

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**BIOMEDICINA**

**DEBORA ARAÚJO DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL CA 19-9 EM CULTURA DE  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO UTILIZANDO A  
TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA O GENE HOXB7.**

**SÃO PAULO**  
**2013**

**DEBORA ARAUJO DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL CA 19-9 EM CULTURA DE  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO UTILIZANDO A  
TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA O GENE HOXB7.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para  
obtenção do título de bacharel em Biomedicina da  
Universidade de Santo Amaro, sob a orientação da  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Regina Andrade de Azevedo e co-  
orientação do Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi.

**SÃO PAULO  
2013**

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Cilene Araujo, que sempre me apoiou, me incentivou e me inspirou a escolher um caminho científico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem sua força e permissão para trilhar este caminho, nada teria conquistado.

À minha mãe, pelo grande incentivo e apoio nestes anos durante a graduação, pelo grande exemplo de fé e superação e até mesmo pelo financiamento das minhas necessidades universitárias.

À minha família, por acreditarem sempre no meu sucesso e me apoiarem a fim de alcançar meus objetivos.

À Profa. Dra. Maria Regina Andrade de Azevedo, cuja orientação foi de extrema importância para a produção deste trabalho.

Ao co-orientador Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi, pela disposição, dedicação e grandes ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Sokolnik de Oliveira, pela boa vontade em participar da banca avaliadora do meu trabalho de conclusão de curso.

À minhas amigas, Fernanda Haniuda, Paloma Sirigatti Knittel e Cynara Marques de Almeida, pelo grande companheirismo, pelas horas de estudos, pelos momentos de diversão e por fazerem destes anos os mais felizes e proveitosos possíveis.

Às minhas colegas, Thais Monteiro Paes, Katiane Alejandra Contreras e Bianca Carolina Paixão Cardoso, pela grande colaboração no desenvolvimento do projeto de iniciação científica, o qual deu origem à este trabalho.

Aos meus professores que foram peças cruciais no desenvolvimento do meu conhecimento.

Ao Daniel Veras, pelo apoio e companheirismo.

E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

*“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”*

Augusto Cury

## RESUMO

Estudos moleculares e genéticos em oncologia clínica têm demonstrado resultados promissores para terapia alvo em alguns tumores. Alterações na expressão dos genes da família HOX já foram evidenciadas em diversos tumores, entre eles, o carcinoma de pâncreas constitui um dos tumores mais agressivos e letais. Um estudo recente, constatou que o RNA mensageiro do gene HOXB7 estava hiper expresso em linhagens de adenocarcinoma pancreático humano e que a utilização de um RNA de interferência, inibiu a expressão do transcrito do gene HOXB7 com inibição da proliferação celular e do crescimento em soft ágar. Atualmente, o antígeno CA 19-9 constitui o marcador sorológico de eleição para o prognóstico e monitoramento do câncer de pâncreas. Este estudo buscou avaliar a concentração do marcador CA 19.9 no sobrenadante de cultura de células pré-estabelecidas de adenocarcinoma pancreático antes e após o fenômeno de interferência com o RNAi para o gene HOX B7 verificando a sua concentração e correlacionando ao efeito da interferência. Os resultados obtidos para o sobrenadante das 3 linhagens de células estudadas (BxPC3, MIA PaCa2 e Capan-1) demonstraram a presença do antígeno em concentrações analíticas apenas na cultura de células da linhagem BxPC3 não sendo observada diferença estatística significativa entre as concentrações do CA 19-9 após o fenômeno de interferência.

**Palavras chave:** Neoplasias Pancreáticas, Antígeno CA 19-9, Expressão Gênica.

## ABSTRACT

Molecular and genetic studies in clinical oncology have shown promising results for targeted therapy in some tumors. Changes in gene expression of HOX family genes have been highlighted in several tumors, including, pancreatic carcinoma, one of the most lethal and aggressive tumors. A recent study noted that the mRNA of the gene HOXB7 was hyper-expressed in human pancreatic adenocarcinoma cell lines and that the use of a RNA interference inhibited the expression of the HOXB7 transcript that also inhibited cell proliferation and growth in soft agar. Currently, the antigen CA 19-9 is the serological marker of choice for monitoring the prognosis of pancreatic cancer. This study sought to evaluate the concentration of the marker CA 19-9 in cell culture supernatant of pre established pancreatic adenocarcinoma cell lines before and after the phenomenon of interference with the RNAi against HOX B7 gene. The results obtained in the supernatant of the 3 cell lines studied (BxPC3, MIA PaCa2 e Capan-1) demonstrated the presence concentrations only in BxPC3 cell line. The concentrations of CA 19-9 before and after interference phenomenon showed not to be statistically significant.

**Key-words:** Pancreatic Neoplasms, CA 19-9 antigen, Gene Expression.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Taxas de incidência de câncer de pâncreas por raça de acordo com o sexo..... 15
- Tabela 2** - Fatores de risco para o câncer de pâncreas..... 16
- Tabela 3** - Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de expressão do gene *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e CAPAN-1..... 30
- Tabela 4** - Determinação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante de cultura celular de acordo com a quantidade de células e a linhagem celular antes do tratamento com RNA interferente..... 31
- Tabela 5** - Determinação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante de cultura celular de células da linhagem BxPC3 antes e após do tratamento com RNA interferente ..... 32

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BRCA2	Gene supressor tumoral BRCA2 ( <i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i> )
CA 19-9	Antígeno Carboidrato 19-9
CEA	Antígeno carcinoembrionário
cDNA	DNA complementar
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CN	Controle negativo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPC4	Gene suppressor tumoral DPC4
Du-PAN-2	Antígeno Glicoprotéico Du-PAN-2
ELAM-1	Molécula de adesão endotelial de leucócitos
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HER	Receptor do fator de crescimento epidermal
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
HOM-C	Complexo homeótico da Drosophila
HOXB7	Homeobox B7
IgG	Imunoglobulina humana do tipo "G"
K-ras	Oncogene Kirsten ras
kDa	kilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
p16	Supressor tumoral p16

p53	Supressor tumoral p53
pb	Pares de bases
pc3	Human prostate cancer cell lines
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
piRNA	RNAs associados à proteína Piwi
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
r.p.m.	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
siRNA	RNA de interferência ( <i>Small interfering RNA</i> )
Span 1	Antígeno span 1
uPAR	Receptor de uroquinase
UTRs	Região não traduzida ( <i>untranslated</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

### **AVALIAÇÃO DO MARCADOR TUMORAL CA 19-9 EM CULTURA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO UTILIZANDO A TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA O GENE HOXB7.**

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Etiologia e epidemiologia do Câncer de pâncreas .....	13
1.2 Carcinogênese e alterações genéticas .....	16
1.3 Marcadores tumorais.....	19
1.4 RNA de interferência (miRNAs).....	21
2 OBJETIVO.....	25
2.1 Objetivos Gerais.....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Casuística.....	26
3.2 Cultura Celular .....	26
3.3 Inibição seletiva do transcrito do gene HOXB7 com RNA interferente.....	27
3.4 Extração e quantificação de RNA.....	28
3.5 Síntese de cDNA (DNA complementar) .....	29
3.6 Expressão do RNAm do gene HOXB7 após interferência.....	29
3.7 Avaliação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante das culturas celulares.....	30
4 RESULTADOS .....	31
4.1 Avaliação do CA 19-9 em sobrenadante de cultura celular BxPC3, Mia PaCa-2 e Capan-1.....	31
4.2 Efeito do RNAi em cultura celular BxPC3, Mia PaCa-2 e Capan-1 .....	32
4.3 Avaliação do CA 19-9 antes e após a inibição do gene HOXB7.....	33

5 DISCUSSÃO .....	34
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etiologia e epidemiologia do câncer de pâncreas

O câncer de pâncreas é um dos cânceres humanos mais letais. Atualmente é a segunda principal causa de mortalidade entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos, responsável por mais de 28 mil mortes por ano, e a quarta principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos e na União Europeia (FERLAY et al, 2007; GREENLEE et al, 2000; JEMAL et al, 2007).

Dentre os países em desenvolvimento, as maiores taxas de incidência estão na América do Sul e Central (PARKIN et al, 2005).

Mesmo diante do desenvolvimento da genética molecular e dos avanços tecnológicos que permitiram uma maior compreensão da patogênese da doença, esta neoplasia ainda está associada a uma taxa de sobrevivência em 5 anos inferior a 5% (LILLEMOE et al, 2000; NIEDERHUBER et al, 1995).

Entre os carcinomas pancreáticos não classificados como endócrinos, 95% correspondem ao adenocarcinoma ductal (ALLEMA et al, 2005). Sendo esta, uma neoplasia clinicamente agressiva caracterizada por diferenciação ductal associada à produção de mucina e expressão de certas citoqueratinas importantes para o diagnóstico (GOGGINS; HRUBAN e KERN, 2001). Pacientes com adenocarcinoma ductal constitui um dos mais letais existentes. Após um ano do diagnóstico do tumor, somente 21,2% dos pacientes permanecem vivos e apenas 5% em 5 anos. A mortalidade por este tipo de tumor tem se mantido estável nos Estados Unidos da América (EUA) nos últimos 27 anos, sendo praticamente a mesma que a taxa de incidência (RIES et al, 2005).

Geralmente, os adenocarcinomas de pâncreas ocorrem após os 30 anos de idade, cuja incidência tende a aumentar conforme a idade, de 10/100.000 casos entre os 40 e 50 anos para 116/100.000 entre 80 e 85 anos. A maioria dos casos é relatada entre os 65 e 80 anos, havendo maior incidência no sexo masculino (LILLEMOE et al, 2000).

Pouco se sabe sobre os fatores de risco que levam um indivíduo a desenvolver câncer de pâncreas. De acordo com alguns estudos ao longo dos anos alguns fatores como o fumo, diabetes, álcool e idade avançada estão relacionados a

esta patologia. A maioria dos indivíduos a apresentarem esta morbidade têm uma idade superior a 45 anos. Sendo a média de idade no momento do diagnóstico de câncer de pâncreas de 71 anos (HOWLADER et al, 2013).

Segundo Howlader et al. (2013), aproximadamente 0,1% dos cânceres de pâncreas foram diagnosticados com menos de 20 anos, 0,4% entre 20 e 34 anos, 2,1% entre 35 e 44 anos, 9,7% entre 45 e 54 anos, 20,8% entre 55 e 64 anos, 26,0% entre 65 e 74 anos, 27,4% entre 75 e 84 anos e 13,5% com 85 anos ou mais anos de idade. Baseados em casos diagnosticados em 2006-2010, a taxa de incidência ajustada por idade foi de 12,2 por 100.000 homens e mulheres por ano.

Muitos estudos em relação à incidência de gênero evidenciou que os homens são mais propensos a desenvolver câncer pancreático do que as mulheres. Há diversas hipóteses de variáveis relacionadas à estes dados, uma delas é a utilização do tabaco, que por sua vez era bem maior pelo sexo masculino. Porém, atualmente esta diferença vem se esgotando (ESTEVE et al, 1994).

Numa pesquisa realizada no Reino Unido em 2008, houveram 8.085 novos casos diagnosticados de câncer de pâncreas. Embora haja uma semelhança nos números de casos em homens e mulheres, as taxas de incidência são mais elevadas para os homens (Cancer Registrations in Wales, 2008; Office for National Statistics, 2010). Estima-se que este risco para o câncer de pâncreas seja de 1 em 77 para os homens e 1 em 79 para as mulheres (ESTEVE et al, 1994; GOLDBERG et al, 1956).

Há alguns problemas em se diferenciar as relações casuais das não casuais que existem entre a pancreatite crônica e o câncer de pâncreas, pois são praticamente as mesmas que existem entre o diabetes melito e a colicistectomia. Em um estudo multicêntrico, isto foi ilustrado, uma vez que o aumento do risco de câncer de pâncreas foi relatado como 15 vezes maior entre os pacientes com pancreatite crônica em comparação com a população em geral (MAISONNEUVE e LOWENFELS et al, 2010).

A tabela a seguir mostra as taxas de incidência por raça/etnia, de acordo com o sexo (Tabela 1).

**Tabela 1 – Taxas de incidência de câncer de pâncreas por raça de acordo com o sexo.**

Taxas de incidência por raça		
Raça / Etnia	Masculino	Feminino
Todas as Raças	13,9 por 100.000 homens	10,9 por 100.000 mulheres
Branco	13,8 por 100.000 homens	10,7 por 100.000 mulheres
Preto	17,6 por 100.000 homens	14,3 por 100.000 mulheres
Ásia / Pessoas do pacífico	10,4 por 100.000 homens	8,9 por 100.000 mulheres
Nativos americanos / Nativos do Alasca	11,4 por 100.000 homens	10,5 por 100.000 mulheres
Hispânico	12,1 por 100.000 homens	10,6 por 100.000 mulheres

(HOWLADER et al, 2013)

O fator causal mais comum da pancreatite crônica é a ingestão abusiva do álcool e o tabagismo, além disso, uma dieta pobre em frutas e legumes também estão fortemente associados (ANDREN-SANDBERG et al, 1997). As chances de se desenvolver câncer de pâncreas, parece estar associada à pancreatite crônica pois a inflamação prolongada pode promover o desenvolvimento de câncer.

Outra forma de pancreatite conectada ao surgimento do câncer de pâncreas é a pancreatite aguda (EKBOM et al, 1993), em um único episódio, bem como uma parte de pancreatite tropical (THOMAS et al, 1990), tem sido associado a um risco aumentado de câncer de pâncreas e o surgimento dos episódios de pancreatite podem expressar-se como uma manifestação clínica precoce do câncer de pâncreas.

Como constantemente associado ao desenvolvimento de diversos cânceres, o tabagismo está casualmente associado ao câncer de pâncreas, dependendo do tempo de duração desta condição e a quantidade de cigarros fumados por dia (TOBACCO..., 2004).

Muitos autores ainda associam o surgimento do câncer de pâncreas com o acúmulo de gordura corporal, hormônios, atividades físicas e principalmente a contribuição genética.

A seguir, segue uma tabela exibindo os principais fatores de risco para o Câncer de Pâncreas, agrupando-os em diferentes grupos de acordo com os diferentes tipos de fatores ditos na literatura (Tabela 2).

**Tabela 2 – Fatores de risco para o câncer de pâncreas.**

FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE PÂNCREAS			
	<b>Aumento dos Riscos</b>	<b>Possíveis riscos</b>	<b>Riscos não comprovados</b>
<b>Fatores demográficos</b>	Avançar da idade Raça negra Gênero masculino	Geográficos	Estado econômico Estado de migração
<b>Fatores do hospedeiro</b>	Neoplasias hereditárias Câncer colorretal Pancreatite Hereditária	Diabetes Pancreatite crônica Hormônios sexuais Anemia perniciosa	Cirurgia de úlcera péptica Colecistectomia
<b>Fatores ambientais</b>	Tabagismo	Dieta Ocupação	Álcool Café Radiação

(LILLEMOE et al, 2000)

## 1.2 Carcinogênese e alterações genéticas

Os tumores de pâncreas são geralmente tumores sólidos e escleróticos, normalmente não existindo um limite nítido entre o tumor e o pâncreas não neoplásico. Com frequência, observa-se invasão de estruturas adjacentes, incluindo colédoco, duodeno, grandes vasos e tecidos moles peri-pancreáticos. Histologicamente, caracterizam-se por glândulas atípicas entremeadas por um denso estroma fibrótico, e grande volume de mucina no citoplasma das células tumorais. Na

imunohistoquímica, são caracterizados pela expressão de antígenos de mucina relacionados a carboidratos, tais como antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9), DU-PAN-2, Span 1, mucina (muc 1), e citoqueratinas 7,8,18 e 19 (KLIMSTRA e ADSAY, 2001).

De acordo com a localização dos adenocarcinomas de pâncreas, 78% estão localizados na cabeça, 11% no corpo, e 10% na cauda do pâncreas (SENER et al, 1999). De modo geral, tumores da cabeça se manifestam por dor abdominal ou icterícia e tumores de corpo e cauda muitas vezes passam despercebidos por apresentarem apenas sintomas inespecíficos, tais como dor abdominal ou dorso-lombar, emagrecimento, náusea, anorexia, saciedade precoce e alterações no hábito intestinal (BELL, 1957; BROOKS e CONLON, 2001).

Em casos de adenocarcinoma ductal, a sobrevida é maior entre os pacientes que têm o tumor ressecado, entretanto esse número corresponde a apenas 5 a 20% dos casos, e em até 58% dos casos nenhum tratamento direcionado para o tumor é realizado devido à sua natureza agressiva. Mesmo no grupo que tem o tumor ressecado, apenas 25% sobrevivem em 5 anos (BROOKS e CONLON, 2001; SENER et al, 1999).

A evolução no conhecimento da genética do câncer de pâncreas incluindo a descoberta de marcadores efetivos para detecção precoce e precisa desta neoplasia, bem como a identificação de potenciais alvos para intervenção terapêutica são de fundamental importância na tentativa de reduzir sua elevada taxa de mortalidade. Eventos moleculares já bem estabelecidos e correlacionados à patogênese das neoplasias pancreáticas ductais, incluem a ativação do oncogene K-ras em mais de 80% dos casos, (MINAMOTO; MAI e RONAI, 2000) expressão aumentada do receptor do fator de crescimento epidermal (HER) e a inativação dos genes supressores de tumor P53, p16, DPC4 e BRCA2 (KOLIOPANOS et al, 2008). A ativação de K-ras apresenta-se como evento precoce, a inativação de p16 como um estágio intermediário e a inativação de p-53, DPC4 e BRCA2 como eventos mais tardios no processo de transformação (FELDMANN et al, 2007).

Diversos outros genes primordiais para o desenvolvimento também foram e estão sendo cada vez mais associados a cânceres em humanos, como os *homeobox*, pois se mostram desregulados em uma ampla gama de neoplasias malignas, incluindo as de pele, colón, próstata, mama, ovário, rim, pulmão, tireóide, além de leucemias (BUZZAI e LICHT, 2008; CHRISTENSEN et al, 2008; HENNESSY e MILLS, 2006).

Geralmente, as consequências dos genes homeobox para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2003). Os genes homeobox são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento (do inglês “master control genes”), pois atuam no topo da hierarquia genética regulando aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular de uma série de organismos dos mais simples aos mais complexos. Esses genes são assim chamados por possuírem um segmento de DNA característico (o homeobox) constituído de 180 pb e que codifica uma proteína com 60 aminoácidos que tem função de fator de transcrição e possui a finalidade de interagir com genes alvos promovendo sua ativação, repressão ou mesmo modulação, o que está na dependência do sinal recebido pela célula. Essa porção proteica de 60 aminoácidos, chamada de homeodomínio, possui estrutura de hélice-alça-hélice e se caracteriza pela similaridade na sequência de aminoácidos, pela especificidade ao DNA, e pelos padrões de expressão durante o desenvolvimento animal. Pouco se sabe sobre os genes alvos das homeoproteínas codificadas pelos homeobox. Sugere-se que essas homeoproteínas atuem em genes que codificam moléculas de adesão, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (AZPIAZU et al, 1996).

Apesar dos efeitos biológicos diferentes que ocorrem in vivo, os homeodomínios de várias proteínas homeobox diferentes compartilham grande similaridade sequencial e podem se ligar, in vitro, de maneira e com similar afinidade a muitas áreas de DNA que contém a sequência de nucleotídeos ATTA no núcleo (GEHRING et al, 1994).

O nome homeobox foi dado a esse grupo de genes porque foram descobertos a partir dos genes homeóticos da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, responsáveis pelo fenômeno conhecido como homeose, quando sofrem mutação. A homeose consiste na transformação de uma estrutura corporal em outra. Exemplo típico ocorre na mutação do gene Antennapedia, que acarreta a formação de patas no lugar das antenas (MORATA e KERRIDGE, 1982). Sabe-se que nos vertebrados os genes homólogos ao complexo homeótico da *Drosophila* (HOM-C) estão dispostos de maneira agrupada e são chamados de HOX. Em humanos estão representados por 39 membros dispostos em quatro grupos (HOX-A, HOX-B, HOX-C e HOX-D), localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente, e contém 9 a 11 genes em cada um desses grupos. Foi proposto que fatores de crescimento representam

alvos normais da ativação de genes HOX durante a embriogênese. Exemplo típico ocorre em melanomas, onde a hiperexpressão do HOXB7 ativa constitutivamente o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), favorecendo a proliferação celular descontrolada (CARÉ et al, 1996). O gene HOXB7 mostrou-se também expresso em câncer de mama e nesse caso foi associado com pior prognóstico (MAKIYAMA et al, 2005).

Em uma análise preliminar realizado Chile et al. (2013), foi observado que o RNA mensageiro do gene HOXB7 estava hiper expresso em uma linhagem de adenocarcinoma pancreático humano, MIA PaCa-2. Esta hiperexpressão foi observada nessa linhagem quando comparada ao tecido pancreático normal. Foi demonstrado que a utilização de um RNA de interferência, inibiu a expressão do transcrito do gene HOXB7 com inibição da proliferação celular e do crescimento em soft ágar.

A luz destas observações, que demonstram a participação do transcrito do gene HOXB7 na proliferação das células tumorais pancreáticas, aventamos a possibilidade de que o marcador sorológico CA 19-9 quando expresso no sobrenadante das culturas de células de adenocarcinoma pancreático poderia ter sua concentração modificada após o fenômeno de interferência com o RNAi do gene HOXB7.

### **1.3 Marcadores tumorais**

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Os marcadores tumorais são úteis no manejo clínico de pacientes com câncer, desde o auxílio no diagnóstico e estadiamento até a avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidiva e prognóstico, além de auxiliar na decisão da terapia a ser utilizada, bem como o uso de terapias adjuvantes (ALMEIDA et al, 2007).

Estas macromoléculas normalmente são sintetizadas na presença de uma imensa variedade de células neoplásicas, onde podem ser originadas pela hiperativação do metabolismo destas, sendo então produtos endógenos. Podem ser os produtos de genes recém ligados, que até então não eram expressos, ou antígenos adquiridos recentemente em nível celular e sub-celular (MALATI et al, 2007).

O surgimento e a concentração destes marcadores tumorais estão altamente relacionadas à formação e ao crescimento de tumores malignos (MALATI et al, 2007). Podem ser detectados em células esfoliadas ou distribuídas, nos diferentes fluídos corporais, como saliva, urina, escarro, derrame, líquido cefalorraquidiano, ou ainda em circulação sanguínea periférica ou no plasma. Segundo Urban e Catane (2009) deve-se observar que estes marcadores estão frequentemente presentes em baixas concentrações no soro de indivíduos saudáveis.

Uma variedade de marcadores sorológicos tem sido associados ao tumor de pâncreas, estes por sua vez, podem ser amplamente divididos em quatro grupos: antígenos associados ao tumor, enzimas, antígenos oncofetais e outros, incluindo a produção ectópica de hormônios e outros peptídeos (PODOLSKY, 1984; REBER, 1998). Infelizmente, essa grande maioria dos marcadores tumorais descritos ainda são falhos quanto à promessa inicial. Hoje os marcadores mais utilizados são os antígenos associados ao tumor (RUCKERT; PILARSKY E GRUTZMANN, 2010).

Os marcadores tumorais antigênicos do câncer de pâncreas podem ser molecularmente definidos como antígenos de carboidratos, glicoproteínas, mucinas e citoqueratinas. O estabelecimento destes, deu-se principalmente pela tecnologia de hibridoma, com o emprego de sondas monoclonais foi possível definir os diversos tipos de antígenos (REBER, 1998; RHODES, 1990).

Entre os antígenos carboidratos, o CA 19-9, definido através de anticorpo monoclonal IgG de camundongo, constitui um oligossacarídeo presente na cadeia glicosilada de mucina de alto peso molecular, sendo atualmente o marcador mais estudado (RÜCKERT; PILARSKY e GRÜTZMANN, 2010).

Outros tipos de marcadores antigênicos também são elevados em icterícia obstrutiva, o mecanismo que leva ao aumento destes marcadores aliado à colestase ainda não é muito claro, porém, propõe-se que isso é uma consequência de lesões nos ductos biliares causados pelos sais biliares secundários e a inflamação, com isso os antígenos são lançados a partir do epitélio (RHODES, 1990).

O CA 19-9 atualmente é o marcador de escolha para o monitoramento da doença bem como no diagnóstico diferencial da pancreatite crônica sintomática. Dentre os marcadores tumorais, é comprovado como o marcador mais útil narrado ao adenocarcinoma pancreático e às neoplasias gastrointestinais de um modo geral. Este antígeno foi identificado por Koprowski et al em 1979. Trata-se de um antígeno carboidrato citosólico, uma lacto-N-fucopentose sinalizada de 210 kDa, da família das

mucinas, fortemente associado ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis, pois pacientes negativos para este antígeno (a-, b-) não produzem CA 19-9 (MALATI et al, 2007; PERKINS et al, 2003; SCHLIEMAN et al, 2003). É sintetizado normalmente pelas células dos ductos pancreáticos e pelos epitélios cólico, gástrico, da vesícula biliar, endometrial e salivar (CARPELAN-HOLMSTRÖM et al, 2004; SALCES et al, 2004).

Embora o CA 19-9 não seja utilizado para triagem de indivíduos assintomáticos, constitui o principal teste sorológico associado ao prognóstico e evolução do câncer de pâncreas, com sensibilidade de 70 a 90% e especificidade de 68 a 91% (AUDISIO et al, 1996).

Takada et al. (1993), referiram que o antígeno CA 19-9 exerce papel de ligante específico para a molécula de adesão endotelial de leucócito (ELAM-1), o que propicia as células tumorais se aderirem às células circulantes e, com isso dar início ao processo metastático. Este ainda, pode estar envolvido no processo de angiogênese tumoral influenciando o rápido crescimento do tumor e das metástases. Esta pode ser uma das razões que explica a grande associação entre os níveis séricos aumentados do CA 19-9 à frequência elevada de metástases, e conseqüentemente, pior prognóstico.

Segundo o estudo de Glenn et al. (1988), foi demonstrado que os níveis plasmáticos de CA 19-9 em pré tratamento, estavam diretamente relacionados com a carga tumoral dos pacientes com câncer de pâncreas clinicamente localizado. Foi provado através do trabalho de Lima et al. (2002) uma correlação estatisticamente significativa entre as mudanças nas medições do tumor durante o tratamento com gencitabina e irinotecano e a concentração do antígeno CA 19-9, fato este que considera este marcador como patognomônico do câncer de pâncreas.

#### **1.4 miRNAs - RNA de Interferência**

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA que não codificam proteínas endógenas, apresentam aproximadamente cerca de 19 a 31 nucleotídeos de comprimento (CHU e RANA, 2007). Sua descoberta tem revolucionado nos últimos tempos toda a compreensão que tínhamos sobre a regulação de genes, a diferenciação celular, proliferação, apoptose, metabolismo e a fisiopatologia de muitas doenças, principalmente o câncer (JORDAN ET al, 2010).

Esta técnica de silenciamento gênico foi descrita pela primeira vez em plantas (petúnias) no início da década de 1990. Onde as plantas que até então superexpressavam os genes para a produção de pigmentos, apresentavam flores brancas graças à inibição da síntese destes pigmentos pelo silenciamento do transgene e do gene endógeno. Posteriormente, este fenômeno foi observado em outras espécies de plantas, fungos e outros organismos, entretanto, o mecanismo que levava a este achado ainda era desconhecido (COGONI e MACINO, 2000; NAPOLI et al, 1990).

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós transcricional agindo sobre o RNA mensageiro (RNAm). Uma molécula de fita dupla de RNA se incorpora na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, em seguida se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizado no RNAm-alvo com isso, ocasionando o silenciamento por inibição da tradução e/ou degradação do RNAm (PETERSEN et al, 2005).

Os RNAi podem ser classificados em três grupos com base na sua principal origem ou os componentes ao qual estão conectados:

- miRNAs – tamanho varia entre 19 a 25 nucleotídeos.
- siRNAs – pequenos RNAs de interferência, tamanho varia entre 19 a 21 nucleotídeos.
- piRNAs – são RNAs associados à proteína Piwi, tamanho varia entre 26 a 31 nucleotídeos.

Sendo os dois primeiros – miRNAs e siRNAs – gerados a partir de um precursor (RNA largo de dupla cadeia), ao qual são cortados por Dicer, uma enzima ribonuclease III. Já o terceiro – piRNA- são gerados independente do precursor Dicer. Supõe-se que estas moléculas surgiram evolutivamente como defesa contra a invasão viral (BAULCOMBE, 2004; PIÑA-SÁNCHEZ e SALCEDO, 2006; VÁZQUEZ-ORTIZ, 2006).

A propriedade inibitória desses miRNAs de dupla cadeia, executam um importante papel na degradação de sequências análogas de RNAm complementar, denominando-os assim de RNA de interferência (RNAi) (HANNON e ROSSI, 2004).

Os RNAi participam de processos como: controle de transposons, remodelação da cromatina, inibição da tradução e inibição e degradação de RNAm específico de um gene (ZHANG et al, 2007). Estas funções fazem parte dos complexos mecanismos regulatórios dos genes, nos processos fisiológicos, como a

embriogênese, a proliferação celular e na apoptose, e nos processos patológicos, como o câncer (WINTER et al, 2009).

A técnica de interferência por RNAi é hoje a mais potente entre outras estratégias de terapia gênica, de grande potencial, tem resultado em metodologias bem-sucedidas para o silenciamento de uma grande variedade de genes codificadores de proteínas. Graças à sua alta especificidade, é capaz de interagir com alelos relacionados à doença que diferem do alelo normal por alguns poucos nucleotídeos (BERTRAND et al, 2002).

O uso de RNAi como aplicação clínica terapêutica é considerado atualmente altamente promissor no combate a doenças que expressam de forma anormal determinados genes, onde a anormalidade pode ser identificada como causa ou o fator contribuinte. Entre essas doenças podemos citar câncer, doenças genéticas dominantes, doenças autoimunes e infecções virais (AAGAARD e ROSSI, 2007).

Este fenômeno tem sido utilizado com sucesso em modelos experimentais no silenciamento de genes críticos para a viabilidade, proliferação e disseminação de células tumorais (SALVI et al, 2004; ZHANG et al, 2004), permitindo uma revolução tecnológica no ramo farmacêutico com a descoberta de novas drogas terapêuticas (STEVENSON, 2004).

O câncer, é caracterizado basicamente pelo descontrole da proliferação celular e a inibição da apoptose. Diversas pesquisas sugerem que os miRNAs regulam o funcionamento dos oncogenes, genes supressores de tumor, responsáveis por codificarem proteínas implicadas no controle do crescimento celular e na apoptose (CHENG et al, 2005; REINHART et al, 2000).

Há diversos estudos da aplicação dos miRNAs como agentes terapêuticos, é o caso da utilização de miRNA sintéticos transfectados mediante lipossomas em diversas linhagens celulares (TONG, 2006). Isto tem nos permitido a obtenção de diversas informações do funcionamento de diferentes genes e o relacionamento destes, com o estabelecimento do câncer, como é o caso deste estudo.

De acordo com o estudo de Yun et al. (2004) sobre a técnica de RNAi contra o Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) humano em ratos com câncer de cérebro humano, demonstrou que esta terapia gênica de transferência de genes não virais específicos à sequências de nucleotídeos do EGFR, quando administradas semanalmente, aumentou 88% o tempo de sobrevivência desses animais.

Segundo Pulukuri et al. (2005), pequenas construções de RNAi inibiu significativamente a expressão do receptor de uroquinase (uPAR) e os níveis de RNAm. Seus dados demonstraram que esta inibição em células PC3 resultaram numa redução dramática da invasão das células do tumor, a viabilidade das células e a indução da apoptose. Refletindo na inibição do crescimento tumoral e a sobrevivência de um modelo de camundongo com câncer de próstata.

A terapia gênica de inibição por RNAi, promete o mais alto nível de especificidade, porém ainda é bastante dificultada pela falta de captação intracelular, a estimulação imunológica inespecífica e a limitada estabilidade sanguínea (SCHIFFELERS et al, 2004).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar e quantificar a presença do marcador CA 19-9 em cultura de células de adenocarcinoma pancreático após o silenciamento do gene HOXB7

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar a concentração do marcador tumoral CA 19-9 em cultura de células de adenocarcinoma pancreático BxPC3, MIA PaCa2 e Capan-1.

Avaliar a concentração do CA 19-9 após a inibição do transcrito do gene HOXB7 em sobrenadante de linhagem celular de adenocarcinoma pancreático humano utilizando o método de RNA interferente (RNAi).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Celular (LIM 25-HCFMUSP).

Foram utilizados para esta pesquisa linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais, MIA PaCa-2 (*ATCC® Number: CRL-1420™*), BxPC-3 (*ATCC® Number: CRL-1687™*) e Capan-1, derivada de um sítio metastático no fígado (*ATCC® Number: HTB-79™*) obtidas na ATCC (*American Type Culture Collection*), um centro de recursos biológicos que autentica linhagens celulares e gerencia a logística de preservação a longo prazo, bem como a distribuição de culturas para a comunidade científica.

O presente estudo obteve dispensa do comitê de ética (Protocolo – 037/2012).

#### 3.2 Cultura Celular

A linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibióticos contendo 10000 unidades de penicilina e 10000µg de estreptomicina por mililitro (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*).

Uma vez em cultura, as duas linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A troca de meio de cultura foi efetuada a cada 24 horas até que as células atingissem confluência para a expansão. Nesta etapa, o meio de cultura presente em cada garrafa foi armazenado para a dosagem do marcador CA 19-9 futuramente, e as células aderidas lavadas com 2mL de PBS (*phosphate buffered saline*). Concluída a lavagem, 1mL de tripsina foi utilizado para inibir a aderência celular. As células soltas foram então transferidas para um tubo cônico após o acréscimo de 3mL de meio de cultura à garrafa seguido de homogeneização. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 1700 r.p.m por 2 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet eluído com 1mL de meio. A solução resultante foi transferida para uma garrafa de 75cm<sup>2</sup> contendo meio para manter o cultivo.

As células foram cultivadas em garrafa de 75cm<sup>2</sup> até atingirem confluência. Os processos de lavagem e tripsinização foram mais uma vez repetidos, todavia, o pellet resultante da centrifugação foi eluído em meio para contagem das células em câmara de Neubauer. Com a contagem finalizada, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células foram utilizadas para a técnica de interferência e a concentração do CA 19-9 verificada em triplicatas do sobrenadante.

### 3.3 Inibição seletiva do transcrito do gene HOXB7 com RNA interferente (RNAi)

A interferência por RNA foi realizada com o estojo comercial *TriFECTa™ Dicer-Substrate RNAi Kit* (IDT, Coralville, IA, USA), o qual apresenta como constituintes três sequências de siRNA (*small interfering RNA*) alvo-específicas, bem como três sequências dupla-fita como controles, a primeira marcada com TYE™ 563; a segunda definida como um controle negativo universal (NC1); e a terceira, um controle positivo que apresenta como alvo o transcrito do gene *HPRT*.

Como descrito anteriormente, em cada um dos poços da placa foram depositadas 10<sup>5</sup> células em 2mL de meio de cultura específico, as quais foram mantidas em estufa 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Concluído o período de incubação, que foi empregado para a aderência celular, o meio de cultura presente em cada poço foi descartado e substituído por meio específico sem antibiótico em volume de 1,5mL (poços destinados ao tratamento) ou 2,0mL (poços destinados à linhagem parental).

O método escolhido para a transfecção das células em cultura foi o de lipofecção. O tratamento foi efetuado de acordo com as recomendações do fabricante, assim, a sequência controle marcada com TYE™ 563 (2µL) e o controle positivo (2µL), ambos na concentração de 10µM, foram diluídos em 248µL de meio Opti-MEM® (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*) e acrescidos de 2% de *Lipofectamine RNAi Max Reagent* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*) já incubada em Opti-MEM por 5 minutos (5µL de lipofectamine em 245µL de Opti-MEM), totalizando um volume de 500µL. A solução resultante foi mais uma vez incubada a temperatura ambiente, agora por 20 minutos, e gotejada em caracol nos poços da placa de cultura destinados ao tratamento, atingindo, dessa forma, a concentração de 10nM. Uma nova incubação à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> foi realizada por um período de 48 horas e o resultado avaliado.

### 3.4 Extração e quantificação de RNA

A extração de RNA total, desempenhada após o processo de inibição, foi efetuada com a utilização de uma solução a base de fenol e isotiocianato de guanidina denominada *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*, que representa uma melhoria para o método de isolamento de RNA de fase única desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

Dessa forma, o meio de cultura presente em cada poço da placa foi aspirado e armazenado para o cumprimento da etapa futura – dosagem do marcador CA 19-9. Foi adicionado às células em cultura 1mL de *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)* em cada poço da placa. Após homogeneização por pipetagem, a mistura foi transferida para um tubo *ependorf* estéril de 1,5mL e incubada em temperatura ambiente por um período de 5 minutos. Concluída a incubação, adicionou-se 200µL de clorofórmio à solução, a qual foi, em seguida, agitada vigorosamente em *Vortex Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)* por 15 segundos; novamente incubada em temperatura ambiente, agora por 3 minutos; e centrifugada nas seguintes condições, 10000r.p.m. por 20 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *ependorf* estéril de 1,5mL e o RNA precipitado com 500µL de álcool isopropílico. A mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos em gelo e centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi removido e ao botão de RNA acrescido 500uL de etanol 70% para lavagem. Depois da homogeneização em *Vortex Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)* e centrifugação nas grandezas de 10000 r.p.m., 20 minutos e 4°C, o botão de RNA foi solubilizado em 30uL de água livre de RNAses.

As amostras foram conservadas em freezer -80°C até o momento do uso, contudo, antes do armazenamento, a concentração de RNA total de cada uma delas foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)* pela absorbância das preparações a 260 nanômetros (nm), utilizando como valor padrão uma unidade de densidade óptica (DO), que equivale a 40µg/mL de RNA. Além disso, foi avaliado a integridade do RNA extraído por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

### 3.5 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de uma quantidade fixa de RNA total, estabelecida em 1000ng para cada amostra. As reações foram executadas com a utilização do estojo comercial *SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*, conforme recomendado pelo fabricante e demonstrado a seguir:

A) Primeiramente, a mistura abaixo foi preparada (MIX):	
10X First-Strand Buffer	2,0uL
Oligo (dT) 12-18 Primer	2,0uL
dNTPs	0,8uL
Água estéril q.s.p	4,2uL
SuperScript™ III RT	1,0uL

B) A solução resultante foi acrescida de 10,0uL de cada amostra de RNA diluída em água estéril q.s.p. respeitando a concentração de 1000ng/uL.

A nova mistura elaborada foi homogeneizada por pipetagem e incubada no termociclador em três condições distintas, primeiramente 50°C por 2 minutos e 95°C por 2 minutos, em seguida 45 ciclos de: 95°C-15 segundos; 56°C-30 segundos; 72°C-30 segundos, e por fim, etapa única de 72°C por 5 minutos.

### 3.6 Expressão do RNAm do gene HOXB7 após interferência

A análise da expressão do transcrito do gene *HOXB7* foi realizada pela técnica de qPCR em tempo real. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata a partir de 100ng de cDNA, 10pmol de cada primer e 12,5µL do reagente *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*, totalizando um volume de 25µL após a adição de água estéril. O gene Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) foi utilizado como referência nesta análise, enquanto a linhagem parental foi considerada a amostra normalizadora.

As reações foram efetuadas segundo o protocolo abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3 – Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de expressão do gene *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e CAPAN-1.**

Processo Inicial		Ciclagem			Processo Final
1ª etapa	2ª etapa	45 ciclos			Etapa única
50°C	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
2 minutos	2 minutos	15 segundos	30 segundos	30 segundos	5 minutos

(CHILE, 2013)

O modelo matemático proposto por Livak e Schmittgen (2001) e padronizado por Chile et al. (2013), foi mais uma vez empregado na análise da expressão gênica, visto que a eficiência de amplificação do gene alvo foi semelhante àquela observada para o gene referência.

### **3.7 Avaliação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante das culturas celulares**

Para avaliação da concentração do marcador sorológico CA 19-9, foram realizadas triplicatas das culturas celulares BxPC3, MIA PaCa2 e Capan-1, onde foi colhido o sobrenadante destas separadamente, antes e após a inibição utilizando como controle as culturas sem inibição do transcrito do *HOXB7*.

O sobrenadante foi armazenado em um tubo cônico e conservado em freezer -80°C até o momento da dosagem.

A concentração do CA 19-9 foi determinada por imunensaio de quimioluminescência para determinação quantitativa *in vitro* em sobrenadante de cultura de células de adenocarcinomas pancreáticos. O kit utilizado para a determinação da concentração do marcador CA 19-9 foi *CA 19-9 assay: Abbott i2000 Architect* (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) em equipamento automatizado, *Architect i1000*, e os valores obtidos analisados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do CA 19-9 em sobrenadante de cultura celular das linhagens BxPC3, MIA PaCa2 e Capan-1.

Foram testadas para a avaliação do CA 19-9 54 amostras de sobrenadante de células em cultura, sendo 18 da linhagem MIA PaCa2, 18 da linhagem BxPC3 e 18 da Capan-1.

As células em cultura atingiram confluência e foram semeadas em placas para cultura de células de 6 poços, com contagem celular de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup>.

De cada linhagem foram colhidas amostras do sobrenadante em triplicata para CONTROLE NEGATIVO (CN), PARENTAL e TRATADAS com o RNAi HOXB7.

O kit utilizado para a determinação da concentração do marcador CA 19-9 foi *Abbott i2000 Architect (CA 19-9 assay)* onde o *cut off* adotado foi de 37U/mL. A linearidade do teste é de 2,00 U/mL – 1200,00 U/mL, onde amostras com valores acima da linearidade foram diluídas e determinadas a partir do fator de diluição.

Inicialmente foi determinada a concentração do CA 19-9 em sobrenadante das culturas celulares antes da inibição do gene pelo RNAi, como segue na tabela a seguir (Tabela 4).

**Tabela 4 – Determinação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante de cultura celular de acordo com a quantidade de células e a linhagem celular antes do tratamento com RNA interferente.**

BxPC3	CN $1 \times 10^5$ células	693 U/mL
	CN $1 \times 10^6$ células	4519 U/mL
MIA PaCa2	CN $1 \times 10^5$ células	<2,00 U/mL
	CN $1 \times 10^6$ células	<2,00 U/mL
Capan-1	CN $1 \times 10^5$ células	<2,00 U/mL
	CN $1 \times 10^6$ células	<2,00 U/mL

Sendo **CN (média)**, a média das triplicatas dos controles negativos – células sem tratamento inibitório, acrescidas somente de meio de cultura.

Nos testes executados em sobrenadante das linhagens celulares MIA PaCa2 e Capan-1 não foram observadas quantidades significativas do antígeno CA 19-9, não sendo possível avaliar os efeitos da inibição no sobrenadante destas células tratadas.

#### 4.2 Avaliação do CA 19-9 em sobrenadante de cultura de células BxPC3 após o fenômeno de interferência.

Na avaliação da concentração do CA 19-9 antes e após a inibição do gene HOXB7, obtivemos os seguintes resultados (Tabela 5).

**Tabela 5 – Determinação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante de cultura celular de células da linhagem BxPC3 antes e após do tratamento com RNA interferente.**

		1x10 <sup>5</sup> células	1x10 <sup>6</sup> células
<b>BxPC3</b>	CN (média)	693 U/mL	4519 U/mL
	Parental (média)	425 U/mL	3938 U/mL
	Tratadas (média)	745 U/mL	4426 U/mL

Sendo **PARENTAL (média)**, a média das triplicatas dos sobrenadantes de células parentais – células sem tratamento inibitório, acrescidas somente de meio de cultura, Opti-MEM e lipofectamina.

Sendo **TRATADAS (média)**, a média das triplicatas dos sobrenadantes de células tratadas com o RNA interferente específico para o gene HOXB7.

Estes testes demonstraram a presença do antígeno em concentrações analíticas apenas na cultura de células da linhagem BxPC3 não sendo observada diferença estatística significativa entre as concentrações do CA 19-9 após o fenômeno de interferência.

### **4.3 Avaliação comparativa do CA 19-9 antes e após a inibição do gene HOXB7.**

Aparentemente, a análise dos dados obtidos não demonstrou diferença significativa, sendo necessário ampliarmos nosso estudo a fim de obtermos mais resultados e assim fazer uma análise estatística adequada.

## 5 DISCUSSÃO

Diversos marcadores tumorais sorológicos têm sido associados ao tumor de pâncreas, sendo atualmente, o CA 19-9 o marcador mais útil narrado ao adenocarcinoma pancreático, servindo como uma ferramenta de grande importância no monitoramento desta doença. Por ser uma análise ainda pouco sensível, sua usualidade cabe principalmente no prognóstico, uma vez que há a diminuição da concentração do CA 19-9 após a cirurgia curativa e o aumento deste marcador no soro de pacientes na presença da doença recorrente. Tornando-o assim um pré-requisito na evolução do câncer de pâncreas.

A contribuição de vários estudos utilizando a cultura de células tem sido um recurso complementar e importante na clínica oncológica. Este modelo experimental tem permitido o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e a identificação de marcadores de diagnóstico e prognóstico muito úteis para a decisão terapêutica. Porém, deve-se considerar diversas regras importantes, a fim de uniformizar os diferentes métodos, como as análises, os subgrupos de doentes, os objetivos, entre outros. Somente desta forma se pode admitir a cultura celular como um modelo útil para a comparação ao modelo in vivo (GUZMAN e JORDAN, 2004; R. IAN, 1987).

Na avaliação da concentração do antígeno CA 19-9 no sobrenadante das culturas celulares deste estudo, não foram detectados quantidades significativas deste marcador nas linhagens Capan-1 e MIA PaCa2, em ambas concentrações de células ( $1 \times 10^5$  céls/cm<sup>3</sup> e  $1 \times 10^6$  céls/cm<sup>3</sup>) não sendo assim, possível fazer uma avaliação dos efeitos da inibição, a partir do sobrenadante dessas células tratadas neste experimento. Estudos anteriores de Chile et al (2013), demonstraram que o silenciamento do gene *HOXB7* na linhagem Capan-1 não caracterizou qualquer alteração em processos biológicos. Diferentemente das linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3, a linhagem Capan-1 é derivada de sítio metastático no fígado, conseqüentemente, o microambiente, associado as características genóticas e fenóticas que diferenciam os tipos celulares, talvez represente a causa para esse evento.

Em contrapartida, o sobrenadante das culturas celulares da linhagem de células de adenocarcinoma pancreático BXPC3 demonstrou quantidades analíticas para o marcador CA 19-9 sendo possível realizar o procedimento de interferência utilizando o iRNA contra o gene HOXB7.

A técnica de degradação de RNAm mediada por *iRNA* é aplicada na tentativa de desvendar o papel de genes específicos no processo tumorigênico. Nesse contexto, Chile et al (2013), observaram a inibição de *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 indicando a participação de mais uma molécula no desenvolvimento do câncer pancreático.

As modificações do funcionamento gênico podem ser consequências de alterações estruturais causadas por mutações, deleções, translocações cromossômicas, amplificações gênicas e polimorfismos de nucleotídeos. Estas mudanças podem ser apenas funcionais também, causadas pelo silenciamento aberrante, chamados de epigenético, que podem acontecer como consequência de metilação de segmentos cromossômicos ou interferência de RNA inibitório (RNAi).

Se por um lado a participação de mecanismos epigenéticos na modulação de expressão dos genes homeobox não está completamente esclarecida, por outro, o envolvimento de microRNAs está cada vez mais fundamentado. Os microRNAs (miRNA) são pequenas moléculas de RNA não codificadoras capazes de induzir a repressão pós-transcricional por meio da ligação a sequências específicas nas regiões 3' não traduzidas (3'UTRs) dos transcritos correspondentes. O silenciamento da expressão gênica por miRNAs pode ser mediado pela desestabilização do RNAm alvo ou por repressão da tradução (WU et al, 2006).

Entre as décadas de 1980 e 1990, já se anunciavam em alguns artigos sobre a terapia gênica como uma nova revolução da medicina. Hoje em dia com os recentes avanços, estão aniquiladas as dúvidas de que as perspectivas que eram esperadas anteriormente se fazem realidade, entretanto os sucessos devem ser observados com otimismo cauteloso, e ainda requerem intenso trabalho de pesquisa. De modo a certificar, se não a cura, ao menos uma melhoria de qualidade de vida de pacientes com doenças genéticas herdadas ou adquiridas (CARLOS e ARMANDO, 2007).

O desenvolvimento recente de alguns métodos, tais como o perfil de expressão do RNAm pelo transcriptoma e a análise das regiões de interação entre DNA e proteína em todo o genoma, indicaram que as proteínas HOX controlam a transcrição de centenas de genes e a falta de HOXB7 poderia representar um estímulo

celular para a redução de expressão de genes ou cofatores envolvidos em diversos processos biológicos. Os resultados obtidos com o sobrenadante das células tratadas com RNAi, tanto na concentração de  $10^5$ , quanto na de  $10^6$ , não demonstraram diferenças estatísticas entre as concentrações do antígeno CA 19-9, não sendo possível até o momento caracterizar o antígeno CA 19-9 como marcador da inibição do gene HOXB7.

Será necessário a realização de outros testes para a complementação dos resultados. Ao desenvolver desta pesquisa identificamos algumas dificuldades, como a obtenção do kit utilizado para a quantificação do marcador tumoral, a quantidade de amostras, o desenvolvimento das culturas celulares e a disponibilidade do laboratório colaborador para o uso do equipamento automatizado Architect i1000.

## 6 CONCLUSÃO

No presente estudo, apenas a linhagem de células BxPC3 apresentou concentrações analíticas do antígeno CA 19-9.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações do marcador CA 19-9 antes e após o fenômeno de interferência utilizando o RNAi contra o gene HOXB7.

De acordo com este estudo, concluímos que não foi possível utilizar o marcador tumoral CA 19-9 como um *reflexo inibitório* do gene HOXB7, sendo necessário ampliar o número de amostras testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, L; ROSSI, JJ. **RNAi Therapeutics: principles, prospects and challenges.** Adv Drug Deliv Ver. v. 59. 2007.

ABATE-SHEN, C. **Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune.** Cancer Cell. v. 4. 2003.

ANDREN-SANDBERG, A; BACKMAN, PL; ANDERSSON, R. **Results of adjuvant therapy in resected pancreatic cancer.** Int J Pancreatol. v.21. 1997.

ALLEMA, JH; GOUMA, DJ; OBERTOP, H. **Tumores exócrinos do pâncreas.** 2005.

ALMEIDA, JRC et al. **Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura.** Ver Bras Cancerologia. v. 53. 2007.

AUDISIO, RA et al. **Clinical relevance of serological markers in the detection and follow-up of pancreatic adenocarcinoma.** Surg. Oncol. v. 5. 1996.

AZPIAZU, N et al. **Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm.** Genes Dev. v. 10. 1996.

BAULCOMBE, D. **RNA silencing in plants.** Nature. v. 431. 2004.

BELL, ET. **Carcinoma of the pancreas.** I. A clinical and pathologic study of 609 necropsied cases. II. The relation of carcinoma of the pancreas to diabetes melito. Am J Pathol. v. 33. 1957.

BERTRAND, JR et al. **Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo Biochem Biophys.** Res Commun. v. 296. 2002.

BROOKS, AD; CONLON, KC. **Pâncreas Câncer: Staging Systems and Techniques** apud Kelsen, DP et al. **Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice**. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

BUZZAI, M; LICHT, JD. **New molecular concepts and targets in acute myeloid leukemia**. *Curr Opin Hematol*. v. 15. 2008.

CANCER REGISTRATIONS IN WALES, 2008. **Welsh Cancer Intelligence and Surveillance Unit**. 2010.

CARÉ, A et al. **HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas**. *Mol Cell Biol*. v. 16. 1996.

CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK e ARMANDO MORAIS VENTURA. **Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica**. *REVISTA USP*, São Paulo, n.75, p. 50-61, setembro/novembro 2007.

CARPELAN-HOLMSTRÖM, M et al. **Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease**. *Oncology*. v. 66. 2004.

COGONI, C; MACINO, G. **Post-transcriptional gene silencing across kingdoms**. *Curr Opin Genet Dev*. V. 10. 2000.

CHENG, A et al. **Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis**. *Nucleic Acids Res*. v. 33. 2005.

CHILE, T. **Análise funcional e expressão do gene homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos ductais**. 2013. 141p. Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHOMCZYNSKI, P e SACCHI, N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Anal. Biochem*. v. 162. 1987.

CHRISTENSEN, KL et al. **The six family of homeobox genes in development and cancer.** Adv Cancer Res. v. 101. 2008.

CHU, CY e RANA, TM. **Small RNAs:** regulators and guardians of the genome. J Cell Physiol. v. 213. 2007.

CUBILLA, AL; FITZGERALD, PJ. **Morphological patterns of primary nonendocrine human pancreas carcinoma.** Cancer Res. v. 35. 1975.

ESTEVE, J; BENHAMOU, E; RAYMOND L. **Descriptive epidemiology: IARC Scientific Publications** N° 128. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1994 apud Cancer Research UK, 2008.

EKBOM, A et al. **Cholecystectomy and colorectal cancer.** Gastroenterology. v. 105. 1993.

FELDMANN, G et al. **Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia.** J Hepatobiliary Pancreat Surg. v. 14. 2007.

FERLAY, J et al. **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.** Ann Oncol. V.18. 2007.

GEHRING, WJ et al. **Homeodomain-DNA recognition.** Cell. v. 29. 1994.

GUZMAN, LM; JORDAN CT. **Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia.** Cancer Control. v. 11. 2004.

GREENLEE, RT et al. **Cancer statistics, 2000.** CA Cancer Journal for Clinicians. V.50. 2000.

HANNON, GJ; ROSSI, JJ. **Unlocking the potential of the human genome with RNA interference.** Nature. v. 431. 2004.

HENNESSY, BT; MILLS, GB. **Ovarian cancer: homeobox genes, autocrine/paracrine growth, and kinase signaling.** Int J Biochem Cell Biol. v. 38. 2006.

GLENN, J et al. **Evaluation of the utility of a radioimmunoassay for serum CA 19-9 levels in patients before and after treatment of carcinoma of the pancreas.** J Clin Oncol. v. 6. 1988.

GOLDBERG, ID et al. The probability of developing cancer. J Natl Cancer Inst. v.17. 1956 apud Cancer Research UK, 2008.

HOWLADER, N et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010.** National Cancer Institute, Bethesda, MD, April 2013.

JEMAL, A et al. **Cancer statistics, 2007.** CA Cancer Journal for Clinicians. V.27. 2007.

JORDAN, YZ LI et al. **Review: The role of microRNAs in kidney disease.** Nephrology. v. 15. 2010.

KERN, SE; GOGGINS, MG; HRUBAN, RH. **Pancreas Cancer: Molecular biology and genetics** apud KELSEN, DP et al. **Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

KLIMSTRA, DS; ADSAY, NV. **Pancreatic Cancer: Pathology** apud KELSEN, DP et al. **Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

KOPROWSKI, H et al. **Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.** Somatic Cell Genet. v. 5. 1979.

KOLIOPANOS, A et al. **Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic cancer.** Hepatobiliary Pancreat Dis int. v.7. 2008.

LILLEMOE, KD; YEO, CJ; CAMERON, JL. **Pancreatic cancer: state of the art care.** CA Cancer Journal for Clinicians. v. 50. 2000.

LIMA, CMR et al. **Irinotecan plus gemcitabine induces both radiographic and CA 19-9 tumor marker responses in patients with previously untreated advanced pancreatic cancer.** J Clin Oncol. v. 20. 2002.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** Methods, v.25. 2001.

MAISONNEUVE, P; LOWENFELS, AB. **Epidemiology of pancreatic cancer: an update.** Dig Dis. v. 28. 2010.

MALATI, T. **Tumour markers: an overview.** Ind J Clin Biochem. v. 2. 2007.

MAKIYAMA, K et al. **Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma.** Oncol Rep. v. 13. 2005.

MINAMOTO, T; MAI, M; RONAI, Z. **K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers a review.** Cancer Detect Prev. v. 24. 2000.

MORATA, G; KERRIDGE, S. **The role of position in determining homoeotic gene function in Drosophila.** Nature. v. 11. 1982.

NAPOLI, C; LEMIEUX, C; JORGENSEN, R. **Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*.** The Plant Cell. V. 2. 1990.

NIEDERHUBER, JE; BRENNAN, MF; MENCK, HR. **The National Cancer Data Base report on pancreatic cancer.** Cancer. v. 76. 1995.

OFFICE FOR NATIONAL STATISTICS, 2010. Cancer Statistics registrations: registrations of cancer diagnosed in 2008, England. N° 39, 2010.

PARKIN, DM et al. **Global cancer statistics, 2002**. CA Cancer Journal for Clinicians. v. 55. 2005.

PETERSEN, CP et al. **The biology of short RNAs**. The RNA World, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 2005.

PERKINS, GL et al. **Serum tumor markers**. Am Fam Physician. v. 68. 2003.

PULUKURI, SM et al. **RNA Interference-directed Knockdown of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Inhibits Prostate Cancer Cell Invasion, Survival, and Tumorigenicity in Vivo**. J. Biol. Chem. v. 280. 2005.

R. IAN FRESHNEY. **Culture of animal cells – A manual of basic technique**. Alan R Liss, Inc.; New York, 1987.

REINHART, BJ et al. **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans**. Nature. v. 403. 2000.

RIES, LAG et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002**. National Cancer Institute, Bethesda, November, 2005.

RÜCKERT, F; PILARSKY, C; GRÜTZMANN, R. **Serum Tumor Markers in Pancreatic Cancer-Recent Discoveries**. Cancers. v. 2. 2010.

SALCES, I et al. **Tissue CA19-9 content in colorectal adenomas and its value in the assessment of dysplasia**. Rev Esp Enferm Dig. v. 96. 2004.

SALVI, A et al. **Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells**. Mol Cancer Ther. v. 3. 2004.

SENER, SF et al. **Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database**. J Am Coll Surg. v. 198. 1999.

SCHIFFELERS, RM et al. **Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle.** *Nucleic Acids Research.* v. 32. 2004.

SCHLIEMAN, MG; HUNG, H; BOLD, RJ. **Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer.** *Arch Surg.* 2003.

STEVENSON, M. **Therapeutic potential of RNA interference.** *N Engl J Med.* v. 351. 2004.

TAKADA, A et al. **Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium.** *Cancer Res.* v. 53. 1993.

TOBACCO SMOKE AND INVOLUNTARY SMOKING. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer. 2004.

TONG, AW. **Small RNAs and non-small cell lung cancer.** *Curr Mol Med.* v. 6. 2006.

THOMAS, CD et al. **Diet divergence in two sympatric congeneric butterflies: community or species level phenomenon.** v. 4. 1990.

URBAN, D; CATANE, R. **Serum tumor markers in oncology.** *Isr Med Assoc J.* v. 11. 2009.

VÁZQUEZ-ORTIZ, G; PIÑA-SÁNCHEZ, P; SALCEDO, M. **Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA.** *Rev Invest Clín.* v. 58. 2006.

WINTER, J et al. **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nature Cell Biology.* v. 11. 2009.

WU, L; FAN, J; BELASCO, JG. **MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA.** *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 103. 2006.

**YUN, Z et al. Intravenous RNA Interference Gene Therapy Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor Prolongs Survival in Intracranial Brain Cancer.** Clin Cancer Res. v. 10. 2004.

**ZHANG, B et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** Dev Biol. v. 302. 2007.

**ZHANG, Y et al. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer.** Clin Cancer Res. v. 10. 2004.