

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA – UNIMAR

MATHEUS BENTO MEDEIROS MOSCATEL

**EXPRESSÃO DOS MIR-148a E MIR-155 ASSOCIADOS AO MECANISMO DE  
APOPTOSE NO CÂNCER DE PÂNCREAS**

MARÍLIA - SP

2021

MATHEUS BENTO MEDEIROS MOSCATEL

**EXPRESSÃO DOS MIR-148a E MIR-155 ASSOCIADOS AO MECANISMO DE  
APOPTOSE NO CÂNCER DE PÂNCREAS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado Interdisciplinar em Interações  
Estruturais e Funcionais na Reabilitação, da  
Universidade de Marília – UNIMAR – Marília –  
SP.

Orientador:  
Prof. Dr. Paulo Cezar Novais

Co-orientadora:  
Prof. Dra. Cláudia Rucco Penteado Detregiachi

MARÍLIA

2021

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: Matheus Bento Medeiros Moscatel

Comitê de Ética em Pesquisa em humanos

Protocolo nº: 4910/2008

Data: 30/03/2009

Moscatel Bento Medeiros, Matheus

Expressão dos miR-148a e miR-155 associados ao mecanismo de apoptose no câncer de pâncreas / Matheus Bento Medeiros Moscatel. - Marília: UNIMAR, 2021.

XXXf.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação – Reabilitação do Sistema Estomatognático) – Universidade de Marília, Marília, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Cezar Novais

1. Adenocarcinoma Pancreático 2. miRNA 3. RT-PCR.

Moscatel Bento Medeiros, Matheus

MATHEUS BENTO MEDEIROS MOSCATEL

**EXPRESSÃO DOS MIR-148a E MIR-155 ASSOCIADOS AO MECANISMO DE APOPTOSE NO CÂNCER DE PÂNCREAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração Reabilitação do Sistema Estomatognático.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Novais

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Coordenação do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação

Considerações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dedico a realização desse trabalho a minha família, amigos, em especial minha esposa, por todo o apoio durante essa jornada. E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram ou motivaram desde o início da caminhada do programa de pós-graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as oportunidades a mim oferecidas e por sempre me fortalecer nesta caminhada.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cezar Novais, por toda a atenção desprendida, profissionalismo, paciência, dedicação e preocupação com todos os detalhes da formulação desta dissertação.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Cláudia Rucco Penteadó Detregiachi pelo comprometimento e parceria.

À minha família, em particular, aos meus pais por toda a ajuda neste percurso profissional, por sempre acreditarem e estarem ao meu lado nas tomadas de decisões e realizações profissionais e pessoais.

À minha esposa, Bruna, por sempre acreditar em meu potencial para a realização de meu mestrado, sempre me incentivar a continuar e dar o meu melhor, e principalmente me apoiar e ajudar sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. José Sebastião dos Santos, chefe da Divisão da Cirurgia Digestiva, que generosamente cedeu as amostras dos pacientes, e em nome da Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, agradecer a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, pelo suporte técnico deste trabalho.

A todos os colegas e amigos, que com palavras de encorajamento, sempre me mantiveram com ânimo e energia para encarar os diversos percalços nesta caminhada de formação acadêmica.

*A dúvida é o princípio da sabedoria.*

*Aristóteles*

---

## EXPRESSÃO DOS MIR-148a E MIR-155 ASSOCIADOS AO MECANISMO DE APOPTOSE NO CÂNCER DE PÂNCREAS

### RESUMO

O adenoma pancreático (AP) está presente em 90% das neoplasias pancreáticas. Deve-se levar em consideração fatores de risco como: faixa etária, gênero, e etnia, entre outros para o acometimento de lesões cancerígenas. A maioria dos pacientes com AP, no momento do diagnóstico, apresenta doença localmente avançada ou com metástases à distância. A ressecabilidade do AP, em geral, é inferior a 20% e as taxas de incidência anual são equivalentes às de mortalidade, o que confere uma sobrevida menor que 5% dos casos em cinco anos. Os miRNAs são RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, são pequenas moléculas endógenas e atuam controlando a expressão gênica em diversos processos patológicos, como a degeneração neurológica, doenças autoimunes, processos inflamatórios, diabetes e câncer. O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão dos miRNAs-148a e -155 no adenocarcinoma pancreático. Foram analisadas a expressão gênica do miRNA-148a e miRNA-155 em 10 amostras de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pancreático provenientes de ressecções cirúrgicas e 5 amostras controles provenientes de doadores saudáveis, pela técnica RT-PCR. Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, podemos concluir que embora não tenha ocorrido uma diferença estatística significativa entre os grupos, pode-se observar nos gráficos, uma menor expressão do miRNA-148a pró-apoptótico, no grupo AP quando comparado com grupo controle, o que pode contribuir assim, com o aumento da malignidade desse tipo de câncer.

**Palavras-chave:** Adenocarcinoma pancreático, miRNA, RT-PCR.

---

---

## EXPRESSION OF MIR-148a AND MIR-155 ASSOCIATED WITH THE APOPTOSIS MECHANISM IN PANCREATIC CANCER

### ABSTRACT

Pancreatic adenoma (PA) is present in 90% of pancreatic neoplasms. Risk factors such as: age group, gender, and ethnicity, among others, for the onset of cancerous lesions must be taken into account. Most patients with PA, at the time of diagnosis, have locally advanced disease or distant metastases. The resectability of the AP, in general, is less than 20% and the annual incidence rates are equivalent to those of mortality, which results in a survival rate of less than 5% of cases in five years. miRNAs are non-coding RNAs (ncRNAs) made up of 19 to 25 nucleotides, are small endogenous molecules and act by controlling gene expression in several pathological processes, such as neurological degeneration, autoimmune diseases, inflammatory processes, diabetes and cancer. The aim of the present work was to analyze the expression of miRNAs-148a and -155 in pancreatic adenocarcinoma. We analyzed the gene expression of miRs-148a and -155 in 10 samples from patients diagnosed with pancreatic adenocarcinoma from surgical resections and 5 control samples from healthy donors, using the RT-PCR technique. Based on the results obtained in our work, we can conclude that although there was no statistically significant difference between the groups, it can be observed in the graphics, a lower expression of pro-apoptotic miRNA-148a in the AP group when compared to the control group, which can thus contribute to the increase in the malignancy of this type of cancer.

**Keywords:** Pancreatic adenocarcinoma, miRNA, RT-PCR.

---

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Representação do cálculo do  $\Delta CT$  e  $\Delta\Delta CT$  para a obtenção da quantificação da expressão dos miRNAs em estudo (fold).....36

**Figura 2** – Aparelho utilizado para a leitura de PCR em tempo real.....37

## **LISTA DE GRÁFICOS**

**Gráfico 1** – Representação da expressão gênica tecidual do miRNA-148a.....41

**Gráfico 2** – Representação da expressão gênica tecidual do miRNA-155.....42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP- Adenosina difosfato;  
AP-Adenocarcinoma do pâncreas;  
ATP- Adenosina Trifosfato;  
Bcl-xl–B-celllymphoma-extra large;  
CCKBR - cholecystokinin-B receptor;  
Cdna-DNA complementar;  
CD95-Fas/APO-1;  
CEMEL-Centro de Medicina Legal;  
CT – thresholdcycles;  
DEPC – dimetilpirocarbonato;  
DGCR8 – DiGeorgesyndromecriticalregion 8;  
Dicer-RNase III endonuclease;  
DISC - complexo de sinalização indutor de morte;  
DNA-ácido desoxirribonucleico;  
dNTP's-Desoxirribonucleotídeos Fosfatados;  
DR5 – Death receptor 5;  
Drosha-Drosha Ribonuclease III;  
FMRP-USP-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;  
HCFMRP-USP-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;  
JAK-STAT–Janus kinase-signal transducer randactivatoroftranscription;  
JAKquinase - TOFACITINIBE;  
mRNA – RNA mensageiro;  
miRNA – MicroRNA;  
NcRNA-RNA não-codificante;  
RT-PCR–PCR quantitativo em tempo real;  
PBS – phosphate-buffered saline;  
Pri-miRNA - miRNAs primários;  
PpENK–proenkephalin gene;  
RIP–Receptor-interacting protein;

RISC-complexo silenciador induzido pelo RNA;

RNA-ácido ribonucleico;

SAGE - análise sérica da expressão gênica;

SOCS3–SuppressorOfCytokineSignaling 3;

TNF –Fator de necrose tumoral;

TNFR-1–Tumor necrosisfactor receptor 1;

TNFR-2 – Tumor necrosisfactor receptor 2;

TRADD – TNFRSF1A Associated Via Death Domain;

## LISTA DE GENES

$\beta$ -catenin -  $\beta$ -catenina;

APAF-1 – Apoptotic protease activating factor 1;

TRAIL/Apo2L – Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand;

Bak–BCL2 Antagonist/Killer;

Bax – BCL2 Associated X;

BCL2 –BCL2 Apoptosis Regulator;

BID –BH3 Interacting Domain Death Agonist;

C-myc - MYC proto-oncogene;

Cyclin D1 - ciclina D1;

DNMT1 - DNA metiltransferase 1;

DR4 –Death receptor 4;

ErbB3 – Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3;

FADD – Fas Associated Via Death Domain;

Fas – Fas Cell Surface Death Receptor;

FasL– Fas Ligand;

MEG-3 - maternally expressed gene-3;

MLH1 - Mut L homologue 1;

P53 - proteína de tumor;

PTEN – phosphatase and tensin homolog;

SEL1L – SEL1L Adaptor Subunit of ERAD E3 Ubiquitin Ligase;

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1. Câncer de pâncreas	17
1.2. Apoptose	19
1.3. MiRNA	23
1.4. miRNA e Câncer de pâncreas	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>31</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1. Pacientes	33
4.2. Métodos	33
4.2.1. Extração do RNA	33
4.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) dos miRNAs	34
4.2.3. RT-PCR dos miRNAs	35
4.2.4. Análise Estatística	37
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1. Análise da expressão gênica tecidual dos miRNAs	40
5.1.1. Análise da expressão gênica tecidual do miRNA-148a	40
5.1.2. Análise da expressão gênica tecidual do miRNA-155	40
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de Pâncreas

O pâncreas se encontra na região superior do abdome, andar supramesocólico, de posição retroperitoneal, posteriormente ao estômago. Com relação a divisão do pâncreas, são observadas três partes principais: a cabeça, que está encaixada na concavidade formada pela curva do duodeno, do lado direito do plano sagital mediano, o corpo, e a cauda, que se localiza à esquerda, se relacionando com o baço (NOBESCHI et al., 2012; MOORE & DALLEY, 2007).

O adenoma pancreático (AP) está presente em 90% das neoplasias pancreáticas. Deve-se levar em consideração fatores de risco como: faixa etária, gênero, e etnia, entre outros para o acometimento de lesões cancerígenas (SCHNEIDER & SCHMID, 2003; MIZRAHI et al, 2020).

A maioria dos pacientes com AP, no momento do diagnóstico, apresenta doença localmente avançada ou com metástases à distância. A ressecabilidade do AP, em geral, é inferior a 20% e as taxas de incidência anual são equivalentes às de mortalidade, o que confere uma sobrevida menor que 5% dos casos em cinco anos. Os principais fatores que contribuem para a baixa sobrevida no AP são a biologia tumoral agressiva, o diagnóstico tardio e a baixa eficácia dos tratamentos adjuvantes e cirúrgicos. O tratamento cirúrgico é o único com impacto na sobrevida que é de aproximadamente 23% em 5 anos (YEO et al, 2002; TAKAORI et al, 2004; JEMAL et al, 2007; VIEIRA et al, 2021).

Com relação a exames e técnicas disponíveis para a tomada de diagnóstico ou ainda evidenciação de alterações presentes no pâncreas, como o AP, muito se discute

a respeito de suas características específicas e limitações. Como exames já existentes e difundidos no meio clínico e laboratorial, a ultrassonografia, a ressonância magnética e a biópsia seguem como “padrão ouro” para evidenciação e diagnóstico (NOBESCHI et al., 2012; RUBIN et al., 1985; VIEIRA et al, 2021).

Caso os exames de imagem sejam utilizados, como é o caso da ultrassonografia e da ressonância magnética, a visualização em casos precoces, ou ainda, em casos que as alterações se apresentem a nível de diferenciação celular e/ou tecidual, o diagnóstico acaba por não conseguir uma taxa significativa e obviamente eficiente de diferenciação, já em alterações tardias, que apresentam alteração de volume tecidual, ou ainda danos aos tecidos acometidos, a possibilidade de diagnóstico assertivo tem um aumento (NOBESCHI et al., 2012). Ao se tratar da biópsia, sua maior limitação seria com relação à invasão do procedimento, principalmente em casos de dúvida diagnóstica, em que não se tenha evidências suficientes que viabilizem a utilização deste procedimento (WANG et al., 2020).

A atividade da telomerase é detectada em quase 95% dos casos de AP e não é registrada nos tumores benignos (HIYAMA et al, 1997). Ainda, o papel da metilação do DNA no AP está bem caracterizado mediante supressão do gene ppENK, com propriedades supressoras de crescimento observada em cerca de 90% dos casos. Quando comparados, os tumores pancreáticos maiores e que acometem pacientes idosos possuem uma maior incidência de lócus metilado em relação aos tumores menores, e que acometem pacientes jovens (UEKI et al, 2000; UEKI et al, 2001).

A análise sérica da expressão gênica (SAGE) e dos microarrays de DNA permitem a identificação de genes que podem servir de marcadores para o diagnóstico/prognóstico e alvos terapêuticos (GRESS et al, 1996; CRNOGORAC-JURCEVIC et al, 2002). Todavia, esses estudos ainda são preliminares e estão

iniciando a elucidação dos complexos mecanismos que envolvem a biologia do adenocarcinoma pancreático.

## 1.2. Apoptose

A apoptose, termo utilizado pela primeira vez por Kerr, Wyllie e Currie (1972), é um processo fisiológico e altamente regulado de morte celular programada que está associada a alterações morfológicas e bioquímicas, características das células em organismos multicelulares. (MAJTNEROVÁ & ROUSAR; 2018; XU, LAI & HUA; 2019).

As caspases (cisteino-proteinase-aspártico-ase) são os componentes centrais da resposta apoptótica, constituindo uma grande família de proteínas homólogas entre si, com atividade enzimática que clivam especificamente ligações peptídicas de substrato apropriado, sendo que 11 isoenzimas de caspases foram descritos em humanos (D'ARCY, 2019). A apoptose desempenha papel crucial na patogênese de vários processos patológicos e fisiológicos, a apoptose é um mecanismo que regula a homeostasia nos organismos multicelulares, através de uma manutenção equilibrada, sendo assim, sua interrupção muitas vezes resulta em diversos distúrbios denominados degenerativos, distúrbios autoimunes e câncer (RIEDL & SHI, 2004; ARUMUGAM & RAZIS, 2018; MAJTNEROVÁ & ROUSAR; 2018; XU, LAI & HUA; 2019).

O início do processo apoptótico é dependente da ativação das caspases, sendo que existem duas categorias dessas proteínas, as caspases iniciadoras e as caspases executoras, uma vez detectado um dano celular, as caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) são ativadas a partir de caspases inativas circulantes e passam a ativar caspases executoras de morte celular (caspases 3, 6 e 7), dando início a uma série de eventos

que culminam em fragmentação do DNA através de endonucleases, destruindo assim proteínas nucleares e citoesqueleto, o que resulta em ativação através de ligantes, para células fagocíticas e formação de corpos apoptóticos (POON et al., 2014; ARCY, 2019; NOVAIS et al, 2012).

Existem duas vias principais de apoptose: a via extrínseca e a intrínseca; sendo que a via extrínseca é conhecida também como via iniciadora, mediada por receptores de morte celular, esses receptores encontram-se expressos na membrana da célula que, após a interação com um ligante extracelular emitem sinais de morte para o espaço interno, por meio de seus domínios de morte citoplasmática. Os receptores de membrana envolvido no processo de apoptose pertencem à superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF), cuja ativação depende de dois ligantes principais: TNF e Fas (RIEDL & SHI, 2004; XU, LAI & HUA; 2019; ARCY, 2019).

O TNF e seus receptores, a saber, TNFR-1 e TNFR-2, são responsáveis por iniciar uma das principais vias da apoptose, a via do TNF, através da interação entre TNF e seus receptores que retransmitem o sinal de morte, através de duas proteínas adaptadoras; domínio de morte associado ao receptor de TNF (TRADD) e o domínio associada a Fas (FADD), que efetuam a morte celular pela ação das caspases. Os ligantes de TNF formam homotrímeros que se ligam aos receptores de TNF na membrana, sendo que após a ligação, as proteínas adaptadoras são recrutadas (TRADD, FADD E RIP) para os receptores TNF no lado citoplasmático, interagindo assim com seus receptores. O FADD recruta a procaspase-8, sendo que esta ao se clivar, passa a ser ativada e dá início a fase de execução da morte celular através de um efeito cascata, já que está cliva a pró-caspase-3 tornando-a ativa, uma vez ativada, a caspase-3 que é uma das responsáveis pela execução final da degradação

proteolítica, leva à morte celular (RIEDL & SHI, 2004; XU, LAI & HUA; 2019; ARCY, 2019).

A via mediada por Fas, conhecida por FasL (ligante Fas) é ativada ao se ligar aos receptores Fas, também conhecido como CD95. O FADD associa-se aos receptores Fas e recruta a procaspase-8, receptores Fas, junto com FADD e procaspase-8, formam um complexo de sinalização indutor de morte denominado (DISC) (RIEDL & SHI, 2004; XU, LAI & HUA; 2019).

A via intrínseca da apoptose também conhecida como via mitocondrial, é caracterizada por estímulos que geram diretamente sinais intracelulares, levando à mudanças bioquímicas dentro da célula. Uma vez estimulada a membrana mitocondrial libera o citocromo c, este se liga a APAF-1 e vão se unir à procaspase-9, esse agregado multimolecular é chamado de apoptossoma, que na presença de ATP ou ADP, recruta a caspase-9 a qual irá clivar caspases efetoras como as 3, 6 e 7, culminando em morte celular (RIEDL & SHI, 2004; XU, LAI & HUA; 2019).

A via extrínseca da apoptose, pode ainda se converter diretamente para o caminho intrínseco pela mediação da caspase-8, a qual cliva a proteína denominada BID que então promoverá a liberação das proteínas mitocondriais para o citoplasma, como a proteína citocromo-c (RIEDL & SHI, 2004).

Uma terceira via apoptótica tem demonstrado ainda ser terapeuticamente estudada, a via do ligante relacionada ao TNF (TRAIL), também conhecido como Apo2L, o qual foi identificado pela primeira vez por sua homologia de sequência com FasL. O TRAIL trimérico se liga à receptores na membrana, como DR4 e o DR5, que desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular semelhante à via Fas. A via TRAIL-DR4/DR5 atua em vários processos fisiológicos, como a ativação de células T e tumorigênese, TRAIL é conhecido como um supressor tumoral pela capacidade de

induzir apoptose exclusivamente em células malignas e xenoenxertos; tornando-o um agente antitumoral, sendo uma caminho TRAIL, independente de p53, proteína esta responsável pelo controle celular, induzindo a célula a apoptose em caso de danos não reparados e que se encontra frequentemente mutada em células cancerosas (XU, LAI & HUA; 2019).

Uma centena de genes é expressa controlando assim a iniciação, execução e a regulação do processo apoptótico, sendo que em diversas situações experimentais, a apoptose é regulada por proteínas da família bcl-2. Esta família é constituída de proteínas indutoras da apoptose como a bax e a bak assim como outras que inibem a apoptose, como as conhecidas bcl-2 e a bcl-xl. As primeiras proteínas agem como moduladoras da atividade das caspases, e as outras inibem a liberação do citocromo c pelas mitocôndrias, impedindo assim a apoptose celular (SOBRADO et al., 2003), sendo considerada então, uma família de proteínas oncogênica, e uma das principais reguladoras da apoptose por modular a membrana externa da mitocôndria (ARUMUGAM & RAZIS, 2018; NOVAIS et al, 2012).

Xu et al., 2019 relatam ainda que a proteína p53 demonstra ser uma proteína reguladora dos membros da família de proteínas Bcl-2, induzindo diretamente a transcrição de Bax, que é uma proteína pró-apoptótica.

O câncer de pâncreas apresenta uma série de alterações no programa de morte celular, sendo que uma via inibidora de apoptose pode influenciar na proliferação do tumor, já que impede esse processo, uma vez que a via é caracterizada por excesso de alterações que compensam outros componentes (RUCKERT et al, 2010). Durante o desenvolvimento do câncer ocorrem alterações nas células normais, como danos do DNA, ativação de oncogenes ou desregulação das proteínas anti-apoptóticas,

alterando a resposta apoptótica tornando as células de câncer de pâncreas mais resistentes a quimioterapia (ARLT et al, 2010).

Assim em um aspecto molecular na última década, pequenas proteínas não-codificadoras de RNAs (ncRNAs) têm sido apreciadas como reguladoras-chave da expressão gênica. Entre estas, miRNAs têm recebido, talvez, a maior atenção, pois são conservados entre os animais filogeneticamente distantes e são derivados de genes previamente não reconhecidos como endógenos, bem como de regiões de íntrons e éxons de conhecidas proteínas codificadoras de genes (MIRANDA et al, 2010).

### **1.3. miRNA**

Os miRNAs são RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, são pequenas moléculas endógenas e atuam controlando a expressão gênica em diversos processos patológicos, como a degeneração neurológica, doenças autoimunes, processos inflamatórios, diabetes e câncer. (BARTEL, 2009; HENEGHAN et al, 2010; VIEIRA et al, 2021; NOVAIS et al, 2020). Esses nucleotídeos são clivados a partir de precursores com 60 a 110 nucleotídeos (pré-miRNAs) pela enzima RNA polimerase II, algumas vezes apresentando milhares de pares de bases na sua constituição (HAMMOND, 2006; NASS et al, 2008; NICOLOSO; CALIN, 2008), que regulam a estabilidade e a eficiência da tradução de um RNA mensageiro (mRNA) específico, podendo inibir a tradução, assim como promover a degradação do RNA (MENDELL, 2005). Constituem uma grande família de RNAs não codificadores cuja função é atuar como sinalizador nas diversas vias de silenciamento gênico (LEE et al,

2004). A formação e atividade do miRNA tem início por meio da enzima polimerase II, formando o miRNA primário (pri-miRNA) (LEE et al, 2004; HE et al, 2020).

Parte dos miRNAs, estruturalmente estão localizados nos íntrons do pré-mRNA e geralmente são transcritos juntamente com os genes codificadores de uma proteína (ZAMORE; HALEY, 2005). Durante o processo de gênese e atividade do miRNA, faz-se necessária uma íntima interação com proteínas específicas como Drosha (RNase III endonuclease), responsável pelo processamento do pri-miRNA no núcleo, liberando o miRNA precursor (pré-miRNA). Este, contendo aproximadamente 70 nucleotídeos servirá de substrato para as etapas subsequentes (LEE et al, 2004). Em seguida, a proteína Drosha liga-se a outra proteína (DGCR8/Pasha) formando o complexo microprocessador, cujas funções ainda estão sendo estudadas.

Este complexo, primeiramente identificado em insetos (*Drosophila*), se mantém presente na espécie humana. O pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela proteína exportina-5, onde é clivado pela Dicer (RNase III endonuclease). Uma das fitas do miRNA é posteriormente incorporada ao “complexo silenciador induzido pelo RNA” (RISC) o qual irá modular a expressão de um gene alvo (ZHANG et al, 2006).

Estudos recentes sugerem que miRNAs específicos podem se ligar a regiões-alvo de genes promotores, induzindo assim a sua expressão, bem como são capazes de modular a expressão gênica pela ligação a uma região codificadora de proteína (DHARAP et al, 2009; NOVAIS et al, 2020).

Vários miRNAs podem se ligar a um mRNA específico, assim como um único miRNA pode se ligar a vários mRNAs. Devido a estar em abundância na função, é pensado que um número pequeno de miRNAs efetivamente controle um grande número de mRNAs de modo seqüencial ou simultaneamente. Além disso, certos

mRNAs e/ou seus produtos protéicos podem controlar a expressão de miRNAs específicos, assim sendo, os miRNAs podem significativamente influenciar a homeostase celular sob condições fisiológicas normais (FAZI et al, 2005). Esta molécula trouxe um novo paradigma no processo de regulação da expressão gênica, onde moléculas de RNA puderam ser consideradas reguladoras gênicas importantes assim como de proteínas (KIRIAKIDOU et al, 2004; HE et al, 2020). Entre 40% a 50% dos mRNAs nos mamíferos podem ser regulados pelos miRNAs em nível transcricional, enquanto que no do genoma humano, cerca de 30% aproximadamente destas transcrições, são controladas por miRNAs (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005).

#### **1.4. miRNA e Câncer de Pâncreas**

O mecanismo de apoptose tem suma importância na continuidade da evolução dos tumores, principalmente se observados os mecanismos de desenvolvimento e estruturas envolvidas das neoplasias malignas de modo geral (SCHNEIDER, SCHMID, 2003).

A utilização dos miRNAs, especificamente no caso dos adenocarcinomas, visa possibilitar o diagnóstico e evidenciação de maneira precoce, aumentando a possibilidade de sucesso no tratamento, bem como procedimentos relativamente menos invasivos para combater a alteração e permitir melhora no quadro do indivíduo acometido (UEKI et al, 2000). Atualmente diversos estudos visam a realização de ensaios clínicos para evidenciar e comprovar possíveis interações entre os miRNAs e as células do câncer pancreático, seja essa interação de forma direta ou indireta (FARHANA et al, 2013; LIU et al, 2014; WANG et al, 2019; SUN et al, 2019).

Com relação ao miR-155 é possível, por meios de pesquisas e descobertas clínicas, observar interações entre a expressão deste miRNA e o processo de apoptose. A presença de vias de ativação e sinalização do mecanismo de apoptose, como a via de sinalização JAK-STAT, sofrem diferentes estímulos a partir do momento em que miRNAs apresentam diferentes níveis de expressão no tecido acometido pelas neoplasias malignas (TAMAIYA et al, 2011; LIU et al, 2018; WANG et al, 2019).

De acordo com o ensaio clínico proposto por Wang, Guo e Fan, 2019, a via de sinalização JAK-STAT é bloqueada quando uma hiperexpressão do miR-155 é evidenciada, diminuindo a função da SOCS3 (Supressor de sinalização de citocinas 3), levando a inibição do desempenho da função da JAK-quinase referente ao processo de apoptose, permitindo assim aumento na progressão da lesão bem como metástase.

Além da interação do miRNA com as vias de sinalização e formação de proteínas e genes, a metilação do DNA, mecanismo utilizado para controle de expressão gênica, está também desempenha papel importante no controle da expressão dos miRNAs e suas possíveis funções moduladoras, como demonstrado no trabalho de Hong et al., 2018, onde evidenciou que a DNMT1 (DNA metiltransferase 1), fo ihiperexpressa em amostras de tecido acometido pelo câncer de pâncreas e linhagem celular do câncer de pâncreas (AsPC-1), e está relacionada com a hipermetilação da região promotora do miRNA-148a, levando a uma menor expressão deste miRNA como consequência. Como resultado desta interação, o autor realizou experimento utilizando DNMT1-siRNA para observar a expressão do miRNA-148a após este silenciamento. A utilização deste gene levou à diminuição da expressão da DNMT1 e aumento na expressão do miRNA-148a, por meio da desmetilação da região promotora. Como resultado destas alterações de expressão foi observado inibição significativa na

proliferação celular, diminuição nos quadros de invasão e migração celular na linhagem de células do câncer de pâncreas selecionada (HONG et al, 2018).

Ainda sobre o processo de metilação, SUN, et al, 2018, pode observar por meio de testes em linhagens de células do câncer de pâncreas (PANC-1 e AsPC-1), tecido acometido pelo AP e testes em animais, que o miRNA-148a, se encontra hipoexpresso, por conta da hipermetilação da região promotora, além deste fato, um de seus possíveis alvos de interação a MEG-3 (maternally expressed gene-3), também apresenta menor expressão. Ao realizar um processo de transfecção do miRNA-148a, nas linhagens celulares, foi possível observar o aumento da expressão do miRNA-148a, bem como o aumento na expressão da MEG-3. Além do aumento deste miRNA, foi possível observar diminuição na expressão da C-myc (MYC proto-oncogene), cyclin D1 (ciclina D1) e  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -catenina), que constituem parte da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenin. De acordo com essas descobertas o autor discorre a respeito dos resultados, como a inibição da migração e invasão celular pela hiperexpressão da MEG-3 e, associado ao miRNA-148a e a interação com a via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenin diminuição nos quadros de invasão e metástase, além de um aumento da apoptose (SUN et al, 2018).

Logo, como apontado em estudos específicos a respeito da interação que os miRNAs desempenham (FARHANA et al, 2013; LIU et al, 2014; WANG et al, 2019; SUN et al, 2019), a possibilidade de sua utilização como biomarcadores ou ainda alvos para a modulação, controle ou supressão do tecido tumoral; está cada vez mais sendo evidenciada por trabalhos científicos, porém, estudos mais específicos ainda são necessários, principalmente para maior especificidade e sensibilidade, tanto do miRNA selecionado, quanto de possíveis alvos para estas biomodulações.

***JUSTIFICATIVA***

---

## 2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento da biologia do câncer de pâncreas tem progredido nos últimos anos. Um ponto de vista diferente da genética molecular destes tumores é observar os aspectos que são específicos da carcinogênese. Evidências substanciais sugerem que o estudo da tumorigênese induzida pela radiação, desregulação do ciclo celular, dinâmica telomérica e instabilidade genética podem identificar genes relevantes no estudo do câncer de pâncreas. Algumas evidências indicam que a análise de genes e mecanismos envolvidos em metástases, apoptose e resistência aos tratamentos, podem contribuir com informações relevantes para elucidar as complexas vias moleculares do câncer e contribuir assim no tratamento de pacientes.

Neste contexto a análise da expressão de miRNAs relacionados ao mecanismo de apoptose no adenocarcinoma pancreático, contribuirá com informações adicionais para o prognóstico desta patologia.

## ***OBJETIVO***

---

### 3. OBJETIVO

- Analisar a expressão dos miRNA-148a e miRNA-155 no adenocarcinoma pancreático.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

#### **4.1. Pacientes**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A coleta do tecido tumoral e do tecido pancreático normal foi realizada pela equipe do Serviço de Cirurgia e Endoscopia do Sistema Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e do Centro de Medicina Legal – CEMEL, nos anos de 2008 à 2012. As amostras selecionadas foram mantidas em Freezer – 80°C do biorepositório locado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos (Processo 4910/2008, aprovado em 30/03/2009).

Foram analisadas 10 amostras de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pancreático provenientes de ressecções cirúrgicas e como controle, foram utilizadas 5 amostras provenientes de doadores saudáveis.

#### **4.2. MÉTODOS**

##### **4.2.1. Extração do RNA**

Foram adicionadas às amostras 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização do aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase

aquosa (superior) de cada frasco transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a - 20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado então 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetilpirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material, em seguida, foi identificado e armazenado a - 80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra, ao final da etapa acima descrita, foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização das bandas de RNA. Também foi empregado o uso do equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 considera-se material degradado, e para valores maiores do que 2,0 é indicativo de interferência do clorofórmio; sendo portanto considerado valor ideal de 1,7 a 1,9.

#### **4.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) dos miRNAs**

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do microRNA a transcrição reversa foi realizada com a utilização do kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems)*. Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de *RT Buffer*; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de *Primers* específicos (miRNAs) e

0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a 16 ° C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 ° C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foram utilizados 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

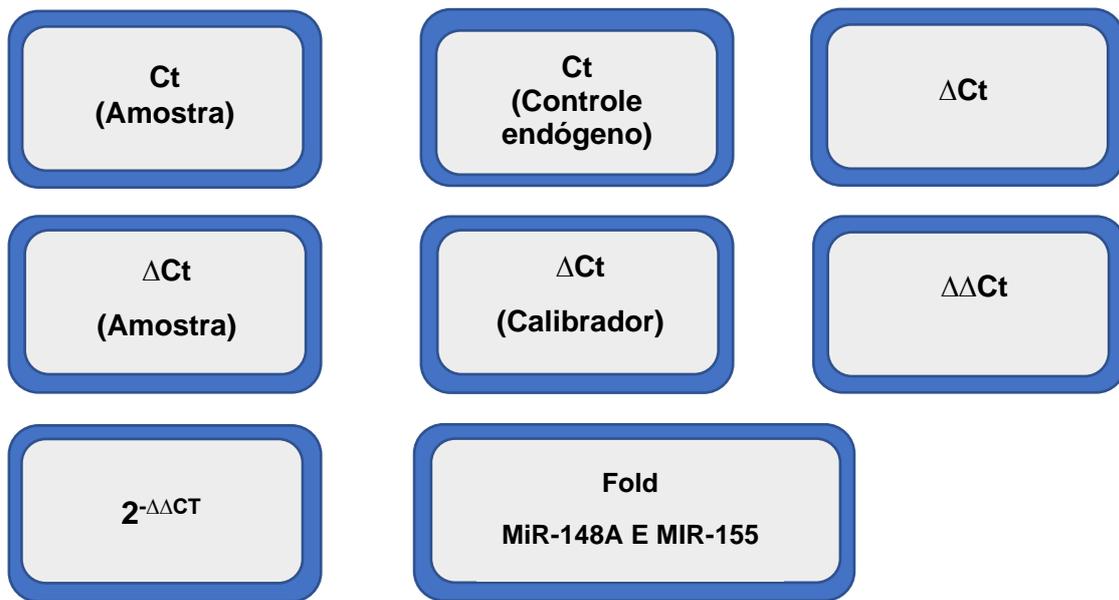
#### 4.2.3. RT-PCR dos miRNAs

O método de PCR em tempo real é utilizado para a expressão diferencial dos miRNAs estudados. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (RT-PCR), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix (AppliedBiosystems)*, as condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea).

Para a análise quantitativa da expressão, são utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand (AppliedBiosystems)*, compostos por oligonucleotídeos e sondas.

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene *house-keeping* na mesma amostra, originando o chamado  $\Delta$ CT, para a realização deste estudo prático o gene U6 foi utilizado como gene *house-keeping* ou controle endógeno. Os valores de  $\Delta$ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes

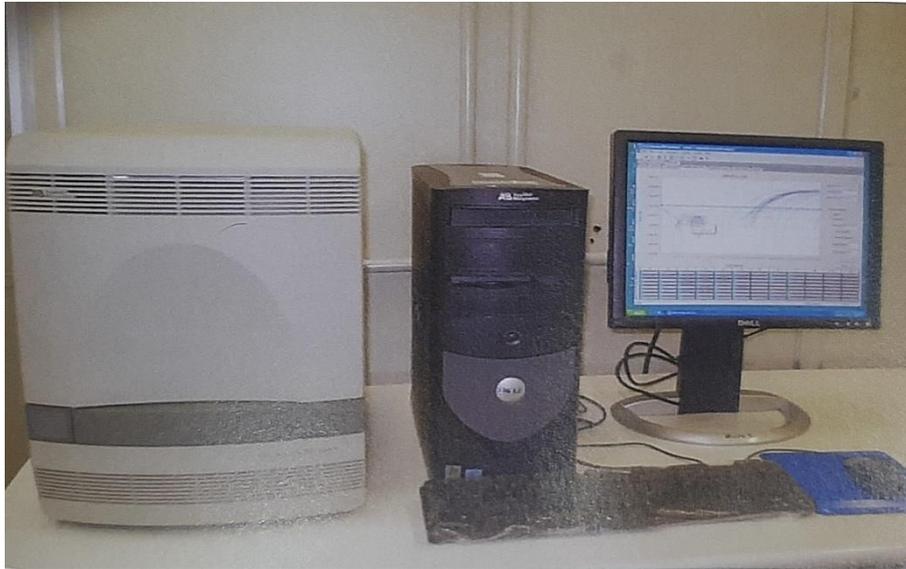
amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o  $\Delta\text{CT}$  de uma amostra do  $\Delta\text{CT}$  do calibrador se difere, neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado  $\Delta\Delta\text{CT}$ . Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .



**Figura 1** – Representação do cálculo do  $\Delta\text{CT}$  e  $\Delta\Delta\text{CT}$  para a obtenção da quantificação da expressão dos miRNAs em estudo (fold).

Foi realizada a quantificação relativa dos miRNAs onde as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (*Applied Biosystems*, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10 $\mu\text{l}$ , utilizando 5 $\mu\text{l}$  do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 $\mu\text{l}$  de cada sonda específica e 4,5 $\mu\text{l}$  de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) foi empregado juntamente com o software *Sequence Detection System* para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software *Excel* para cálculo dos valores de

$\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  e  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . O software *GraphPadPrism 9.2.0* (*GraphPadPrism, Inc, San Diego, CA, EUA*), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.



**Figura 2** – Aparelho utilizado para a leitura de PCR em tempo real.

#### **4.2.4. Análise estatística**

Para as variáveis quantitativas obtidas após realização e processamento dos dados do RT-PCR, a comparação entre os grupos tumor e controle, bem como visualização da concentração dos miRNAs em tecido acometido pelo AP e tecido controle, foi realizado um teste para a visualização da existência de uma curva de Gauss para início do processamento e organização dos dados. Os resultados se enquadraram em uma distribuição não paramétrica, logo por este resultado obtido, em associação com o número de grupos para estudo, além do número de amostras disponibilizadas, o teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* foi o selecionado para a realização da análise estatística dos dados. Todas as análises foram conduzidas no

*software GraphPadPrism 9.2.0 (GraphPadPrism, Inc, San Diego, CA, EUA), considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ .*

## ***RESULTADOS***

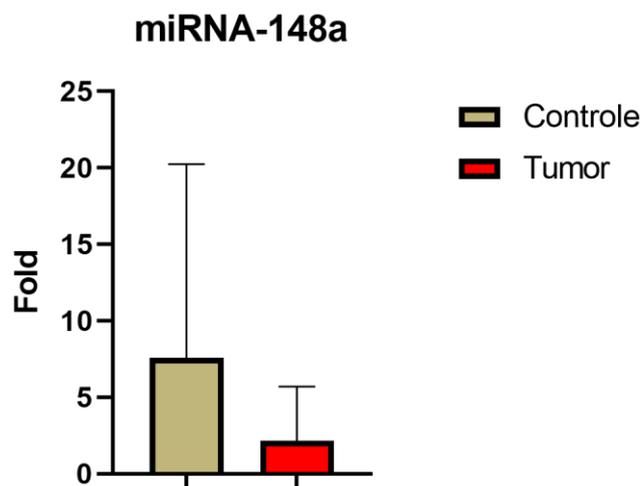
---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise da expressão gênica tecidual dos miRNAs

#### 5.1.1. Análise da expressão gênica tecidual do miRNA-148a

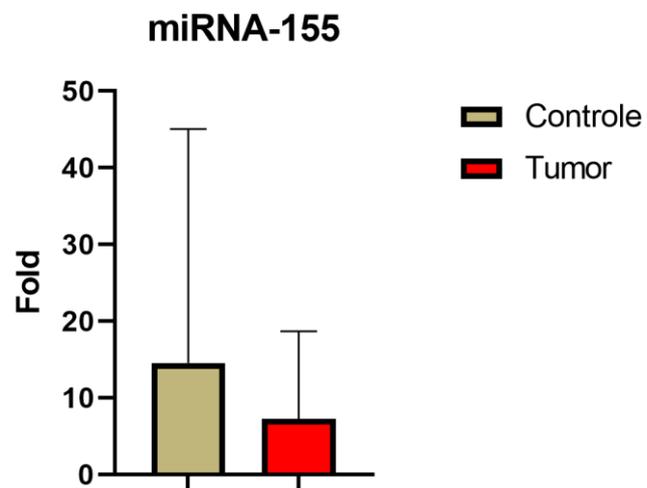
A expressão gênica tecidual do miRNA-148a está representada no gráfico 1, evidenciando menor expressão no grupo tumor em relação ao controle estudado, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p= 0.30$ , *Wilcoxon-Mann-Whitney*).



**Gráfico 1** – Representação da expressão gênica tecidual do miRNA-148<sup>a</sup> ( $p= 0.30$ , *Wilcoxon-Mann-Whitney*).

#### 5.1.2. Análise da expressão gênica tecidual do miR-155

A expressão gênica tecidual do miRNA-155 está representada no gráfico 2, evidenciando resultado semelhante ao miRNA-148a, menor expressão no grupo tumor em relação ao controle estudado, porém da mesma forma que os resultados anteriores obtidos, sem diferença estatisticamente significativa ( $p= 0.76$ , *Wilcoxon-Mann-Whitney*).



**Gráfico 2** – Representação da expressão gênica tecidual do miRNA-155 ( $p= 0.76$ , *Wilcoxon-Mann-Whitney*).

## ***DISCUSSÃO***

---

## 6. Discussão

O desenvolvimento de neoplasias malignas no pâncreas é foco de diversos estudos e ensaios, sejam eles voltados para a descoberta de novas formas de tratamento, associado a possível redução da invasibilidade, diminuição na formação de colônias celulares do câncer de pâncreas, trauma gerado pelo protocolo de tratamento adotado ou ainda a evidencição de proteínas ou genes alterados nos tecidos ou região adjacente que possa expor a presença e desenvolvimento destas alterações. É importante ressaltar que grande parte das alterações malignas do pâncreas recebe diagnóstico tardio, principalmente associado a seu quadro, na maioria das vezes, assintomático em fases iniciais, o que acaba por gerar uma diminuição nas possibilidades de tratamentos menos invasivos ou em casos ainda mais avançados, acaba por afetar a sobrevivência do indivíduo acometido, seja pelo comprometimento sistêmico ou dificuldade no tratamento associado a quadros de metástase ou ainda invasão e destruição tecidual adjacente (RAWAT et al, 2019).

Para Liu et al, 2013, que por meio do processo de transfecção obteve resultados interessantes com relação a expressividade do miRNA-155, dados posteriormente discutidos pelo autor, e da expressão também alterada da MLH1 (Mut L homologue 1) geralmente relacionado com processos de apoptose, crescimento tumoral e malignidade celular. Foi possível observar uma associação inversa entre o miRNA-155 e a MLH1, logo o aumento da expressão de um, leva a diminuição do outro. Fator esse de suma importância principalmente no estudo da interação entre miRNAs e amostras.

Em nosso trabalho, onde realizamos a análise da RT-PCR permitiu a observação da diferença de expressão encontrada entre os miRNAs selecionados para o estudo. É possível observar que as amostras apresentam uma menor expressão de ambos os miRNAs quando avaliados no tecido acometido pelo adenocarcinoma pancreático, em relação ao grupo controle

LIU et al (2014), estudaram através de amostras de tecidos acometidos pelo AP (n=42) e linhagens celulares, a relação do gene SEL1L com miRNAs, dentre eles o miRNA-155, com a finalidade de entender a hipossupressão deste gene (SEL1L), nos tecidos acometidos pelo AP. A SEL1L é considerado um supressor tumoral putativo, associado a eventos como diferenciação e processo apoptótico, pela interação com a

via de sinalização Notch, além de estar associada à modulação da expressão de outras proteínas ligadas ao câncer como a PTEN. Como resultado de seu estudo, foi possível observar que o SEL1L e o miRNA-155 apresentam relações inversas, ou seja, nas amostras e linhagens celulares estudadas, hiperexpressão do miRNA-155 resultava em menor expressão do SEL1L, observado em 18 das 23 amostras do adenocarcinoma pancreático que apresentaram está menor expressão. Em nosso trabalho, quando comparamos o resultado do miRNA-155, é possível observarmos diferentes níveis de sua expressão, o que relacionado com vias de sinalização e também formação de proteínas pode vir a gerar alterações nos processos de desenvolvimento dos tumores pancreáticos, e corroborar para posteriores experimentos laboratoriais com a finalidade de formular novos meios de utilização destes miRNAs para diagnósticos ou tratamentos.

De acordo com estudos realizados por ZHANG et al (2014), foi possível visualizar em 28 amostras de tecido acometido pelo câncer de pâncreas e 5 linhagens de células do câncer de pâncreas, quando comparados com controle de amostras saudáveis, em análise por RT-PCR, uma hipoexpressão do miRNA-148a. Além do achado significativo com relação a expressão, em trabalhos anteriores, Zhao et al (2005) pode constatar, por meio da utilização de análises bioinformáticas, potenciais alvos para o miRNA-148a, sendo esses Bcl-2 (B cell lymphoma) e CCKBR (cholecystokinin-B receptor). Como resultado o autor pode evidenciar que a interação entre estes potenciais alvos e o miRNA-148a resultou em inibição da proliferação celular das linhagens selecionadas para o estudo, além de promoção da apoptose, resultado esse, obtido por meio da realização do teste da Annexin V-FITC e teste da atividade da caspase; o que corrobora com nossos achados, já que a análise do miRNA-148a em nosso trabalho, resultou numa hipoexpressão quando comparado ao grupo controle, porém sem significância estatística.

SUN et al (2019), realizou estudo no qual se baseou na observação dos efeitos gerados entre o miRNA-148a e linhagens celulares, amostras de tecido de câncer de pâncreas e também por meio da realização de experimentos em ratos. Com a obtenção e refinamento dos dados foi possível constatar num primeiro momento, a diferença significativa na expressão do miRNA-148a em tecidos AP em relação às amostras controles saudáveis, sendo constatada uma hipoexpressão deste, fator esse explicado pela metilação da região promotora, ou região responsável pela formação das proteínas associadas ao miRNA escolhido. Por meio da realização da técnica de

transfecção do miRNA-148a, na região promotora, foi observado aumento da expressão do gene MEG-3 (maternally expressed gene-3), resultando em promoção do quadro da apoptose além de diminuição na progressão do ciclo celular e inibição da migração e invasão por parte das células do câncer de pâncreas.

Ainda com relação a interação entre o câncer de pâncreas e o miRNA-148a é possível evidenciar outros pontos importantes associados à regulação e efeitos provenientes da mesma. FENG et al (2016), constatou por meio de análise bioinformática, RT-PCR e demais testes adotados, que o miRNA-148a influencia a regulação da proteína ErbB3 (HER3). De acordo com os resultados obtidos há uma correlação inversa entre o miRNA e a proteína, no caso a supressão da ErbB3 gera nas linhagens celulares estudadas, alteração em dois pontos distintos. Ao se observar a PANC-1, repressão da proteína acaba por gerar uma repressão nos processos de proliferação e migração celular.

Com os resultados obtidos no nosso experimento e após análise estatística, foi possível observar que para os dois miRNAs selecionados (148-a e 155), há diferença com relação à expressão e tecido estudado, porém sem significância estatística entre os grupos AP X Controle.

Seguindo a linha de pesquisa embasada nos miRNAs e sua utilização tanto para diagnóstico precoce, por meio de sua utilização como prováveis biomarcadores ou ainda coadjuvantes na implementação e formulação de planos de tratamento para as neoplasias malignas que acometem não somente pâncreas, porém demais estruturas componentes do corpo humano, a realização de novos estudos se faz necessária, para averiguação da possível interação entre miRNAs e proteínas ou vias de sintetização e a resposta causada por essas alterações.

Dos trabalhos selecionados para embasamento teórico, de acordo com resultados obtidos e principalmente a associação dos miRNAs selecionados, é possível observar a importância do aprofundamento dos experimentos e ensaios clínico-laboratoriais, visando maior entendimento das interações encontradas entre os miRNA-148a e miRNA-155 com os tecidos acometidos pelo câncer de pâncreas e saudáveis, além de seu potencial regulador no processo de formação, ou seja, expressão genes proteínas, que desempenham papéis fundamentais na regulação do desenvolvimento tumoral, proliferação assim como da apoptose.

## **CONCLUSÃO**

---

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, podemos concluir que embora não tenha ocorrido uma diferença estatística significativa entre os grupos, pode-se observar nos gráficos, uma menor expressão do miRNA-148a pró-apoptótico, no grupo AP quando comparado com grupo controle, o que pode contribuir assim, com o aumento da malignidade desse tipo de câncer.

Assim sendo, concluímos ainda que mais estudos relacionando miRNAs e o mecanismo de apoptose, devem ser realizados para um maior entendimento dessa via molecular, dentre outras, que acometem o Adenocarcinoma Pancreático.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARLT, A.; MUERKOSTER, S.S.; SCHAFER, H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. **Cancer Letters**, 2010.

Arumugam A, AbdullRazis AF. Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: a Review. **AsianPac J Cancer Prev**. 2018 Jun 25; 19(6):1439-1448.

BARTEL, D, P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, **Cell**. 136 p.215-33 n.2, 2009.

CRNOGORAC-JURCEVIC T, EFTHIMIOU E, NIELSEN T, LOADER J, TERRIS B, STAMP G, BARON A, SCARPA A AND LEMOINE NR Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. **Oncogene** 2002, 21:4587-94.

D'Arcy, M.S. (2019), Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, 43: 582-592.

DHARAP, A.; BOWEN, K.; PLACE, R.; LI, L.C.; VEMUGANTI, R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.29, n. 4, p. 675-687, 2009.

Farhana L, Dawson MI, Murshed F, Das JK, Rishi AK, et al. (2013) Upregulation of miR-150\* and miR-630 Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells by Targeting IGF-1R. **PLoS ONE** 8(5): e61015.

FAZI, F. et al. A minicircuitry comprised of MicroRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  regulates human granulopoiesis. **Cell**, v. 123, p. 819–831, 2005.

GRESS TM, MULLER-PILLASCH F, GENG M, ZIMMERHACKL F, ZEHETNER G, FRIESS H, BUCHLER M, ADLER G AND LEHRACH H. A pancreatic cancer specific expression profile. **Oncogene** 1996, 13:1819-30.

HAMMOND, S.M. MicroRNAs as oncogenes. **Current Opinion in Genetics & Development**, 16:4-9, 2006.

HENEGHAN *et al.* Systemic *miRNA-195* Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease, **the oncologist** v.26 p. 673-682 n.4, 2010.

He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). MiRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. **International journal of biological sciences**, 16(14), 2628–2647. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>

HIYAMA E.; HIYAMA K.; OHTSU K.; YAMAOKA H.; ICHIKAWA T.; SHAY J. W.; YOKOYAMA T. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? **Eur. J. Câncer** 1997, 33(12) 1932-6.

Hong L, Sun G, Peng L, Tu Y, Wan Z, Xiong H, Li Y, Xiao W. The interaction between miR-148a and DNMT1 suppresses cell migration and invasion by reactivating tumor suppressor genes in pancreatic cancer. **Oncol Rep.** 2018 Nov; 40(5):2916-2925.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, MURRAY T, XU J, THUN MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007; 57: 43-66.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Câncer*, v. 26, p. 239– 257, 1972.

KIRIAKIDOU, M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. **Genes Dev**, v. 18, n. 10, p. 1165-1178, 2004.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J.**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.

Liu B, Wu S, Ma J, Yan S, Xiao Z, Wan L, Zhang F, Shang M, Mao A. LncRNA GAS5 reverses EMT and tumor stem cell-mediated gemcitabine resistance and metastasis by targeting miR-221/ SOCS3 in pancreatic cancer. **MolTherNucleicAcids** 2018; 13: 472-482.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1469-1478, 2018.

MENDELL, J. T. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. **Cell Cycle**. v. 9, p. 1179-1184, 2005.

MIRANDA RC et al. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? **AlcoholClinExp Res**, v. 34, n. 4, p. 575-587, 2010.

Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., &Shroff, R. T. (2020). *Pancreatic cancer*. **The Lancet**, 395(10242), 2008–2020.

MOORE, K.L; DALLEY, A.F. Anatomia orientada para a clínica. 5.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2007.

NASS D, ROSENWALD S, MEIRI E, GILAD S, TABIBIAN-KEISSAR H, SCHLOSBERG A, et al. (2008). MiR-92b and miR-9/9 are specifically expressed in brain primary tumors

and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. **Brain Pathology**, 2: 1-9.

NICOLOSO MS, CALIN GA. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. **BrainPathol.** 2008; 18(1): 122-9.

NOBESCHI, L.; BERNARDES, W.; FAVERO, N. Diagnostico e prevenção do câncer de pâncreas. Ensaio e Ciência: **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.** 2012, 16(1), 167-175.

NOVAIS, P. C.; DE PAULA, A. A. P.; REIS, R. B.; BARIONE, D. F.; FRANQUEIRO, A. G.; RODRIGUES JR., A. A.; LIZARTE, F. S. N.; DE CARVALHO, C.A.M.; TIRAPELLI, D. P. C.; PERIA, F. M.; SAGGIORO, F. P.; TUCCI JR., S.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P. & TIRAPELLI, L. F. Immunohistochemistry analysis of proteins related with apoptosis as prognostic factor in epidermoid carcinoma of penis. **Int. J. Morphol.**, 30(3):1029-1034, 2012.

P. C. Novais, Neto, F. S. L., Cirino, M. Lde A., Porsani, L. B., da Silva, J. P., Gula, I. S., M. Durand, deT., de Carvalho, C. A. M., Schimming, B. C., M. Tazima, deF. G. S., Carlotti, Jr, C. G., Colli, B. O., Tirapelli, D. Pda C., and Tirapelli, L. F., "Analysis of microRNAs -15b, -16, -21, -221 and -222 as molecular markers in the blood of rats submitted to focal cerebral ischemia associated with alcoholism", **Genetics and Molecular Research**, vol. 19, no. 3, 2020.

Poon, I., Lucas, C., Rossi, A. *et al.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nat Rev Immunol** 14, 166–180 (2014).

Rawat M, Kadian K, Gupta Y, Kumar A, Chain PSG, Kovbasnjuk O, Kumar S, Parasher G. MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. **Genes** (Basel). 2019 Sep 25; 10(10):752.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 897-907, 2004.

RUBIN, E.; DUNHAM, W.K.; STANLEY, R.J. PANCREATIC metástases in boné sarcomas CT demonstrations. **JCAT**, n.9, p.886-8, 1985.

RUCKERT,F.;SAMM,N.;LEHNER,A.;SAEGER,H.D.;GRUTZMANN,PILARSKY,C. Simultaneous gene silencing of Bcl-2, XIAP and Survivin re-sensitizes pancreatic cancer cells towards apoptosis.**BMC Cancer.** 2010, 10:379.

SCHNEIDER, G.; SCHMID, R.M. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. **Mol.Cancer**, v.2, p.15, 2003.

Sobrado M., López M., Carceller F., García A., Roda J. (2003). Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, 118(1), 107–113

Sun Y, Zhu Q, Zhou M, Yang W, Shi H, Shan Y, Zhang Q, Yu F. Restoration of miRNA-148a in pancreatic cancer reduces invasion and metastasis by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway via downregulating maternally expressed gene-3. **Exp Ther Med.** 2019 Jan; 17(1):639-648.

Tamaiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2011; 31: 980-985.

TAKAORI, K.; HRUBAN, R.H.; MAITRA, A.; TANIGAWA, N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. **Pancreas.** 2004; 28:257–62.

UEKI, T.; TOYOTA, M.; SOHN, T.; YEO, C.J.; ISSA, J.P.; HRUBAN, R.H.; GOGGINS, M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res.** 2000, 60:1835-9.

UEKI, T.; TOYOTA, M.; SKINNER, H.; WALTER, K.M.; YEO, C.J.; ISSA, J.P.; HRUBAN, R.H.; GOGGINS, M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. **Cancer Res.** 2001, 61:8540-6.

Vieira N. Faria, Serafini L. Neder, Novais P. Cezar, Neto F. Sanches Lizarte, Cirino M. Luiz de Assis, Kemp R., Ardengh J. Celso, Saggiaro F. Pinto, Gaspar A. Facury, Sankarankutty A. Kumar, Júnior J. Resende Lopes, Tirapelli D. Pretti da Cunha, dos Santos J. Sebastião et al The role of circulating miRNAs and CA19-9 in pancreatic cancer diagnosis. **Oncotarget.** 2021; 12: 1638-1650.

Wang J, Guo J, Fan H. MiR-155 regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells through targeting SOCS3. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2019 Jun; 23(12):5168-5175.

Wang J, Guo J, Fan H. MiR-155 regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic Cancer cells through targeting SOCS3. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2020 Dec; 24(24):12625.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251–306, 1980.

Xuebo Xu, Yueyang Lai, Zi-Chun Hua; Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Biosci Rep** 31 January 2019; 39 (1): BSR20180992.

YEO TP, HRUBAN RH, LEACH SD, WILENTZ RE, SOHN TA, KERN SE, et al. Pancreatic cancer. **Curr Probl Cancer** 2002; 26:176–275.

ZAMORE, P. D.; HALEY, B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1519-1524, 2005.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G. P.; ANDERSON, T. A. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. **Dev Biol.**, v. 289, n. 1, p. 3-16, 2006.

Zhao MD, Hu XM, Sun DJ, Zhang Q, Zhang YH, Meng W. Expression of some tumor associated factors in human carcinogenesis and development of gastric carcinoma. **World J Gastroenterol.** 2005; 11(21):3217–21.