THAIS CHILE

**Análise funcional e expressão do gene homeobox *HOXB7*
em adenocarcinomas pancreáticos
ductais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Chile, Thais

Análise funcional e expressão do gene homeobox *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais / Thais Chile. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Ricardo Rodrigues Giorgi.

Descritores: 1.Adenocarcinoma ductal do pâncreas 2.Expressão gênica
3.Genes homeobox 4.Gene *HOXB7* 5.Interferência de RNA

USP/FM/DBD-052/13

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu marido Julio Cesar

e à minha filha Maria Clara pelo amor

incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A Deus, fonte de sabedoria, pela força e coragem concedidas, permanecendo ao meu lado em todo o percurso desta caminhada.

Aos meus pais, José Roberto e Auzenir, exemplos incontestáveis de perseverança, pelo amor, dedicação e incentivo.

Ao meu irmão, Felipe, pela amizade e alegria com as quais sempre me ouviu.

Ao meu marido, Julio Cesar, pelo carinho, estímulo e, principalmente, por segurar minhas mãos em cada momento difícil. Amo você!

À minha filha, Maria Clara, prestes a nascer, capaz de alegrar meus dias com cada movimento e com todas as novidades fornecidas pela gravidez.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia, Gisele, Elza, Alessandra, Carol, Kátia, Jean e Henrique, por existirem em minha vida. Sem vocês não estaria aqui! Obrigada pela convivência, pela alegria de todos os dias e por cada brigadeiro dividido.

À Prof. Dra. Helena Paula Brentani, minha querida chefe, por dividir comigo um pouco de seu imenso conhecimento. Agradeço por todos os conselhos e pelo auxílio fundamental com a análise estatística deste trabalho.

À doce Dra. Márcia Kubrusly, pela amizade e por compartilhar seu amplo conhecimento em tumorigênese pancreática.

À Vanessa de Jesus Rodrigues de Paula, minha nova amiga, por auxiliar nos experimentos de Western blotting.

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo.

À bióloga Maria Angela Henriques Zanella Fortes pela colaboração fundamental nesta pesquisa, pela amizade, pela companhia nos últimos oito anos e, sobretudo, pelos momentos de descontração que tornaram meus dias mais alegres.

À Prof^a Dr^a Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannela, responsável pelo Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM25), pelo estímulo, boa vontade e colaboração durante o trabalho.

A todos os integrantes do LIM25 pelo carinho com o qual me receberam.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Finalmente, quero ressaltar meu eterno reconhecimento ao Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi por ter sido orientador persistente e amigo, que, com muita paciência, me aceitou com todas as minhas limitações e que, com sua competência, me ajudou na realização deste trabalho. Rick, sou imensamente grata pelo carinho e pela amizade ao longo de todos estes anos! Você foi o alicerce desta construção!

“Que ninguém se engane, só se consegue
a simplicidade através de muito trabalho”.

Clarice Lispector

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 Introdução.....	2
1.1 Adenocarcinoma pancreático ductal.....	2
1.2 Aspectos moleculares da carcinogênese pancreática.....	5
1.2.1 Genes supressores tumorais.....	5
1.2.2 Oncogenes	8
1.2.3 Genes de reparo do DNA.....	9
1.2.4 Fatores de crescimento.....	10
1.2.5 Expressão gênica.....	11
1.2.6 Encurtamento dos telômeros.....	12
1.2.7 Micro-RNAs (miRNAs)	12
1.2.8 Câncer pancreático familiar.....	13
1.3 Vias efetoras em adenocarcinoma pancreático ductal.....	13
1.3.1 Reativação da sinalização do desenvolvimento no câncer pancreático.....	15
2 Objetivos.....	28
3 Métodos.....	30

3.1 Casuística.....	30
3.2 Coleta do material.....	30
3.3 Extração e quantificação de RNA.....	30
3.4 Extração e quantificação de DNA.....	32
3.5 Síntese de cDNA (DNA complementar)	33
3.6 PCR quantitativa em tempo real.....	34
3.6.1 Determinação do gene referência.....	34
3.6.2 Expressão do gene <i>HOXB7</i>	37
3.6.3 Amplificação gênica.....	40
3.7 Cultura celular.....	43
3.7.1 Inibição do transcrito do gene <i>HOXB7</i>	45
3.7.1.1 Expressão do RNAm do gene <i>HOXB7</i> após interferência.....	51
3.7.1.2 Expressão da proteína codificada pelo gene <i>HOXB7</i> após interferência.....	53
3.7.1.3 Determinação da viabilidade celular.....	55
3.7.1.4 Citometria de fluxo após interferência.....	56
3.7.1.5 <i>Microarray</i> após interferência.....	59
3.8 Análise estatística.....	63
3.8.1 Expressão e amplificação do gene <i>HOXB7</i>	63
3.8.2 MTT e citometria de fluxo.....	63
3.8.3 <i>Microarray</i>	63
4 Resultados.....	67
4.1 Expressão do RNAm do gene <i>HOXB7</i> em adenocarcinomas pancreáticos ductais e tecidos metastáticos.....	67
4.2 Amplificação do gene <i>HOXB7</i>	70

4.3 Expressão do RNAm do gene <i>HOXB7</i> após tratamento com <i>siRNA</i>	71
4.4 Expressão da proteína codificada pelo gene <i>HOXB7</i> após tratamento com <i>siRNA</i>	73
4.5 MTT.....	74
4.6 Detecção dos marcadores BCL2, BAD, BAX e ciclina D1.....	76
4.7 Análise das fases do ciclo celular.....	81
4.8 Avaliação de apoptose.....	83
4.9 Identificação de genes diferencialmente expressos após interferência.....	84
5 Discussão.....	89
6 Conclusões.....	104
7 Anexos.....	106
8 Referências Bibliográficas.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
5-FU	5- fluorouracil
ACTB	Beta-actina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADP	Adenocarcinomas pancreáticos ductais
AKT	Proteína quinase B <i>(Serine/threonine-protein kinase)</i>
ANG2	Angiopoetina 2 <i>(Angiopoietin 2)</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B2M	Beta-2-microglobulina <i>(Beta-2-microglobulin)</i>
BAD	Promotor de morte celular associado a BCL2 <i>(BCL2-associated agonist of cell death)</i>
BAX	Proteína X associada a BCL2 <i>(BCL2-associated X protein)</i>
BCL2	Proteína anti-apoptótica <i>(B-cell CLL/lymphoma 2)</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico <i>(Fibroblast growth factor basic)</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CASP9	Caspase 9 <i>(Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase)</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CCNB2	Ciclina B2 <i>(Cyclin B2)</i>
CDC2	Quinase dependente de ciclina 1 <i>(Cyclin-dependent kinase 1)</i>
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CLDN	Claudinas
cm ²	Centímetros quadrados
CN	Controle negativo
COX	Ciclo-oxigenase
cRNA	RNA complementar
CT	Ciclo limiar <i>(Threshold cycle)</i>
Cy3	Cianina 3
DAG	Grafos acíclicos direcionados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade óptica
DPC4/SMAD4	Membro 4 da família SMAD <i>(SMAD family member 4)</i>

DTT	Ditiotreitol
E2F	Fator de transcrição E2F
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>E2F transcription factor</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
FAMM	Melanoma múltiplo familiar atípico
FGFR2	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos básico (<i>Basic fibroblast growth factor receptor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Identificação e quantificação das células pelo volume (<i>Forward Scatter</i>)
GLI	Família de reguladores transcricionais (<i>GLI family zinc finger</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
H2B	Histona 2B (<i>H2B histone</i>)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HER	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
HES	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HESCs	Células estromais do endométrio humano

HFGS	<i>Hand-foot genital syndrome</i>
HH	Hedgehog
hMLH1	Proteína de reparo de DNA incompatível Mlh1 (<i>DNA mismatch repair protein Mlh1</i>)
hMSH2	Proteína de reparo de DNA incompatível Msh2 (<i>DNA mismatch repair protein Msh2</i>)
hMSH3	Proteína de reparo de DNA incompatível Msh3 (<i>DNA mismatch repair protein Msh3</i>)
hMSH6/GTBP	Proteína de reparo de DNA incompatível Msh6 (<i>DNA mismatch repair protein Msh6</i>)
HOXB7	Homeobox B7
hPMS1	Proteína de reparo de DNA incompatível PMS1 (<i>DNA mismatch repair protein PMS1</i>)
hPMS2	Proteína de reparo de DNA incompatível PMS2 (<i>DNA mismatch repair protein PMS2</i>)
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase (<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina (<i>Insulin-like growth factor</i>)
IKB	Inibidor do fator nuclear Kappa Beta
IKK	Quinase do inibidor do fator nuclear Kappa Beta
IL8	Interleucina 8 (<i>Interleukin 8</i>)
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IMS	Instabilidade microssatélite

IP	Iodeto de propídeo
KRAS	GTPase monomérica <i>(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)</i>
M	Molar
mA	Miliampere
MBD1	Proteína contendo domínio de ligação a CpG metilada <i>(Methyl-CpG binding domain protein 1)</i>
MEIS	homeobox MEIS <i>(Meis homeobox)</i>
mg	Miligrama
miRNA	Micro-RNA
mL	Mililitro
MLL	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
mM	Milimolar
MMP2	Metaloproteinase de matriz-2 <i>(Matrix metalloproteinase-2)</i>
MMP9	metaloproteinase de matriz-9 <i>(Matrix metalloproteinase-9)</i>
MTOR	Serina-treonina quinase <i>(Serine/threonine kinase)</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MYC	Proto-oncogene c-Myc <i>(v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)</i>
N	Tecidos pancreáticos normais

NC1	Controle negativo universal
NEMO	Modulador essencial do fator nuclear Kappa B (<i>NF-kappa-B essential modulator</i>)
NFKB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NIP	Neoplasias intraepiteliais pancreáticas
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NUP98	Nucleoporina (<i>Nucleoporin 98kDa</i>)
p16INK4A/CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>)
p21	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>)
p27	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)
p53	Supressor tumoral p53 (<i>Tumor suppressor p53</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBX	Proteína homeobox PBX (<i>PBX homeobox protein</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Quinase de fosfatidilinositol
PIK3CA	Gene codificador da quinase de fosfatidilinositol (<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>)
PLGA	poli (ácido láctico–co–ácido glicólico)
PLK1	Proteína quinase reguladora de ciclo celular (<i>Polo-like kinase 1</i>)
pmol	Picomol
ppENK	Preproencefalina (<i>Preproenkephalin</i>)
PPomas	Tumores produtores do peptídeo pancreático
PRSS1	Tripsinogênio Catiônico (<i>Cationic trypsinogen</i>)
PS	Fosfatidilserina
PT	Tecidos pancreáticos peritumorais
PTC	Proteína supressora de tumor patched (<i>PTCH protein</i>)
PTEN	Fosfatase de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfatado (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
PUMA	Modulador de apoptose hiper-regulado por p53 (<i>BCL2 binding component 3</i>)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa

r.p.m.	Rotações por minuto
RALGDS	Estimulador da dissociação do nucleotídeo guanina de Ral <i>(Ral guanine nucleotide dissociation stimulator)</i>
RAP80	<i>Receptor-associated protein 80</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPL30	Proteína ribossomal L30 <i>(Ribosomal protein L30)</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
siRNA	RNA de interferência <i>(Small interfering RNA)</i>
SMAD	Família de proteínas envolvidas na transdução de sinais dos receptores de TGF-beta
SMAD2	Membro 2 da família SMAD <i>(SMAD family member 2)</i>
SMAD3	Membro 3 da família SMAD <i>(SMAD family member 3)</i>
SMO	Smoothened <i>(Smoothened, frizzled family receptor)</i>
SSC	identificação e quantificação das células pela granulosidade ou complexidade <i>(Side Scatter)</i>
STAT3	transdutor de sinal e ativador transcricional 3 <i>(Signal transducer and activator of transcription 3)</i>

STK11/LKB1	Serina-treonina quinase 11 <i>(Serine/threonine kinase 11)</i>
SVO	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
TALE	Fator homeobox 1 induzido por TGF- β <i>(TGFB-induced factor homeobox 1)</i>
TBS	Tampão Tris-salino <i>(Tris-buffered saline)</i>
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta <i>(Transforming growth factor, beta)</i>
TGF β RI	Receptor do fator de crescimento tumoral I <i>(Transforming growth factor, beta receptor 1)</i>
TGF β RII	Receptor do fator de crescimento tumoral II <i>(Transforming growth factor, beta receptor 2)</i>
TSP-1	trombospondina 1 <i>(thrombospondin 1)</i>
UTR	Região não traduzida
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular <i>(Vascular endothelial growth factor)</i>
VIPomas	Tumores produtores de peptídeo intestinal vasoativo
α	Intervalo de confiança
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação do fenômeno de homeose. No mutante *Antennapedia* ocorre a formação de patas no local de antenas, enquanto no mutante *Bithorax* são formadas asas no local de halteres. Fonte: Grier et al., 2005.....18
- Figura 2.** Conservação entre o complexo HOM-C e os genes *HOX*. A expressão dos genes *HOX* humanos é regulada de acordo com três preceitos: colinearidade espacial, prevalência posterior e colinearidade temporal. Fonte: Grier et al., 2005.....21
- Figura 3.** Expressão do RNAm do gene *HOXB7* nas linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático ductal e no *pool* de tecidos pancreáticos normais. (A) Gráfico representativo dos valores de expressão do transcrito do gene *HOXB7* (média± desvio padrão). (B) Gel de agarose 2% demonstrando o produto da RT-qPCR em tempo real para os genes *GAPDH* (referência) e *HOXB7*. *p=0,01.....26
- Figura 4.** Gel representativo dos RNAs isolados dos adenocarcinomas pancreáticos ductais demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.....32
- Figura 5.** Placa comercial utilizada na determinação do gene referência ideal ao estudo. O produto apresenta 32 genes endógenos em triplicata.....35
- Figura 6.** Gráfico representativo da determinação do gene referência. O gene *RPL30* demonstrou a menor variação de expressão entre os tecidos analisados.....37
- Figura 7.** Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *RPL30*. (A) demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. (B) demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *RPL30*. A inclinação da reta foi igual a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.....40

Figura 8. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *B2M*. (A) demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. (B) demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *B2M*. A inclinação da reta foi superior a 0,1, indicando eficiências de amplificação discrepantes e, portanto, a utilização do método descrito por Pfaffl.....43

Figura 9. Avaliação da eficiência das sequências controles necessárias ao processo de interferência. (A) demonstra as células parentais (sem tratamento); (B) apresenta as células transfectadas com o controle fluorescente *TYETM*; (C) exibe a redução de expressão do RNAm do gene *HPRT* no período de 24 horas após a transfecção do controle positivo anti-*HPRT*.....47

Figura 10. Gráfico representativo dos testes de sequências e concentrações de *siRNA* alvo-específicos. A sequência definida como *HOXB7-3* foi caracterizada como ideal para o estudo quando utilizada na concentração de 10nM.....48

Figura 11. Gráficos representativos da expressão do RNAm do gene *HOXB7* nos períodos de 48 e 72 horas após a transfecção do duplex alvo-específico (*siRNA*) e controle negativo (CN). O período de 48 horas foi considerado ideal para o procedimento.....49

Figura 12. Gel representativo dos RNAs isolados das linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais após o processo de inibição. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.....50

Figura 13. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *GAPDH*. (A) demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. (B) demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *GAPDH*. A inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.....52

Figura 14. *Self-self*. Determinação de *cutoffs* intensidade-dependentes. As linhas escuras representam os limiares superiores e inferiores obtidos a partir do estabelecimento de um intervalo de confiança de 99% (α).....64

Figura 15. Expressão normalizada do RNAm do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais. **A** indica a comparação entre adenocarcinomas e tecidos peritumorais ($p=0,0002$); **B** indica a comparação entre adenocarcinomas e tecidos normais ($p<0,0001$). **ADP** – adenocarcinomas pancreáticos ductais; **N** – tecidos pancreáticos normais; **PT** – tecidos pancreáticos peritumorais.....68

Figura 16. Expressão normalizada do RNAm do gene *HOXB7* em tecidos metastáticos. **A** indica a comparação entre tecidos metastáticos e tecidos peritumorais ($p=0,1170$); **B** indica a comparação entre tecidos metastáticos e tecidos normais ($p=0,0034$). **M** – tecidos metastáticos; **N** – tecidos pancreáticos normais; **PT** – tecidos pancreáticos peritumorais.....69

Figura 17. Número de cópias do gene *HOXB7* em tecidos pancreáticos. A amplificação foi definida como positiva para número de cópias superior a três. **M** - tecidos metastáticos; **ADP** - adenocarcinomas pancreáticos ductais; **N** - tecidos pancreáticos normais.....70

Figura 18. Expressão do RNAm do gene *HOXB7* no período de 48 horas após a transfecção do *siRNA*. Os experimentos foram desenvolvidos em triplicata e estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. **A** indica a linhagem MIA PaCa-2 ($*p=0,0270$); **B** demonstra a linhagem BxPC-3 ($*p=0,0322$); **C** indica a linhagem Capan-1 ($*p=0,0003$). **CN**- controle negativo.....72

Figura 19. Expressão da proteína *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 no período de 48 horas após a transfecção do *siRNA*. Beta-actina foi utilizada como controle interno. **CN** – controle negativo.....73

Figura 20. Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT). A, B e C representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. Os pontos (círculos, quadrados e triângulos) representam as médias $\pm$ desvio padrão.....	75
Figura 21. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem MIA PaCa-2. A, B, C e D representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.....	77
Figura 22. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem BxPC-3. A, B, C e D representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.....	78
Figura 23. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem Capan-1. A, B, C e D representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.....	79
Figura 24. Expressão dos marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1. A, B e C representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	80
Figura 25. Distribuição das fases do ciclo celular. A, B e C representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. Os gráficos demonstram três condições distintas: linhagem tratada com controle negativo, linhagem parental e linhagem tratada com RNA de interferência direcionado ao transcrito de <i>HOXB7</i> . As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	82
Figura 26. Histogramas representativos do processo apoptótico. A, B e C representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 respectivamente.....	83
Figura 27. Porcentagem de células apoptóticas após tratamento com <i>siRNA</i> anti- <i>HOXB7</i> . As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$	84

Figura 28. DAG da linhagem MIA PaCa-2. Os quadros vermelhos indicam as categorias significativamente enriquecidas por genes hiporregulados após a inibição do transcrito do gene *HOXB7*.....86

Figura 29. DAG da linhagem BxPC-3. Os quadros vermelhos indicam as categorias significativamente enriquecidas por genes hiporregulados após a inibição do transcrito do gene *HOXB7*.....87

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Padrão de ciclagem utilizado para a determinação do gene referência.....	36
Tabela 2 - Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de expressão do gene <i>HOXB7</i> nas amostras tumorais, peritumorais e normais.....	38
Tabela 3 - Amplímeros utilizados para a análise da amplificação gênica.....	41
Tabela 4 - Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de amplificação do gene <i>HOXB7</i>	41
Tabela 5 - Amplímeros utilizados para a análise da expressão gênica.....	51
Tabela 6 - Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de expressão do gene <i>HOXB7</i> nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1.....	51
Tabela 7 - Composição da <i>Transcription Master Mix</i>	60

RESUMO

Resumo

Chile, T. Análise funcional e expressão do gene homeobox *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 141p.

O adenocarcinoma pancreático ductal representa a quarta causa de morte por câncer, visto que as taxas de incidência são praticamente idênticas às taxas de mortalidade, o que justifica a natureza altamente agressiva do tumor. Em uma análise preliminar realizada por nosso grupo, avaliou-se a expressão do gene homeobox *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, bem como em tecidos pancreáticos normais, detectando-se o aumento significativo da expressão nas células derivadas de adenocarcinoma pancreático. Alterações na expressão de *HOXB7* foram relatadas na formação e progressão de outros cânceres. Nessas condições, este estudo visou não somente avaliar a expressão deste gene em uma série de 29 adenocarcinomas pancreáticos ductais, 6 tecidos metastáticos e 24 tecidos peritumorais, comparando-os aos tecidos normais, mas também averiguar o efeito de sua inibição sobre o perfil de expressão das células citadas. A análise da expressão gênica demonstrou a hiper-regulação do transcrito do gene *HOXB7* nos tecidos tumorais, corroborando os resultados observados nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1. A inibição realizada com RNA de interferência promoveu a modulação de diferentes processos biológicos nas três linhagens celulares pesquisadas, bem como a indução de apoptose e diminuição da proliferação das células MIA PaCa-2. Nesse contexto, o homeobox neste estudo investigado representa mais um componente associado à ampla rede de moléculas envolvidas na caracterização do câncer pancreático e um promissor alvo para futuras terapias biológicas.

Descritores: adenocarcinoma ductal do pâncreas; expressão gênica; genes homeobox; gene *HOXB7*; interferência de RNA.

SUMMARY

Summary

Chile T. Functional analysis and expression of the homeobox gene *HOXB7* in pancreatic ductal adenocarcinoma [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013. 141p.

The pancreatic ductal adenocarcinoma is the fourth leading cause of cancer death, whereas the incidence rates are practically identical to mortality rates, which explains the highly aggressive tumor. In a preliminary analysis performed by our group, we evaluated the expression of the homeobox gene *HOXB7* in cell lineages MIA PaCa-2, BxPC-3 and Capan-1, as well as in normal pancreatic tissue, detecting a significant increase in expression in cells derived from pancreatic adenocarcinoma. Changes in expression of *HOXB7* were reported in the formation and progression of other cancers. Under these conditions, this study aimed to not only evaluate the expression of this gene in a series of 29 pancreatic ductal adenocarcinomas, 6 metastatic tissues and 24 peritumoral tissues, comparing them to normal tissues, but also examined the effect of its inhibition on the expression profile of the cells mentioned. The analysis of gene expression showed the hyper-regulation of *HOXB7* gene transcript in the tumor tissues, confirming the results observed in cell lineages MIA PaCa-2, BxPC-3 and Capan-1. The inhibition performed with RNA interference promoted the modulation of different biological processes in all three cell lines investigated, as well as the induction of apoptosis and decreased in proliferation of the MIA PaCa-2 cells. In this context, the homeobox investigated in this study represents another component associated with the extensive network of molecules involved in the characterization of pancreatic cancer and a promising target for future biologic therapies.

Descriptors: pancreatic ductal adenocarcinoma; gene expression; homeobox genes;
HOXB7 gene; RNA interference.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Adenocarcinoma pancreático ductal

O câncer de pâncreas é um dos cânceres humanos mais letais, estando associado a uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 5% e, mesmo com grandes avanços tecnológicos, maior conhecimento da genética molecular e do melhor entendimento sobre a doença, esta neoplasia continua sendo a quarta causa de morte por câncer e a segunda entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos (Siegel et al., 2012; López-Casas e López-Fernández, 2010).

O adenocarcinoma pancreático ductal é a neoplasia pancreática mais comum, correspondendo a 95% dentre todos os tumores pancreáticos. Os demais tipos tumorais originam-se dos componentes celulares exócrinos ou endócrinos. Carcinomas de células acinares, tumores císticos serosos e mucinosos, tumores intraductais papilíferos produtores de mucina, tumores sólidos pseudopapilares e tumores de papila representam, assim como os adenocarcinomas pancreáticos ductais, tumores do pâncreas exócrino, contudo, distinguem-se destes pelo padrão molecular (Allema et al., 2005). As neoplasias endócrinas, por sua vez, são representadas pelos tumores originários e não-originários das células das ilhotas pancreáticas. Insulinomas, glucagonomas, somatostatatomas, VIPomas e PPomas são exemplos de tumores endócrinos originários das células das ilhotas do pâncreas, enquanto gastrinomas, tumores produtores de ACTH, síndrome de hipercalcemia ectópica, tumores produtores de hormônio antidiurético e tumores carcinóides constituem tumores não-originários das ilhotas (Duarte, 2005).

Alguns fatores de risco para o câncer de pâncreas foram identificados e uma importante associação foi encontrada em relação à idade, uma vez que as taxas de

incidência aumentam progressivamente com o avançar desta, com mais de 80% dos casos de câncer pancreático ocorrendo em indivíduos com idade entre 60 e 80 anos (Lillemoe et al., 2000). Assim como a idade, tabagismo e pancreatite crônica constituem fatores de risco para o câncer pancreático. Outros fatores, tais como dieta rica em carnes e gorduras, baixos níveis de folato sérico, diabetes mellitus e obesidade também podem conferir risco aumentado. Além disso, aproximadamente 7% a 10% dos pacientes demonstram uma predisposição familiar para câncer de pâncreas (Maisonneuve e Lowenfels, 2010).

A maioria dos pacientes com adenocarcinoma pancreático tem doença incurável quando o diagnóstico é estabelecido. O tumor localiza-se mais frequentemente na cabeça do pâncreas (65%). Cerca de 15% localiza-se no corpo e/ou na cauda, e 20% envolve difusamente toda a glândula (Allema et al., 2005).

As taxas de incidência do adenocarcinoma pancreático ductal são praticamente idênticas às taxas de mortalidade, o que justifica a natureza altamente agressiva do tumor, bem como os sintomas pouco específicos que levam ao diagnóstico tardio e a resistência à quimioterapia e radioterapia disponíveis (Ghaneh et al., 2007). O único tratamento curativo é representado pela ressecção cirúrgica, contudo, é realizada em uma quantidade muito pequena dos casos (aproximadamente 10%), pois, no momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta a doença avançada, seja localmente, seja em função das metástases à distância (Winter et al., 2006).

Embora o aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas propicie a ressecção tumoral completa, a maioria dos pacientes submetidos ao procedimento apresenta recorrência, cuja taxa é reduzida com a terapia sistêmica adjuvante. Esta é representada principalmente por alguns quimioterápicos, entre eles, 5-fluorouracil, capecitabina, gencitabina, análogos de platina, taxanos e irinotecanos, bem como pela combinação

dessas drogas. A terapia neoadjuvante, por sua vez, corresponde à combinação de quimioterapia e radioterapia, sendo indicada, sobretudo, antes da ressecção tumoral para melhorar as taxas de cura, assim como aos pacientes que não são candidatos à cirurgia (Herrerros-Villanueva et al., 2012; Páez et al., 2012).

O progresso no entendimento da genética do câncer de pâncreas apresenta um número de implicações importantes, uma vez que, na tentativa de reduzir a elevada taxa de mortalidade da neoplasia, pode conduzir tanto à descoberta de marcadores efetivos para a detecção precoce da doença quanto à identificação de alvos potenciais para a intervenção terapêutica.

O detalhamento das diferentes alterações genéticas permitiu uma importante distinção molecular entre os tumores pancreáticos, revelando que o adenocarcinoma pancreático ductal apresenta características próprias quando comparado aos tumores exócrinos não-ductais e aos carcinomas neuroendócrinos pancreáticos.

A identificação e classificação das neoplasias intraepiteliais pancreáticas (NIPs) como lesões precursoras do adenocarcinoma pancreático levaram ao modelo morfológico e genético de progressão que incorpora as alterações do genoma, transcriptoma e proteoma implicadas no desenvolvimento da neoplasia. Essas lesões podem ser classificadas em NIP1A e 1B (lesões sem atipia), NIP2 (lesões com atipia moderada) e NIP3 (lesões com atipia intensa), de modo que quanto maior o grau de atipia, maior o número de mutações genéticas associadas (Hruban et al., 2001; Ghaneh et al., 2007).

Os genes envolvidos na formação ou progressão do adenocarcinoma pancreático ductal podem ser subdivididos em três grupos distintos: genes supressores tumorais, oncogenes e genes de reparo do DNA.

1.2 Aspectos moleculares da carcinogênese pancreática

1.2.1 Genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais são genes que promovem a proliferação celular e, portanto, o crescimento tumoral quando inativados. Esses genes podem ser inativados por uma série de mecanismos, entre eles, uma mutação intragênica em um alelo juntamente com a perda do segundo alelo; uma deleção em homozigose; ou, ainda, hipermetilação da região promotora, resultando em silenciamento gênico. Em cânceres esporádicos, as mutações são somáticas e, portanto, adquiridas ao longo da vida, por outro lado, pacientes com formas hereditárias de câncer herdam um alelo mutante germinativo enquanto o segundo alelo apresenta uma mutação somática nas células cancerígenas (Koorstra et al., 2008).

O gene *p16INK4A*, também conhecido como *CDKN2A* (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A), está localizado no braço curto do cromossomo 9 (9p) e encontra-se inativado em até 95% dos casos de adenocarcinoma pancreático ductal por deleção homozigótica (40%), mutações intragênicas com perda do segundo alelo (40%) e silenciamento gênico por hipermetilação da região promotora (15%) (Caldas et al., 1994; Schutte et al., 1997). A proteína codificada pelo gene em questão pertence à família dos inibidores de quinase dependentes de ciclina e possui efeitos seletivos sobre a formação dos complexos ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6, impedindo, portanto, a fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB1) e a consequente liberação dos fatores de transcrição E2F, os quais, quando liberados, ativam a transcrição de um conjunto de genes cujos produtos são essenciais à progressão para a fase S do ciclo celular. Desse modo, a inativação de *p16INK4A* resulta na fosforilação inadequada da proteína RB1,

facilitando a progressão do ciclo celular para a transição G1/S (Garcea et al., 2005; Maitra e Hruban, 2008; Yachida e Iacobuzio-Donahue, 2009).

O gene *p53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p), codifica uma proteína com papel fundamental no bloqueio do ciclo celular e apoptose. Mutações no gene *p53* podem provocar proliferação celular inapropriada, aumento da sobrevivência celular e instabilidade genética (Kirsch e Kastan, 1998). Em câncer pancreático, este gene encontra-se inativado em 50-70% dos casos devido à perda de heterozigose associada à mutação no segundo alelo, resultando em desregulação tanto na divisão celular quanto na morte celular programada (Redston et al., 1994; Garcea et al., 2005; Maitra e Hruban, 2008; Yachida e Iacobuzio-Donahue, 2009).

A interrupção do ciclo celular induzida por *p53* ocorre tardiamente na fase G1 do ciclo celular por meio da transcrição *p53*-dependente do inibidor de quinase dependente de ciclina *p21* (*CDKN1A*), que regula negativamente a formação dos complexos ciclina-CDK e, portanto, bloqueia a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Este mecanismo proporciona o tempo necessário para o reparo do DNA danificado. Mutações no gene *p53* levam à tradução de uma proteína incapaz de ligar-se ao DNA, logo, a transcrição de *p21* não é efetuada conduzindo à proliferação anormal. A perda da atividade de *p21* foi observada em aproximadamente 30-60% dos tumores pancreáticos, com linhagens celulares de pâncreas e tumores pancreáticos mostrando uma correlação entre a atividade de *p53* e *p21* (Garcea et al., 2005; Koorstra et al., 2008).

A morte celular programada motivada por *p53* é realizada pela ativação de genes envolvidos na cascata apoptótica, como *PUMA* e *NOXA*, os quais são ativados após o dano do DNA pela própria proteína *p53*. Quando ativados, codificam proteínas que se ligam a *BCL2* e promovem a morte celular (Villunger et al., 2003).

O gene supressor de tumor *DPC4* (*SMAD4*) localiza-se no braço longo do cromossomo 18 (18q) e encontra-se inativado em até 55% dos casos de adenocarcinoma pancreático ductal. Essa inativação pode ocorrer tanto por deleção homozigótica, em cerca de 30% dos casos; quanto por perda de um alelo juntamente com mutação intragênica no segundo alelo, o que acontece em aproximadamente 25% dos casos. O produto codificado pelo gene *DPC4*, o fator de transcrição SMAD4, é um importante regulador da via de sinalização do fator de crescimento tumoral (TGF- β) (Wilentz et al., 2000; Strimpakos et al., 2008).

As proteínas SMAD, como componentes críticos da via de sinalização de TGF- β , regulam negativamente a proliferação de células epiteliais. A transdução de sinal de TGF- β é realizada por dois tipos de receptores, TGF β RI e TGF β RII. O fator de crescimento TGF- β liga-se ao receptor TGF β RII, o qual ativa o receptor TGF β RI, este, por sua vez, promove a fosforilação dos alvos intracelulares SMAD2 e SMAD3. As proteínas SMAD2 e SMAD3 fosforiladas formam heterodímeros com SMAD4 e o complexo resultante atua no núcleo celular, interagindo diretamente com o DNA ou indiretamente por meio de outras proteínas de ligação ao DNA. Deste modo, as proteínas SMAD4 presentes nos heterodímeros são capazes de regular a transcrição de genes alvos e, por conseguinte, controlar a proliferação celular (Miyaki e Kuroki, 2003).

O fator de transcrição SMAD4 também apresenta uma ação independente por meio da supressão da angiogênese. Este efeito é desempenhado pelo aumento de TSP-1, um potente inibidor da angiogênese (Schwarte-Waldhoff et al., 2000).

A importância do silenciamento de *SMAD4* em adenocarcinomas pancreáticos ductais é apoiada pela ocorrência de tumores SMAD4-negativos biologicamente mais agressivos (Koliopanos et al., 2008). A inativação do gene *SMAD4* é relativamente específica para câncer pancreático, embora ocorra com menor incidência em outros

cânceres, tais como câncer de cólon, mama e ovário ou carcinomas do trato biliar. As neoplasias pancreáticas não-ductais e a maioria das malignidades extra-pancreáticas não apresentam *SMAD4* silenciado. Nessas condições, a inativação desse gene é um marcador diagnóstico auxiliar para câncer de pâncreas, incluindo suspeitas de metástases de um tumor pancreático primário oculto (Koorstra et al., 2008).

A inativação do gene supressor de tumor *ppENK* foi descrita em mais de 90% dos casos de adenocarcinoma pancreático como resultado de eventos epigenéticos, especificamente a metilação da região promotora (Ueki et al., 2001; Koliopanos et al., 2008).

Outros genes supressores tumorais foram relatados como inativados ou mutados em adenocarcinomas pancreáticos, entretanto, com menor frequência. Entre eles, destaca-se o gene *BRCA2*, que encontra-se inativado em até 10% dos adenocarcinomas pancreáticos ductais (Goggins et al., 2000; Strimpakos et al., 2008; Koliopanos et al., 2008).

1.2.2 Oncogenes

Os proto-oncogenes são genes que codificam proteínas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, contudo, quando ativados por mutação, contribuem para a tumorigênese e ganham a denominação de oncogenes. Em contraste aos genes supressores tumorais, os oncogenes agem em uma forma dominante, ou seja, a mutação de uma única cópia do gene é suficiente para a ativação. Os proto-oncogenes podem ser ativados a oncogenes por uma variedade de mecanismos, incluindo mutações de ponto e amplificação (Koorstra et al., 2008).

A mutação de ponto mais comum envolve o proto-oncogene *KRas*, localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p). Este gene encontra-se ativado em 70 a 100% dos

adenocarcinomas pancreáticos ductais, a porcentagem mais elevada de alteração de *KRAS* encontrada em tumores humanos (Almoguera et al., 1988; Hruban et al., 1993; Kubrusly et al., 2002).

A proteína codificada por *KRAS* pertence à classe monomérica de GTPases, assim, mutações no gene que codifica esta proteína resultam em ganho de função constitutivo, pois a proteína RAS permanece em seu estado ativo, isto é, ligada a GTP, mesmo na ausência de sinais externos, o que leva à proliferação celular e supressão da apoptose (Koorstra et al., 2008).

Os sítios de mutação mais frequentes em *KRAS* incluem os códons 12, 13 e 61, porém, em cânceres pancreáticos ductais, a maioria das mutações ocorre no códon 12, no qual a substituição de um nucleotídeo na primeira ou na segunda base pode preceder o desenvolvimento da malignidade. A ativação de *KRAS* está associada a múltiplas vias efetoras, principalmente as vias RAF, PI3K e RALGDS (Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008; Strimpakos et al., 2008; Koliopanos et al., 2008).

O gene *BRAF* está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q) e encontra-se mutado em aproximadamente um terço dos cânceres pancreáticos com *KRAS* selvagem (Calhoun et al., 2003). Desse modo, mutações em *KRAS* e *BRAF* são mutuamente exclusivas e tumores com formas mutantes de um destes dois genes retêm, invariavelmente, cópias selvagens do outro gene.

1.2.3 Genes de reparo do DNA

Seis genes humanos responsáveis pelo reparo do DNA foram descritos, *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6/GTBP* e *hMSH3*. Esses genes atuam na identificação e reparo do DNA danificado. Quando um gene de reparo está inativado, o DNA

danificado não é reparado de modo eficiente e mutações são acumuladas (Lillemoe et al., 2000; Maitra et al., 2006).

Os genes *hMLH1* e *hMSH2* são exemplos de genes de reparo que podem estar inativados em câncer pancreático. Assim, quando um destes genes está inativado, alterações no DNA ocorrem levando à instabilidade microssatélite (IMS). Cerca de 4% dos adenocarcinomas pancreáticos apresentam IMS, caracterizando-se histologicamente por um padrão de crescimento sincicial (Han et al., 1993; Goggins et al., 1998; Lillemoe et al., 2000; Koorstra et al., 2008).

1.2.4 Fatores de crescimento

Além da inativação dos genes supressores de tumor e das mutações em oncogenes, alterações na expressão de fatores de crescimento e seus receptores estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular ao longo do processo tumorigênico.

Nessas condições, diversos fatores de crescimento apresentam expressão elevada em adenocarcinomas pancreáticos ductais, tais como TGF- β , EGF, bFGF, PDGF, IGF e VEGF, bem como seus respectivos receptores (Ebert et al., 1995; Korc, 1998; Ozawa et al., 2001; Shi et al., 2001; Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008; Koliopanos et al., 2008)

A família de receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) é constituída por quatro membros, HER-1 (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), HER-3 (ERBB3) e HER-4 (ERBB4), sendo a hiperexpressão do gene *HER-2/neu* proeminente em adenocarcinomas pancreáticos ductais bem diferenciados com relato em aproximadamente 60% dos casos (Safran et al., 2001; Strimpakos et al., 2008).

1.2.5 Expressão gênica

O estudo da expressão gênica global em tumores pancreáticos tem permitido a identificação de muitos genes diferencialmente expressos, como o gene que codifica a proteína mesotelina, a qual apresenta expressão aumentada em quase todos os adenocarcinomas pancreáticos. No entanto, ocorre com baixa frequência nas lesões precursoras e está ausente nos tecidos pancreáticos não neoplásicos, evidenciando seu papel no processo invasivo (Argani et al., 2001; Wang et al., 2012).

A enzima ciclo-oxigenase (COX), por sua vez, converte ácido araquidônico em tromboxanos e prostaglandinas. COX1 é a isoforma constitutiva com expressão na maioria dos tecidos; sua inibição resulta em efeitos adversos, tais como úlceras gastrointestinais ou comprometimento do fluxo sanguíneo renal. Por outro lado, a isoforma COX2 é induzida por citocinas e sinais intracelulares produzidos em sítios de inflamação; pode também ser induzida em vários tecidos normais por hormônios de ovulação e gravidez, fatores de crescimento, oncogenes e promotores tumorais. Constitutivamente, a expressão de COX2 ocorre somente em cérebro e tecido da medula espinhal. O aumento da expressão de COX2 foi implicado na carcinogênese de muitos tumores, tais como cólon, reto, mama, cabeça e pescoço, pulmão, pâncreas, estômago e próstata (Taketo, 1998; Strimpakos et al., 2008).

Em câncer de pâncreas, foi demonstrado um aumento da expressão de COX2 em 57% dos casos e valores aumentos de RNA mensageiro em mais de 60 vezes, evidenciando a importância do processo inflamatório no desenvolvimento tumoral (Kokawa et al., 2001; Juuti et al., 2006).

1.2.6 Encurtamento dos telômeros

As extremidades dos cromossomos (telômeros) são constituídas por pequenas seqüências repetitivas de DNA associadas a proteínas. Defeitos nestas regiões podem representar a maior causa de instabilidade cromossomal observada em muitos cânceres e na grande maioria dos cânceres pancreáticos, uma vez que alguns estudos demonstram que os telômeros tornam-se curtos muito precocemente no desenvolvimento da neoplasia pancreática. Este encurtamento dos telômeros pode conduzir à fusão anormal das extremidades cromossômicas e, desta forma, à instabilidade cromossômica, promovendo a progressão neoplásica celular (Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008).

A atividade da telomerase é indetectável na maioria das células somáticas humanas, contudo, em 85% dos cânceres e linhagens celulares imortais, encontra-se ativa. No câncer de pâncreas, a atividade da telomerase foi detectada em mais de 95% dos casos e não foi verificada em tumores benignos, o que demonstra uma possível aplicabilidade no diagnóstico diferencial entre câncer pancreático e pancreatite crônica (Büchler et al., 2001; Ghaneh et al., 2007).

1.2.7 Micro-RNAs (miRNAs)

Recentemente, os micro-RNAs ganharam atenção como mais uma família de moléculas envolvidas no desenvolvimento do câncer, podendo atuar como supressores tumorais ou oncogenes (Esquela-Kerscher e Slack, 2006; Szafranska et al., 2007). Ao ligar-se aos RNAs alvos, os micro-RNAs causam silenciamento gênico pós-transcricional por clivagem do RNA mensageiro alvo ou por inibição do processo de tradução (Valencia- Sanchez et al., 2006; Wang Z. et al., 2011).

Vários estudos destacaram o desbalanço da expressão de micro-RNAs em câncer de pâncreas. Enquanto miR-21, miR-155, miR-221 e miR-222 estão hiperexpressos neste tipo tumoral (Bloomston et al., 2007; Lee et al., 2007), miR-34a apresenta expressão reduzida em linhagens celulares de câncer pancreático (Chang et al., 2007).

1.2.8 Câncer pancreático familiar

O conhecimento dos fatores genéticos responsáveis pelo câncer de pâncreas familiar é extremamente pequeno, entretanto, estima-se que a agregação familiar e a suscetibilidade genética tenham um papel em aproximadamente 10% dos adenocarcinomas pancreáticos ductais (Lynch et al., 1996; Klein et al., 2001) . Sabe-se que parentes de primeiro grau de indivíduos com câncer de pâncreas apresentam risco dobrado para o desenvolvimento da doença e que este risco aumenta em função do número de familiares afetados (Maitra e Hruban, 2008; Koorstra et al., 2008) .

Algumas doenças hereditárias elevam o risco de câncer de pâncreas, entre elas, a síndrome do câncer de mama/ovário familiar (causada por mutações no gene *BRCA2*), síndrome de FAMM (causada por mutações germinativas no gene *p16*), síndrome de Peutz-Jeghers (causada por mutações no gene *STK11/LKB1*), pancreatite hereditária (causada por mutações germinativas no gene *PRSS1*) e câncer colorretal hereditário não poliposo (causado por mutações em *hMLH1* ou *hMSH2*) (Lillemoe et al., 2000; Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008).

1.3 Vias efetoras em adenocarcinoma pancreático ductal

A família NF κ B (*nuclear factor kappa B*) é formada por moléculas citoplasmáticas que, em condições normais, permanecem em estado inativo. Nos mamíferos, existem cinco proteínas NF κ B (RelA, RelB, c-Rel, NF κ B1 e NF κ B2), as

quais constituem homo e heterodímeros capazes de ativar grupos específicos de genes. As proteínas inibidoras, denominadas IKB, ligam-se aos dímeros e os mantêm inativos no citoplasma das células que não sofreram estimulação. A liberação dos dímeros de NFkB requer uma via de sinalização que promove, sequencialmente, a fosforilação, a ubiquitinação e a posterior degradação das proteínas IKB (IKB α , IKB β e IKB ϵ). A etapa de fosforilação é mediada pela IKB-quinase (IKK), estabelecendo um processo multiproteico contendo duas serina-treonina quinases (IKK α e IKK β) e uma proteína reguladora chamada NEMO (*NFkB essential modulator*). No núcleo, os dímeros ativos de NFkB ligam-se aos sítios de DNA específicos e promotores gênicos regulando a atividade transcricional. *VEGF*, *EGF* e *MMP9*, genes envolvidos na sobrevivência celular, apoptose, progressão, invasão e metástase tumorais, apresentam alteração no padrão de expressão gênica (Strimpakos et al., 2008).

Como em outros cânceres, a família NFkB encontra-se ativada em células de câncer pancreático, demonstrando um papel central na sua patogênese, progressão, invasão e metástase (Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b).

Outra via de sinalização alterada em adenocarcinomas pancreáticos é a via PI3K/AKT, a qual regula a sobrevivência celular, proliferação e resistência à apoptose. Esta via apresenta como componente iniciador o fosfatidilinositol (PI), um lipídeo de membrana fosforilado pela PI3 quinase em PI (3,4,5)P3. Esta fosforilação é inibida por fosfatases de fosfoinosítídeos específicas, como PTEN. Algumas proteínas intracelulares ligam-se ao composto PI (3,4,5)P3, entre elas, destaca-se a serina-treonina quinase AKT, capaz de inibir as proteínas pró-apoptóticas BAD e CASP9, promovendo, consequentemente, a sobrevivência celular. Além disso, AKT também propicia a ativação de MTOR ocasionando, em adição à sobrevivência, a proliferação celular (Doucas et al., 2006; Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008).

É importante relatar que, mesmo na ausência de mutações, a via PI3K/AKT é constitutivamente ativa na maioria dos cânceres pancreáticos, o que pode estar relacionado à redução da expressão de PTEN (Ebert et al., 2002; Asano et al., 2004; Reichert et al., 2007). Mutações no gene *PIK3CA*, o gene codificador de PI3K, foram relatadas em uma série de lesões precursoras de adenocarcinomas ductais (Schönleben et al., 2006). Além dessas alterações, foi demonstrado que o gene *AKT2* pode estar amplificado, ou ativado, em até 60% dos carcinomas pancreáticos (Cheng et al., 1996; Ruggeri et al., 1998; Altomare et al., 2002; Schlieman et al., 2003). A proteína codificada por *AKT* ainda é capaz de ativar IKK e, portanto, apresenta importante participação na via NFκB (Fernandez-Zapico e Urrutia, 2004).

1.3.1 Reativação da sinalização do desenvolvimento no câncer pancreático

A via de sinalização Notch apresenta suma importância no direcionamento celular e proliferação durante o desenvolvimento embrionário, entretanto, os efeitos da via não estão limitados ao período citado, uma vez que demonstra uma participação crucial na manutenção do balanço entre proliferação celular, diferenciação e apoptose ao longo da vida (Sjölund et al., 2005).

A proteína transmembrana NOTCH demonstra passagem única e necessita de processamento proteolítico para funcionar. Atua como uma proteína gênica latente e produz a sinalização mais simples de um receptor de superfície celular para o núcleo. A via envolve receptores NOTCH ligados à membrana (NOTCH1-4) e ligantes de NOTCH (membros das famílias Delta e Jagged) nas células adjacentes (Sjölund et al., 2005; Miele et al., 2006). Quando a via Notch é ativada pelo ligante de outra célula, o domínio citoplasmático do receptor é hidrolisado e se desloca para o núcleo, onde aciona a transcrição de um grupo de genes que respondem a NOTCH. O domínio

intracelular ativo de NOTCH interage com proteínas de ligação ao DNA, convertendo-as de repressores transcripcionais, em ativadores transcripcionais, sobretudo, dos genes *HES*, os quais codificam proteínas inibidoras de transcrição mantendo as células em um estado precursor (Ghaneh et al., 2007).

Na tumorigênese, a via Notch pode ser oncogênica ou antiproliferativa, assim, em um número limitado de tipos tumorais, a sinalização Notch é antiproliferativa, contudo, muitos estudos mostram um efeito oposto em vários cânceres humanos, incluindo o câncer pancreático. No pâncreas adulto normal, os receptores da via e seus ligantes apresentam expressão reduzida, já nos casos de câncer pancreático, a expressão é extremamente elevada, o que pode ser observado tanto nos estágios precoces da tumorigênese pancreática quanto no câncer pancreático invasivo (Ghaneh et al., 2007; Koorstra et al., 2008; Strimpakos et al., 2008).

Assim como a via Notch, a via de sinalização Hedgehog regula o desenvolvimento de muitos órgãos durante a embriogênese, todavia, diferentemente da primeira, encontra-se ativa durante a formação embrionária do pâncreas (Thayer et al, 2003).

A família Hedgehog foi descoberta em *Drosophila melanogaster*, na qual apresenta apenas um membro. Mutação do gene *Hedgehog* produz uma larva coberta por prolongamentos pontiagudos semelhante a um ouriço (em inglês, *hedgehog*). Em mamíferos, as proteínas ou ligantes da família Hedgehog, conhecidas como SONIC, INDIAN e DESERT, são cruciais para o desenvolvimento do trato gastrointestinal (Ghaneh et al., 2007).

As proteínas HEDGEHOG (HH) produzidas pelas células são liberadas no espaço extracelular, onde sofrem adição de colesterol e tornam-se altamente lipofílicas. A via Hedgehog está sob a regulação negativa da proteína supressora de tumor PTC

(*patched*), a qual inativa a proteína SMO (*smoothened*). Os ligantes HEDGEHOG, juntamente com a proteína transmembrana PTC, interrompem a inibição de SMO e, com isso, permitem a ativação da família GLI de reguladores transcricionais (Thayer et al, 2003). Alterações que ativam essa via, como perda de PTC, mutações ativadoras em *Smoothened* e aumento de expressão de GLI e proteínas HEDGEHOG, são implicadas em uma grande variedade de cânceres, entre eles, o adenocarcinoma pancreático ductal. (Hezel et al., 2006).

A ativação da via Hedgehog foi relacionada tanto ao início da neoplasia pancreática ductal quanto à manutenção do câncer avançado (Taipale e Beachy, 2001). A expressão dos ligantes HEDGEHOG, de PTC e do componente essencial SMO é indetectável em ductos pancreáticos humanos normais, entretanto, um aumento relativo na expressão dessas proteínas é observado durante a tumorigênese pancreática ductal (Thayer et al, 2003; Berman et al., 2003; Pasca di Magliano et al., 2006). A via Hedgehog também está implicada em metástases (Thayer et al, 2003).

Cabe ainda relatar que existe uma relação entre KRAS oncogênico e a ativação da via Hedgehog, já que por meio da sinalização RAF/MEK/ERK, RAS suprime a degradação de GLI, aumentando sua presença no núcleo. Nesse contexto, RAS desempenha um importante papel na ativação da via sinalizadora Hedgehog mesmo na ausência dos ligantes adicionais durante a tumorigênese pancreática (Ji et al., 2007).

Outra via primordial ao desenvolvimento, a via homeobox, está sendo progressivamente associada ao câncer em humanos, uma vez que seus componentes se mostram desregulados em uma ampla gama de neoplasias malignas, incluindo as neoplasias de pele, cólon, próstata, mama, ovário, rim, pulmão, tireóide, bem como as leucemias (Abate-Shen, 2002; Shah e Sukumar, 2010).

Os genes homeobox são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento, pois atuam no topo da hierarquia genética regulando os aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular de uma série de organismos, dos mais simples aos mais complexos (Mark et al., 1997). Esses genes foram descobertos a partir dos genes homeóticos da mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, e são responsáveis pelo fenômeno de homeose quando sofrem mutação, isto é, a transformação de uma estrutura corporal em outra. Exemplos típicos são os mutantes *Bithorax* e *Antennapedia*, de modo que enquanto no primeiro ocorre o surgimento de porções de um par de asas extra onde deveriam estar estruturas muito menores chamadas halteres, no segundo existe a formação de patas ao invés de antenas (Grier et al., 2005) (**Figura 1**).

Figura 1. Representação do fenômeno de homeose. No mutante *Antennapedia* ocorre a formação de patas no local de antenas, enquanto no mutante *Bithorax* são formadas asas no local de halteres. Fonte: Grier et al., 2005.

O mutante *Bithorax*, descoberto em 1915 por Bridges, está associado a um grupo composto por três genes homeobox, *Ubx*, *Abd-A* e *Abd-B*, que constituem o chamado complexo *Bithorax*. Por outro lado, o mutante *Antennapedia* está relacionado ao conjunto que compreende cinco genes homeobox, *Lab*, *Pb*, *Dfd*, *Scr* e *Antp*, os quais compõem o complexo *Antennapedia*. Os genes do complexo *Bithorax* controlam as diferenças entre os segmentos abdominais e torácicos do corpo, diferentemente dos genes do complexo *Antennapedia*, que controlam as diferenças entre os segmentos torácicos e os da cabeça. Ambos os complexos constituem o complexo homeótico da *Drosophila melanogaster*, o complexo HOM-C, determinante para o padrão cabeça-cauda do corpo (Bridges e Morgan, 1923; Garcia-Bellido, 1977; Grier et al., 2005).

Em vertebrados, a família de genes homeobox pode ser dividida em duas subfamílias, os genes homeobox agrupados, conhecidos como genes *HOX*; e os genes homeobox divergentes ou não agrupados, que estão distribuídos por todo o genoma (Nunes et al., 2003).

Neste estudo, maior ênfase será atribuída aos genes *HOX*, os quais estão envolvidos com a identidade posicional específica ao longo do eixo corporal ântero-posterior. Em humanos, os genes *HOX* são representados por 39 membros dispostos em quatro grupos distintos (*HOX-A*, *HOX-B*, *HOX-C* e *HOX-D*), localizados nos cromossomos, 7p, 17q, 12q e 2q, respectivamente, havendo 9 a 11 genes em cada um desses grupos. Acredita-se que os genes *HOX* tenham surgido da duplicação e divergência de um gene *HOX* primordial (Duboule, 1992; Cillo et al., 1999; Cillo et al., 2001; Welik, 2009).

Há um elevado grau de homologia entre os genes *HOX* humanos e os genes que constituem o complexo HOM-C da *Drosophila*. Dessa maneira, enquanto os últimos são regulados para determinar o padrão cabeça-cauda da mosca, os genes *HOX* humanos

são controlados de acordo com três preceitos básicos. Primeiramente, a posição de um gene *HOX* 3' para 5' dentro de um grupo corresponde à expressão ao longo do eixo ântero-posterior, o que é conhecido como colinearidade espacial. Dessa forma, genes localizados na região 3' apresentam expressão em tecidos localizados na região anterior, por outro lado, genes localizados na região 5' demonstram expressão em tecidos localizados na região posterior. O segundo preceito de controle dos genes *HOX* durante o desenvolvimento normal corresponde ao fato de que genes *HOX* posicionados mais a 5' no grupo possuem um fenótipo dominante em relação aos que estão localizados mais a 3', fenômeno descrito com prevalência posterior. O terceiro e último preceito correlaciona-se com a colinearidade temporal, isto é, a expressão dos genes *HOX* ocorre, temporalmente, em uma ordem correspondente a suas posições de 3' para 5' dentro de cada grupo (Grier et al., 2005; Shah e Sukumar, 2010) (**Figura 2**).

Figura 2. Conservação entre o complexo HOM-C e os genes *HOX*. A expressão dos genes *HOX* humanos é regulada de acordo com três preceitos: colinearidade espacial, prevalência posterior e colinearidade temporal. Fonte: Grier et al., 2005.

Os genes *HOX* humanos são pequenos, pois apresentam apenas dois éxons e um único íntron. No interior do segundo éxon encontra-se o homeobox, um segmento de DNA característico constituído por 180 pares de base que apresenta um elevado grau de homologia entre os genes *HOX*, sobretudo dentro de grupos parálogos. As proteínas codificadas por esses genes atuam como fatores de transcrição específicos e são conhecidas como homeoproteínas, visto que apresentam o homeodomínio, uma

estrutura de hélice-alça-hélice contendo 60 aminoácidos. O homeodomínio pode ser dividido em três regiões helicoidais, sendo que a terceira hélice entra em contato com o giro maior do DNA enquanto a primeira e segunda hélices dispõem-se sobre o polinucleotídeo. Além disso, o contato do homeodomínio com o DNA é realizado pela sequência que precede a primeira hélice, o braço N-terminal (Abate-Shen, 2002).

As proteínas *HOX* caracterizam-se pela similaridade na sequência de aminoácidos (homeodomínio), pela especificidade ao DNA e pelos padrões de expressão durante o desenvolvimento humano. O homeodomínio regula as interações sequência-específicas com elementos do DNA, principalmente aqueles que contêm a sequência TAAT, conseqüentemente, muitas homeoproteínas funcionam como reguladores transcricionais, algumas como ativadores, outras como repressores da transcrição. Acredita-se que as especificidades funcionais das homeoproteínas são estabelecidas por vários níveis de regulação, incluindo o controle pós-transcricional, transporte núcleo-citoplasma e interações proteína-proteína. Exemplos da interação protéica acontecem com as proteínas TALE (*three amino acid loop extension*), PBX e MEIS, as quais demonstram ampla expressão tanto em tecido fetal quanto em tecido adulto e atuam como cofatores das proteínas HOX, ligando-se às sequências de aminoácidos que flanqueiam o homeodomínio (Abate-Shen, 2002; Grier et al., 2005; Lappin et al., 2006; Shah e Sukumar, 2010).

Assim como na *Drosophila*, mutações em genes *HOX* humanos podem acarretar alterações estruturais, o que pode ser observado tanto na sinpolidactilia e braquidactilia, decorrentes de mutações no gene *HOXD13*, quanto na HFGS (*hand-foot genital syndrome*), associada com mutações no gene *HOXA13* (Goodman e Scambler, 2001). No entanto, a participação dos genes *HOX* em alterações estruturais é ínfima perante seu papel na oncogênese ou supressão tumoral.

Numerosos exemplos da expressão aberrante de genes homeobox foram encontrados em câncer. Abate-Shen (2002), baseado nessas observações, classificou-os em três categorias. Na primeira, genes homeobox podem ser re-expressos em células tumorigênicas derivadas de células embrionárias nas quais um determinado gene homeobox é normalmente expresso durante o desenvolvimento, o que caracteriza a hipótese da “oncologia que recapitula a ontologia” e inclui a maioria dos casos de genes homeobox desregulados em câncer. Na segunda, genes homeobox podem ser expressos em células tumorigênicas derivadas daquelas nas quais um gene homeobox específico não é normalmente expresso durante o desenvolvimento. Por fim, a terceira categoria inclui os genes homeobox que apresentam expressão reduzida em células tumorigênicas derivadas de tecidos nos quais um determinado gene homeobox é normalmente expresso no estado totalmente diferenciado.

Em leucemias, a expressão desregulada dos genes *HOXA9*, *HOXA10* e *HOXC6* pode ocorrer devido a translocações envolvendo alguns reguladores a montante, tais como o gene *MLL* (Armstrong et al., 2002); ou, ainda, a fusão de um gene *HOX* a um outro gene, como o codificador da nucleoporina (*NUP98*) (Pineault et al., 2004). Embora o potencial oncogênico de alguns genes *HOX* esteja bem definido em leucemias, seu papel em outras neoplasias ainda é alvo de estudo. Hong et al. (2010) identificaram o aumento de expressão do gene homeobox *HOXB4* em amostras de carcinoma de ovário quando comparadas aos tecidos normais, classificando o gene como candidato à carcinogênese. Este relato enriqueceu o trabalho desenvolvido por Yamashita *et al.* (2006), no qual foi demonstrado o aumento de expressão dos genes homeobox *HOXB7*, *HOXA13* e *HOXB13* tanto no câncer de ovário quanto nas linhagens celulares deste derivadas em comparação aos controles normais. O aumento da expressão do gene *HOXB13* foi também evidenciado por Miao *et al.* (2007), os quais

expuseram a participação do homeobox não só na promoção do crescimento tumoral *in vivo*, mas também na resistência à apoptose mediada por tamoxifeno.

Hayashida *et al.* (2010), por sua vez, relataram o aumento de expressão de *HOXB9* em câncer de mama, estando a elevada expressão associada ao potencial invasivo, visto que, *in vivo*, este fator de transcrição promove a formação de tumores de mama volumosos e bem vascularizados, os quais metastatizam para o pulmão.

Enquanto muitos estudos demonstraram o aumento de expressão dos genes *HOX* em câncer, outros relataram a redução, como exposto por Adwan *et al.* (2011), cujo trabalho evidenciou a diminuição da expressão do RNA mensageiro do gene *HOXC8* em adenocarcinomas pancreáticos ductais quando comparados ao tecidos normais e amostras de pancreatite crônica. A técnica de imuno-histoquímica, por sua vez, revelou uma marcação mais forte no tecido circundante do que nos tecidos neoplásicos.

Os padrões de expressão dos genes *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB2* e *HOXD13* também foram caracterizados em câncer de pancreático. Assim, enquanto os três primeiros demonstram-se hiper-regulados, o último distingue-se pela hiporregulação (Gray et al., 2011).

O gene homeobox *HOXB7*, bem como os demais genes *HOX* citados, apresenta um papel importante em diversas neoplasias. Em melanomas, o aumento de expressão de *HOXB7* ativa constitutivamente o fator de crescimento de fibroblastos básico (*bFGF*), favorecendo a proliferação celular descontrolada (Carè et al., 1996), fato, este, que também foi observado em câncer de mama, já que a transfecção de *HOXB7* induziu a proliferação de células SkBr3 por ativação de *bFGF* (Carè et al., 1998).

Em adição ao *bFGF*, *HOXB7* pode induzir a expressão de outros genes, sobretudo, aqueles relacionados à angiogênese e invasão tumoral, entre eles, *VEGF*,

interleucina-8, angiopoetina-2 e as metaloproteinases 2 e 9 (Carè et al., 2001; Hyashida et al., 2010).

Hyman et al. (2002) mencionaram a amplificação (região 17q21.3) como um dos mecanismos responsáveis pelo aumento de expressão do gene *HOXB7* em câncer de mama e sugeriram que tal aumento pode favorecer a progressão tumoral e conferir um fenótipo de doença agressivo.

O aumento de expressão do gene *HOXB7* também foi descrito em carcinoma oral de células escamosas, no qual induz proliferação celular e está associado ao pior prognóstico (Destro et al., 2010). Em câncer colorretal, a proteína codificada pelo gene *HOXB7* foi considerada um fator prognóstico e mediador do desenvolvimento e progressão tumoral (Liao et al., 2011).

Até o momento, um único estudo na literatura avaliou o comportamento do gene *HOXB7* em tumores pancreáticos, revelando não apenas o aumento de expressão, mas, também, a correlação com o fenótipo invasivo, metástase em linfonodos e baixa taxa de sobrevivência. A avaliação tecidual foi sucedida pelo estudo das linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais e, embora uma correlação com o processo invasivo tenha sido observada, nenhuma influência na proliferação ou viabilidade celular foi detectada (Nguyen Kovochich et al., 2012).

Em uma análise preliminar realizada por nosso grupo, observamos que o RNA mensageiro de *HOXB7* apresentava expressão aumentada em linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais (MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1) quando comparadas ao pool de tecidos normais (**Figura 3**). Nesse contexto, este estudo visou identificar o padrão de expressão do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos e controles normais, bem como observar os efeitos decorrentes da inibição do transcrito deste gene na proliferação celular, apoptose e perfil de expressão gênica.

Figura 3. Expressão do RNAm do gene *HOXB7* nas linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático ductal e no *pool* de tecidos pancreáticos normais. **(A)** Gráfico representativo dos valores de expressão do transcrito do gene *HOXB7* (média± desvio padrão). **(B)** Gel de agarose 2% demonstrando o produto da RT-qPCR em tempo real para os genes *GAPDH* (referência) e *HOXB7*. *p=0,01.

OBJETIVOS

2 Objetivos

Esta investigação teve como objetivos:

- Avaliar a magnitude de expressão do transcrito do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais;
- Inibir o transcrito do gene *HOXB7* em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano (MIA PaCa2-, BxPC-3 e Capan-1) utilizando o método de RNA interferente (RNAi);
- Avaliar o efeito da inibição do transcrito do gene *HOXB7* sobre a proliferação celular, apoptose e expressão gênica.

MÉTODOS

3 Métodos

3.1 Casuística

A casuística deste trabalho foi composta por 29 amostras de adenocarcinomas pancreáticos ductais, 6 amostras de tecidos metastáticos, 24 amostras de tecidos peritumorais e 10 amostras de tecidos pancreáticos normais.

As amostras foram obtidas após a ressecção cirúrgica dos tumores dos pacientes internados sob a supervisão do Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo A**) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (**Anexo B**). Os tecidos pancreáticos normais foram obtidos no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVO) mediante autópsia de indivíduos com 8 horas pós-morte (**Anexo C**).

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) (**Anexo D**). Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo E**).

3.2 Coleta do material

Os tecidos tumorais e as amostras normais foram obtidos imediatamente após ressecção cirúrgica e autópsia, respectivamente; armazenados em tubos criogênicos de 2mL e acondicionados em nitrogênio líquido até o processamento.

3.3 Extração e quantificação de RNA

O RNA total foi isolado não só dos tecidos tumorais, mas também dos tecidos pancreáticos peritumorais e normais. Para a extração, foi utilizada uma solução 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).

Inicialmente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas no aparelho *Mikro-Dismembrator U* (*B. Braun Biotech International, Melsungen, Hesse, Germany*). Ao tecido pulverizado foi adicionado 1mL de *TRIzol® Reagent* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*). Após homogeneização por pipetagem, a mistura foi transferida para um tubo *eppendorf* 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; mais uma vez incubada em temperatura ambiente, agora por 3 minutos; e centrifugada nas seguintes condições, 12000xg por 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo *eppendorf* estéril de 1,5mL e o RNA precipitado com 500µL de álcool isopropílico. A mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada nas mesmas condições supracitadas, com exceção do período de tempo, que foi modificado para 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao botão de RNA acrescido 1mL de etanol 75% para lavagem. Depois da homogeneização em *Vortex Genie® 2T* (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*) e centrifugação nas grandezas de 7500xg, 5 minutos e 4°C, o botão de RNA foi solubilizado em 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 absorvância 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, o grau de pureza e a integridade do RNA também foram avaliados, o primeiro pela relação 260/280nm, que deve ser superior a 1,8 para ácidos nucleicos, e, o segundo, por eletroforese em gel de agarose 1,0% (**Figura 4**).

Figura 4. Gel representativo dos RNAs isolados dos adenocarcinomas pancreáticos ductais demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.

3.4 Extração e quantificação de DNA

Assim como o RNA, o DNA foi isolado com a utilização de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Após a completa remoção do remanescente de fase aquosa, adicionou-se 300µL de etanol 100% à solução presente no tubo e a mistura foi homogeneizada por inversão. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas nas grandezas de 2000xg, 5minutos e 4°C. Concluída a centrifugação, o sobrenadante composto por fenol e etanol foi descartado e, ao *pellet* constituído pelo precipitado de DNA, acrescentou-se 1mL de solução de citrato de sódio 0,1M 10% etanol. O *pellet* foi incubado nesta solução de lavagem por 30 minutos a temperatura ambiente, aplicando-se homogeneizações periódicas. Posteriormente, efetuou-se a centrifugação nas mesmas condições aqui citadas, ou seja, 2000xg por 5minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet utilizado na próxima etapa.

O processo de lavagem com citrato de sódio 0,1M 10% etanol foi executado por duas vezes. Depois do último descarte de sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* de DNA com 1mL de etanol 75%. Esta solução foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, empregando-se homogeneização a cada 10 minutos. Uma vez concluída a incubação, a solução foi centrifugada a 2000xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* solubilizado em solução de NaOH 8mM.

A concentração de DNA em cada uma das amostras processadas foi definida em espectrofotômetro *NanoDrop*[®] *ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA*) pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando como valor padrão uma unidade de DO igual a 50µg/mL de DNA. Do mesmo modo que foi estabelecido para o RNA, o grau de pureza e a integridade do DNA foram analisados pela relação 260/280nm e eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

3.5 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de uma quantidade fixa de RNA total, estabelecida em 500ng para cada amostra. As reações foram executadas com a utilização do estojo comercial *SuperScript*TM *III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*), conforme recomendado pelo fabricante e demonstrado a seguir:

A) Primeiramente, a mistura abaixo foi preparada.

RNA (250ng/uL)	2,0uL
Oligo (dT) 12-18 Primer	1,0uL
dNTPs	1,0uL
Água estéril q.s.p	13,0uL

B) A solução resultante foi aquecida a 65°C por 5 minutos, depositada em gelo por 1 minuto e acrescida dos componentes citados abaixo.

5X First-Strand Buffer	4,0uL
0,1M DTT	1,0uL
SuperScript TM III RT	1,0uL
Água estéril	1,0uL

C) A nova mistura elaborada foi homogeneizada por pipetagem e incubada em duas condições distintas, primeiramente 50°C por 60 minutos e, logo após, 70°C por 15 minutos.

3.6 PCR quantitativa em tempo real

3.6.1 Determinação do gene referência

Em função da alta sensibilidade e por permitir a quantificação seja de transcritos raros, seja de pequenas mudanças na expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi a técnica de escolha para analisar a expressão do transcrito do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais.

Antes de iniciar as reações necessárias para a determinação da expressão do RNA mensageiro do gene *HOXB7* nos tecidos envolvidos neste estudo, efetuou-se a escolha do gene referência, isto é, aquele cujo RNAm apresentava menor variação de expressão entre os diferentes tecidos analisados. Para isto, foi utilizado o produto comercial *TaqMan Express Endogenous Control Plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que apresenta 32 genes endógenos em duplicata, como evidenciado abaixo (**Figura 5**).

Genes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB
B	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8
C	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC
D	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A
E	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A
F	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1
G	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19
H	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17	PCP4	RPL37A	RPL30	RPS17

Figura 5. Placa comercial utilizada na determinação do gene referência ideal ao estudo. O produto apresenta 32 genes endógenos em triplicata.

As amostras de cDNA foram aplicadas nas duas placas utilizadas no estudo da seguinte forma: no primeiro grupo de genes de ambas as placas foi depositado um *pool* de cDNA constituído por 10 amostras de adenocarcinomas pancreáticos ductais; no segundo grupo, um *pool* de 6 amostras metastáticas; e, por fim, no terceiro grupo, um *pool* de 10 tecidos pancreáticos normais.

Cada uma das misturas descritas acima foi elaborada com o reagente *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de modo que cada poço da placa apresentasse a quantidade final de 80ng de cDNA em 20uL de solução. Uma vez finalizado o procedimento de preparo, a placa foi depositada no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para a realização da reação de PCR em tempo real nas condições recomendadas pelo fabricante e abaixo expostas (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Padrão de ciclagem utilizado para a determinação do gene referência.

Processo Inicial		Ciclagem	
1ª etapa	2ª etapa	40 ciclos	
50°C	95°C	95°C	60°C
2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

A análise dos dados foi realizada no site <http://www.leonxie.com/referencegene.phd> a partir dos valores de CT (“*threshold cycle*”), ou ciclo limiar, no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectado.

O gene *RPL30*, que codifica uma proteína ribossomal que compõe a subunidade 60S, foi eleito o gene referência para esta pesquisa, pois mostrou-se mais estável em relação aos demais genes investigados (**Figura 6**). A classificação abrangeu o conjunto de algumas formas de análise, entre elas, *BestKeeper*, *Normfinder*, *Genorm* e *Delta CT*.

Figura 6. Gráfico representativo da determinação do gene referência. O gene *RPL30* demonstrou a menor variação de expressão entre os tecidos analisados.

3.6.2 Expressão do gene *HOXB7*

Uma vez determinado o gene constitutivo ideal para o estudo, a análise da expressão do gene *HOXB7* pôde ser efetuada. As reações foram preparadas a partir de 100ng de cDNA com a utilização dos componentes comerciais *TaqMan® Gene Expression Assay* e *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo as recomendações do fabricante, mas com algumas modificações, como demonstrado a seguir:

cDNA (100ng/μL)	1,0μL
TaqMan Gene Expression Master Mix	10,0μL
TaqMan Gene Expression Assay	1,0μL
Água estéril	8,0μL

As reações foram realizadas em duplicata para todas as amostras, tanto para o gene alvo quanto para o gene referência. Um *pool* de cDNA contendo 10 amostras de tecidos pancreáticos normais na concentração de 100ng/μL foi utilizado como amostra normalizadora. A ciclagem, por sua vez, foi condizente com o padrão exposto abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de expressão do gene *HOXB7* nas amostras tumorais, peritumorais e normais.

Processo Inicial		Ciclagem	
1ª etapa	2ª etapa	40 ciclos	
50°C	95°C	95°C	60°C
2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de CT e o cálculo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, que compõe o método de análise descrito por Livak e Schmittgen (2001), foi utilizado para aferir a expressão gênica, levando-se em consideração a eficiência de amplificação dos genes no estudo (*HOXB7* e *RPL30*).

Nesse contexto, para a quantificação relativa dos produtos de amplificação, foi efetuada a análise da eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno (gene referência). Para isso, uma curva com diluições seriadas do *pool* de cDNA contendo 10 amostras de adenocarcinomas pancreáticos foi elaborada, partindo de 500ng de cDNA e fazendo uma diluição seriada de 1:5, com até 5 pontos. Cada uma das diluições foi

amplificada por qPCR em tempo real tanto para o gene alvo quanto para o gene referência.

Para a utilização do método proposto por Livak e Schmittgen (2001), as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno (referência) devem ser aproximadamente iguais. Um modo sensível para assegurar que os diferentes ensaios possuem a mesma eficiência é observar como o ΔCT (CT alvo – CT endógeno) varia com a diluição da amostra. A diferença é plotada contra o logaritmo da concentração inicialmente colocada. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor ou igual a 0,1, as eficiências de amplificação são comparáveis e o modelo matemático descrito por Livak e Schmittgen (2001) pode ser empregado. Por outro lado, quando as eficiências não são comparáveis, o modelo matemático utilizado é o descrito por Pfaffl (2001), no qual a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(\text{Eficiência}_{\text{alvo}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}{(\text{Eficiência}_{\text{endógeno}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}$$

$$\text{Eficiência} = -1 + (10^{-1/\text{slope}})$$

Portanto, para avaliar a expressão gênica por qPCR em tempo real, determinou-se, anteriormente, a eficiência de amplificação para o gene de interesse, a qual foi comparada à eficiência de amplificação do gene referência (*RPL30*) com a intenção de definir o método matemático ideal para análise dos dados de expressão. Como demonstrado na **Figura 7**, a eficiência de amplificação do gene *HOXB7* foi comparável àquela do gene *RPL30*, visto que a inclinação da reta foi igual a 0,1, permitindo, assim, a utilização do método matemático descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Figura 7. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *RPL30*. **(A)** demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. **(B)** demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *RPL30*. A inclinação da reta foi igual a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.

3.6.3 Amplificação gênica

As reações de amplificação foram executadas no equipamento *Rotor-GeneTM 6000* (Corbett Research, Sydney, NSW, Australia) com a utilização do estojo comercial *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). O gene beta-2-microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência, uma vez que apresenta duas cópias no genoma.

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na tabela abaixo (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Amplímeros utilizados para a análise da amplificação gênica.

Gene	Oligonucleotídeos	
	Senso	Antisenso
<i>HOXB7</i>	CGA TGC AGG GCTTGT ACC	AGG CGC CTT CAG GGT AAT
<i>B2M</i>	CGTGTG AAC CATGTG ACT TTG	GAA TTC ATC CAA TCC AAA TGC

As amostras tumorais e normais foram amplificadas em duplicata a partir de 50ng de DNA genômico, 10pmol de cada primer e 12,5µL do reagente *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*, totalizando um volume final de 25µL após o acréscimo de água estéril. As reações foram efetuadas de acordo com o manual de instruções do fabricante, cuja descrição segue abaixo (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Padrão de ciclagem utilizado para a avaliação de amplificação do gene *HOXB7*.

Processo Inicial		Ciclagem			Processo Final
1ª etapa	2ª etapa	45 ciclos			Etapa única
50°C	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
2 minutos	2 minutos	15 segundos	30 segundos	30 segundos	5 minutos

O método matemático utilizado para análise foi o modelo descrito por Pfaffl, uma vez que a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle não foram equiparáveis. A curva de eficiência foi elaborada a partir da diluição seriada de um *pool* de DNA constituído por 10 amostras de tecidos pancreáticos normais. Assim como a curva realizada para a expressão gênica, a curva efetuada para a amplificação apresentou os seguintes pontos da série de diluições 1:5: 500ng, 100ng, 20ng, 4ng e 0,8ng de DNA, respectivamente (**Figura 8**). Todas as diluições foram amplificadas por qPCR em tempo real não só para o gene alvo, mas também para o gene referência.

A amplificação de *HOXB7* foi definida como positiva para número de cópias maior do que três.

Figura 8. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *B2M*. **(A)** demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. **(B)** demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *B2M*. A inclinação da reta foi superior a 0,1, indicando eficiências de amplificação discrepantes e, portanto, a utilização do método descrito por Pfaffl.

3.7 Cultura celular

As linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais foram 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.

A linhagens celulares MIA PaCa-2 (ATCC® Number: CRL-1420™) e BxPC-3 (ATCC® Number: CRL-1687™) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm²

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*). A linhagem Capan-1 (*ATCC® Number: HTB-79™*), que distingue-se das demais pela origem metastática, foi cultivada de modo semelhante, todavia, o meio de cultura ideal para o cultivo foi definido como IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*).

Uma vez em cultura, as três linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. 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 descartado 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 75cm² contendo meio para manter o cultivo.

As células foram cultivadas em garrafa de 75cm² até atingirem confluência. O processo de descarte do meio, lavagem e tripsinização foi mais uma vez repetido, todavia, o *pellet* resultante da centrifugação foi eluído em meio para contagem das células em câmara de Neubauer. Finalizada a contagem, 10⁵ células foram utilizadas para a técnica de interferência.

3.7.1 Inibição do transcrito do gene *HOXB7*

A interferência por RNA foi realizada com o estojo comercial *TriFECTaTM 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 TYETM 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*.

Primeiramente, as linhagens celulares foram tratadas com os controles na concentração de 10nM e, posteriormente, com a três sequências de *siRNA* alvo-específicas, as quais foram testadas em três concentrações diferentes (0,1nM, 1nM e 10nM). Placas com seis poços foram utilizadas para o tratamento. Como descrito anteriormente, em cada um dos poços da placa foram depositadas 10⁵ células em 2mL de meio de cultura específico, as quais foram mantidas em estufa 37°C com 5% CO₂ 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 tratamento foi efetuado de acordo com as recomendações do fabricante, assim, a sequência controle marcada com TYETM 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 lipofectmina 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 a 37°C com 5% de CO₂ foi realizada por um período de 24 horas e o resultado avaliado.

De acordo com o fabricante, duas das três sequências alvo-específicas devem promover, pelo menos, 70% de redução da expressão do RNAm do gene *HOXB7* em concentração de 10nM. Isso acontece quando a transfecção do controle fluorescente indica que mais de 80% das células foram transfectadas e o controle positivo anti-*HPRT* demonstra 80% de eficiência, o que foi observado (**Figura 9**).

Figura 9. Avaliação da eficiência das sequências controles necessárias ao processo de interferência. **(A)** demonstra as células parentais (sem tratamento); **(B)** apresenta as células transfectadas com o controle fluorescente *TYETM*; **(C)** exibe a redução de expressão do RNAm do gene *HPRT* no período de 24 horas após a transfecção do controle positivo anti-*HPRT*.

O procedimento realizado com as três sequências de *siRNA* alvo-específicas foi idêntico àquele efetuado para os controles, todavia, cada sequência foi empregada em três concentrações distintas. Desse modo, além de definir a melhor sequência para a inibição, foi possível determinar a concentração ideal para uso.

A linhagem MIA PaCa-2 foi selecionada para os testes das sequências e concentrações. Após 48 horas de inibição, foi demonstrado que o duplex definido como sequência *HOXB7-3* era ideal para a interferência, principalmente quando empregado na concentração de 10nM (**Figura 10**). Portanto, esta sequência foi utilizada para as inibições subsequentes em todas as linhagens, agora em períodos de tempos diferentes, fixados em 48 e 72 horas (**Figura 11**). Uma vez determinado o melhor tempo de inibição (48 horas), a interferência foi realizada em triplicata para cada uma das linhagens celulares. O controle negativo foi utilizado em todos os experimentos.

MIA PaCa-2

Figura 10. Gráfico representativo dos testes de sequências e concentrações de *siRNA* alvo-específicos. A sequência definida como *HOXB7-3* foi caracterizada como ideal para o estudo quando utilizada na concentração de 10nM.

Figura 11. Gráficos representativos da expressão do RNAm do gene *HOXB7* nos períodos de 48 e 72 horas após a transfecção do duplex alvo-específico (*siRNA*) e controle negativo (CN). O período de 48 horas foi considerado ideal para o procedimento.

Cabe ainda destacar que a extração de RNA total, desempenhada após o processo de inibição, foi efetuada com o produto comercial *RNeasy Plus Mini Kit* (*Qiagen, Duesseldorf, North Rhine-Westphalia, Germany*), conforme as orientações do fabricante. Dessa forma, o meio de cultura presente em cada poço da placa foi aspirado, as células lavadas com PBS e, em seguida, rompidas pela adição de 350µL de *Buffer RLT Plus*. O lisado oriundo da ruptura foi homogeneizado, transferido para a coluna *gDNA eliminator* conectada ao tubo coletor e submetido à centrifugação por 30 segundos a 10000 r.p.m.. Finalizada a centrifugação, a coluna foi descartada e 350µL de etanol 70% adicionados à solução transposta. A mistura foi homogeneizada e transferida para a coluna *RNeasy spin*, que, assim como a anterior, apresenta-se conectada ao tubo coletor. Uma nova centrifugação foi realizada, agora por 15 segundos, mas com a mesma rotação. Nesta etapa, a solução transposta foi descartada e a coluna lavada com *Buffer RW1* e *RPE*, respectivamente. Por fim, 30µL de água estéril foram adicionados diretamente à membrana da coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 10000 r.p.m.. A solução transposta foi quantificada e armazenada a -80°C até o momento do uso. A **Figura 12** mostra a integridade do RNA extraído.

Figura 12. Gel representativo dos RNAs isolados das linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais após o processo de inibição. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.

3.7.1.1 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 *GAPDH* foi utilizado como referência nesta análise, enquanto a linhagem parental foi considerada a amostra normalizadora.

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na tabela abaixo (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Amplímeros utilizados para a análise da expressão gênica.

Gene	Oligonucleotídeos	
	Senso	Antisenso
<i>HOXB7</i>	GAG CAG AGG GAC TCG GAC TT	GCC GGT TCT GAA ACC AAA T
<i>GAPDH</i>	CTC TCT GCT CCT CCT GTT CG	TGA CTC CGA CCT TCA CCT TC

As reações foram efetuadas segundo o protocolo abaixo (**Tabela 6**).

Tabela 6 - 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

O modelo matemático proposto por Livak e Schmittgen (2001) 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 (**Figura 13**). A diluição seriada para a elaboração da curva de eficiência foi realizada a partir de 5 pontos de diluição 1:5, iniciando com 500ng de cDNA da linhagem MIA PaCa-2 parental.

Figura 13. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *HOXB7* e *GAPDH*. **(A)** demonstra a curva padrão oriunda da amplificação de cada ponto de diluição seriada. **(B)** demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *HOXB7* e *GAPDH*. A inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.

3.7.1.2 Expressão da proteína codificada pelo gene *HOXB7* após interferência

O processo de interferência foi sucedido não só pela análise da expressão do transcrito de *HOXB7*, mas também pela avaliação da expressão protéica. Após remoção do meio de cultura e lavagem com PBS gelado, as proteínas totais das três linhagens cultivadas em placas de cultura específicas (6 poços) foram extraídas com 200µL de *RIPA buffer* (*Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA*) contendo inibidores de proteases (*Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany*). O lisado oriundo da raspagem com *cell scraper* foi transferido para um tubo *eppendorf* estéril de 1,5mL e armazenado a -80°C até o momento de uso. Prosseguiu-se com o descongelamento do lisado, o qual foi submetido à centrifugação (12000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C). O sobrenadante foi separado para a quantificação protéica.

A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio *Bio-Rad DC (detergent compatible) Protein Assay* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) com base no método de Lowry (Lowry et al., 1951). O ensaio foi efetuado em placas de 96 poços, de modo que em cada um dos poços foram pipetados 25µL de reagente A, 200µL de reagente B e 5µL da amostra específica ou branco. Uma curva de BSA (*bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) nas concentrações de 0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,5mg/mL, 1,0mg/mL e 1,5mg/mL foi empregada como padrão, logo, as soluções contendo diferentes concentrações de BSA também foram acrescidas dos reagentes presentes no estojo comercial *Bio-Rad DC (detergent compatible) Protein Assay*. Uma vez elaborada, a placa foi mantida em agitação por 15 minutos a temperatura ambiente. Concluído o período de incubação, as absorbâncias das amostras foram determinadas

em leitor de microplacas (*PerkinElmer, Boston, MA, USA*) a 680nm. Todas as amostras foram empregadas em triplicatas.

Finalizada a determinação da concentração protéica, 30µg de proteína total de cada amostra foram depositados em poços específicos do gel de poliacrilamida-SDS (30% acrilamida; 0,8% bisacrilamida; 1,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,5M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 10% persulfato de amônio; N, N, N', N'-tetrametil-etileno-diamina) imerso em tampão de corrida (25mM Tris pH 8,6; 192mM glicina; 1% SDS). Prosseguiu-se com a eletroforese, a qual foi efetuada no sistema de mini-géis verticais Mini-Protean III (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) por 90 minutos a 120 volts. O marcador de peso molecular utilizado foi condizente ao tamanho da proteína estudada (24KDa).

Após o término da eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose no processo denominado transferência. Esta foi realizada em cuba Bio-Rad (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) por 70 minutos a 250mA. Todo o processo foi desenvolvido em tampão gelado (25mM Tris pH 8,6; 192mM glicina; 20% metanol) e a cuba depositada em gelo.

A membrana proveniente da transferência foi submetida a quatro etapas de lavagem em TBS-tween 0,2% com duração de 5 minutos cada. Em seguida, foi incubada com o anticorpo primário direcionado à proteína HOXB7 (ab51237, *Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*). Este foi utilizado na concentração 1:50 com 5% de leite por um período de 18 horas a 4°C. Concluído o período de incubação, a membrana foi mais uma vez submetida às etapas de lavagem citadas anteriormente e incubada, por 1 hora, com o anticorpo secundário específico (RPN1001, *GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*) na concentração 1:400. Após a incubação e novo processo de lavagem, o experimento foi finalizado com a terceira incubação, a qual foi realizada com o conjugado de horseradish-peroxidase (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase*

Conjugate RPN1231, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) na concentração 1:3000 por 1 hora.

Por fim, em sala escura, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)* foi adicionado à membrana de nitrocelulose, que, por sua vez, foi colocada em contato com o filme fotográfico, por tempos variados, de acordo com a necessidade de captação de luz no filme. O filme de autorradiografia foi, então, revelado em solução reveladora, lavado em água corrente e depositado em solução fixadora. As bandas reveladas foram analisadas.

É importante salientar que um anticorpo direcionado à beta-actina (ab8227, *Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*) foi utilizado como controle interno e, assim como aquele direcionado a *HOXB7*, foi testado não só com as proteínas totais extraídas das células tratadas com RNA de interferência específico, mas também com o conjunto protéico das linhagens tratadas com o controle negativo e das células parentais.

3.7.1.3 Determinação da viabilidade celular

Os efeitos da inibição de *HOXB7* também foram avaliados sobre a viabilidade celular. Para isso, utilizou-se o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), um teste baseado na conversão de sal tetrazólico em precipitado insolúvel de cor violeta (formazan). Esta conversão é realizada por desidrogenases mitocondriais ativas em células vivas (Mosmann, 1983).

Os testes colorimétricos foram efetuados em três períodos de tempo distintos, 48, 72 e 96 horas após o tratamento das linhagens celulares com RNA de interferência. Uma vez concluído cada um dos períodos citados, prosseguiu-se com a remoção do meio de cultura e acréscimo de 1mL da solução 0,3mg/mL de MTT (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) por poço de placa utilizado. As células foram incubadas em estufa a

37°C com 5% CO₂ por 4 horas. Em seguida, a solução de MTT foi removida e 500µL de etanol 70% adicionados para promover a lise celular. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado para dissolver o formazan e transferido para poços específicos de uma nova placa para leitura em espectrofotômetro (570nm). Os resultados foram liberados em unidades de absorbância.

Todos os testes foram realizados em quintuplicata tanto para as células tratadas com *siRNA* específico quanto para as linhagens tratadas com controle negativo e células parentais.

3.7.1.4 Citometria de fluxo após interferência

A citometria de fluxo permite a identificação e quantificação das células pelo volume (FSC – *Forward Scatter*), granulosidade ou complexidade (SSC-*Side Scatter*) e fluorescência relativa.

Nesta pesquisa, a citometria de fluxo foi empregada para três procedimentos distintos: detecção dos marcadores BCL2, BAD, BAX e ciclina D1; análise das fases do ciclo celular; e avaliação de apoptose. Todos os procedimentos foram realizados no citômetro *FACScalibur* (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) com a utilização das células oriundas do melhor tempo de inibição do transcrito do gene *HOXB7*, bem como do tratamento com o controle negativo e das linhagens parentais. No entanto, enquanto que para a detecção de marcadores e avaliação de apoptose a interferência foi efetuada com 10⁶ células/mL, para a análise de ciclo celular, foi realizada a partir de 10⁵ células/mL.

As células presentes no *pellet* oriundo da tripsinização foram lavadas em PBS gelado e submetidas à etapa de permeabilização da membrana celular, a qual foi efetuada por 30 minutos a 4°C na presença de saponina 0,2%. Após este período, as

células foram lavadas no mesmo tampão e incubadas, durante 1 hora, com 1µg dos seguintes anticorpos primários: anti-BCL2 Ab692 (*Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*), anti-BAD Ab32445 (*Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*), anti-BAX Ab5714 (*Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*) e anti-ciclina D1 sc8396 (*Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA*).

Posteriormente, efetuou-se uma nova lavagem em PBS e as células foram submetidas, mais uma vez, ao processo de incubação, que foi efetuado nas mesmas condições citadas, mas com o anticorpo secundário conjugado ao *Alexa-Fluor 488* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*). Concluída a incubação, prosseguiu-se com a lavagem. O *pellet* formado a partir desta foi ressuspenso em tampão *FACS flow* (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) contendo 2% de paraformaldeído. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo e os dados adquiridos com o *Cell Quest software*, com aquisição de pelo menos 10000 eventos para cada amostra.

A intensidade de fluorescência foi avaliada no canal FL1, ou seja, o canal de detecção da fluorescência verde, classificada como fluorescência do tipo 1 nos ensaios de citometria. Para o *Alexa Fluor 488*, que assemelha-se ao isotiocianato de fluoresceína (*FITC*), o comprimento de onda máximo de excitação corresponde a 495nm, enquanto o comprimento de onda máximo de emissão equivale a 519nm.

A detecção dos marcadores foi sucedida pela análise das fases do ciclo celular. Nesta etapa, as células oriundas da tripsinização foram tratadas com etanol gelado 70% contendo 100µg/mL de RNase. Em seguida, foram lavadas e incubadas em PBS a 37°C por 45 minutos. A marcação foi efetuada em solução contendo iodeto de propídeo (IP) na concentração de 1,8mg/mL para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular.

Os resultados foram adquiridos a partir do programa *Cell Quest* e analisados em *ModFit software*. A intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo foi detectada no canal FL2 e os resultados expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular, bem como em percentual de DNA fragmentado. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para o iodeto de propídeo equivalem a 536nm e 617-623nm, respectivamente.

Por fim, a avaliação da apoptose foi efetuada com a utilização do estojo comercial *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Dessa forma, as células foram lavadas em PBS gelado e ressuspensas em *IX Annexin V Binding Buffer*. Adicionou-se, então, 5µL de anexina V e 5µL de iodeto de propídeo (IP) a 100µL dessa solução, que, após o acréscimo, foi incubada no escuro por 15 minutos. Após o período de incubação, acrescentou-se 400µL de *IX Annexin V Binding Buffer* a cada amostra. As células foram analisadas em *FACScalibur* utilizando o *Cell Quest software*. Os resultados provenientes deste procedimento determinaram a porcentagem de células apoptóticas em cada amostra avaliada.

Cabe ressaltar que a anexina V é uma proteína de ligação a fosfolipídeos cálcio-dependente que apresenta alta afinidade por fosfatidilserina (PS), a qual é transportada da camada interna para a camada externa da membrana celular em células apoptóticas (Vermes et al, 1995). O conjugado anexina V-FITC é sensível para a detecção de células em apoptose, visto que a exposição de fosfatidilserina ocorre precocemente no processo apoptótico (Koopman et al, 1994). O iodeto de propídeo, por sua vez, é um marcador de DNA não específico que é excluído de células vivas com membranas plasmáticas intactas, mas incorporado em células não viáveis, caracterizando a necrose. (Eray et al, 2001).

3.7.1.5 *Microarray* após interferência

O RNA total oriundo do melhor tempo de inibição do transcrito do gene *HOXB7*, bem como das células parentais, foi quantificado em *Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) e empregado na técnica de *microarray*. Este procedimento foi executado em duplicata para todas as linhagens, as quais foram subdivididas em tratadas e não tratadas com *siRNA*. Cada reação foi elaborada a partir de 200ng de RNA total em um volume de 1,5µL. Prosseguiu-se com as orientações do protocolo *One-Color Microarray-Based Gene Expression* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) e com a utilização do estojo comercial *Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit*, conforme relatado abaixo.

O reagente *Agilent One-Color Spike Mix* foi diluído 10 vezes e acrescido, em volume de 2µL, a cada tubo contendo 200ng de RNA. Em seguida, 1,8µL de uma mistura contendo 0,8µL de *T7 Promoter Primer* e 1,0µL de água estéril foram adicionados aos tubos e cada solução homogeneizada vagarosamente. As misturas foram aquecidas a 65°C por 10 minutos e depositadas em gelo por 5 minutos. A próxima etapa foi representada pela síntese de cDNA, para isso, 4,7µL de uma solução específica foram acrescentados a cada tubo. Essa solução foi constituída por 2,0µL de *5x First Strand Buffer*, 1,0µL de 0,1M DTT, 0,5µL de 10mM dNTP mix e 1,2µL de *AffinityScript RNase Block Mix*. Concluiu-se a síntese com três incubações distintas: a primeira foi efetuada a 40°C por 2 horas; a segunda, a 70°C por 15 minutos, e, a última, a 4°C por 5 minutos.

A síntese de cDNA foi sucedida pela etapa de síntese de cRNA. Nesta etapa, 6µL de uma mistura denominada *Transcription Master Mix* (**Tabela 7**), cuja composição encontra-se demonstrada abaixo, foram adicionados a cada tubo. Após a adição, cada amostra foi incubada a 40°C por 2 horas e purificada.

Tabela 7 - Composição da *Transcription Master Mix*.

Componente	Volume (μ L) por reação
Água estéril	0,75
5X Transcription Buffer	3,2
0,1M DTT	0,6
NTP mix	1,0
T7 RNA Polymerase Blend	0,21
Cyanine 3-CTP	0,24

A purificação de cRNA foi efetuada com o produto comercial *RNAspin Mini kit* (*GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*) de acordo com as instruções do fabricante, mas com algumas alterações, conforme descrito adiante. Primeiramente, 3,5 volumes de *Buffer RA1* foram adicionados por volume de amostra, ou seja, 56 μ L. Além do tampão, acrescentou-se etanol absoluto na mesma grandeza. A solução foi homogeneizada lentamente, transferida para a coluna *RNAspin Mini* conectada ao tubo coletor e, posteriormente, submetida à centrifugação a 8000xg por 30 segundos a 4°C. Finalizada a centrifugação, o filtrado foi descartado e mais duas centrifugações subsequentes foram realizadas após o acréscimo de *Buffer RA3* à coluna, o qual foi utilizado em volume de 600 μ L e 250 μ L, respectivamente. Depois do último descarte do filtrado, 30 μ L de água estéril foram adicionados à coluna que foi centrifugada nas grandezas de 11000xg por 1 minuto a 4°C. A solução transposta foi quantificada no equipamento *Nanovue* (*GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*) para a

determinação não só da massa total de cRNA em microgramas, mas também da atividade específica, isto é, picomol de cianina 3 por micrograma de cRNA. Por isso, alguns parâmetros foram estabelecidos, entre eles, o valor padrão de DO (fator 40) e o fluorocromo utilizado (cianina 3).

Segundo as orientações do protocolo, os valores ideais de massa total e atividade específica variam conforme o formato de *microarray* empregado. Nesta pesquisa, foram utilizadas três lâminas de vidro contendo quatro arrays cada (G2519F-026652), sendo assim, enquanto a massa total de cada amostra deve ser igual ou superior a 1,65µg de cRNA, a atividade específica, por sua vez, deve ser igual ou superior a 6,0pmol de cianina 3 (Cy3) por micrograma de cRNA. Os valores foram obtidos mediante os cálculos abaixo.

$$\text{Massa Total} = \frac{\text{Concentração de cRNA (ng/}\mu\text{L)} \times 30 \mu\text{L (volume de eluição)}}{1000} = \mu\text{g de cRNA}$$

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\text{Concentração de Cy3 (pmol/}\mu\text{L)}}{\text{Concentração de cRNA (ng/}\mu\text{L)}} \times 1000 = \text{pmol Cy3 por } \mu\text{g de cRNA}$$

Todas as amostras testadas demonstraram valores superiores àqueles preconizados, portanto, caracterizaram-se como ideais para o estudo e foram preparadas para a hibridização, mais uma vez de acordo com o formato de lâmina utilizado, ou seja, *Human GE 4x44K Microarray* (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Desse modo, 11µL de *10x Blocking Agent* foram acrescentados a 1,65µg de cRNA marcado com Cy3, totalizando um volume de 52,8µL após o acréscimo de água estéril. Por fim, adicionou-se 2,2µL de *25x Fragmentation Buffer* às amostras, que, em seguida, foram incubadas a

60°C por 30 minutos para a fragmentação do cRNA. Terminada a incubação, foram depositadas em gelo por 1 minuto.

A reação de fragmentação foi interrompida pelo acréscimo de 55µL de *2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM* seguido de homogeneização por pipetagem. Posteriormente, as amostras foram colocadas em gelo até a distribuição nas lâminas contendo os *arrays*.

As lâminas demarcadas (*gasket slides*) que compõem o estojo comercial citado anteriormente foram acomodadas no interior de uma base apropriada (*SureHyb chamber base*) para a pipetagem de amostras. Cada amostra foi depositada em uma das quatro demarcações da lâmina, deste modo, enquanto a primeira lâmina foi destinada à linhagem Mia PaCa-2, a segunda e a terceira foram destinadas às linhagens BxPC-3 e Capan-1, respectivamente.

As duas primeiras demarcações de cada lâmina foram reservadas para as amostras tratadas com *siRNA*, enquanto as duas últimas foram designadas para as amostras parentais, ou sem tratamento.

As amostras foram pipetadas em volume de 100µL por demarcação da lâmina, a qual, quando completamente preenchida, foi coberta por uma lâmina de vidro contendo os quatro *arrays* em simetria com as demarcações. O “sanduíche” formado dentro da base de apoio foi protegido pela adição de uma tampa de encaixe específica à base (*SureHyb chamber cover*). O conjunto foi fixado por uma braçadeira e incubado a 65°C por 17 horas com rotação de 10 r.p.m., concluindo, assim, a etapa de hibridização.

Após a hibridização, o “sanduíche” foi desmontado e os *arrays* submetidos a sucessivas lavagens com *Buffer 1*, *Buffer 2*, acetonitrila e *DryingSolution*, respectivamente.

Por fim, a leitura das lâminas foi efetuada no equipamento *High-Resolution Microarray Scanner* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) e os dados obtidos a partir do pacote de dados *Feature Extraction Software version 9.5.3*.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Expressão e amplificação do gene *HOXB7*

Os testes estatísticos foram bicaudais, com significância estatística fixada em 0,05. As variáveis contínuas foram analisadas usando os testes não paramétricos *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney U*. Os valores foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos. Os dados foram compilados em planilhas de cálculos e analisados utilizando-se o programa *JMP Software version 8* (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

3.8.2 MTT e citometria de fluxo

A estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com teste comparativo múltiplo de Tukey-Kramer. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como significativos valores de p inferiores a 0,05.

3.8.3 Microarray

A análise dos dados obtidos a partir da técnica de *microarray* foi efetuada com a utilização do *HT-self* (Vêncio e Koide, 2005). Os experimentos *self-self* foram realizados com as duplicatas não tratadas marcadas com Cy3 (linhagem não tratada x linhagem não tratada), admitindo-se, assim, que a variabilidade de sinal em ensaios de *microarray* é dependente da intensidade e qualquer diferença de hibridização é produto de artefato experimental. A partir do *self-self*, um intervalo de credibilidade de 99% foi

estabelecido para diferenciar alterações de expressão de artefato de técnica, resultando, portanto, na determinação de *cutoffs* intensidade-dependentes, os quais foram aplicados nos experimentos *non-self-self* (linhagem tratada x linhagem não tratada) (**Figura 14**).

Figura 14. *Self-self*. Determinação de *cutoffs* intensidade-dependentes. As linhas escuras representam os limiares superiores e inferiores obtidos a partir do estabelecimento de um intervalo de confiança de 99% (α).

Na plataforma de array, o mesmo gene encontra-se representado mais de uma vez por meio de diferentes sondas, por conseguinte, três critérios foram definidos para identificar um gene como diferencialmente expresso: a. cada gene foi representado por pelo menos duas sondas; b. mais do que 50% das sondas representativas de determinado gene apresentavam um sinal presente depois da análise de qualidade de expressão; c. havia 100% de concordância de sinal entre as sondas.

Nesse contexto, duas listas de genes diferencialmente expressos foram geradas para cada linhagem celular, uma contendo os genes hiper-regulados e outra apresentando os genes hiporregulados comuns às duplicatas avaliadas. Cada lista foi disposta em categorias de processos biológicos de acordo com o banco de dados *Gene Ontology*, sendo a análise efetuada em *WebGestalt* (Zhang et al., 2005). Os resultados

foram visualizados em grafos acíclicos direcionados ou *DAGs* (do inglês, *directed acyclic graph*) para manter a relação entre as categorias enriquecidas.

A análise estatística para a identificação de categorias enriquecidas foi realizada a partir da seleção de um conjunto de genes referência presentes em plataformas de *array Agilent*, o que é fornecido no *WebGestalt*. Este programa utiliza o teste hipergeométrico para avaliar o enriquecimento categórico e, como múltiplas categorias são testadas ao mesmo tempo, os valores de *p* são ajustados conforme o método de ajuste de testes múltiplos proposto por Benjamini e Hochberg (1995).

A significância para a análise de enriquecimento a partir do conjunto referência foi fixada em 0,01. Além disso, um número mínimo de 2 genes foi estabelecido como o *cutoff* requerido para que uma categoria seja considerada.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Expressão do RNAm do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais e tecidos metastáticos

A **Figura 15A** mostra os níveis de expressão do RNA mensageiro do gene *HOXB7* em 29 amostras de adenocarcinomas pancreáticos ductais e em 24 amostras de tecidos pancreáticos peritumorais. Os adenocarcinomas demonstraram maior expressão do transcrito do gene *HOXB7* em relação ao grupo de tecidos peritumorais ($p=0,0002$). O aumento de expressão nos tecidos tumorais também foi verificado quando os adenocarcinomas foram comparados ao conjunto de tecidos pancreáticos normais ($p<0.0001$), o que pode ser visualizado na **Figura15B**.

De acordo com a **Figura 16 (A e B)**, os tecidos metastáticos não demonstraram diferença de expressão do RNAm do gene *HOXB7* quando comparados aos tecidos peritumorais ($p=0,1170$), ficando a alteração restrita à comparação com os tecidos normais ($p=0,0034$).

Figura 15. Expressão normalizada do RNAm do gene *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais. **A** indica a comparação entre adenocarcinomas e tecidos peritumorais ($p=0,0002$); **B** indica a comparação entre adenocarcinomas e tecidos normais ($p<0,0001$). **ADP** – adenocarcinomas pancreáticos ductais; **N** – tecidos pancreáticos normais; **PT** – tecidos pancreáticos peritumorais.

Figura 16. Expressão normalizada do RNAm do gene *HOXB7* em tecidos metastáticos. **A** indica a comparação entre tecidos metastáticos e tecidos peritumorais ($p=0,1170$); **B** indica a comparação entre tecidos metastáticos e tecidos normais ($p=0,0034$). **M** – tecidos metastáticos; **N** – tecidos pancreáticos normais; **PT** – tecidos pancreáticos peritumorais.

4.2 Amplificação do gene *HOXB7*

O número de cópias do gene *HOXB7* em cada uma das amostras investigadas pode ser observado na **Figura 17**. Somente duas das vinte e nove amostras de adenocarcinomas pancreáticos avaliadas (6,9%) demonstraram número de cópias superior a três.

Figura 17. Número de cópias do gene *HOXB7* em tecidos pancreáticos. A amplificação foi definida como positiva para número de cópias superior a três. **M** - tecidos metastáticos; **ADP** - adenocarcinomas pancreáticos ductais; **N** - tecidos pancreáticos normais.

4.3 Expressão do RNAm do gene *HOXB7* após tratamento com *siRNA*

Conforme descrito anteriormente, as linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 foram submetidas ao tratamento com RNA de interferência direcionado ao transcrito do gene *HOXB7*. A **Figura 18** demonstra a diferença de expressão entre as células tratadas e não tratadas no período de 48 horas após a transfecção. As linhagens tratadas com o RNA de interferência específico demonstraram a redução da expressão do transcrito do gene *HOXB7* quando comparadas às linhagens transfectadas com o controle negativo ou linhagens parentais.

Figura 18. Expressão do RNAm do gene *HOXB7* no período de 48 horas após a transfecção do *siRNA*. Os experimentos foram desenvolvidos em triplicata e estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. **A** indica a linhagem MIA PaCa-2 (* $p=0,0270$); **B** demonstra a linhagem BxPC-3 (* $p=0,0322$); **C** indica a linhagem Capan-1 (* $p=0,0003$). CN- controle negativo.

4.4 Expressão da proteína codificada pelo gene *HOXB7* após tratamento com *siRNA*

O tratamento com RNA de interferência foi sucedido não apenas pela avaliação da expressão do transcrito do gene *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, mas também pela determinação da expressão protéica. Quando comparadas às linhagens parentais e àquelas transfectadas com o controle negativo, as células tratadas com *siRNA anti-HOXB7* demonstraram redução da expressão da proteína HOXB7 no período de 48 horas após a transfecção (**Figura 19**), o que também pode ser evidenciado pela observação da expressão de beta-actina (ACTB), a qual foi empregada como controle interno

Figura 19. Expressão da proteína HOXB7 nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 no período de 48 horas após a transfecção do *siRNA*. Beta-actina foi utilizada como controle interno. **CN** – controle negativo

4.5 MTT

Como descrito anteriormente, o impacto da interferência na viabilidade celular foi investigado por testes colorimétricos nos períodos de 48, 72 e 96 horas após a transfecção do *siRNA* específico. A **Figura 20** demonstra que, independente do período de tempo avaliado, não ocorreu diferença de absorbância quando as linhagens tratadas com RNA de interferência anti-*HOXB7* foram comparadas às células tratadas com controle negativo e às células parentais.

Figura 20. Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT). **A**, **B** e **C** representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. Os pontos (círculos, quadrados e triângulos) representam as médias $\pm$ desvio padrão.

4.6 Detecção dos marcadores BCL2, BAD, BAX e ciclina D1

A detecção dos marcadores BCL2, BAD, BAX e ciclina D1 foi efetuada por citometria de fluxo para as linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1. A expressão de cada marcador foi avaliada 48 horas após a transfecção do RNA de interferência anti-*HOXB7*. As células tratadas com o duplex específico foram comparadas àquelas tratadas com o controle negativo, bem como com as linhagens parentais.

Conforme evidenciado nas **Figuras 21 e 24**, a linhagem celular MIA PaCa-2 tratada demonstrou o aumento de expressão dos marcadores BAD ($p<0,01$) e BAX ($p<0,01$) e a redução de expressão dos marcadores BCL2($p<0,001$) e ciclina D1 ($p<0,05$) quando comparada ao controle negativo e à linhagem parental. De modo distinto, a linhagem BxPC-3 tratada apresentou não só o aumento de expressão dos marcadores BAD ($p<0,05$) e BAX ($p<0,01$), mas também do marcador BCL2 ($p<0,01$). Em relação à ciclina D1, a comparação entre as células tratadas, controle negativo e linhagem parental não demonstrou alterações de expressão significativas (**Figuras 22 e 24**).

A linhagem Capan-1 tratada demonstrou apenas o aumento de expressão dos marcadores BAD ($p<0,01$) e BAX ($p<0,05$), já que em relação aos marcadores BCL2 e ciclina D1 não foi identificada modulação de expressão significativa (**Figuras 23 e 24**).

Figura 21. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem MIA PaCa-2. **A**, **B**, **C** e **D** representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.

Figura 22. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem BxPC-3. A, B, C e D representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.

Figura 23. Histogramas representativos da detecção de marcadores na linhagem Capan-1. A, B, C e D representam os marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1, respectivamente.

Figura 24. Expressão dos marcadores BCL2, BAD, BAX e Ciclina D1. **A**, **B** e **C** representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7 Análise das fases do ciclo celular

A porcentagem de células distribuídas em cada fase do ciclo celular foi determinada para as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 no período de 48 horas após a transfecção do RNA de interferência específico ao transcrito de *HOXB7*. As linhagens tratadas foram comparadas àquelas transfectadas com o controle negativo e às células parentais.

Como demonstrado na **Figura 25**, a linhagem MIA PaCa-2 tratada demonstrou aumento da porcentagem de células em sub-G1 ($38,4 \pm 6,8$) quando comparada ao controle negativo ($17,2 \pm 8,7$) e às células parentais ($19,1 \pm 6,5$). O mesmo foi verificado na linhagem BxPC-3, a qual, uma vez tratada, apresentou aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo ($24,8 \pm 2,5$) quando comparada às células transfectadas com o duplex empregado como controle negativo ($12,2 \pm 3,4$) e à linhagem parental ($7,0 \pm 1,7$).

Assim como as linhagens celulares supracitadas, quando comparada ao controle negativo ($18,3 \pm 3,5$) e às células parentais ($19,3 \pm 5,5$), a linhagem Capan-1 tratada ($50,2 \pm 9,3$) também demonstrou aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular.

Figura 25. Distribuição das fases do ciclo celular. **A**, **B** e **C** representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1, respectivamente. Os gráficos demonstram três condições distintas: linhagem tratada com controle negativo, linhagem parental e linhagem tratada com RNA de interferência direcionado ao transcrito de *HOXB7*. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.8 Avaliação de apoptose

O processo de apoptose foi avaliado 48 horas após a inibição do transcrito do gene *HOXB7* em todas as linhagens pesquisadas. Assim como na detecção de marcadores e análise do ciclo celular, as células tratadas foram comparadas ao controle negativo e às linhagens parentais.

Entre as três linhagens avaliadas, somente a linhagem MIA PaCa-2 demonstrou o aumento da porcentagem de células apoptóticas após o tratamento (**Figura 26 e 27**).

Figura 26. Histogramas representativos do processo apoptótico. **A**, **B** e **C** representam as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 respectivamente.

Figura 27. Porcentagem de células apoptóticas após tratamento com *siRNA* anti-*HOXB7*. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.9 Identificação de genes diferencialmente expressos após interferência

A técnica de *microarray* possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos em plataforma *Agilent* a partir da utilização dos transcritos derivados das linhagens celulares tratadas (*siRNA* anti-*HOXB7*) e não tratadas. Quando comparadas às células parentais, as linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3 tratadas demonstraram 679 e 2554 genes hiporregulados, respectivamente. Estes foram categorizados conforme os processos biológicos nos quais estão envolvidos. Os *DAGs* de cada linhagem estão expostos abaixo (**Figuras 28 e 29**) e as categorias significativamente enriquecidas dispostas em anexo (**Anexos F e G**).

É importante ressaltar que o número de genes hiper-regulados após o tratamento das linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3 com *siRNA* específico foi reduzido e, por isso, não categorizado.

A linhagem metastática Capan-1 demonstrou apenas 108 genes modulados pela inibição do transcrito de *HOXB7*, sendo 12 hiporregulados e 96 hiper-regulados pelo tratamento, os quais não foram categorizados.

Figura 29. DAG da linhagem BxPC-3. Os quadros vermelhos indicam as categorias significativamente enriquecidas por genes hiporregulados após a inibição do transcrito do gene *HOXB7*.

Discussão

5 Discussão

No presente estudo investigou-se o padrão de expressão do gene homeobox *HOXB7* em adenocarcinomas pancreáticos ductais, bem como os efeitos da inibição do transcrito deste gene nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1.

Muitos estudos relataram o aumento da expressão de genes HOX em câncer. Alguns exemplos são *HOXA7* e *HOXD13* em câncer de pulmão (Lechner et al., 2001); *HOXC4* e *HOXC8* em câncer de próstata (Miller et al., 2003); e *HOXA10* em câncer de endométrio (Yoshida et al., 2006). Pesquisas realizadas com câncer de mama (Wu et al., 2006) e carcinoma de células escamosas bucal (Destro et al., 2010) revelaram o aumento de expressão de *HOXB7*, fato, este, que corroborou aquele observado em adenocarcinomas pancreáticos ductais.

Conforme relatado anteriormente, o conjunto de adenocarcinomas avaliado apresentou expressão aumentada do homeobox *HOXB7* quando comparado tanto ao grupo de tecidos peritumorais quanto ao conjunto de tecidos normais. O aumento de expressão estendeu-se também aos tecidos metastáticos, os quais apresentaram expressão aumentada exclusivamente em relação ao grupo normal.

O aumento de expressão do gene *HOXB7* foi ainda relatado em câncer colorretal (Liao et al., 2011). Em melanomas, a expressão constitutiva deste homeobox foi diretamente vinculada à expressão de *bFGF*, uma vez que o tratamento de linhagens celulares com oligômeros antissense direcionados ao transcrito de *HOXB7* inibiu a proliferação celular e aboliu, especificamente, a expressão de bFGF (Carè et al., 1996). Carè et al. (1998) demonstraram que a expressão de *HOXB7* na linhagem celular SkBr3 (carcinoma de mama) foi capaz de induzir a expressão de *bFGF*, evidenciando, assim, a relação direta entre o homeobox e o fator de crescimento, o qual é fundamental no decorrer da embriogênese e, quando desregulado, na progressão tumoral.

Além de induzir a expressão de *bFGF*, o homeobox HOXB7 também promoveu o aumento de expressão de fatores angiogênicos na linhagem celular SkBr3, como VEGF, IL8 e ANG2 (Carè et al., 2001). Em células derivadas de mieloma múltiplo, a expressão aumentada de HOXB7 foi associada ao aumento de expressão dos fatores pro-angiogênicos como VEGF e MMP2, bem como à redução de expressão de trombospondina-2, um potente inibidor da angiogênese tumoral (Storti et al., 2011).

Segundo Hyman et al. (2002), a amplificação gênica pode ser um mecanismo proeminente para o aumento de expressão de *HOXB7* em câncer de mama, todavia, a amplificação do gene foi observada em apenas 10% das 363 amostras avaliadas. No presente estudo, o aumento de expressão de *HOXB7* não foi associado à amplificação gênica, visto que apenas dois dos tecidos tumorais investigados demonstraram um padrão de amplificação distinto quando comparados aos tecidos normais. Desse modo, talvez o aumento de expressão de *HOXB7* esteja vinculado a mecanismos epigenéticos.

A participação de eventos epigenéticos na modulação de expressão dos genes *HOX* foi citada por Strathdee et al. (2007), os quais associaram a metilação do DNA à redução de expressão dos genes *HOXA4* e *HOXA5* em leucemias mielóide e linfóide. Da mesma maneira, Kim et al. (2009) também relacionaram a redução da expressão do gene *HOXA5* em câncer pulmonar de não-pequenas células à metilação. Em contraste, Avraham et al. (2010) observaram um padrão similar de metilação dos genes pertencentes ao grupo *HOXA* entre tecidos normais e cancerígenos, classificando a metilação do DNA como um processo normal sem ligação à tumorigênese.

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; Pillai et al; 2007; Standart e Jackson, 2007) .

Segundo Yekta et al. (2004), miR-196a foi capaz de reprimir a expressão de um membro do grupo *HOXB*, o transcrito *HOXB8*. O padrão de expressão deste miRNA foi ainda observado em células derivadas de melanomas, nas quais demonstrou-se hiporregulado quando comparadas a melanócitos normais. Além disso, a indução da expressão de miR-196a em linhagens celulares de melanoma propiciou a redução da expressão do transcrito de *HOXB7* em relação às células empregadas como controle, portanto, a correlação inversa entre a expressão de *HOXB7* e miR-196a indicou a regulação deste gene homeobox por miRNA (Braig et al., 2010).

Independente do mecanismo pelo qual a expressão do RNAm do gene *HOXB7* é regulada, este estudo visou investigar a relevância do aumento de expressão do transcrito em adenocarcinomas pancreáticos ductais. Para isso, utilizou-se a técnica de interferência com o objetivo de inibir a expressão do RNAm de *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 e, conseqüentemente, identificar os principais processos alterados em função desta inibição.

Após a reação de interferência, que possibilitou não apenas a hiporregulação do RNAm do gene *HOXB7*, mas também a redução da expressão protéica em todas as linhagens avaliadas, averiguou-se a expressão de alguns marcadores, bem como a distribuição das fases do ciclo celular e o processo de apoptose, por citometria de fluxo.

Conforme relatado, todas as linhagens demonstraram o aumento de expressão das proteínas pró-apoptóticas BAD e BAX após o tratamento com *siRNA* anti-*HOXB7*, todavia, o padrão de expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 diferiu entre as três

linhagens celulares pesquisadas. Dessa forma, enquanto a linhagem MIA PaCa-2 tratada apresentou a redução de expressão da proteína BCL2, as células BxPC-3 exibiram o aumento. A linhagem Capan-1, por sua vez, não demonstrou diferença de expressão da proteína anti-apoptótica entre as condições tratada e parental.

Dong et al. (2011) detectaram o aumento de expressão do RNAm do gene *BCL2* em células MIA PaCa-2 após a transfeccção de miR-21, indicando que o microRNA foi capaz de promover a expressão do transcrito por ligação à região 3'UTR. A hiper-regulação de *BCL2* foi acompanhada pela hiporregulação de *BAX*, assim como pela redução de apoptose, menor atividade de caspase-3, diminuição da quimiossensibilidade à gencitabina e aumento da proliferação celular. Por outro lado, o inibidor de miR-21 propiciou os efeitos opostos, e, portanto, semelhantes àqueles ocasionados pela redução da expressão do RNAm de *HOXB7* na linhagem MIA PaCa-2.

Nessas circunstâncias, a inibição do transcrito de *HOXB7* em células MIA PaCa-2 relacionou-se não só com a redução da expressão de BCL2 e hiper-regulação das proteínas pro-apoptóticas BAX e BAD, mas também com a hiporregulação da ciclina D1, uma proteína reguladora da transição da fase G1 para S do ciclo celular. A somatória desses eventos pode justificar o fenômeno de apoptose observado exclusivamente após o tratamento da linhagem MIA PaCa-2, embora a transfeccção do duplex específico tenha caracterizado aumento do número de células em sub-G1 em todas as linhagens celulares estudadas e a avaliação da viabilidade celular não tenha caracterizado modificações em nenhum dos períodos de tempo averiguados, o que talvez justifique-se pela baixa sensibilidade deste método (Denizot e Lang, 1986; Wang et al., 2010).

A inibição da proteína RAP80 representa outro exemplo da modulação das proteínas anti e pró-apoptóticas em câncer de pâncreas. Segundo os dados demonstrados

na pesquisa de Li et al. (2012), a expressão de BAX foi significativamente aumentada, enquanto a expressão de BCL2 foi reduzida, em células SW1990 e Capan-2 tratadas com *siRNA* anti-RAP80 em combinação com gencitabina. De acordo com os autores, a inibição da expressão de RAP80 pode aumentar a sensibilidade das células ao tratamento com gencitabina e estimular a apoptose.

Embora as linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 sejam derivadas de câncer pancreático, cada uma delas apresenta padrões fenotípicos e genotípicos distintos (Deer et al., 2010), os quais podem explicar as diferenças encontradas após a redução de expressão do RNAm de *HOXB7*. A distinção existente entre os tipos celulares não restringiu-se à expressão dos marcadores de apoptose e ciclina D1, uma vez que alguns processos biológicos foram diferencialmente modulados após a interferência.

O tratamento das linhagens MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 foi efetuado sob condições bem estabelecidas de concentração de *siRNA* e tempo de inibição. No entanto, quando comparadas às células MIA PaCa-2, as linhagens BxPC-3 e Capan-1 apresentaram aumento tanto da relação BCL2/BAX quanto da relação BCL2/BAD, o que, talvez, represente uma das causas para a ausência de modulação do processo apoptótico entre as células tratadas e parentais.

Um exemplo do envolvimento da relação BCL2/BAX no processo de apoptose foi descrito por James et al. (1998), os quais evidenciaram a importância dos compostos de vitamina D na redução da relação BCL2/BAX e, conseqüentemente, no aumento da suscetibilidade das células MCF-7 de câncer de mama à apoptose.

A análise da técnica de microarray, por sua vez, permitiu a identificação dos processos biológicos modulados pela inibição do RNAm do gene *HOXB7* nos diferentes tipos celulares, com exceção da linhagem Capan-1, na qual a repressão do transcrito não propiciou a categorização.

A linhagem MIA PaCa-2 foi caracterizada pela modulação de alguns processos específicos quando comparada à linhagem BxPC-3, como, por exemplo, a regulação de atividade das ubiquitina-ligases e o processo catabólico proteossomal de proteínas dependente de ubiquitina.

De acordo com os experimentos desenvolvidos por Zhu et al. (2010), os genes *HOX* são alvos específicos regulados pela monoubiquitinação de histona, fato que também foi citado por Wei et al. (2006), todavia, enquanto os primeiros relataram que a redução da monoubiquitinação da histona H2B reprime a expressão de genes *HOX*, os últimos evidenciaram que a perda da ubiquitinação da histona H2A relaciona-se com o aumento da expressão do gene *HOXC5*.

Em contraste aos dados supracitados, a investigação aqui realizada não apresentou como meta determinar os mecanismos de regulação da expressão do gene *HOXB7*, mas, sim, definir os processos modulados por sua inibição. Nesse contexto, a redução da expressão do RNAm de *HOXB7* em células MIA PaCa-2 foi capaz de reprimir transcritos de genes associados ao processo de ubiquitinação. O papel dos genes *HOX* na regulação da ubiquitinação também foi demonstrado por Wang H. et al. (2011), os quais descreveram que a hiper-regulação de *HOXA10* em células mielóides aumenta a ubiquitinação proteica dependente da ubiquitina-ligase denominada Triad-1.

Alguns transcritos associados com a síntese de aminas também foram hiporreguladas pela inibição do RNAm do gene *HOXB7* na linhagem MIA PaCa-2. Sabe-se que as poliaminas atuam em processos biológicos por meio da estabilização de macromoléculas aniônicas e modulam as interações DNA-proteína e proteína-proteína. A homeostase dessas moléculas é essencial para a sobrevivência celular, visto que a depleção ativa vias celulares que restringem a proliferação ou induzem a apoptose, como descrito por Evageliou e Hogarty (2009). Estes expuseram que a redução da

produção de poliaminas em neuroblastomas pode atenuar a iniciação e progressão tumoral mediada por MYC. De modo semelhante, Coker et al. (2012) relataram que o silenciamento de enzimas catabolizadoras de poliaminas reduziu a apoptose induzida por inibidores de quinase dependentes de ciclina em células Caco-2 de câncer de cólon.

Embora a biossíntese e o catabolismo de aminas representem mais um dos processos associados ao câncer, nenhum estudo na literatura os citou como mecanismos que justifiquem o envolvimento de muitos genes *HOX* na tumorigênese. Portanto, a regulação dos transcritos envolvidos na síntese de aminas pela inibição do RNA mensageiro do gene *HOXB7* em células MIA PaCa-2 representa a primeira indagação sobre a importância desse processo biológico na cascata de eventos que ligam os genes *HOX* ao câncer.

A inibição do transcrito do gene *HOXB7* propiciou a regulação de processos biológicos comuns às linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3, como a organização e modificação da cromatina, assim como a montagem do complexo protéico da célula.

As proteínas apresentadoras do homeodomínio foram identificadas como reguladoras da transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação normais, bem como na transformação tumoral (Garcia-Fernández, 2005). Cabe destacar que, embora essas proteínas exibam especificidade *in vivo*, as mesmas partilham de afinidades de ligação ao DNA muito similares *in vitro*, sugerindo, por conseguinte, que interações proteína-proteína medeiam sua especificidade. Baseando-se nesses aspectos, Chariot et al. (1999) demonstraram que *HOXB7* interage com a proteína co-ativadora CBP (CREB-binding protein) em células MDA-MB231 de câncer de mama e esta interação pode regular suas propriedades transcricionais, visto que CBP apresenta uma atividade de acetiltransferase de histonas intrínseca desestabilizando os nucleossomos e

facilitando o acesso de fatores de transcrição ao DNA (Bannister e Kouzarides, 1996; Martinez-Balbás et al., 1998).

Em contrapartida, Shen et al. (2001) propuseram um modelo alternativo no qual as homeoproteínas funcionariam como repressores transcripcionais por bloqueio da atividade de CBP, sugerindo, conseqüentemente, que, dependendo do tipo de cofator, as proteínas HOX atuariam não apenas como ativadores da transcrição, mas também como supressores.

O desenvolvimento recente de algumas 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 que, talvez, a ligação das proteínas HOX ao DNA seja influenciada mais pela acessibilidade à cromatina do que pela afinidade aos sítios de ligação (Choo e Russel, 2011). Sendo assim, a redução da expressão dos transcritos de genes envolvidos na organização e modificação da cromatina após a supressão do RNAm de *HOXB7* pode representar um evento derivado da ausência de interações proteicas entre a homeoproteína e seus ligantes capazes de alterar a conformação da cromatina, pois, talvez, a falta de *HOXB7* represente um estímulo celular para a redução de expressão de cofatores. Além disso, como as homeoproteínas regulam a transcrição de centenas de genes, a repressão de uma delas pode justificar a redução de expressão de genes envolvidos em diferentes processos biológicos, inclusive na organização e modificação da cromatina.

Como descrito, o processo de composição do complexo proteico celular também foi modulado pela inibição de *HOXB7* nas linhagens MIA PaCa-2 e BxPC-3. Sabe-se que os genes HOX são altamente conservados durante o processo evolutivo e que, durante o desenvolvimento embrionário, são expressos de maneira coordenada para

assegurar que as células se diferenciem em tecidos apropriados ao longo do eixo ântero-posterior do embrião em desenvolvimento (Lappin et al., 2006). A expressão desses genes permanece ativa durante toda a vida, entretanto, anormalidades no padrão de expressão são constantemente associadas ao câncer (Grier et al., 2005). Portanto, o papel da inibição do RNAi do gene *HOXB7* na redução da expressão dos transcritos relacionados à montagem do complexo proteico pode estar simplesmente associado à supressão do fator responsável pela ativação transcricional dos genes envolvidos nesse processo biológico.

Cabe ressaltar que, após o tratamento com *siRNA* anti-*HOXB7*, a linhagem BxPC-3 demonstrou, ainda, a modulação dos seguintes processos: transporte proteico, *splicing* de RNA e tradução. Assim sendo, o processo traducional pode estar comprometido não só pela repressão da transcrição de determinados genes, como, por exemplo, *bFGF*, mas também pela redução da expressão de genes cujas proteínas participam do processamento do RNA e da tradução propriamente dita.

A resposta celular aos estímulos de danos no DNA foi outro processo modulado pela inibição de *HOXB7* em células BxPC-3. Segundo Rubin et al. (2007), após formar complexos com proteínas Ku, *HOXB7* aumentou a taxa de reparo do DNA em células epiteliais mamárias MCF10A expostas à radiação. Do mesmo modo, Chiba et al. (2012) relataram que o aumento de expressão do gene *HOXB9* em câncer mama induziu radiorresistência por incremento das respostas direcionadas ao DNA danificado. Nessas condições, a hiporregulação do processo de reparo do DNA em células derivadas de adenocarcinoma pancreático pode estar associada à diminuição de expressão de *HOXB7*.

Por fim, a avaliação do ciclo celular revelou que a supressão de *HOXB7* interferiu, sobretudo, com a regulação das ciclinas e das quinases destas dependentes,

todavia, enquanto os dados de citometria demonstraram a redução da ciclina D1 na linhagem MIA PaCa-2, os resultados obtidos com a técnica de microarray evidenciaram um desequilíbrio do ciclo em ambas as linhagens. Dessa maneira, se por um lado as células BxPC-3 apresentaram a hiporregulação de genes associados à fase M do ciclo celular, por outro, a linhagem MIA PaCa-2 mostrou uma hiporregulação generalizada, mas incapaz de categorizar qualquer fase do ciclo.

O aumento da expressão do gene *HOXB7* em linhagens celulares derivadas de câncer colorretal foi associado à aceleração de transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, assim como à hiper-regulação de ciclina D1 e hiporregulação de p27. Por outro lado, a inibição desse gene conduziu ao bloqueio G1-S, à hiporregulação de ciclina D1 e hiper-regulação de p27. Esses dados levaram à sugestão de que a hiper-regulação de *HOXB7* pode ser um marcador prognóstico válido para a progressão de câncer colorretal (Liao et al, 2011).

A hiper-regulação de ciclina D1 em células MIA PaCa-2 submetidas à interferência não foi acompanhada pela redução de expressão de p27, contudo, entre os transcritos hiporregulados pelo tratamento e demonstrados pela técnica de *microarray* estão *E2F* e *RBI* (retinoblastoma 1), os quais são essenciais para a transição G1-S. Sendo assim, embora o experimento de microarray não tenha revelado a categorização de G1, transcritos importantes na progressão desta fase para a etapa subsequente foram modulados pela inibição de *HOXB7*.

Em contrapartida, a supressão de *HOXB7* foi relacionada à hiporregulação da fase M do ciclo celular em células BxPC-3, fato, este, que também foi evidenciado pela inibição de *HOXA10* durante a decidualização de células estromais do endométrio humano (HESCs). Segundo Lu et al. (2008), as células estromais foram bloqueadas na fase G2/M por intermédio da hiporregulação de centenas de genes, como, por exemplo,

CDC2 (CDK1- quinase dependente de ciclina 1) e *CCNB2* (ciclina B2), os quais também apresentaram expressão reduzida após a inibição de *HOXB7* na linhagem BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático.

É importante ressaltar que a transição epitelial-mesenquimal (EMT) conferida por componentes do complexo HOX em alguns estudos, não foi completamente esclarecida em câncer de pâncreas. Sabe-se que, para caracterizar este fenômeno, as células epiteliais perdem, sequencialmente, aderência, proteínas de junção, polaridade e, conseqüentemente, o contato célula-célula, sendo submetidas ao remodelamento do citoesqueleto para facilitar a motilidade e invasão (Thiery, 2002). *In vivo*, a hiper-regulação de *HOXB9* promoveu a formação de tumores de mama grandes e bem vascularizados, os quais metastatizaram para o pulmão (Hayashida et al., 2010). De modo semelhante, a expressão de *HOXB7* em células epiteliais de mama MCF10A conferiu a transição epitelial-mesenquimal pela aquisição de propriedades agressivas de tumorigenicidade, migração e invasão (Wu et al., 2006).

A inibição de *HOXB7* nas linhagens celulares derivadas de tumores primários (MIA PaCa-2 e BxPC-3) promoveu não apenas a redução de expressão do fator de crescimento *bFGF*, mas também de seu receptor (*FGFR2*). Além disso, transcritos da família das claudinas (*CLDN*) também foram hiporregulados, logo, as junções oclusivas que impedem o fluxo de materiais e vedam o espaço intercelular podem estar comprometidas. Deste modo, embora a modulação dos principais fatores angiogênicos associados à expressão de *HOXB7* não esteja presente, a hiporregulação de outros transcritos talvez indique a participação de *HOXB7* na transformação das células tumorais primárias pela aquisição de propriedades essenciais de migração e invasão.

Como já descrito, 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 genótípicas e fenotípicas que diferenciam os tipos celulares, talvez represente a causa para esse evento. Esta sugestão corrobora o estudo de Khamis et al. (2012), segundo o qual a metástase do câncer de mama é regulada não só por alterações nas células tumorais, mas também por alterações recíprocas com o microambiente circundante, uma vez que cada etapa do processo metastático é acompanhada pelo recrutamento de células estromais do microambiente e a produção de uma matriz única de fatores de crescimento e quimiocinas.

O entendimento das anormalidades moleculares implicadas na patogênese do adenocarcinoma pancreático ductal revelaram novos alvos para a terapia, ainda que algumas drogas, tais como 5-FU e gencitabina, representem a base quimioterápica para a doença (Shi et al., 2012). Os alvos moleculares mais importantes incluem o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Herreros-Villanueva et al., 2012).

Outro alvo promissor derivado do entendimento dos mecanismos moleculares no perfil agressivo do câncer de pâncreas é o silenciamento seletivo da expressão gênica com a utilização de RNA de interferência. A partir desta técnica, Huang et al. (2011) silenciaram o gene *STAT3* em células SW1990 de câncer pancreático, e demonstraram não só a inibição da tumorigenicidade, mas também a supressão do crescimento tumoral quando o duplex foi injetado diretamente dentro do tumor em camundongos nude. A silenciamento de *STAT3* no mesmo tipo celular também promoveu a redução de expressão das metaloproteinases de matriz-2 (MMP2) e de VEGF (Qiu et al., 2007). Dessa maneira, o silenciamento de determinados genes com a utilização da técnica de

RNA de interferência pode representar uma nova opção terapêutica para o câncer pancreático.

A supressão da expressão de *EGFR* em células PANC-1 reduziu significativamente a capacidade de migração e invasão, inibindo, por conseguinte, a transição epitelial-mesenquimal por meio do aumento de expressão de marcadores epiteliais e redução dos marcadores mesenquimais (Chang et al., 2012).

Como pode ser observado, a técnica de degradação de RNAm mediada por *siRNA* é aplicada na tentativa de desvendar o papel de genes específicos no processo tumorigênico. Nesse conteúdo, a inibição de *HOXB7* nas linhagens celulares MIA PaCa-2, BxPC-3 e Capan-1 representou mais um estudo neste âmbito, o qual, somado aos demais, indica a participação de mais uma molécula no desenvolvimento do câncer pancreático.

Embora a gencitabina represente o quimioterápico padrão para câncer pancreático, sua utilização está longe de ser considerada ideal, uma vez que a exposição prolongada à droga conduz à resistência. Esta é uma das principais causas do insucesso do tratamento para o adenocarcinoma pancreático. Sendo assim, novas estratégias terapêuticas são necessárias, como demonstrado por Yu et al. (2008), os quais relataram que a hiporregulação da proteína PLK1 com RNA de interferência aumenta a sensibilidade à gencitabina, boqueia o ciclo celular na fase G2/M e reduz a proliferação das células derivadas de adenocarcinoma pancreático.

No mesmo âmbito, Réjiba et al. (2007) evidenciaram que o silenciamento de *KRAS* por intermédio de *siRNA* foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência e reduzir significativamente o volume tumoral em camundongos quando empregado em combinação com gencitabina.

Portanto, a utilização de RNA de interferência como uma modalidade terapêutica tem gerado grandes expectativas, todavia, a maneira pela qual é disponibilizado às células ainda é alvo de dificuldades. Uma das formas mais comuns é a combinação com nanopartículas. Luo et al. (2009) incorporaram um plasmídeo contendo *siRNA* direcionado a *MBD1* dentro de nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e testaram a eficiência terapêutica em células BxPC-3, demonstrando que a nanopartícula de *MBD1* inibiu o crescimento celular e induziu a apoptose. Do mesmo modo, Pitella et al. (2012) relataram redução de crescimento tumoral com a administração de nanopartículas carreadoras de *siRNA* direcionado a *VEGF*.

O papel da inibição de *HOXB7* em células derivadas de adenocarcinoma pancreático já foi aqui destacado e enriquece os achados publicados por Nguyen Kovochich et al. (2012), os quais salientaram a redução do processo invasivo após transfecção, mas não a influência no processo apoptótico ou a importância na caracterização de diferentes perfis de expressão gênica entre os tipos celulares avaliados. Cabe agora evidenciar não só a importância da administração do *siRNA* alvo em combinação com quimioterápicos, mas também a relevância do transporte por nanopartículas, na melhoria dos resultados obtidos.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

O conjunto de adenocarcinomas pancreáticos ductais demonstrou o aumento de expressão do transcrito do gene *HOXB7* quando comparado ao grupo de tecidos peritumorais e ao conjunto de tecidos pancreáticos normais, fenômeno, este, que parece não estar associado à amplificação gênica.

A inibição do RNAm de *HOXB7* nas linhagens MIA PaCA-2 e BxPC-3 alterou os perfis de expressão de diferentes processos biológicos, todavia, nenhuma modificação significativa associada a estes processos foi encontrada na linhagem metastática Capan-1, cujos genes modulados não foram categorizados.

O silenciamento do transcrito de *HOXB7* promoveu a indução de apoptose e redução da proliferação das células MIA PaCa-2, o que não foi evidenciado nas demais linhagens estudadas.

ANEXOS

7 Anexos

Anexo A – Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

DECLARAÇÃO

Declaramos que a Divisão de Clínica Cirúrgica II - Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital das Clínicas da FMUSP está colaborando com o projeto de pesquisa intitulado ***Análise funcional, expressão e mutação do gene homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos*** que será desenvolvido no Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas – LIM 25 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 29 de julho de 2010.

Prof. Dr. Telesforo Bacchella

Prof. Dr. Telesforo Bacchella
Diretor do Serviço de Cir. de Vias Biliares
e Pâncreas- CRM: 17208
Divisão de Clínica Cirúrgica II

Prof. Dr. Ivan Cecconello
Diretor da Divisão de Clínica Cirúrgica II
Titular das Disciplinas de Cirurgia do Aparelho Digestivo
e de Coloproctologia da FMUSP

Anexo B – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO Octávio Frias de Oliveira Secretaria de Estado da Saúde Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<p>São Paulo 11 de agosto de 2010</p> <p>Registro: NP 073- 2010</p> <p>Ref. Solicitação de execução de estudo.</p> <p>"Análise Funcional, Expressão e Mutação do gene Homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos"</p> <p>Pesquisador responsável: Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella</p> <p>Prezado Pesquisador</p> <p>Considerações.</p> <p>Trata-se de estudo prospectivo com o objetivo principal de identificar o padrão de expressão do gene HOXB7 em tumores pancreáticos e no tecido normal.</p> <p>Responsabilidades dos Pesquisadores:</p> <p>Enviar a carta/email de de aprovação de patrocínio pela FAPESP.</p> <p>Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.</p>		
		<p>Atenciosamente,</p> <p> </p> <p>Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff Diretor Clínico</p>

Anexo C – Serviço de Verificação de Óbitos da Capital.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

Título da Pesquisa: Análise funcional, expressão e mutação do gene homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos

Pesquisador Executante: Thais Chile

Pesquisador Responsável: Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 23 de maio de 2011.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci
Diretor SVOC-USP

Anexo D – CAPPesq.

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18/01/2011, **APROVOU ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **0656/10**, intitulado: "**Análise funcional, expressão e mutação do gene homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos**" apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Maria Lucia Cardillo Correa Giannella

Pesquisador (a) Executante: Thais Chile

CAPPesq, 18 de Janeiro de 2011

Professora Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Em Endocrinologia

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

FMS_POS-GRADUACAO-SE -21-Jan-2011-15:31-000285-1/1

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0656/10

Título: ANÁLISE FUNCIONAL, EXPRESSÃO E MUTAÇÃO DO GENE HOMEBOX HOXB7 EM ADENOCARCINOMAS PANCREÁTICOS

Pesquisador Responsável: Maria Lucia Cardillo Correa Giannella

Pesquisador Executante: Thais Chile

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 30/09/11 - Adendo ao Protocolo**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 16 de Dezembro de 2011

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Vice-Cordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Análise funcional, expressão e mutação do gene homeobox HOXB7 em adenocarcinomas pancreáticos
2. **PESQUISADOR :** Ricardo Rodrigues Giorgi
CARGO/FUNÇÃO: Biologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 5601(CRBM)
UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia
3. **AValiação DO RISCO DA PESQUISA:**
RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR
4. **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s). O câncer de pâncreas é um dos cânceres humanos mais letais, estando associado a uma alta taxa de mortalidade. Geralmente, é diagnosticado em estágios avançados, dificultando o sucesso do tratamento. Nessas condições, as pesquisas sobre o diagnóstico precoce e fatores de prognóstico são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de prevenção ou tratamento. Atualmente, muitas pesquisas genéticas são desenvolvidas na tentativa de desvendar o processo de formação tumoral. O presente estudo, por sua vez, tem como objetivo avaliar a participação de mais um gene na formação e progressão do câncer pancreático, o gene HOXB7, o qual já foi relacionado a outros tipos de tumores.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. Ao aceitar tomar parte deste estudo, o fragmento tumoral será coletado durante o ato cirúrgico. Para cada fragmento coletado, serão realizados os seguintes procedimentos laboratoriais: determinação da magnitude de expressão do gene HOXB7, rastreamento de mutações e análise funcional do gene.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. Todos os fragmentos tumorais serão obtidos durante ato cirúrgico.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3. As amostras de tecido tumoral coletadas para os procedimentos laboratoriais descritos acima farão parte da peça cirúrgica já prevista, sem lesão que possa significar risco de qualquer natureza para o paciente, exceto os inerentes do próprio ato cirúrgico.

5 – Benefícios para o participante. Este estudo proporcionará um melhor entendimento das alterações fisiopatológicas que ocorrem no desenvolvimento ou progressão dos tumores pancreáticos, o que poderá ter implicações prognósticas e terapêuticas futuras.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar. Não existe procedimento alternativo.

7 – Garantia de acesso. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 4344 e telefone 30618457. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Anexo F – Processos Biológicos Associados à Inibição do Transcrito de *HOXB7* na Linhagem MIA PaCa-2.

Processo Biológico	Valor de <i>p</i> ajustado
Biogênese do complexo protéico (42 genes)	adjP=1.40e-03
Ciclo celular (60 genes)	adjP=3.30e-03
Interações interespecies entre organismos (27 genes)	adjP=2.20e-03
Montagem do complexo macromolecular da célula (32 genes)	adjP=1.20e-03
Montagem do complexo macromolecular (51 genes)	adjP=1.20e-03
Montagem do complexo protéico (42 genes)	adjP=1.40e-03
Montagem do complexo protéico da célula (21 genes)	adjP=1.90e-03
Organização da cromatina (30genes)	adjP=8.40e-03
Organização das subunidades do complexo macromolecular da célula (36 genes)	adjP=1.20e-03
Organização de organelas (87 genes)	adjP=1.20e-03
Organização de subunidades do complexo macromolecular (55genes)	adjP=1.20e-03
Processo de biossíntese de aminas (12 genes)	adjP=5.00e-03
Processos catabólicos proteossomais de proteínas dependentes de ubiquitina (15 genes)	adjP=2.20e-03
Processos catabólicos proteossomais de proteínas (15 genes)	adjP=2.20e-03
Regulação positiva de atividade da <i>ubiquitin-protein ligase</i> (11 genes)	adjP=5.20e-03
Regulação positiva de atividade de ligase (11 genes)	adjP=7.30e-03

Anexo G – Processos Biológicos Associados à Inibição do Transcrito de *HOXB7* na Linhagem BxPC-3.

Processo Biológico	Valor de <i>p</i> ajustado
Biogênese de componentes celulares (202 genes)	adjP=1.00e-05
Biogênese do complexo protéico (116genes)	adjP=2.08e-05
Ciclo celular (195 genes)	adjP=3.07e-08
Estabelecimento da localização protéica (171 genes)	adjP=1.16e-05
Estabelecimento de localização na célula (195 genes)	adjP=2.24e-05
Expressão gênica (592genes)	adjP=1.35e-06
Fase do ciclo celular (104 genes)	adjP=2.24e-05
Fase M (90 genes)	adjP=6.06e-06
Fase M do ciclo celular mitótico (67 genes)	adjP=5.33e-05
Interações interespecies entre organismos (74 genes)	adjP=6.00e-06
Localização celular (203 genes)	adjP=4.16e-05
Localização de macromoléculas (228 genes)	adjP=9.53e-07
Localização protéica (187 genes)	adjP=1.86e-05
Modificação da cromatina (69 genes)	adjP=4.44e-05
Montagem do complexo macromolecular (141 genes)	adjP=4.16e-05
Montagem do complexo protéico (116 genes)	adjP=2.08e-05
Organização cromossômica (110 genes)	adjP=8.30e-06
Organização das subunidades do complexo macromolecular (155 genes)	adjP=1.78e-05
Organização das subunidades do complexo macromolecular da célula (95 genes)	adjP=1.02e-05
Organização de componentes celulares (453 genes)	adjP=2.04e-07
Organização de organelas (290 genes)	adjP=4.53e-12
Processamento de RNA (134 genes)	adjP=4.38e-09
Processo do ciclo celular (133 genes)	adjP=6.06e-06
Processo metabólico (1249genes)	adjP=6.38e-10
Processo metabólico celular (1148 genes)	adjP=8.08e-13
Processo metabólico de macromoléculas (986 genes)	adjP=2.27e-09
Processo metabólico de macromoléculas celulares (929 genes)	adjP=2.46e-11
Processo metabólico de proteínas (513 genes)	adjP=2.49e-08
Processo metabólico de proteínas celulares (467 genes)	adjP=7.16e-12
Processo metabólico primário (1129 genes)	adjP=4.15e-08
Processos metabólicos de DNA (125 genes)	adjP=1.36e-06
Prolongamento traducional (44genes)	adjP=5.69e-10
Regulação da organização de organelas (54 genes)	adjP=4.16e-05
Resposta aos estímulos de danos no DNA (90 genes)	adjP=4.05 e-06
Resposta celular ao estresse (121 genes)	adjP=2.29e-05
Resposta celular aos estímulos de danos no DNA (82 genes)	adjP=9.95 e-06
Splicing de RNA (74 genes)	adjP=1.12e-05
Tradução (108genes)	adjP=7.44e-010
Transporte intracelular (150 genes)	adjP=9.53e-07
Transporte protéico (169 genes)	adjP=1.30e-05

BIBLIOGRAFIA

8 Referências Bibliográficas

Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(10):777-85.

Adwan H, Zhivkova-Galunska M, Georges R, Eyol E, Kleeff J, Giese NA, Friess H, Bergmann F, Berger MR. Expression of HOXC8 is inversely related to the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2011; 105(2):288-95.

Allema JH, Gouma DJ, Obertop H. Tumores exócrinos do pâncreas. In: Coelho, JCU. *Aparelho digestivo: clínica e cirurgia*. 3ª edição. São Paulo: editora Atheneu; 2005. p. 1867-1878.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988; 53(4):549-54.

Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Tanno S, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*. 2002; 87(4):470-6.

Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Jaffee E, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res.* 2001; 7(12):3862-8.

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002; 30(1):41-7.

Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2004; 23(53):8571-80.

Avraham A, Sandbank J, Yarom N, Shalom A, Karni T, Pappo I, Sella A, Fich A, Walfisch S, Gheber L, Evron E. A similar cell-specific pattern of HOXA methylation in normal and in cancer tissues. *Epigenetics.* 2010; 5(1):41-6.

Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature.* 1996; 384(6610):641-3.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B.* 1995; 57(1):289-300.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003; 425(6960):846-51.

Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007; 297(17):1901-8.

Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(20):3535-48.

Bridges CB; Morgan TH. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Publ Carnegie Inst*. 1923; 327:1-251.

Büchler P, Conejo-Garcia JR, Lehmann G, Müller M, Emrich T, Reber HA, Büchler MW, Friess H. Real-time quantitative PCR of telomerase mRNA is useful for the differentiation of benign and malignant pancreatic disorders. *Pancreas*. 2001; 22(4):331-40.

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 1994; 8(1):27-32.

Calhoun ES, Jones JB, Ashfaq R, Adsay V, Baker SJ, Valentine V, Hempen PM, Hilgers W, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *Am J Pathol.* 2003; 163(4):1255-60.

Carè A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A, Peschle C, Colombo MP. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res.* 2001; 61(17):6532-9.

Carè A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Peschle C, Colombo MP. Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. *Oncogene.* 1998; 16(25):3285-9.

Carè A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(9):4842-51.

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007; 26(5):745-52.

Chang ZG, Wei JM, Qin CF, Hao K, Tian XD, Xie K, Xie XH, Yang YM. Suppression of the epidermal growth factor receptor inhibits epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Dig Dis Sci*. 2012; 57(5):1181-9.

Chariot A, van Lint C, Chapelier M, Gielen J, Merville MP, Bours V. CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene*. 1999; 18(27):4007-14.

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(8):3636-41.

Chiba N, Comaills V, Shiotani B, Takahashi F, Shimada T, Tajima K, Winokur D, Hayashida T, Willers H, Brachtel E, Vivanco MD, Haber DA, Zou L, Maheswaran S. Homeobox B9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(8):2760-5.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-59.

Choo SW, Russell S. Genomic approaches to understanding Hox gene function. *Adv Genet.* 2011; 76:55-91.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 2001; 188(2):161-9.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res.* 1999; 248(1):1-9.

Coker A, Arisan ED, Palavan-Ünsal N. Silencing of the polyamine catabolic key enzyme SSAT prevents CDK inhibitor-induced apoptosis in Caco-2 colon cancer cells. *Mol Med Report.* 2012; 5(4):1037-42.

Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas.* 2010; 39(4):425-35.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986; 89(2):271-7.

Destro MFSS, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol.* 2010; 36(1):141-9.

Dong J, Zhao YP, Zhou L, Zhang TP, Chen G. Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Arch Med Res*. 2011; 42(1):8-14.

Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM, Berry DP. Chemoprevention of pancreatic cancer: a review of the molecular pathways involved, and evidence for the potential for chemoprevention. *Pancreatology*. 2006; 6(5):429-39.

Duarte B. Tumores endócrinos do pâncreas. In: Coelho, JCU. *Aparelho digestivo: clínica e cirurgia*. 3ª edição. São Paulo: editora Atheneu; 2005. p. 1879-1892.

Duboule D. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays*. 1992; 14(6):375-84.

Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Kobrin MS, Büchler MW, Korc M. Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 1995; 62(5):529-35.

Ebert MP, Fei G, Schandl L, Mawrin C, Dietzmann K, Herrera P, Friess H, Gress TM, Malfertheiner P. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer*. 2002; 86(2):257-62.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):259-69.

Evageliou NF, Hogarty MD. Disrupting polyamine homeostasis as a therapeutic strategy for neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 1;15(19):5956-61.

Fernandez-Zapico ME, Urrutia R. Molecular pathogenesis of pancreatic carcinogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004; 1: 247–252. 47.

Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2005; 41(15):2213-36.

Garcia-Bellido A. Homeotic and atavic mutations in insects. *Am Zool*. 1977; 17, 613-629.

Garcia-Fernàndez J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(12):881-92.

Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*. 2007; 56(8):1134-52.

Goggins M, Hruban RH, Kern SE. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol*. 2000; 156(5):1767-71.

Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol.* 1998; 152(6):1501-7.

Goodman FR, Scambler PJ. Human HOX gene mutations. *Clin Genet.* 2001; 59(1):1-11.

Gray S, Pandha HS, Michael A, Middleton G, Morgan R. HOX genes in pancreatic development and cancer. *JOP.* 2011; 12(3):216-9.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.* 2005; 205(2):154-71.

Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.* 1993; 53(21):5087-9.

Hayashida T, Takahashi F, Chiba N, Brachtel E, Takahashi M, Godin-Heymann N, Gross KW, Vivanco MM, Wijendran V, Shioda T, Sgroi D, Donahoe PK, Maheswaran S. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(3):1100-5.

Herrerros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(14):1565-72.

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2006; 20(10):1218-49.

Hong JH, Lee JK, Park JJ, Lee NW, Lee KW, Na JY. Expression pattern of the class I homeobox genes in ovarian carcinoma. *J Gynecol Oncol*. 2010; 21(1):29-37.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(5):579-86.

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol*. 1993; 143(2):545-54.

Huang C, Yang G, Jiang T, Cao J, Huang KJ, Qiu ZJ. Down-regulation of STAT3 expression by vector-based small interfering RNA inhibits pancreatic cancer growth. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(25):2992-3001.

Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringnér M, Sauter G, Monni O, Elkahloun A, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(21):6240-5.

James SY, Mercer E, Brady M, Binderup L, Colston KW. EB1089, a synthetic analogue of vitamin D, induces apoptosis in breast cancer cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* 1998; 125(5):953-62.

Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(19):14048-55.

Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Pathol.* 2006; 59(4):382-6.

Khamis ZI, Sahab ZJ, Sang QX. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer.* 2012; 2012:574025.

Kim DS, Kim MJ, Lee JY, Lee SM, Choi JY, Yoon GS, Na YK, Hong HS, Kim SG, Choi JE, Lee SY, Park JY. Epigenetic inactivation of Homeobox A5 gene in nonsmall cell lung cancer and its relationship with clinicopathological features. *Mol Carcinog.* 2009; 48(12):1109-15.

Klein AP, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J.* 2001; 7(4):266-73.

Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer*. 2001; 91(2):333-8.

Koliopanos A, Avgerinos C, Paraskeva C, Touloumis Z, Kelgiorgi D, Dervenis C. Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008; 7(4):345-56.

Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*. 2008; 8(2):110-25.

Korc M. Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 1998; 7(1):25-41.

Kubrusly MS, Cunha JE, Bacchella T, Abdo EE, Jukemura J, Penteado S, Morioka CY, de Souza LJ, Machado MC. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian casuistic. *JOP*. 2002; 3(5):144-51.

Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J*. 2006; 75(1):23-31.

Lechner JF, Fugaro JM, Wong Y, Pass HI, Harris CC, Belinsky SA. Perspective: cell differentiation theory may advance early detection of and therapy for lung cancer. *Radiat Res*. 2001; 155(1 Pt 2):235-238.

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120(5):1046-54.

Li Y, Gu WJ, Liu HL. Induction of Pancreatic Cancer Cell Apoptosis and Enhancement of Gemcitabine Sensitivity by RAP80 siRNA. *Dig Dis Sci*. 2012.

Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, Bian XW, Deng YJ, Ding YQ. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(11):3569-78.

Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. 2000; 50(4):241-68.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.

López-Casas PP, López-Fernández LA. Gene-expression profiling in pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10(5):591-601.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.

Lu Z, Hardt J, Kim JJ. Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation. *Mol Hum Reprod*. 2008; 14(6):357-66.

Luo G, Jin C, Long J, Fu D, Yang F, Xu J, Yu X, Chen W, Ni Q. RNA interference of MBD1 in BxPC-3 human pancreatic cancer cells delivered by PLGA-poloxamer nanoparticles. *Cancer Biol Ther*. 2009; 8(7):594-8.

Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, Lynch JF, Fusaro LR, Fusaro RM, Ghadirian P. Familial pancreatic cancer: a review. *Semin Oncol*. 1996; 23(2):251-75.

Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis*. 2010; 28(4-5):645-56.

Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3:157-88.

Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006; 20(2):211-26.

Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res*. 1997; 42(4):421-9.

Martinez-Balbás MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T. The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J*. 1998; 17(10):2886-93.

Miao J, Wang Z, Provencher H, Muir B, Dahiya S, Carney E, Leong CO, Sgroi DC, Orsulic S. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(43):17093-8.

Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med*. 2006 ; 6(8):905-18.

Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res*. 2003; 63(18):5879-88.

Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 306(4):799-804.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.

Nguyen Kovochich A, Arensman M, Lay AR, Rao NP, Donahue T, Li X, French SW, Dawson DW. HOXB7 promotes invasion and predicts survival in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2013; 119(3): 529-39.

Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(1):94-8.

Ozawa F, Friess H, Tempia-Caliera A, Kleeff J, Büchler MW. Growth factors and their receptors in pancreatic cancer. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001; 21(1):27-44.

Páez D, Labonte MJ, Lenz HJ. Pancreatic cancer: medical management (novel chemotherapeutics). *Gastroenterol Clin North Am*. 2012; 41(1):189-209.

Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M. Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev*. 2006; 20(22):3161-73.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*. 2007; 17 (3):118–26.

Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(5):1907-17.

Pittella F, Miyata K, Maeda Y, Suma T, Watanabe S, Chen Q, Christie RJ, Osada K, Nishiyama N, Kataoka K. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J Control Release*. 2012.

Qiu Z, Huang C, Sun J, Qiu W, Zhang J, Li H, Jiang T, Huang K, Cao J. RNA interference-mediated signal transducers and activators of transcription 3 gene silencing inhibits invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*. 2007; 98(7):1099-106.

Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res*. 1994; 54(11):3025-33.

Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2007; 67(9):4149-56.

Réjiba S, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Sci*. 2007; 98(7):1128-36.

Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, Pandita RK, Sharma GG, Ha HC, Gasson J, Hanakahi LA, Pandita TK, Sukumar S. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res*. 2007; 67(4):1527-35.

Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog*. 1998; 21(2):81-6.

Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2001; 24(5):496-9.

Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer*. 2003; 89(11):2110-5.

Schönleben F, Qiu W, Ciau NT, Ho DJ, Li X, Allendorf JD, Remotti HE, Su GH. PIK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(12):3851-5.

Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 1997; 57(15):3126-30.

Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(17):9624-9.

Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(5):361-71.

Shen WF, Krishnan K, Lawrence HJ, Largman C. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(21):7509-22.

Shi S, Yao W, Xu J, Long J, Liu C, Yu X. Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer? *Cancer Lett*. 2012; 317(2):127-35.

Shi X, Friess H, Kleeff J, Ozawa F, Büchler MW. Pancreatic cancer: factors regulating tumor development, maintenance and metastasis. *Pancreatology*, 2001; 1(5):517-24.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62(1):10-29.

Sjölund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *Eur J Cancer*. 2005; 41(17):2620-9.

Standart N, Jackson RJ. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes Dev*. 2007; 21:1975–82.

Storti P, Donofrio G, Colla S, Airolidi I, Bolzoni M, Agnelli L, Abeltino M, Todoerti K, Lazzaretti M, Mancini C, Ribatti D, Bonomini S, Franceschi V, Pistoia V, Lisignoli G, Pedrazzini A, Cavicchi O, Neri A, Rizzoli V, Giuliani N. HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2011; 25(3):527-37.

Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, Meyer S, Eden T, Dickinson AM, Mountford JC, Jorgensen HG, Soutar R, Brown R. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(17):5048-55.

Strimpakos A, Saif MW, Syrigos KN. Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2008; 27(3):495-522.

Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007; 26(30):4442-52.

Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 2001; 411(6835):349-54.

Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(20):1529-36.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003; 425(6960):851-6.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442-54.

Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61(23):8540-6.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006; 20(5):515-24.

Vêncio RZ, Koide T. HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res*. 2005; 12(3):211-4.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*. 2003; 302(5647):1036-8.

Wang H, Bei L, Shah CA, Horvath E, Eklund EA. HoxA10 influences protein ubiquitination by activating transcription of ARIH2, the gene encoding Triad1. *J Biol Chem*. 2011; 286(19):16832-45.

Wang K, Bodempudi V, Liu Z, Borrego-Diaz E, Yamoutpoor F, Meyer A, Woo RA, Pan W, Dudek AZ, Olyae MS, Esfandyari T, Farassati F. Inhibition of mesothelin as a novel strategy for targeting cancer cells. *PLoS One*. 2012; 7(4):e33214.

Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10202.

Wang Z, Banerjee S, Li Y, Rahman KM, Zhang Y, Sarkar FH. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2006a; 66(5):2778-84.

Wang Z, Rao DD, Senzer N, Nemunaitis J. RNA interference and cancer therapy. *Pharm Res*. 2011; 28(12):2983-95.

Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006b; 5(3):483-93.

Wei J, Zhai L, Xu J, Wang H. Role of Bmi1 in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *J Biol Chem*. 2006; 281(32):22537-44.

Wellik DM. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2009; 88:257-78.

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000; 60(7):2002-6.

Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgins MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10 (9): 1199-210.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103 (11):4034-9.

Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, Argani P, Sukumar S. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006; 66(19):9527-34.

Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(3):413-22.

Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, Yokohama Y, Ishikawa M. Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28(4):931-8.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004; 304(5670):594-6.

Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006; 66(2):889-97.

Yu C, Zhang X, Sun G, Guo X, Li H, You Y, Jacobs JL, Gardner K, Yuan D, Xu Z, Du Q, Dai C, Qian Z, Jiang K, Zhu Y, Li QQ, Miao Y. RNA interference-mediated silencing of the polo-like kinase 1 gene enhances chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(6A):2334-49.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(Web Server issue):W741-8.

Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell*. 2005; 20(4):601-11.