1 – 6

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, *et al.* (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:19075–19080

Hermeking H (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2: 193 – 199

Herrerros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L (2013) Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 418: 22 – 29

Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605 – 1617

Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE (2000) Genetic progression in the pancreatic ducts. *American Journal of Pathology* 156: 1821 – 1825

Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, *et al.* (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS ONE* 5: 1 – 12

Inca (2003). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/>> (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Inca (2010). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>>. (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, *et al.* (2012) MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 18: 534 – 545

Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Meng Y, *et al.* (2009) MicroRNA-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS ONE* 4: 1 -13

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JCH, Leary RJ, *et al.* (2008) Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321: 1801–1806

Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, López-Romero P, Tan AC, *et al.* (2009) A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 8: 2013 – 2024

Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, *et al.* (2011) Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 56: 602 – 609

Kosaka N, Iguchi H, Ochiga T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science* 101: 2087 - 2092.

LaFemina J, Katabi N, Klimstra D, Correa-Gallego C, Gaujoux S, *et al.* (2013) Malignant Progression in IPMN: A Cohort Analysis of Patients Initially Selected for Resection or Observation. *Ann Surg Oncol.* 20:440 – 447

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.

Landi S. (2009) Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: a review of the literature. *Mutat Res* 681:299-307.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, *et al.* (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 141: 672 – 675

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR *et al.* (2006) Expression profile identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120: 1046 – 1054

Lee, RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee YH e Wong DT (2009) Saliva: an emerging biofluid for early detection of disease. *Am J Dent* 22: 241 – 248

Lee, RC e Ambros V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets *Cell* 120: 15 – 20

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzesse (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049 – 1057

Li Y, St. John MAR, Zhou X, Kim Y, Sinha U, *et al.* (2004) Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research* 10: 8442–8450

Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, *et al.* (2012) Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clinical Chemistry* 58: 610 – 618

Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, *et al.* (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7: 2591-2600

Lowenfels AB, Maisonneuve P. (2006) Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:197-209

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature Letters* 435: 834 – 838

Luttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, *et al.* (2001) Allelic Loss Is Often the First Hit in the Biallelic Inactivation of the p53 and DPC4 Genes During Pancreatic Carcinogenesis. *American Journal of Pathology* 158: 1677 – 1683

Ma R, Jiang T, Kang X (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exper Clin Cancer Res* 21: 1 – 9

Maser RS e DePinho RA (2002) Connecting Chromosomes, Crisis and Cancer. *Science* 297: 565 – 569

Mayo SC, Austin DF, Sheppard BC, Mori M, Shipley DK, *et al.* (2009) Evolving preoperative evaluation of patients with pancreatic cancer: does laparoscopy have a role in the current era? *J Am Coll Surg* 208:87-95

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS* 105: 10513 – 10518

Ministério da saúde (2003). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421> (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura, *et al.* (2011) Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 105: 1733 – 1740

Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, *et al.* (2009) Micro-RNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 8: 1067 – 1074

National Cancer Data Base (2010). Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-survival-rates>> (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Neuzillet C, Sauvanet A, Hammel P (2011) Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Visceral Surgery* 148: e232 – e243

Nilsen, TW (2007) Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in Genetics* 23: 243 – 249

Olive KO, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, *et al.* (2009) Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* 324: 1457 – 1461

Papaconstantinou IG, Lykoundis PM, Gazouli M, Manta A, Polymeneas G, Voros D (2012) A review on the role of microRNA in biology, diagnosis and treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 41: 671 – 677

Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic BA, *et al.* (2009) Salivary microRNA: discovery, characterization and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Research* 15: 5473 – 5477

Patel RS, Jakymiw A, Yao B, Pauley BA, Carcamo WC, *et al.* (2011) High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Archives of Oral Biology* 56: 1506 – 1513

Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, *et al.* (2010) Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE* 5: 1 – 13

Rachagani S, Kumar S, Batra S (2010) MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Letters* 292: 8 – 16

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, *et al.* (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148: 349 – 361

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, *et al.* (1997) Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 57: 1731 – 1734

Ruan K, Fang X e Ouyang G (2009) MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters* 285: 116 – 126

Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG *et al.* (2010) Aberrant microRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 10: 66 – 73

Samuel N e Hudson TJ (2012) The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9: 77 – 87

Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128: 1606 – 1625

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (2004) Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421> (Acessado em 02 de fevereiro de 2013)

Sempere LF e Kauppinen S. Translational implications of microRNAs in clinical diagnostic and therapeutics. In: Bradshaw RA e Dennis EA, editors, *Handbook of Cell Signaling* 2nd Edition. Oxford: Academic Press, 2009, pp. 2965 – 2981.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer Statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10 – 29

Steinberg W. The clinical utility of the CA19-9 tumor associated antigen. *Am J Gastroenterology*. 85 94, 350-355 (1990)

Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, *et al.* (2000) The Presence of Soluble c-erbB-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma: A preliminary Study. *Clinical Cancer Research* 6: 2363–2370

Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, *et al.* (2007) Micro-RNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26: 4442 – 4452

Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, *et al.* (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massive parallel sequencing. *Cell Cycle* 6: 1586 – 1593

Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B (2012) Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences* 37: 460 – 465

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13: 423 – 433

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049 – 1057

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, *et al.* (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2257–2261

Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, *et al.* (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2: 807 – 813

Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. (1992) Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; 326:455-65

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, *et al.* (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS ONE* 6: 1 – 7

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Sumida K, Deguchi Y, *et al.* (2012) Circulating MicroRNAs in Serum of Human K-ras Oncogene Transgenic Rats With Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Pancreas* 41: 1013 – 1018

Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, *et al.* (2010) Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 138: 949 – 957

Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, *et al.* (2009) Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 33: 698 – 709

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Casos

**BIOMARCADORES EM CÂNCER DE PÂNCREAS: ESTUDOS GENÔMICOS E
PROTEÔMICOS EM MATERIAL BIOLÓGICO**

Pesquisadores: Patricia Izetti, Bárbara Alemar, Alessandro Bersch Osvaldt, Gabriel Macedo, Cleandra Gregório Silva, Úrsula Matte, Patrícia Ashton-Prolla

**Consentimento Informado para Armazenamento de Material Biológico e Estudos
Moleculares em Pacientes com Doenças do Pâncreas**

O Grupo de Oncogenética e Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre estão realizando um estudo para procurar novas alternativas para o diagnóstico de doenças do pâncreas. Nesse estudo serão avaliados materiais biológicos de pessoas com e sem doenças pancreáticas. Por meio deste estudo, convidamos pessoas com alterações no pâncreas a doar um ou mais dos seguintes materiais: sangue, tecido pancreático (uma pequena parte do pâncreas que poderá ser retirada durante a cirurgia) e saliva dos quais serão extraídos DNA, RNA e proteínas (material genético e proteômico). A partir do estudo deste material, pretendemos correlacionar os achados moleculares a fim de identificar marcadores associados ao desenvolvimento de doenças do pâncreas. Isso poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias que visem a detecção e o manejo precoce dessas doenças.

Este material será estocado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e poderá ser utilizado para futuros estudos sobre fatores genéticos associados a diversas doenças do pâncreas. Os dados pessoais e clínicos constantes do prontuário dos participantes serão digitados em um banco de dados e mantidos sob sigilo. Todas as análises laboratoriais serão realizadas sem identificação nominal das pessoas. A quantidade de tecido pancreático e sangue doado para estes estudos não irão prejudicar sua saúde.

Se você desejar participar do estudo, quaisquer perguntas que você tiver em relação às coletas e aos procedimentos que serão feitos no futuro serão respondidas por membros da equipe de cirurgia que está lhe acompanhando ou por membros da equipe de pesquisa. Se você não desejar participar do estudo, a sua decisão não afetará seu acompanhamento médico ou cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se você deseja participar e concorda em doar estes materiais para pesquisa, por favor, responda às perguntas a seguir:

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa:
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

MC 100162

1. Você concorda que as suas amostras obtidas neste estudo sejam armazenadas e utilizadas neste estudo sobre doenças de pâncreas?

sim não

2. Você quer ser informado sobre os resultados destes estudos?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta pergunta, será avisado sobre qualquer informação obtida neste estudo.

3. Se você respondeu "sim" à pergunta anterior, e por alguma razão estiver impossibilitado de receber estes resultados, você deseja que estes sejam transmitidos a alguma pessoa próxima a você?

sim (neste caso, indicar nome e telefone _____)

não

4. Você concorda que suas amostras sejam armazenadas para uso futuro em outras pesquisas não relacionadas a doenças do pâncreas?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta questão, será contatado para conceder ou não sua autorização para o uso do material biológico doado na realização de novos estudos, bem como o será para receber os resultados dos mesmos, caso assim deseje.

5. Você concorda que suas amostras sejam enviadas para centros de pesquisa no exterior, para realização de análises complementares?

sim não

As amostras serão enviadas sem identificação, e os resultados obtidos não trarão benefício direto para você.

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo. O período de armazenamento é de 5 anos, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia, e neste caso as suas amostras serão destruídas. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados pessoais ou a liberação de amostras identificadas ou resultados para terceiros sem a sua autorização por escrito. Se publicados em revistas científicas, os resultados desse estudo serão apresentados de forma anônima, sem identificação dos participantes.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

ME 100162

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Casos

**BIOMARCADORES EM CÂNCER DE PÂNCREAS: ESTUDOS GENÔMICOS E
PROTEÔMICOS EM MATERIAL BIOLÓGICO**

Pesquisadores: Patrícia Izetti, Bárbara Alemar, Alessandro Bersch Osvaldt, Gabriel Macedo, Cleandra Gregório Silva, Úrsula Matte, Patrícia Ashton-Prolla

**Consentimento Informado para Armazenamento de Material Biológico e Estudos
Moleculares em Pacientes com Doenças do Pâncreas**

O Grupo de Oncogenética e Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre estão realizando um estudo para procurar novas alternativas para o diagnóstico de doenças do pâncreas. Nesse estudo serão avaliados materiais biológicos de pessoas com e sem doenças pancreáticas. Por meio deste estudo, convidamos pessoas com alterações do pâncreas a doar sangue e saliva dos quais serão extraídos DNA, RNA e proteínas (material genético e proteômico). A partir do estudo deste material, pretendemos correlacionar os achados moleculares a fim de identificar marcadores associados ao desenvolvimento de doenças do pâncreas. Isso poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias que visem a detecção e o manejo precoce dessas doenças.

Este material será estocado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e poderá ser utilizado para futuros estudos sobre fatores genéticos associados a diversas doenças do pâncreas. Os dados pessoais e clínicos constantes do prontuário dos participantes serão digitados em um banco de dados e mantidos sob sigilo. Todas as análises laboratoriais serão realizadas sem identificação nominal das pessoas. A quantidade de saliva e sangue doado para estes estudos não irão prejudicar sua saúde.

Se você deseja participar do estudo, quaisquer perguntas que você tiver em relação às coletas e aos procedimentos que serão feitos no futuro serão respondidas por membros da equipe de cirurgia que está lhe acompanhando ou por membros da equipe de pesquisa. Se você não deseja participar do estudo, a sua decisão não afetará seu acompanhamento médico ou cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se você deseja participar e concorda em doar estes materiais para pesquisa, por favor, responda às perguntas a seguir:

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

VW 100163

1. Você concorda que as suas amostras obtidas neste estudo sejam armazenadas e utilizadas neste estudo sobre doenças de pâncreas?

sim não

2. Você quer ser informado sobre os resultados destes estudos?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta pergunta, será avisado sobre qualquer informação obtida neste estudo.

3. Se você respondeu "sim" à pergunta anterior, e por alguma razão estiver impossibilitado de receber estes resultados, você deseja que estes sejam transmitidos a alguma pessoa próxima a você?

sim (neste caso, indicar nome e telefone _____)

não

4. Você concorda que suas amostras sejam armazenadas para uso futuro em outras pesquisas não relacionadas a doenças do pâncreas?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta questão, será contatado para conceder ou não sua autorização para o uso do material biológico doado na realização de novos estudos, bem como o será para receber os resultados dos mesmos, caso assim deseje.

5. Você concorda que suas amostras sejam enviadas para centros de pesquisa no exterior, para realização de análises complementares?

sim não

As amostras serão enviadas sem identificação, e os resultados obtidos não trarão benefício direto para você.

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo. O período de armazenamento é de 5 anos, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia, e neste caso as suas amostras serão destruídas. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados pessoais ou a liberação de amostras identificadas ou resultados para terceiros sem a sua autorização por escrito. Se publicados em revistas científicas, os resultados desse estudo serão apresentados de forma anônima, sem identificação dos participantes.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

INE 10.0162

Para que se cumpram os efeitos legais, o presente documento composto de três páginas foi elaborado em duas vias de igual teor, ambas firmadas e rubricadas pelos envolvidos (paciente e pesquisador) abaixo identificados.

Declaro que li e compreendi as informações acima, e recebi uma via assinada e rubricada deste documento. Declaro, ainda, que tive minhas dúvidas esclarecidas por

Nome do entrevistador Assinatura do entrevistador

Ass. _____
Assinatura do paciente

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____ Data: _____

Testemunha: _____
Nome e assinatura

Data: _____

Pesquisadores responsáveis: Em caso de dúvida os pesquisadores e o comitê de ética poderão fornecer esclarecimentos. Telefones para contato: Pesquisadores → Dr. Alessandro Osvaldt, Dra Patricia Ashton-Prolla, Dra. Patrícia Izetti e mestranda Bárbara Alemar: (51) 3359-7661
Comitê de Ética HCPA (51) 3359-8304.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisas
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29/03/2012

WK 100162

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controles (sangue e saliva)

ANEXO IV

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

BIOMARCADORES EM DOENÇAS DO PÂNCREAS: ESTUDOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS EM MATERIAL BIOLÓGICO

Pesquisadores: Patricia Izetti, Bárbara Alemar, Alessandro Bersch Osvaldt, Gabriel Macedo, Cleandra Gregório Silva, Úrsula Matte, Patricia Ashton-Prolla

Consentimento Informado para Armazenamento e Estudos Moleculares em Material Biológico de Pacientes sem Doenças do Pâncreas

O Grupo de Oncogenética e Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre estão realizando um estudo para procurar novas alternativas para o diagnóstico de doenças do pâncreas. Nesse estudo serão avaliados materiais biológicos de pessoas com e sem doença do pâncreas. Você está sendo convidado para participar desse estudo porque não tem nenhuma doença neoplásica do pâncreas. O estudo envolve a coleta de sangue e saliva para análises de marcadores genéticos e de proteínas. A partir do estudo deste material, pretendemos correlacionar os achados moleculares em materiais biológicos de pacientes saudáveis, pacientes com pancreatite crônica e pacientes câncer de pâncreas, a fim de identificar marcadores associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas benignas e malignas. Isso poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias que visem a detecção e o manejo precoce das doenças do pâncreas.

Este material será estocado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e poderá ser utilizado para futuros estudos sobre fatores genéticos associados a diversas doenças do pâncreas. Os dados pessoais e clínicos constantes do prontuário dos participantes serão digitados em um banco de dados e mantidos sob sigilo. Todas as análises laboratoriais serão realizadas sem identificação nominal das pessoas. A quantidade de saliva e sangue doado para estes estudos não irão prejudicar sua saúde.

Se você deseja participar do estudo, quaisquer perguntas que você tiver em relação às coletas e aos procedimentos que serão feitos no futuro serão respondidas por membros da equipe de cirurgia que está lhe acompanhando ou por membros da equipe de pesquisa. Se você não deseja participar do estudo, a sua decisão não afetará seu acompanhamento médico ou cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se você deseja participar e concorda em doar estes materiais para pesquisa, por favor, responda às perguntas a seguir:

Rubrica do paciente

Rubrica do pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29/03/2012

MC 100162

1. Você concorda que as suas amostras obtidas neste estudo sejam armazenadas e utilizadas neste estudo sobre doenças de pâncreas?

sim não

2. Você quer ser informado sobre os resultados destes estudos?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta pergunta, será avisado sobre qualquer informação obtida neste estudo.

3. Se você respondeu "sim" à pergunta anterior, e por alguma razão estiver impossibilitado de receber estes resultados, você deseja que estes sejam transmitidos a alguma pessoa próxima a você?

sim (neste caso, indicar nome e telefone _____)

não

4. Você concorda que suas amostras sejam armazenadas para uso futuro em outras pesquisas não relacionadas a doenças do pâncreas?

sim não

Se você respondeu "sim" a esta questão, será contactado para conceder ou não sua autorização para o uso do material biológico doado na realização de novos estudos, bem como o será para receber os resultados dos mesmos, caso assim deseje.

5. Você concorda que suas amostras sejam enviadas para centros de pesquisa no exterior, para realização de análises complementares?

sim não

As amostras serão enviadas sem identificação, e os resultados obtidos não trarão benefício direto para você.

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo. O período de armazenamento é de 5 anos, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia, e neste caso as suas amostras serão destruídas. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados, você pode mudar de idéia a qualquer momento. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados pessoais ou a liberação de amostras identificadas ou resultados para terceiros sem a sua autorização por escrito. Se publicados em revistas científicas, os resultados desse estudo serão apresentados de forma anônima, sem identificação dos participantes.

Para que se cumpram os efeitos legais, o presente documento composto de três páginas foi elaborado em duas vias de igual teor, ambas firmadas e rubricadas pelos envolvidos (paciente e pesquisador) abaixo identificados.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPQ/HCPA

VERSÃO APROVADA

29/03/2012

MC 100162

Declaro que li e compreendi as informações acima, e recebi uma via assinada e rubricada deste documento. Declaro, ainda, que tive minhas dúvidas esclarecidas por

Nome do entrevistador Assinatura do entrevistador

Ass. _____
Assinatura do paciente

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____ Data: _____

Testemunha: _____
Nome e assinatura

Data: _____

Pesquisadores responsáveis: Em caso de dúvida os pesquisadores e o comitê de ética poderão fornecer esclarecimentos. Telefones para contato: Pesquisadores → Dr. Alessandro Osvaldt, Dra Patricia Ashton-Prolla, Dra. Patrícia Izetti e mestranda Bárbara Alamar: (51) 3359-7661
Comitê de Ética HCPA (51) 3359-8304.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

NE 102162

Cartas de aprovação do projeto – CEP HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100162

Versão do Projeto: 17/06/2010

Versão do TCLE: 17/06/2010

Pesquisadores:

ALESSANDRO BERSCH OSVALDT
PATRICIA LISBOA IZETTI RIBEIRO
GUILHERME BALDO
GABRIEL DE SOUZA MACEDO
VIVIAN PIERRI BERSCH
BARBARA ALEMAR BESERRA
GILBERTO SCHWARTSMANN
URSULA DA SILVEIRA MATTE
PATRICIA ASHTON PROLLA

Título: BIOMARCADORES EM CÂNCER DE PÂNCREAS: ESTUDOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS EM MATERIAL BIOLÓGICO

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 01 de julho de 2010.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110510

Pesquisador Responsável

PATRICIA ASHTON PROLLA

Título: MicroRNAs em Adenocarcinoma Ductal Pancreático: Novos Biomarcadores de Diagnóstico e Prognóstico

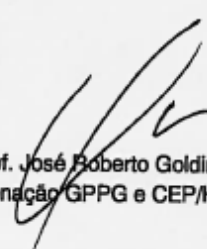
NOVA VERSÃO DO PROJETO

Data da Versão:

28/08/2012

Este documento referente ao projeto acima foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 14 de setembro de 2012.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenação GPPG e CEP/HCPA