JEAN JORGE SILVA DE SOUZA

**Identificação de fatores diabetogênicos
associados ao adenocarcinoma de pâncreas**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto

SÃO PAULO

2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM 25 – da disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo a concessão de bolsa de estudo do CNPq (processo nº 140243/2002-0) e auxílio-pesquisa da FAPESP (processo nº 04/10692-8).

À minha esposa, Maria Luiza, que sempre me incentivou e alegrou com seu amor.

Ao meu filho, Luiz Henrique, nova fonte de alegria e amor.

Aos meus pais, Jorge e Ivanilde, que me ensinaram muito sobre educação, força e amor.

À tia Lucimar. Muito obrigado por tudo.

Agradecimentos

Aos pacientes, que mesmo em momentos difíceis de suas vidas doaram de si para ajudar os que virão.

Ao Professor Daniel Giannella Neto, pelas conversas, pela confiança, pelos ensinamentos, pelas contemplações que fizemos juntos... que eu me torne um dia um “arqueiro zen”...

Aos médicos do serviço de cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do HCFMUSP – Drs. José Eduardo M. Cunha, José Jukemura, André Montagnini

Aos médicos do serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado do HCFMUSP – Dr. Marcel Cerqueira César Machado e toda sua equipe

À médica patologista Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, que realizou os estudos de imunohistoquímica

À bióloga Maria Ângela Henriques Zanela Fortes, pelos ensinamentos nas técnicas de laboratório, e que auxiliou na realização das lâminas de microarranjo e nas reações de PCR em tempo real.

Ao biomédico Ricardo Rodrigues Giorgi, que compartilhou seu conhecimento comigo e que auxiliou na realização das lâminas de microarranjo.

Ao biólogo Marco Antônio Rego, que realizou as dosagens dos hormônios insulina e peptídeo C.

À técnica Maria Auxiliadora R. Higa, pelo auxílio no preparo do material usado nas dosagens hormonais e nas reações de PCR em tempo real.

À biomédica Ana Carolina por importantes orientações sobre o manuseio do aparelho de PCR em tempo real.

À secretária Norisa Amadeo Herrera, que com muita força e determinação ajudou e organizou o trabalho administrativo do laboratório.

Ao biomédico Dr. José Tadeu Stefano e à biomédica e graduanda de Medicina Dra. Andréa Cecília Toscanini, pelos ensinamentos de técnicas de laboratório.

À enfermeira Ana Cristina Oliveira de Souza e a toda a equipe de enfermagem da enfermaria de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital das Clínicas da FMUSP, por seu apoio e sua dedicação aos pacientes.

À Dra. Márcia Saldanha Kubrusly, do LIM-37, Serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado, pela coleta de alguns dos fragmentos tumorais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, Professo Titular da Disciplina de Obstetrícia, e ao Dr. Mario Kondo, que gentilmente cederam o fragmento de placenta usado como controle interno em reação de PCR.

Ao Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, do Serviço de Verificação de Óbito, que gentilmente cedeu fragmento de próstata usado como controle interno em reação de PCR.

À FAPESP e ao CNPq, por tornarem possível a transformação de idéias em descobertas.

*“Cria em mim, ó Deus, um coração puro, e
renova em mim um espírito reto.”*

Salmo 51:10

“... além disso, não precisamos correr sozinhos o risco da aventura, pois os heróis de todos os tempos a enfrentaram antes de nós. O labirinto é conhecido em toda sua extensão. Temos apenas de seguir a trilha do herói, e lá, onde temíamos encontrar algo abominável, encontraremos um deus. E lá, onde esperávamos matar alguém, mataremos a nós mesmos. Onde imaginávamos viajar para longe, iremos ter ao centro de nossa própria existência. E lá, onde pensávamos estar sós, estaremos na companhia do mundo todo.”

Joseph Campbell (1904 - 1987)

“O êxito na vida é resultado de esforço, e não de um milagre.”

Autor desconhecido

“Há duas formas para viver sua vida: uma é acreditar que não existe milagre; a outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.”

Albert Einstein

Esta 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DIABETES MELITO COMO CAUSA DE ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS	4
1.2. ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS COMO CAUSA DE DIABETES MELITO	7
2. OBJETIVOS	11
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
3.1 CASUÍSTICA.....	12
3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	15
3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE POR TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)...	28
3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL CONTRA PEPTÍDEO DERIVADO DO FAM3D	37
3.5 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA O FAM3D	39
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4. RESULTADOS	45
4.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU NÃO DE DIABETES MELITO	46
4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EVIDENCIADA POR MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE TUMORES DE PACIENTES COM DIABETES MELITO(DM) COMPARADOS COM PACIENTES COM NORMOTOLERANTES À SOBRECARGA DE GLICOSE (NGT) PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS	50
4.3 EXPRESSÃO DE mRNA DOS GENES FAM3D, NPY E S100A8 POR RT- QPCR.	58
4.4 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA O FAM3D	64
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	76
7. ANEXOS.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr.	Doutor
et al.	e outros
Prof.	Professor
q.s.p	quantidade suficiente para

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
$\pm$	mais ou menos
$<$	menor
$=$	igual a
$>$	maior que
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
cm	centímetro
dL	decilitro
h	hora
kg	quilograma
kg/m^2	quilograma por metro quadrado
L	litro
m	metro
mm	milímetro
mmol	milimol
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma

nM	nanomolar
rcf	força centrífuga relativa (<i>relative centrifuge force</i>)
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)
μg	micrograma
μL	microlitro
μU	micro-unidade
U	unidade

LISTA DE SIGLAS

CA 19-9	Antígeno de carboidrato 19-9 (<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEA	Antígeno carcino-embrionário
cRNA	Ácido ribonucleico complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato de sódio
DM	Diabetes melito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Nucleotídeos trifosfatados
EUA	Estados Unidos da América
GTTO	Teste de tolerância à glicose por via oral
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
HOMA-Beta	<i>Homeostais Model Assessment - Beta</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC	intervalo de confiança
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ND	Não-diabéticos
NGT	Normotolerantes à glicose

NPY	Neuropeptídeo Y
NS	Estatisticamente não-significativo
RNA	ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa quantitativa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização da ligação das sondas de oligonucleotídeos à matrix de poliacrilamida nas lâminas do sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray®	18
Figura 2 - Curvas de eficiência do gene FAM3D (A) e do gene controle GAPDH (B)	30
Figura 3 - Curvas de eficiência do gene NPY (A) e do gene controle GAPDH (B).....	31
Figura 4 - Curvas de melting do gene FAM3D: 1ª Reação (A), 2ª Reação (B).....	34
Figura 5 - Curvas de melting do gene NPY: 1ª Reação (A), 2ª Reação (B).....	35
Figura 6 - Eletroforese em gel de TAE agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos na RT-qPCR para FAM3D e GAPDH em amostras de adenocarcinoma de pâncreas: (A) 1-4: DM; 5-7: IGT; (B) 8-12: NGT; P: placenta; CN: controle negativo	36
Figura 7 - Eletroforese em gel de TAE agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos na RT-qPCR para NPY e GAPDH em amostras de adenocarcinoma de pâncreas: (A) 1-4: DM; 5-7: IGT; (B) 8-12: NGT; P: próstata.....	36
Figura 8 - Índice HOMA-IR dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à	

glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito49

Figura 9 - Índice HOMA-Beta dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito49

Figura 10 - Relação entre as intensidade das expressões de mRNA dos genes analisados pelo microarranjos observadas nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes melito comparados com pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com tolerância normal à glicose. As áreas em vermelho representam os valores de intensidade dos genes diferencialmente expressos. A seta indica a expressão mRNA do gene FAM3D que é maior nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes melito51

Figura 11 - Grupamento hierárquico de genes diferencialmente expressos no pool de tumores dos portadores de diabetes melito e no pool de tumores de indivíduos normotolerantes à glicose. DM: Diabetes melito; ND: Não-diabéticos56

Figura 12 - Distribuição dos subconjuntos de genes diferencialmente expressos no pool de tumores dos portadores de diabetes melito e no pool de tumores de indivíduos normotolerantes à glicose. DM=Diabetes Melito; ND=Não-Diabéticos57

Figura 13 - Expressão normalizada do mRNA do gene FAM3D em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a

tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT:	
Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito	62
Figura 14 - Expressão normalizada do mRNA do gene NPY em pacientes	
com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a	
tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT:	
Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito	62
Figura 15 - Expressão normalizada do mRNA do gene S100A8 em pacientes	
com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a	
tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT:	
Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de Diabetes Melito	63
Figura 16 - Expressão do FAM3D em tecido de cólon normal humano na	
imunohistoquímica. As células epiteliais colônicas se coram	
fortemente no citoplasma.....	65
Figura 17 - Expressão do FAM3D em tecido de placenta humana normal na	
imunohistoquímica. As células dos vilos se coram fortemente no	
núcleo. No trofoblasto não se observa células coradas com o	
anticorpo contra o FAM3D	65
Figura 18 - Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em ilhotas	
pancreáticas humanas normais. As células das ilhotas	
pancreáticas se coram fortemente no citoplasma, com padrão	
difuso	66
Figura 19 - Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em ductos	
pancreáticos humanos normais. As células dos ductos	

pancreáticos se coram fortemente no citoplasma, com padrão
granuloso66

Figura 20 - Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em adenocarcinoma
ductal de pâncreas. Em alguns tumores observa-se um padrão
nuclear e citoplasmático para o FAM3D nas células tumorais.....67

Figura 21 - Expressão do FAM3D em adenocarcinoma ductal de pâncreas.
Em alguns tumores observa-se apenas um padrão citoplasmático
granuloso, semelhante ao observado no cólon normal e nos ductos
pancreáticos normais.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das principais classes de genes presentes no sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray® de acordo com o processo biológico no qual estão envolvidos	18
Tabela 2 - Amplímeros selecionados para o estudo dos genes FAM3D, NPY, S100A8 e GAPDH.....	29
Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais dos 33 portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas	47
Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose.....	48
Tabela 5 - Genes expressos mais de cinco vezes na lâmina dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas portadores de diabetes melito comparados aos pacientes com tolerância normal à glicose pelo teste oral	52
Tabela 6 - Genes expressos mais de cinco vezes na lâmina dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com tolerância normal à glicose comparados aos pacientes portadores de diabetes melito	53
Tabela 7 - Características clínicas e achados cirúrgicos dos 12 pacientes cujos tumores foram estudados por RT-qPCR.....	60
Tabela 8 - Expressão de mRNA dos genes FAM3D, NPY e S100A8 nas amostras de tumores dos pacientes estudados	60

Tabela 9 - Expressão de mRNA do gene FAM3D em sangue periférico de portador de adenocarcinoma ductal de pâncreas e em amostras de tumores e sangue periférico de pacientes com outras neoplasias.....	61
---	----

RESUMO

Diabetes melito ou intolerância à glicose estão presentes em até 80% dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas. Portadores desta neoplasia têm resistência à insulina e alteração na secreção de insulina em resposta à glicose, o que pode levar ao aparecimento ou piora de diabetes. Para identificar genes diferencialmente expressos, que podem representar fatores diabetogênicos produzidos pelo adenocarcinoma de pâncreas, utilizou-se a comparação de microarranjos de oligonucleotídeos hibridizados com RNA complementar (cRNA) de tumores pancreáticos de pacientes com e sem diabetes melito no pré-operatório. Uma lâmina foi hibridizada com cRNA de dois pacientes portadores de diabetes melito, e outra com cRNA de dois pacientes com tolerância normal à glicose pelo teste oral. Considerando a expressão ajustada para os controles internos dos microarranjos, 293 genes estavam duas ou mais vezes mais expressos na lâmina dos portadores de diabetes melito; destes, 25 genes estavam pelo menos cinco vezes mais expressos. Duzentos e noventa e sete genes estavam pelo menos duas vezes mais expressos na lâmina dos pacientes com tolerância normal à glicose, dos quais 54 genes estavam cinco ou mais vezes mais expressos nestes indivíduos. Dos genes mais expressos nos tumores dos indivíduos portadores de diabetes melito, três deles, FAM3D, do inglês “Family with Sequence Similarity number 3 member D”, neuropeptídeo Y (NPY), e proteína de ligação do cálcio S100A8, foram estudados por reação em cadeia da polimerase em tempo real. A expressão do FAM3D foi 4070

(1000-37588) nas amostras de tumores de pacientes com diabetes melito, contra 109 (10-1112) nas de pacientes não-diabéticos (com intolerância à glicose ou com tolerância normal à glicose) ($p < 0,05$). A expressão do NPY foi 0,46 (0,19-0,91) nos tumores dos portadores de diabetes, contra 0,32 (0,21-0,58) nos tumores dos não-diabéticos ($p = \text{NS}$). Quanto à expressão de S100A8, foi 0,52 (0,27-0,60) nos tumores dos diabéticos, e 0,34 (0,16-1,44) nos não-diabéticos. Estudo imunohistoquímico mostrou que o FAM3D está expresso no núcleo e no citoplasma de células de tumores pancreáticos, tanto de indivíduos com diabetes melito quanto de não-diabéticos, assim como no citoplasma de células de ilhotas pancreáticas e de células ductais normais do pâncreas. Concluímos que o FAM3D é uma proteína expressa em tecido pancreático normal e tumoral, e que existe maior conteúdo do mRNA do FAM3D nos adenocarcinomas de pâncreas de portadores de diabetes melito do que nos de não-diabéticos.

Descritores: Carcinoma ductal pancreático; Diabetes mellitus; Expressão gênica; Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos; Neuropeptídeo Y; Proteínas S100.

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma is closely related to diabetes mellitus; up to 80% of pancreas adenocarcinoma patients have diabetes or impaired glucose tolerance. Pancreas adenocarcinoma patients have both insulin resistance and altered insulin secretion in response to glucose, and impaired glucose metabolism has been reported in muscle of tumor patients, involving glycogen metabolism and post-receptor insulin signaling. But despite progress in research about this issue, precise mechanisms responsible for the interaction of pancreatic adenocarcinoma and diabetes mellitus remain unknown. The aim of this study was to identify differentially expressed genes between pancreas adenocarcinoma of patients who had and who did not have diabetes mellitus before surgery. Clinical and laboratorial data of 33 patients with pancreatic adenocarcinoma were evaluated, and tumor gene expression was analyzed by microarray method between two patients who had diabetes mellitus and two who did not have glycemic homeostasis impairment, and later used quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) in twelve tumor fragments mRNA to confirm obtained data. Pancreatic adenocarcinoma patients who had diabetes mellitus had higher HOMA-IR ($p < 0.05$) and a trend to lower HOMA-beta indexes than non-diabetic patients. Microarray revealed 293 genes twice more expressed in the pool of diabetic patients as compared to the pool of normal glucose tolerance patients. Of these, 25 were five times more expressed in diabetic patients' pancreatic adenocarcinomas. Three

genes were chosen for RT-qPCR: Family with Sequence Similarity number 3 member D (FAM3D), neuropeptide Y (NPY), and calcium-binding protein S100A8. FAM3D expression was 4070 (1000-37588) in diabetic patients tumors versus 109 (10-1112) in non-diabetic (impaired glucose and normal glucose tolerance) patients' tumors ($p<0.05$). NPY expression was 0.46 (0.19-0.91) in diabetic patients and 0.32 (0.21-0.58) in non-diabetic patients' tumors ($p=NS$). Calcium-binding protein S100A8 expression was 0.52 (0.27-0.60) in diabetic and 0.34 (0.16-1.44) in non-diabetic patients ($p=NS$). Immunohistochemistry revealed that FAM3D protein was expressed in pancreatic adenocarcinoma cells in a diffuse nuclear and cytoplasmic pattern. It was also expressed in the cytoplasm of islets of Langerhans and normal pancreatic ducts cells. The present study indicates that cytokine-like FAM3D protein is expressed in normal and tumoral pancreatic tissue, and that FAM3D mRNA content is higher in pancreatic adenocarcinoma in diabetic than in non-diabetic patients.

Descriptors: Pancreatic ductal carcinoma; Diabetes mellitus; Gene expression; Oligonucleotide array sequence analysis; Neuropeptide Y; S100 proteins.

1. INTRODUÇÃO

Entre os carcinomas pancreáticos não-endócrinos, 76% correspondem ao adenocarcinoma ductal. O restante corresponde aos carcinomas de células gigantes, micradenocarcinomas, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinoma mucinoso, cistoadenocarcinomas, carcinoma de células acinares, carcinomas da infância, e não-classificados¹. O adenocarcinoma ductal de pâncreas é uma neoplasia clinicamente agressiva caracterizada por diferenciação ductal, que pode ser demonstrada por produção de mucina e pela expressão de certas citoqueratinas².

Sendo um dos tipos mais letais de câncer, após um ano do diagnóstico do tumor, apenas 21,2% dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas estão vivos, e apenas 5,0% em 5 anos³. A mortalidade por este tipo de tumor tem se mantido estável nos Estados Unidos da América (EUA) nos últimos 27 anos, sendo praticamente a mesma que a taxa de incidência³.

Os adenocarcinomas de pâncreas ocorrem após os 30 anos de idade, sendo mais freqüentes após os 70 anos³. São geralmente tumores sólidos e escleróticos, e em muitos casos, o pâncreas adjacente é afetado por pancreatite esclerosante, e não existe um limite nítido entre o tumor e o pâncreas não neoplásico. Frequentemente há invasão de estruturas adjacentes, incluindo colédoco, duodeno, grandes vasos e tecidos moles peri-pancreáticos. Se caracterizam histologicamente por glândulas atípicas entremeadas por um denso estroma fibrótico. O estroma frequentemente constitui mais de 50% do tumor, o que dificulta a obtenção de tecido

carcinomatoso puro para fins de pesquisa. Existe grande quantidade de mucina no citoplasma das células tumorais. Frequentemente encontram-se dentro do tumor estruturas não-tumorais, tais como ductos não-neoplásicos, ilhotas e ácinos⁴. Na imunohistoquímica, caracterizam-se pela expressão de antígenos de mucina relacionados a carboidratos (*mucin-related carbohydrate antigens*), tais como CEA, CA 19-9, DU-PAN-2, e Span 1, mucina (MUC 1), e citoqueratinas 7, 8, 18 e 19.

Entre os adenocarcinomas de pâncreas, 78% estão localizados na cabeça, 11% no corpo, e 10% na cauda do pâncreas⁵. Em geral, tumores da cabeça se manifestam por dor abdominal ou icterícia, e tumores de corpo e cauda muitas vezes passam despercebidos por apresentarem apenas sintomas inespecíficos, tais como dor abdominal ou dorso-lombar, emagrecimento, náusea, anorexia, saciedade precoce e alterações no hábito intestinal^{6,7}.

Nos casos de adenocarcinoma ductal, a sobrevida é maior entre os pacientes que têm o tumor ressecado, porém esse número corresponde a apenas 5 a 20% dos casos, e em até 58% dos casos nenhum tratamento direcionado para o tumor é realizado devido à sua natureza agressiva. Mesmo no grupo que tem o tumor ressecado, apenas 25% sobrevivem em 5 anos^{5,7}. Quimioterapia e radioterapia adjuvantes podem permitir aumentos modestos na sobrevida e estão em investigação.

Uma das hipóteses sobre a tumorigênese do adenocarcinoma de pâncreas é a de que ele se inicia em células tronco pluripotenciais, incluindo células presentes nas ilhotas pancreáticas^{8,9}. Porém, Cubilla &

Fitzgerald¹ observaram lesões pré-malignas em ductos pancreáticos de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas, quando comparados a pâncreas de pacientes com outras neoplasias malignas. Essas células ductais, assim como as células tumorais, possuem grande quantidade de mucina em seu citoplasma, o que reforçaria a hipótese de origem ductal para o adenocarcinoma de pâncreas.

Portadores de câncer, independentemente do local de origem ou órgão acometido, apresentam prevalência de diabetes melito maior do que a população em geral¹⁰. As alterações no metabolismo da glicose observadas em pacientes com câncer envolvem menor depuração de glicose após sobrecarga por via oral, resistência à insulina^{11,12} e menor secreção de insulina em resposta à glicose^{13,14}, tolbutamida e glucagon¹⁵.

Por sua vez, portadores de diabetes melito apresentam maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer do que indivíduos não-diabéticos, particularmente câncer de pâncreas, linfoma e melanoma^{16,17}.

Em indivíduos com tumor pancreático, diabetes melito é observado com maior frequência do que na população geral^{6,10,18}. Até 80% dos pacientes com tumor pancreático apresentam diabetes ou intolerância à glicose no momento do diagnóstico do câncer^{19,20}. Essa frequência de diabetes melito é muito maior entre os portadores de adenocarcinoma de pâncreas do que entre pacientes com tumores malignos em outros órgãos^{18,21}. Embora essa associação seja reconhecida, ainda existe debate sobre se o diabetes melito predispõe ao adenocarcinoma de pâncreas, ou

se, em certos casos, o diabetes melito é uma manifestação precoce do tumor. As duas situações parecem ser verdadeiras.

1.1. DIABETES MELITO COMO CAUSA DE ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS

As evidências de que diabetes melito é fator de risco para adenocarcinoma de pâncreas partem de estudos com portadores de diabetes de longa data que mostram existir, para eles, um risco aumentado de câncer de pâncreas^{16,17,22,23}. Esse aumento no risco de adenocarcinoma de pâncreas em pacientes com diabetes melito é ainda mais expressivo se levarmos em consideração a alta taxa de mortalidade cardiovascular desses pacientes, e o seu menor risco de câncer em geral (incluindo todos os órgãos)^{6,16}.

Kessler¹⁶ observou, em uma coorte retrospectiva de portadores de diabetes melito atendidos na Joslin Clinic (Boston, E.U.A.), que apesar de um risco de morte por câncer diminuído em homens e igual ao da população geral em mulheres, os diabéticos tinham um risco significativamente maior de desenvolver adenocarcinoma de pâncreas. O tempo médio entre o diagnóstico de diabetes e o diagnóstico do adenocarcinoma de pâncreas foi de $11,4 \pm 2,9$ anos. Quando se excluíram os casos com menos de um ano entre o diagnóstico de diabetes e o diagnóstico do tumor, a relação deixou de ser significativa entre os homens, mas continuou significativa entre as mulheres, sugerindo que o diabetes melito é realmente um fator de risco importante para este tipo de tumor.

Porém, estes dados também sugerem que o adenocarcinoma de pâncreas está associado a diabetes melito de início recente que pode ser causado pelo tumor.

O aumento no risco de adenocarcinoma de pâncreas em diabéticos também foi observado por Chow et al.²³. Neste estudo, o risco de adenocarcinoma de pâncreas permanecia elevado mesmo após 10 anos de diagnóstico de diabetes melito. Neste mesmo grupo de pacientes, o risco de adenocarcinoma de pâncreas foi significativo somente nos pacientes com mais de 40 anos de idade, sugerindo que não existe associação entre diabetes do tipo 1 e adenocarcinoma de pâncreas. Esse aumento no risco de adenocarcinoma de pâncreas em pacientes com glicemia elevada de longa data também foi observado em estudo prospectivo realizado por Batty et al.²⁴, no qual o aumento da glicemia pós-prandial teve correlação positiva com mortalidade por este tipo de câncer.

Em um estudo de meta-análise, Everhart e Wright²⁵ verificaram associação positiva entre diabetes melito preexistente, diagnosticado mais de um ano antes do diagnóstico do adenocarcinoma de pâncreas, e este tipo de tumor. Observou-se um risco relativo individual que variou de 0,78 a 6,1, com um risco relativo combinado de 2,1 (IC 95%: 1,6–2,8). Os resultados foram semelhantes quando foram considerados somente estudos com duração de diabetes maior do que 5 anos, e também quando foram ajustados para o tabagismo.

O aumento no risco de adenocarcinoma de pâncreas em portadores de diabetes melito pode ser explicado em parte por maior proliferação das

células tumorais nestes indivíduos. Com efeito, estudo *in vitro* realizado por Fisher et al.²⁶ mostrou que diversas linhagens celulares de câncer de pâncreas possuem receptores de insulina, e que a proliferação destas células aumentou significativamente quando as mesmas foram tratadas com insulina. Esse mesmo grupo havia demonstrado que células de tumor de pâncreas proliferam mais quando tratadas com glicose e com ácidos graxos, condições presentes em portadores de diabetes²⁷. A administração de insulina, (ou seja, insulina *in vivo*) por sua vez, causou diminuição na proliferação de câncer de pâncreas transplantado em “hamsters”. Em outro estudo, Schneider et al.⁹ mostraram que a administração de metformina a “hamsters” diminuiu a incidência de câncer de pâncreas induzido pelo carcinógeno N-nitrosobis-(2-oxopropil)amina (BOP, na sigla em inglês), assim como evitou o aparecimento de lesões pré-neoplásicas no pâncreas destes “hamsters”. Os estudos citados acima levam a supor que fatores associados à obesidade e diabetes melito, tais como hiperglicemia, aumento de ácidos graxos e hiperinsulinemia promovem o crescimento tumoral no pâncreas, e que quando o pâncreas é deixado em repouso, o estímulo para o crescimento tumoral diminui. Isto poderia ser uma das explicações da maior incidência de adenocarcinoma de pâncreas em portadores de diabetes melito.

1.2. ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS COMO CAUSA DE DIABETES MELITO

Devido à menor associação entre adenocarcinoma de pâncreas e diabetes melito quando os casos de diabetes de diagnóstico recente são excluídos^{6,10,16,18,28}, alguns pesquisadores^{19,20,28} sugeriram que este tumor poderia interferir no metabolismo da glicose, e que diabetes diagnosticado até 3-5 anos antes do diagnóstico do tumor pancreático seria causado pela presença do mesmo e não um fator de risco para o tumor.

Há evidências de que adenocarcinoma de pâncreas possa causar alteração no metabolismo da glicose. Em camundongos, injeções intraperitoneais de meios condicionados de tumores pancreáticos humanos são capazes de induzir alterações no metabolismo da glicose²⁹. Estes mesmos meios condicionados de células tumorais pancreáticas induzem alterações no metabolismo hepático, levando a aumento de glicose e de proteino-quinase C³⁰.

O comprometimento da homeostase glicêmica associado ao adenocarcinoma de pâncreas caracteriza-se por marcada resistência à insulina^{19,20,21}, que melhora após a exérese do tumor por pancreatectomia parcial³¹, e por diminuição da secreção de insulina em resposta à glicose^{21,32}. Não há correlação entre o tamanho ou a localização do tumor e a taxa de captação da glicose avaliada pelo *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico²⁰ o que indica que outros fatores ainda desconhecidos, talvez humorais, possam ser responsáveis pela intolerância à glicose observada nos portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas^{29,30}.

Em análise retrospectiva de 166 pacientes com adenocarcinoma de pâncreas internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de 1998 a 2003 observou-se que 30,1% dos pacientes tinham diagnóstico prévio de diabetes melito. A mediana do tempo de diagnóstico de diabetes nestes pacientes foi de 5 meses, sugerindo participação do tumor na etiologia do diabetes. A comparação entre pacientes com e sem diabetes revelou que a frequência do sexo feminino e de história familiar de diabetes foram maiores no grupo com diabetes. Não houve diferença quanto a localização do tumor no pâncreas, existência de metástases, taxa de ressecção do tumor, nem às concentrações de bilirrubina, amilase, ou CA 19-9³³. Outros estudos^{20,34,35} também mostraram que tais diferenças clínicas entre os pacientes não são comuns e não explicam as alterações na homeostase glicêmica em portadores de adenocarcinoma de pâncreas.

Os mecanismos intracelulares de resistência periférica à insulina no diabetes melito associado a adenocarcinoma de pâncreas ainda não estão totalmente esclarecidos. Liu et al.³⁶ observaram que a ligação da insulina ao seu receptor, o conteúdo de mRNA e a atividade tirosino-cinase do receptor de insulina, assim como o conteúdo de mRNA do receptor de insulina 1 (IRS-1) e de transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) em resposta à insulina no músculo esquelético de pacientes acometidos por tumor pancreático não estavam alterados. Observaram, porém, que o conteúdo de mRNA e a atividade da glicogênio-sintase 1 estavam diminuídos nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas em comparação aos controles.

Nos que eram portadores de diabetes, a atividade da glicogênio-sintase estava diminuída com maior atividade da glicogênio-fosforilase “a” e “b”. Os autores concluem que a resistência à insulina associada ao adenocarcinoma de pâncreas se deve a defeitos pós-receptor que comprometem a síntese e armazenamento de glicogênio. Tal defeito pós-receptor foi posteriormente descrito por Isaksson et al.³⁷, que observaram alteração de sinalização pós-receptor de insulina, com diminuição da atividade da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3-K) e do transporte de glicose.

Em casos de diabetes que não dependem de insulina para o tratamento ou intolerância à glicose associados a adenocarcinoma de pâncreas, os níveis basais de insulina e peptídeo C estão geralmente normais ou elevados^{19,21}, porém, a secreção de insulina em resposta à hiperglicemia é tardia e diminuída¹⁹. As ilhotas pancreáticas intratumorais e aquelas presentes no tecido pancreático peri-tumoral apresentam menor número de células beta e maior número de células alfa quando comparadas às ilhotas distantes do tumor, o que presume-se seja causado por algum fator secretado pelo tumor³⁸.

A identificação de marcadores bioquímicos para tumores pancreáticos poderia permitir o rastreamento de adenocarcinoma de pâncreas em pacientes e em seus familiares. O rastreamento da população assintomática ainda é pouco realista, mas, em subpopulações com alto risco para tumor pancreático (tais como obesos, diabéticos, tabagistas), técnicas mais sensíveis de detecção permitiriam identificar o tumor, ou

também, lesões pré-neoplásias em uma fase em que o tratamento poderia ser mais eficaz, trazendo maiores benefícios para os pacientes.

A identificação de fatores diabetogênicos nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas poderia contribuir para a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no comprometimento da homeostase glicêmica, assim como para o diagnóstico precoce destes tumores na população diabética.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Caracterizar o perfil de homeostase glicêmica em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas em nosso meio;
- 2.2. Identificar fatores diabetogênicos cujos genes se expressam diferencialmente em tumores pancreáticos do tipo adenocarcinoma ductal, por meio da comparação dos perfis de expressão de adenocarcinoma ductal de pâncreas de pacientes portadores de diabetes melito em comparação com pacientes com tolerância normal à glicose.
- 2.3. Analisar a expressão de mRNA de genes possivelmente identificados em amostras de adenocarcinomas ductais de pâncreas obtidos por ablação cirúrgica, correlacionando-a com a tolerância à glicose.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Neste estudo prospectivo, observacional, estudaram-se 33 pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas atendidos pelas Equipes do Prof. Dr. José Eduardo M. Cunha, do Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas da 2ª Clínica Cirúrgica, e do Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado, do Serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado do HCFMUSP no período de abril de 2002 a dezembro de 2004.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do HCFMUSP e, de acordo com a regulamentação em vigor, os pacientes ou seus representantes legais assinaram termo de consentimento informado.

Estudaram-se preferencialmente, mas não obrigatoriamente, os pacientes que tinham maior probabilidade de ressecção do tumor de acordo com a avaliação clínica e radiológica, ou seja, pacientes que não tinham metástases em fígado ou à distância, e que tivessem condições pré-operatórias adequadas que permitissem o procedimento cirúrgico, visando obter material para análise.

Nove pacientes tinham diagnóstico prévio de diabetes melito. Em 13 dos 24 pacientes sem diagnóstico de diabetes realizou-se teste oral de tolerância à glicose. No teste evidenciaram-se três casos de diabetes, cinco casos de intolerância à glicose, e em cinco pacientes a tolerância à glicose foi normal (Anexo A).

Analisaram-se os dados clínicos e laboratoriais dos 33 pacientes estudados, mas somente 12 pacientes forneceram amostras de tumor de boa qualidade que puderam ser usadas nos estudos moleculares (Anexo B).

3.1.1. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes:

- Com doenças que cursam com resistência à insulina, por exemplo, hipercortisolismo, acromegalia;
- Com doenças graves coexistentes, por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência hepática ou renal descompensadas.

3.1.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

3.1.2.1 Realizaram-se as seguintes avaliações clínica e laboratorial dos pacientes: determinação quantitativa de glicemia plasmática, pelo método da glicose oxidase; insulina plasmática, por método radioimunológico específico (Linco Research, Inc., St. Charles, EUA); peptídeo C plasmático, por método radioimunológico (Diagnostic System Laboratories, Webster, EUA); hemoglobina glicada (HbA1c), pelo método enzaimunoensaio com micropartículas; bilirrubinas totais e frações, pelo método Jendrassik Groff; amilase, pelo método cinético-colorimétrico ultravioleta; e marcadores tumorais: CA 19-9,

por eletroquimioluminescência, e antígeno carcinoembrionário (CEA), por eletroquimioluminescência.

3.1.2.2 Em 13 pacientes também foi realizado teste de tolerância à glicose por via oral (GTTO), com determinação de glicemia e insulina plasmáticas antes e 30, 60, 90, 120 e 180 min após a ingestão de 75 g de glicose por via oral. O exame foi realizado após jejum de pelo menos 12 h, com paciente em repouso, e o sangue para exame foi colhido por punção em veia periférica antecubital. Foram usados os critérios diagnósticos da Associação Americana de Diabetes³⁹.

3.1.2.3 A sensibilidade à insulina nos pacientes foi avaliada pelo índice HOMA-IR de acordo com a equação (1)^{40,41}:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mmol/L)} \times \text{insulina (}\mu\text{U/mL)} / 22,5 \quad (1)$$

E a capacidade da célula beta de secretar insulina foi avaliada pelo índice HOMA-Beta de acordo com a equação (2)⁴¹:

$$\text{HOMA-Beta} = 20 \times \text{insulina (}\mu\text{U/mL)} / (\text{glicemia [mmol/L]} - 3,5) \quad (2)$$

3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

3.2.1 Processamento das amostras: Imediatamente após a exérese do tumor, as amostras de tecido foram armazenadas em tubos criogênicos de 2 mL sob condições estéreis, sendo uma amostra em tubo seco e outra em tubo contendo 1,0 mL do reagente TRIzol[®] (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, EUA), que contém fenol e isotiocianato de guanidina. Todo material colhido foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente mantido a – 80° C até sua utilização.

3.2.2. Extração e quantificação de RNA: As amostras mantidas em solução TRIzol[®] foram congeladas em nitrogênio líquido, pulverizadas no aparelho Mikro-Dismembrator U (B. BRAUN., Melsungen, Alemanha) e homogeneizadas em 1,0 mL de reagente TRIzol[®]. O homogeneizado foi transferido para um tubo tipo Eppendorf estéril de 1,5 mL tratado com dietilpirocarbonato de sódio (DEPC) para a realização da separação de fase. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 240 µL de clorofórmio e o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos. A suspensão foi mantida em incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida foi centrifugada a 4° C, 12.000 rpm, por 15 minutos. Da mistura separada em três fases, foi retirada a fase superior aquosa, a qual foi transferida para um novo tubo Eppendorf de 1,5 mL. À fase

aquosa foram adicionados 650 μ L de isopropanol e tubo foi agitado em vórtex. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos, e então foi centrifugada a 4° C, 12.000 rpm, por 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, o “pellet” de RNA foi lavado com 1,2 mL de etanol gelado a 75% com DEPC, e o tubo foi centrifugado a 4° C, 7.500 rpm, por 5 minutos. O “pellet” de RNA foi seco em ar ambiente e diluído em água estéril tratada com DEPC a 0,01%. A concentração do RNA de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro Hitachi U-2000 (Hitachi), pela absorbância das preparações a 260 nm, utilizando como valor padrão, 1 OD₂₆₀=40 μ g/mL de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação 260/280 nm, tendo sido utilizados os mRNAs cuja relação foi $\geq 1,7$. A qualidade do RNA foi avaliada também pela relação rRNA 18S/28S em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio. De 15 amostras tumorais, obteve-se RNA de boa qualidade em 12, as quais puderam ser utilizadas nos experimentos. As amostras foram então congeladas a -70° C até posterior utilização.

3.2.3 Identificação de genes diferencialmente expressos pelo sistema CodeLink Expression Bioarray®: Para identificação dos genes diferencialmente expressos foi utilizado um sistema de expressão gênica denominado CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray® (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Bio-Sciences, Piscataway, EUA). Este sistema permite a determinação semi-quantitativa do conteúdo

de RNA mensageiro (mRNA) de múltiplos genes simultaneamente. O sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray[®], compreende 19.881 oligonucleotídeos com 30 pares de bases, validados e baseados em diversos bancos de dados públicos como UniGene, RefSeq e Incyte's Life Seq Gold and Foundation, bem como 300 controles negativos, 108 controles positivos e 100 genes considerados "housekeeping". As principais classes de genes presentes nesse sistema estão demonstradas na tabela 1.

Cada um dos oligonucleotídeos é covalentemente fixado a uma matrix tridimensional de poliacrilamida por meio da sua extremidade 5' (Figura 1). O sistema é construído em pequenas câmaras (lâminas de vidro) que facilitam a hibridização com cRNAs (RNA complementar) marcados com biotina, produtos da transcrição "in vitro". O sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray[®] tem sensibilidade suficiente para detectar um único transcrito por célula⁴².

Foram utilizadas no sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray[®] amostras de mRNA de tumor de pâncreas de dois portadores de diabetes melito e de dois indivíduos com tolerância normal à glicose.

Tabela 1 - Distribuição das principais classes de genes presentes no sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray® de acordo com o processo biológico no qual estão envolvidos

Principais processos biológicos	Nº de Genes
Oncogenes	~1000
Ciclo celular	~1300
Sinalização célula-célula	~700
Transdutores de sinais	~1600
Metabolismo	~900
Desenvolvimento	~1400
Transcrição e tradução	~1000
Resposta inflamatória e imune	~800
Fosforilação de proteínas	~400
Apoptose	~400
Processamento de RNA	~300
Transportador de íons	~200

Figura 1. Esquematização da ligação das sondas de oligonucleotídeos à matriz de poliacrilamida nas lâminas do sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray®.

3.2.4 Purificação do RNA: Para purificação do RNA utilizado no sistema CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray®, foi utilizado o “kit” comercial RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, EUA), segundo instruções do fabricante, como se segue: Dez microgramas do RNA total foram misturadas com um volume apropriado de água destilada, tratada com inibidor de RNase (DEPC), para um volume final de 100 µL. Ao volume de 100 µL foram adicionados 350 µL do tampão RLT previamente preparado pela adição de β-mercaptoetanol. Em seguida foram adicionados 250 µL de etanol absoluto e misturados. Os 700 µL acima preparados foram colocados em uma mini-coluna RNeasy (Qiagen, Valencia, EUA) e centrifugados a 10.000 rpm por 15 segundos. A coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 µL do tampão RPE. A coluna foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores. Foi realizada uma nova lavagem com o tampão RPE e o RNA foi recuperado da coluna com 30 µL de água isenta de RNase, por centrifugação a 10.000 rpm por 1 minuto.

Em seguida, o volume das amostras foi reduzido em concentrador (Eppendorf concentrator 5301), para se obter a concentração final de 1 µg em 10 µL.

3.2.5 Preparação das amostras para síntese da primeira fita de cDNA: Para síntese da primeira fita de cDNA foram inicialmente preparadas amostras de controles bacterianos, que foram adicionadas posteriormente na reação da primeira fita:

Preparação da solução controle bacteriana *araB/entF*:

mRNA controle bacteriano <i>araB</i> a 0,1 µg/ µL	5 µL
mRNA controle bacteriano <i>ent F</i> a 0,1 µg/ µL	5 µL
Água isenta de RNase	40 µL
Volume total	50 µL

Preparação da solução controle estoque *fixB/gnd* com 33,33 ng/mL:

mRNA controle bacteriano <i>fixB</i> a 0,1 µg/µL	5 µL
mRNA controle bacteriano <i>gnd</i> a 0,1 µg/µL	5 µL
Água isenta de RNase	5 µL
Volume total	15 µL

Preparação da solução de mRNAs de controles bacterianos para concentração final de 1 ng/µL de *araB/entF*, 3,33 ng/µL de *fixB/gnd*, e 10,0 ng/µL de *hisB/leuB*.

Solução estoque <i>araB/entF</i> a 10 ng/µL	9 µL
Solução estoque <i>fixB/gnd</i> a 33,33 ng/µL	9 µL
mRNA controle bacteriano <i>hisB</i> a 0,1 µg/µL	9 µL
mRNA controle bacteriano <i>leuB</i> a 0,1 µg/µL	9 µL
Volume total	90 µL

Foi preparada também uma diluição dos mRNAs controles bacterianos para uma concentração final de 100 pg/µL de *araB/ent F*, 333 pg/µL *fix B/gnd*, e 1,0 ng/µL *hisB/leuB*:

araB/entF (1 ng/ μ L), fixB/gna (3,33 pg/ μ L) e hisB/leuB (10 ng/ μ L)	8 μ L
Água isenta de Rnase	72 μ L
Volume total	80 μ L

Preparo de uma solução de RNAs controle bacterianos para ser utilizada na preparação dos alvos:

araB/entF (10 pg/ μ L), fixB/gnd (333 pg/ μ L) e hisB/leuB (1,0 pg/ μ L)	5 μ L
Água isenta de Rnase	195 μ L
Volume total	200 μ L

3.2.6 Sínteses da 1ª fita de cDNA: Para síntese da 1ª fita de cDNA foi utilizado 1 μ g de cada um dos RNAs purificados acima, conforme descrito abaixo:

RNA total purificado	10 μ L
Controles bacterianos	1 μ L
Primer T7–(dT) ₂₄ a 0,5 pmol/ μ L	1 μ L
Água isenta de RNase q.s.p.	12 μ L
Volume total	24 μ L

As amostras foram incubadas a 70° C por 10 minutos em termociclador, e em seguida colocadas em gelo, onde foram adicionados os seguintes reagentes:

Tampão 5x <i>first strand</i>	2 μ L
Mistura de dNTPs 10 mM	4 μ L
Inibidor de Rnase	1 μ L
Transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen)	1 μ L
Água q.s.p.	20 μ L

A reação acima foi incubada em termociclador a 42° C por 1 hora.

3.2.7 Síntese da 2ª fita de cDNA: Para síntese da 2ª fita do cDNA foi utilizado o protocolo que se segue:

Primeira fita de cDNA	20 µL
Água	63 µL
Tampão da segunda fita 10x	10 µL
Mistura de dNTPs 5mM	4 µL
DNA polimerase	2 µL
RNase H	1 µL
Volume total	100 µL

A reação acima foi incubada por 2 horas a 16° C em termociclador

3.2.8 Purificação da fita dupla de DNA

A purificação da segunda fita de cDNA foi realizada utilizando-se o kit QIAquick (Qiagen, Valencia, EUA) o protocolo que se segue:

Inicialmente foram adicionados 500 µL de tampão PB ao cDNA preparado acima e misturado. Foi montada uma coluna fornecida pelo kit em um tubo de 2 mL. À coluna foi adicionada a reação acima (cDNA e tampão PB). A coluna foi centrifugada por 60 segundos a 10.000 rcf e o eluato foi descartado. Foram, então, adicionados 700 µL de tampão PE e a coluna foi novamente centrifugada a 10.000 rcf por 30 segundos. O eluato da coluna foi novamente desprezado e a coluna transferida para um novo tubo Eppendorf. Foram então adicionados 30 µL de tampão EB, e após incubação por 1 minuto a

temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 10.000 rcf durante 1 minuto. O eluato da coluna foi desidratado em um aparelho concentrador (Eppendorf 5301, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) até atingir o volume de 9,5 µL.

3.2.9 Síntese de cRNA – Transcrição *in vitro*: Para síntese do cRNA das amostras foi utilizado o “kit” CodeLink Expression Assay Reagent Manual Prep (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, EUA) de acordo com o protocolo com algumas modificações:

cDNA purificado e concentrado	9,5 µL
tampão da enzima T7 10x	4,0 µL
ATP 75 mM	4,0 µL
GTP 75 mM	4,0 µL
CTP 75 mM	4,0 µL
UTP 75 mM	3,0 µL
Biotina-11-UTP 10 mM	7,5 µL
Mistura da enzima T7	4,0 µL
Volume Total	40,0 µL

A mistura acima foi incubada a 37° C em forno de hibridização por 14 horas.

3.2.10 Recuperação do cRNA marcado com biotina: Para se obter a purificação dos cRNAs marcados foi utilizado o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, EUA). Inicialmente foram preparadas duas soluções tampão que foram utilizadas para purificação dos cRNAs.

Tampão RLT:

10 μ L de β -mercaptoetanol por mililitro de solução RLT

Tampão RPE: Preparado pela adição de etanol absoluto como recomendado pelo fabricante.

Foram adicionados 40 μ L de água estéril para cada amostra de cRNA. Em seguida foram adicionados 350 μ L de tampão RLT e 250 μ L de etanol absoluto. A amostra acima foi colocada em uma coluna “spin” RNeasy fornecida pelo fabricante e centrifugada a 8000 rcf por 15 segundos. A coluna foi transferida para outro tubo coletor e foram adicionados 500 μ L da solução tampão RPE. Após nova centrifugação a 8.000 rcf por 15 segundos, as colunas foram transferidas para um tubo Eppendorf, onde foram adicionados 100 μ L de água, procedendo-se, a seguir, a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. O cRNA foi, então, obtido por centrifugação a 8.000 rcf, e armazenado a -70° C até o momento do uso.

3.2.11 Fragmentação do cRNA: Após a recuperação do cRNA, o mesmo foi fragmentado para hibridização utilizando-se o “Kit” CodeLink Expression Assay Reagent Manual Prep (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, EUA). Para cada lâmina foram diluídos 10 μ g do cRNA em 20 μ L de água, em seguida foram adicionados 5 μ L do tampão de fragmentação, aquecido por 20 minutos a 94° C e resfriado em gelo por 5 minutos.

3.2.12 Preparação das misturas para reação de hibridização: Para cada lâmina processada, foi preparada uma mistura de hibridização em um tubo de microcentrífuga contendo 10 µg do cRNA fragmentado como segue:

Componente A do tampão de hibridização	78 µL
Componente B do tampão de hibridização	130 µL
Água	27 µL
cRNA fragmentado	25 µL
<hr/>	
Volume total	260 µL

A solução de hibridização acima foi incubada a 90° C por 5 minutos para desnaturar o cRNA.

3.2.13 Hibridização: Para cada lâmina (bioarray), foram pipetados 250 µL com auxílio de um pipetador de 1.000 µL. A ponteira foi posicionada sobre o orifício apropriado da lâmina e injetada à solução de hibridização lentamente, evitando bolhas no interior da câmara. Após o carregamento, as câmaras de hibridização foram seladas para prevenir evaporação. Em seguida as lâminas foram montadas em uma bandeja apropriada, colocadas em um agitador (Innova 4080 Shaking Incubator – New Brunswick Scientific, Edison, EUA) e mantidas a 37° C sob agitação a 300 rpm por 18 horas.

3.2.14 Processamento pós-hibridização: Para lavagem das lâminas após a hibridização, foram preparados os seguintes tampões:

TNT 1x (1 litro)

Tris HCl 1M pH 7,6	100 mL
NaCl 5M	30 mL
Tween 20	0,5 mL
Água destilada	870 mL
Volume Total	1000,5 mL

A solução acima foi filtrada em filtro de 0,2 μ M (Nalgene)

TNT 0,75x (500 mL)

Tris HCl 1M pH 7,6	37,5 mL
NaCl 5M	11,25 mL
Tween 20	0,19 mL
Água destilada	451,25 mL
Volume Total	500,19 mL

A solução acima foi filtrada em filtro de 0,2 μ M (Nalgene)

Tween 20 0,05%

Tween 20	250 μ L
Água destilada	499,75 μ L

SSC/Tween

SSC 20x	12,5 mL
Tween 20	150 μ L
Água destilada	237,35 mL

TNB (200 mL)

Tris HCl pH 7,6 1M	20 mL
NaCl 5M	6 mL
Água destilada	174 mL

A solução acima foi aquecida a 60° C para posterior adição do reagente bloqueador NEN (Perkin-Elmer PE, Boston, EUA) na concentração final de 0,5%.

3.2.15 Procedimento para lavagem dos microarranjos: Após o período de 18 horas, as lâminas foram removidas do agitador, e colocadas em um aparato de lâminas previamente preenchido com 13 mL de tampão TNT 0,75x filtrado e incubadas a 46° C por 1 hora. Após o período de uma hora, o aparato contendo as lâminas foi removido e colocado em outro reservatório contendo 3,4 mL de CY5–estreptavidina (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, EUA), incubados por 30 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. A seguir, as lâminas foram lavadas por 5 minutos seqüencialmente em quatro aparatos contendo 240 mL de tampão TNT 1x. Após a quarta lavagem, as lâminas foram colocadas em outro recipiente contendo 240 mL de 0,05% Tween/SSC por 30 segundos. Em seguida as lâminas foram secas por centrifugação a 2.000 rpm por 3 minutos em centrífuga Sigma 4-15C (No. 81010) Qiagen, usando um rotor apropriado (Swinging bucket rotor).

3.2.16 Leitura das lâminas de microarranjos: A leitura das lâminas foi realizada em Scanner Axon GenePix 4000B a 635 nM, voltagem de 600 V e resolução 10 µm, com auxílio do programa Expression Analysis Software (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, EUA).

3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE POR TRANSCRIÇÃO REVERSA QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real ou PCR quantitativa (RT-qPCR) consiste na aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase. Utilizam-se reagentes fluorescentes para identificar o sinal, e o resultado obtido na fase exponencial da reação é extrapolado, de modo a obter a quantidade inicial de amostra.

As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Austrália), utilizando-se o “kit” comercial Quantitect[®] Sybr Green RT-PCR for quantitative, real-time, one-step RT-PCR (Cat No. 204243 – Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme recomendação do fabricante com algumas modificações:

<i>2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix</i>	10,0 µL
<i>Primer A (10 pMol/µL)</i>	1,0 µL
<i>Primer B (10 pMol/µL)</i>	1,0 µL
<i>QuantiTect RT Mix</i>	0,2 µL
Água estéril q.s.p.	20,0 µL
RNA (20 ng/ µL)	4,0 µL
Volume Total	20,0 µL

Os amplímeros utilizados nas reações de RT-qPCR encontram-se na Tabela 2, e foram obtidos com o auxílio do programa Primer 3⁴³.

Tabela 2 - Amplímeros selecionados para o estudo dos genes FAM3D, NPY, S100A8 e GAPDH

Gene	Sigla	Amplímero 5' → 3'	Amplímero 3' → 5'
NM_138805	FAM3D	GGGACAGCTGGGTCTTCATA	CCGGGCTCTGACTCCTAAGT
NM_000905	NPY	CCAGCCCAGAGACACTGATT	CTGCATGCATTGGTAGGATG
NM_002964	S100A8	ATGTCTCTTGTCAGCTGTCTTTCA	TCCCTGTAGACGGCATGG
BC_025925	GAPDH	GCCAAAAGGGTCATCATCTC	GCAGGGATGATGTTCTGGAG

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de C_T (*threshold cycle*) ou limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectada⁴⁴.

A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada a fim de se evitar amplificação inespecífica. Em cada reação, foi utilizado um controle interno (GAPDH), para controle da quantidade e da qualidade do RNA. Foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene controle interno para poder-se utilizar o método descrito por Pfaffl⁴⁵. Para tanto, foram feitas duas curvas para cada um dos genes estudados, com diluições seriadas do RNA total, para o gene alvo bem como do RNA para o gene GAPDH, partindo de 125 ng/μL de RNA total. Cada diluição seriada (125 ng/μL, 12,5 ng/μL, 1,25 ng/μL, 0,125 ng/μL e 0,0125 ng/μL) foi posteriormente amplificada por RT-qPCR (Figuras 2 e 3).

A

B

Figura 2. Curvas de eficiência do gene FAM3D (A) e do gene controle GAPDH (B).

A

B

Figura 3. Curvas de eficiência do gene NPY (A) e do gene controle GAPDH (B).

Os tecidos usados como referência para as reações de RT-qPCR foram: placenta, para o gene FAM3D; próstata, para o NPY; e leucócitos periféricos, para o S100A8.

Todas as reações de RT-qPCR foram feitas em duplicatas tanto para o gene alvo quanto para o controle interno. Observou-se para que todos amplímeros fossem sintetizados em diferentes éxons, para se evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico.

Para o gene FAM3D, a transcrição reversa foi realizada a 50° C por 30 minutos, seguida por 15 minutos a 95° C. Durante esse tempo, a transcriptase reversa é destruída e a DNA polimerase é ativada. Quarenta ciclos de PCR (20 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C, 30 segundos a 72° C) foram corridos no aparelho Rotor Gene na presença de SYBR Green. A análise dos dados foi realizada no ciclo de 72° C.

Para o gene NPY, a transcrição reversa foi realizada a 50° C por 30 minutos, seguida por 15 minutos a 95° C. Quarenta ciclos de PCR (20 segundos a 95° C, 30 segundos a 55° C, 30 segundos a 72° C) foram corridos no aparelho Rotor Gene na presença de SYBR Green.

Para o gene S100A8, a transcrição reversa foi realizada a 50° C por 30 minutos, seguida por 15 minutos a 95° C. Quarenta ciclos de PCR (20 segundos a 95° C, 30 segundos a 57° C, 30 segundos a 72° C) foram corridos no aparelho Rotor Gene na presença de SYBR Green.

A expressão dos genes foi calculada através da equação (3):

$$\text{Expressão (ou relação)} = \frac{(E \text{ alvo})^{\Delta CP \text{ alvo (controle - amostra)}}}{(E \text{ referência})^{\Delta CP \text{ referência (controle - amostra)}}} \quad (3)$$

descrita por Pfaffl⁴⁵, onde E=eficiência na curva, CP=CT obtido no experimento.

Observou-se, também, a especificidade da reação de RT-qPCR realizando-se a análise da curva de “melting”. Se a reação for específica para os produtos de PCR analisados, a curva mostrará um único pico a uma determinada temperatura com todas as amostras. Foram realizadas curvas de melting, uma para cada gene (FAM3D, NPY, S100A8 e GAPDH) (Figuras 4 e 5).

Nas curvas de melting para os genes analisados, observou-se um pico em uma temperatura diferente das demais (Figuras 4 e 5). Esse pico refere-se ao controle negativo com a provável formação de dímeros de amplicómeros, ou as amostras que continham mRNA degradado. Para que se pudesse analisar a possibilidade de amplificação inespecífica, separaram-se os produtos do RT-qPCR em tempo real de algumas amostras em um gel de TAE-agarose a 1%. Não foi observada amplificação inespecífica nos produtos de PCR analisados (Figuras 6 e 7).

A

B

Figura 4. Curvas de *melting* do gene FAM3D: 1ª Reação (A), 2ª Reação (B).

Figura 5. Curvas de *melting* do gene NPY: 1ª Reação (A), 2ª Reação (B).

A

B

Figura 6. Eletroforese em gel de TAE agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos na RT-qPCR para FAM3D e GAPDH em amostras de adenocarcinoma de pâncreas: (A) 1-4: DM; 5-7: IGT ; (B) 8-12: NGT; P: placenta; CN: controle negativo.

A

B

Figura 7. Eletroforese em gel de TAE agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos na RT-qPCR para NPY e GAPDH em amostras de adenocarcinoma de pâncreas: (A) 1-4: DM; 5-7: IGT ; (B) 8-12: NGT; P: próstata.

3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL CONTRA PEPTÍDEO DERIVADO DO FAM3D

A partir da sequência de aminoácidos da proteína FAM3D (NP_620160), obtida no site BLASTp, foi selecionada a sequência FIGAKDLRGKSPFE entre as sequências de peptídeos com maior antigenicidade para imunização de coelho. Esta sequência corresponde aos aminoácidos 181 a 194 da proteína FAM3D, e tem peso molecular de 1710 daltons.

Procedeu-se então à síntese do peptídeo escolhido, a qual foi realizada pela empresa New England Peptide, Inc. (Gardner, EUA). O antígeno escolhido foi levemente modificado para maximizar a resposta imune e a especificidade. Um resíduo de cisteína foi acoplado a porção amino-terminal do peptídeo para garantir o acoplamento a outra proteína, se necessário, e para permitir a adesão do peptídeo a uma coluna de afinidade para purificação. O bloqueio tanto da porção amino-terminal quanto da porção carboxi-terminal do peptídeo permite que o mesmo mimetize a proteína *in vivo*. A sequência modificada do peptídeo foi Ac-CFIGAKDLRGKSPFE-amida. Após a síntese, o peptídeo foi purificado a pelo menos 85%, e foi realizada confirmação do peso molecular por espectrometria de massa e de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Procedeu-se então, pela empresa New England Peptide, Inc. (Gardner, EUA) à imunização de dois coelhos, utilizando o peptídeo sintetizado, da seguinte forma:

Dos 10 mg de peptídeo (antígeno) produzidos, 4 mg foram acoplados a KLH para imunização, usando ésteres MBS.

Dia 0 – Pré-sangramento, 5 mL – Imunização 1 (CFA)

Dia 14 – Imunização 2 (IFA)

Dia 28 – Imunização 3 (IFA)

Dia 35 – Sangramento 1 para produção de anticorpos (40 a 50 mL)

Dia 42 – Sangramento 2 para produção de anticorpos (40 a 50 mL).

Após a realização dos sangramentos, o anti-soro foi testado para reatividade dos anticorpos com o peptídeo usando um ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*). O peptídeo foi aderido a uma placa de 96 poços. Em seguida foi realizada a diluição do antisoro contendo o anticorpo. Assim foi medida a quantidade de anticorpo na amostra, ou título.

Os títulos obtidos foram os seguintes:

No Sangramento 1 (35 dias) o título foi de 508.000.

No Sangramento 2 (42 dias) o título foi de 748.800.

Todos os soros obtidos (pré-sangramento, do 1º sangramento, e do 2º sangramento) foram liofilizados, e juntamente com 5,8 mg do peptídeo foram enviados para realização dos estudos de imunohistoquímica e de “western-blot”.

3.5 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA O FAM3D

A análise imunohistoquímica utilizada na pesquisa do FAM3D nos diversos tecidos foi realizada por método de imunoperoxidase.

Cortes histológicos de 3 mm de espessura foram sobrepostos em lâminas sialinizadas [3-Aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)] e seguiu-se o protocolo descrito a seguir.

3.5.1 Desparafinação

O conjunto de lâminas sialinizadas contendo os cortes dos diversos tecidos foi colocado em suporte adequado, posteriormente imerso em xilol e aquecido a 60 ° C em estufa por 30 minutos. Após as lâminas receberam banho de xilol frio por, aproximadamente, 10 minutos.

3.5.2 Hidratação

Após a fase de desparafinação, as lâminas foram hidratadas em banhos de álcool, primeiro em álcool absoluto, duas vezes, depois em álcool a 95°, duas vezes, e em álcool a 75°, uma vez. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente abundante, seguindo-se lavagem com água deionizada.

Após a fase de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 6%, 20 volumes, com cinco banhos de cinco minutos cada.

3.5.3 Recuperação Antigênica

Foi realizado pré-tratamento para recuperação antigênica através de alta temperatura, recuperação à quente, em panela de pressão, em solução de ácido cítrico 0,01 M, pH 6,0 por 3,5 minutos. Após este período, as lâminas imersas nesta solução foram lavadas em água corrente e em água deionizada, e em tampão PBS por três vezes.

3.5.4 Incubação com o Anticorpo Primário (FAM3D)

O anticorpo primário policlonal FAM3D obtido de coelhos, título 508.000, foi diluído em solução de albumina a 1% e em PBS na proporção 1:1000, foi aplicado sobre os cortes em câmara úmida, e as lâminas foram incubadas a 37° C por 1 hora.

As lâminas foram então lavadas em PBS e incubadas com Envision (Dako Corp.). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas por três vezes em tampão PBS e reveladas com substrato cromogênico, diaminobenzidina a 60 mg/dL em PBS + 1,5 mL de água oxigenada a 20 volumes, (Sigma Chemical Co.) de 3 a 5 minutos a 37° C.

As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e em água deionizada, e foram contra-coradas com Hematoxilina de Harrys (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 segundos. Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente e em água deionizada, sendo então desidratadas em álcool 75°, em álcool a 95° por duas vezes, em álcool absoluto por duas vezes, e em xilol por três vezes. As lâminas foram então montadas com resina Entellan (Merck) para microscopia.

A positividade para o anticorpo FAM3D foi avaliada de forma qualitativa, descrevendo-se o padrão de positividade, se difuso ou granular, e a localização da marcação, se nuclear ou citoplasmático.

A supervisão dos procedimentos executados e a análise dos resultados foram realizadas por médico especialista do Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos perfis de expressão gênica das amostras dos tumores dos dois pacientes com diabetes melito e dos dois pacientes com tolerância normal à glicose foi realizada pelo método não paramétrico de Spearman para amostras pareadas, comparando-se as médias dos valores de expressão obtidos por densitometria óptica de cada um dos 19.981 genes que compuseram os respectivos painéis de expressão.

Para análise estatística inicialmente foi utilizado o quantil-quantil (q-q plot) para uma melhor distribuição dos valores. Isto se deve ao fato de que

tanto a média quanto o desvio-padrão podem não ser medidas adequadas para representar um conjunto de dados, pois são afetados de forma exagerada por valores extremos; apenas com estes dois valores não temos idéia da simetria ou assimetria da distribuição dos dados. Assim dados assimétricos são mais bem representados utilizando-se o quartil. Quartil é o valor da variável que ocupa 0,5. Esse valor divide a área de uma distribuição de freqüências em múltiplos inteiros de um quarto de área total. Assim o valor que é chamado de quartil 1 (Q1) divide a distribuição em 25%, 75%, isto é 25% dos valores ficam a esquerda do Q1 e 75% à direita. Quartil 2 (Q2) coincide com a mediana 50% dos valores à esquerda e 50% à direita. Neste estudo foi utilizado o gráfico quantil-quantil ou q-q plot para fazermos a distribuição e centralização dos dados. O cálculo dos quantis (valor Q) foi obtido pela classificação em escores dos valores de DO, subtraídos de 0,5 e divididos pelo total de valores de DO dos genes de cada um dos dois painéis⁴⁶ (Storey & Tishibani, 2003). A média dos valores Q calculada para os genes do painel dos tumores dos pacientes com diabetes melito (Q_DM) foi subtraída da média dos valores Q para os genes do painel dos tumores dos pacientes com tolerância normal à glicose (Q_NGT). A interpolação entre os valores observados de Q_DM-Q_NGT e os quantis esperados permitiu a identificação de genes cujas diferenças de expressão afastavam-se do ajuste à distribuição normal.

Grupamento Hierárquico: Para melhor identificar as relações existentes entre as amostras estudadas, utilizou-se a técnica de análise multivariada, com aplicação do método de reconhecimento de padrões

Agrupamento Hierárquico ou análise de Clusters (método de Ward), utilizando o programa JMP 5.1.1 (SAS institute Inc., Cary, EUA). O agrupamento hierárquico procura classificar num mesmo subgrupo as amostras ou elementos semelhantes por grau de similaridade, que resulta em um gráfico denominado dendograma. O subconjunto inicial foi constituído pelos valores Q_DM e Q_NGT de cada um dos genes e, calculando-se a distância entre cada subconjunto, combina-se os dois subconjuntos mais próximos. O processo combinatório continua até que todos os pontos fiquem reunidos em um único grupamento final. Determinando-se o número de subconjuntos de genes, compõe-se uma árvore (dendograma) cujas extremidades correspondem aos genes individuais, o grupamento final único ao tronco e as combinações dos subconjuntos intermediários aos ramos. Os subconjuntos de genes com expressões similares em cada uma das condições (tumores de pacientes com diabetes melito versus tumores de pacientes com tolerância normal à glicose) foram arranjados visando maximizar a similaridade na expressão dos genes de um mesmo subconjunto e minimizar a similaridade na expressão entre subconjuntos distintos de genes.

Todos os testes estatísticos foram bicaudais, com significância estatística fixada em 0,05. Utilizou-se o teste exato de Fisher para comparação de variáveis categóricas entre os portadores de diabetes melito e os não-diabéticos. As variáveis contínuas foram analisadas usando testes não-paramétricos (Mann-Whitney). Os valores foram expressos em mediana, valores mínimo e máximo. Os dados foram compilados em

planilhas de cálculo (Microsoft® Excel 2003) e analisados utilizando-se o programa JMP 5.1.1

4. RESULTADOS

De abril de 2002 a dezembro de 2004 foram estudados 54 pacientes com suspeita clínica de adenocarcinoma de pâncreas. Em 33 casos houve confirmação do diagnóstico de adenocarcinoma ductal de pâncreas. Em 14 casos, nos quais o tumor foi retirado, o diagnóstico foi confirmado pelo exame histopatológico da peça cirúrgica; em 12 por exame histopatológico de biópsia de fígado, linfonodo ou do próprio tumor; em 5 o diagnóstico foi confirmado por exame citopatológico de material obtido por punção aspirativa com agulha fina guiada por ultra-sonografia endoscópica; e em 2 casos pelos achados cirúrgicos.

Quanto à tolerância à glicose, 9 dos 33 pacientes com adenocarcinoma de pâncreas tinham diagnóstico prévio de diabetes melito por ocasião do diagnóstico do tumor. Dos 24 pacientes restantes, 13 foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose, dos quais: 3 tiveram diagnóstico de diabetes melito, em 5 foi diagnosticado intolerância à glicose, e em 5 a tolerância à glicose foi normal (Anexo A). Nos 11 pacientes restantes, a glicemia de jejum era menor do que 126 mg/dL.

A tabela 3 apresenta as características clínicas e laboratoriais dos 33 pacientes.

4.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU NÃO DE DIABETES MELITO

A mediana do tempo de diagnóstico de diabetes melito foi 6 (0-144) meses. Os pacientes com diabetes tinham IMC significativamente menor e apresentaram maior perda ponderal do que os indivíduos que não tinham diagnóstico de diabetes (Tabela 4). Quando, entretanto, se excluem os pacientes com intolerância à glicose do grupo de pacientes não-diabéticos, a diferença de IMC entre os diabéticos e não-diabéticos desaparece, mas persiste a diferença de perda ponderal.

O índice HOMA-IR dos pacientes com diabetes foi estatisticamente maior quando comparada com o dos indivíduos não-diabéticos (Figura 8). A secreção de insulina calculada pelo índice HOMA-beta não diferiu de forma significativa entre os grupos (Figura 9).

Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais dos 33 portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas

	Valor referência	Total
n		33
Idade (anos)		57 (37-79)
Sexo (M/F)		18/15
IMC (kg/m ²) (n=27)	18,5-24,9 kg/m ²	22,8 (14,7-36,9)
Cintura (cm) (n=14)	<80 cm (F)	86 (68-110) (F)
	<88 cm (M)	89 (75-105) (M)
Quadril (cm) (n=14)		92 (79-118)
Relação cintura-quadril (n=14)	<0,80 (F)	0,92 (0,82-1,03) (F)
	<0,92 (M)	1,01 (0,89-1,10) (M)
Portadores de Diabetes Melito (%)		36%
Duração do Diabetes Melito (meses)		6 (0-144)
Percentual de perda de peso (n=24)		14% (4,8-29,4%)
Historia familiar de diabetes (n=26)		62%
Tumor localizado na cabeça do pâncreas (n=28)		86%
Ressecção do tumor (n=33)		45,5%
Bilirrubina direta (mg/dL) (n=29)	< 0,4	5,6 (0,1-29,7)
Bilirrubina indireta (mg/dL) (n=29)	0,1-0,6	0,7 (0,1-6,4)
Peptídeo C jejum (ng/mL) (n=20)	0,36-3,56	2,5 (0,7-6,4)
HOMA-IR (n=20)		4,1 (0,8-26,3)
HOMA-Beta (%) (n=20)		145 (7-415)
Hb glicada (%) (n=18)	4,1-6,5%	6,3 (3,9-9,9)
CA 19-9 (U/mL) (n=27)	< 37	309 (0,6-28407)
CEA (ng/mL) (n=24)	< 5,0	5,2 (0,7-113,1)
Amilase (U/mL) (n=27)	< 100	58 (13-244)

Resultados expressos em mediana (variação).

F: Sexo feminino; M: Sexo masculino

Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose

	Não-diabéticos*	Diabetes Melito	
	N=21	N=12	p
Idade (anos)	55 (42-79)	62 (37-72)	NS
Sexo (M/F)	13/8	5/7	NS
IMC (kg/m ²)	27,1 (15,5-36,9)	21,5 (14,7-31,6)	<0,05
Cintura (cm)	95 (75-110)	85 (68-106)	NS
Quadril (cm)	94 (79-118)	88 (79-103)	NS
Relação cintura-quadril	0,95 (0,82-1,10)	0,93 (0,86-1,03)	NS
Percentual de perda de peso	11% (5-23%)	19% (10-29%)	<0,05
História familiar de diabetes	56%	70%	NS
História de tabagismo	80%	55%	NS
História de etilismo	56%	36%	NS
HAS (%)	50%	42%	NS
Tumor na cabeça do pâncreas	90%	89%	NS
Ressecção do tumor	48%	33%	NS
Bilirrubina direta (mg/dL)	6,3 (0,2-29,7)	2,3 (0,1-22,0)	NS
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,1 (0,1-6,4)	0,5 (0,1-3,1)	NS
Insulina jejum (μU/mL)	13,1 (3,4-28,0)	15,0 (4,9-52,4)	NS
Peptídeo C jejum (ng/mL)	2,2 (0,7-4,7)	2,9 (1,0-6,4)	NS
HOMA-IR	2,8 (0,8-7,0)	5,9 (2,2-26,3)	<0,05
HOMA-Beta (%)	172 (45-415)	66 (7-379)	NS
HbA1c (%)	6,2 (4,6-7,4)	6,5 (3,9-9,9)	NS
CA 19-9 (U/mL)	296 (0,6-15951)	969 (0,6-28407)	NS
CEA (ng/mL)	5,2 (0,7-113,1)	7,7 (2,2-13,1)	NS
Amilase (U/mL)	57 (13-244)	59 (29-95)	NS

* Inclui 10 pacientes submetidos a GTTO que mostrou 5 com intolerância à glicose e 5 com tolerância normal à glicose, e inclui também 11 pacientes com glicemia de jejum <126 mg/dL que não foram submetidos a GTTO. Resultados expressos em mediana (variação).

Figura 8. Índice HOMA-IR dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito.

Figura 9. Índice HOMA-Beta dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NGT: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito.

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EVIDENCIADA POR MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE TUMORES DE PACIENTES COM DIABETES MELITO COMPARADOS COM PACIENTES NORMOTOLERANTES À SOBRECARGA DE GLICOSE PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS

Neste estudo foram comparadas duas situações distintas em portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas: portadores de diabetes melito, e indivíduos com tolerância normal à glicose de acordo com o GTTO. Os RNAs das condições acima descritas foram hibridizados separadamente em sistemas de expressão gênica CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray® (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). A Figura 10 mostra a interpolação da intensidade dos sinais nas duas condições analisadas.

Considerando a expressão ajustada para os controles internos dos microarranjos CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray® (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), 293 genes estavam pelo menos duas vezes mais expressos na lâmina dos portadores de diabetes do que na lâmina dos normotolerantes à glicose; destes, 25 genes estavam pelo menos cinco vezes mais expressos (Tabela 5). Duzentos e noventa e sete genes estavam pelo menos duas vezes mais expressos na lâmina dos pacientes normotolerantes à glicose do que na dos portadores de diabetes, dos quais 54 genes estavam pelo menos cinco vezes mais expressos (Tabela 6).

Figura 10. Relação entre as intensidade das expressões de mRNA dos genes analisados pelo microarranjos observadas nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes melito comparados com pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com tolerância normal à glicose. As áreas em vermelho representam os valores de intensidade dos genes diferencialmente expressos. A seta indica a expressão mRNA do gene FAM3D que é maior nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes melito.

Tabela 5 - Genes expressos mais de cinco vezes na lâmina dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas portadores de diabetes melito comparados aos pacientes com tolerância normal à glicose

NCBI	UNIGENE	SÍMBOLO	DESCRIÇÃO	DM	NGTD	EXPRESSÃO
NM_052863	Hs.62492	SCGB3A1	Secretoglobin, family 3A, member 1	75,24	1,17	64,22
NM_002125	Hs.308026	HLA-DRB5	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	173,37	4,90	35,40
NM_000669	Hs.2523	ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	22,55	1,05	21,40
NM_003226	Hs.352107	TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)	84,24	5,57	15,12
NM_001852	Hs.37165	COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2	16,34	1,21	13,55
NM_005423	Hs.2979	TFF2	Trefoil factor 2 (spasmodic protein 1)	65,89	5,22	12,61
NM_138805	Hs.61265	FAM3D	Family with sequence similarity 3, member D	22,55	1,92	11,75
NM_000558	Hs.347939	HBA1	Hemoglobin, alpha 1	88,98	8,30	10,72
NM_000517	Hs.347939	HBA2	Hemoglobin, alpha 2	88,98	8,30	10,72
NM_030943	Hs.236720	AMN	Amnionless protein	13,22	1,43	9,27
NM_003890	Hs.111732	FCGBP	IgG Fc binding protein	224,85	28,62	7,86
U57645	NULL	ID1	Human helix-loop-helix proteins Id-1 and Id-1' genes, complete cds	7,56	1,03	7,30
NM_000955	Hs.159360	PTGER1	Prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42 Kd	8,22	1,15	7,14
NM_018140	Hs.100824	FLJ10565	Hypothetical protein FLJ10565	13,24	1,92	6,90
NM_025079	Hs.288300	FLJ23231	Hypothetical protein FLJ23231	30,75	5,04	6,10
NM_000035	Hs.234234	ALDOB	Aldolase B, fructose-bisphosphate	96,77	15,86	6,10
NM_025206	Hs.72222	FER1L4	Fer-1-like 4 (C. elegans)	41,59	7,09	5,86
NM_022350	Hs.280380	LOC64167	Aminopeptidase	19,17	3,29	5,82
AW369811	Hs.20726	NULL	IL0-BT0168-091199-139-e05 cDNA	16,84	2,91	5,79
NM_024703	Hs.91753	FLJ22593	Hypothetical protein FLJ22593	12,26	2,14	5,72
NM_018406	Hs.198267	MUC4	Mucin 4, tracheobronchial, transcript variant 1	10,40	1,85	5,62
NM_000905	Hs.1832	NPY	Neuropeptide Y	7,25	1,32	5,48
NM_003528	Hs.2178	H2BFQ	H2B histone family, member Q	41,80	7,77	5,38
NM_024997	Hs.391763	FLJ12668	Hypothetical protein FLJ12668	7,63	1,45	5,26
BC001653	Hs.321130	MLPH	Clone MGC:2771 IMAGE:2958853, complete cds	11,13	2,21	5,05
NM_002639	Hs.55279	SERPINF5	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	7,07	1,41	5,01

DM=Diabetes Melito; NGT=Normotolerantes à sobrecarga de glicose (não-diabéticos).

Tabela 6 - Genes expressos mais de cinco vezes na lâmina dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas com tolerância normal à glicose comparados aos pacientes portadores de diabetes melito

NCBI	UNIGENE	SÍMBOLO	DESCRIÇÃO	DM	NGT	EXPRESSÃO
Hs.144699	NM_080385	CPA5	Carboxypeptidase A5	0,79	916,02	1159,71
Hs.4158	NM_006507	REG1B	Regenerating islet-derived 1 beta (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein)	0,83	416,17	502,88
Hs.74502	NM_001906	CTRB1	Chymotrypsinogen B1	1,43	716,20	499,29
Hs.221040	NM_006620	HBS1L	HBS1-like (S. cerevisiae)	2,74	611,63	223,3
Hs.156114	NM_080792	BIT	Brain-immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs	1,48	60,64	40,89
Hs.40499	NM_012242	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	1,21	32,62	26,99
Hs.279902	NM_004270	CRSP9	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 9 (33kD)	6,97	186,78	26,78
Hs.335493	NM_020978	AMY2B	Amylase, alpha 2B; pancreatic	3,72	91,44	24,55
Hs.53985	NM_001502	GP2	Glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	9,77	238,60	24,42
Hs.79361	NM_002774	KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	1,37	27,44	20,09
Hs.155313	AB002331	DATF1	Human mRNA for KIAA0333 gene, partial cds	2,81	54,38	19,38
Hs.76177	NM_001633	AMBP	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	1,48	21,68	14,69
Hs.74502	BM918622	NULL	AGENCOURT_6635257 cDNA, 5' end	0,81	11,26	13,86
Hs.2210	AL133017	NULL	cDNA DKFZp434E0727	2,98	38,37	12,88
Hs.283761	BC007395	NULL	Clone IMAGE:3834239, partial cd	1,36	16,81	12,39
Hs.20575	BE891602	NULL	601435290F1 cDNA, 5' end	1,77	20,84	11,76
Hs.1282	NM_000065	C6	Complement component 6	1,17	13,21	11,31
Hs.66581	NM_006849	PDIP	Protein disulfide isomerase, pancreatic	5,73	61,70	10,77
Hs.170808	NM_000818	GAD2	Glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65 kD)	1,22	11,41	9,34
Hs.93909	NM_001297	CNGB1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	1,38	12,8	9,31
Hs.105924	NM_004942	DEFB2	Defensin, beta 2	3,86	34,9	9,04
Hs.89832	NM_000207	INS	Insulin	97,39	879,96	9,04
NULL	AF060515	NULL	Cyclin K (CPR4) mRNA, complete cds	1,30	11,06	8,48
Hs.76353	NM_000624	SERPINA5	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5	2,13	17,53	8,24
Hs.79886	BC015529	NULL	Similar to ribose 5-phosphate isomerase A, clone MGC:9441 IMAGE:3904718, complete cds	0,79	6,49	8,22
Hs.136348	NM_006475	OSF-2	Osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	3,99	32,61	8,17
Hs.295944	NM_006528	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	0,96	7,66	7,95
Hs.83393	NM_001323	CST6	Cystatin E/M	1,37	10,89	7,95
Hs.169206	NM_006370	VTI2	Vesicle-associated soluble NSF attachment protein	17,67	139,69	7,91

			receptor (v-SNARE; homolog of <i>S. cerevisiae</i> VT11)			
Hs.75774	NM_003248	THBS4	Thrombospondin 4	5,42	40,66	7,51
Hs.76780	NM_006741	PPP1R1A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	1,00	7,30	7,27
Hs.270833	NM_001657	AREG	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	1,39	10,02	7,22
Hs.1460	NM_002054	GCG	Glucagon	4,56	32,78	7,18
Hs.76353	BC008915	NULL	Clone MGC:16086 IMAGE:3618167, complete cds	2,73	19,47	7,12
Hs.110	AB007896	KIAA0436	KIAA0436 mRNA, partial cds	0,80	5,67	7,1
Hs.77091	NM_006730	DNASE1L1	Deoxyribonuclease I-like 1	6,10	42,03	6,89
Hs.333383	NM_003665	FCN3	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 3 (Hakata antigen)	0,82	5,57	6,82
NULL	BE895761	NULL	Human red cell anion exchanger (EPB3, AE1, Band 3) gene, 3' region.	1,05	7,14	6,81
Hs.36563	AK026071	FLJ22418	cDNA FLJ22418 fis, clone HRC08590	0,78	5,13	6,54
Hs.82037	NM_005644	TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20 kD	5,32	34,79	6,54
Hs.663	NM_000492	CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette (sub-family C, member 7)	1,46	9,50	6,50
Hs.7041	NM_024312	MGC4170	MGC4170 protein	1,12	7,15	6,39
Hs.151544	NM_002351	SH2D1A	SH2 domain protein 1A, Duncan's disease (lymphoproliferative syndrome)	1,09	6,95	6,35
Hs.19520	NM_021603	FXSD2	FXSD domain-containing ion transport regulator 2 (FXSD2), transcript variant b	7,42	44,76	6,04
Hs.2265	NM_003020	SGNE1	Secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein)	1,41	8,53	6,03
Hs.423	NM_002580	PAP	Pancreatitis-associated protein (PAP), transcript variant 1	47,15	278,49	5,91
Hs.116428	NM_006998	SECRET	Secretagogin	1,68	9,77	5,81
Hs.313	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	5,82	32,91	5,65
Hs.2733	NM_002145	HOXB2	Homeo box B2	4,64	25,17	5,42
Hs.194366	NM_000371	TTR	Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)	5,62	30,40	5,41
Hs.334370	NM_018476	BEX1	Brain expressed, X-linked 1	1,88	10,03	5,34
Hs.1211	NM_001611	ACP5	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	0,78	4,08	5,22
Hs.94360	NM_002450	MT1L	Metallothionein 1L	22,19	114,5	5,16
Hs.284171	AB040968	KIAA1535	mRNA for KIAA1535 protein, partial cds	2,22	11,17	5,02

As Figuras 11 e 11 representam a distribuição dos 20 subconjuntos de genes diferencialmente expressos no pool de tumores dos diabéticos e no pool de tumores de normotolerantes. Observou-se maior expressão no pool dos diabéticos nos subconjunto 3, 4, 6, 8, 11, 14, 15, 17 e 19 e maior expressão no pool dos normotolerantes nos subconjuntos 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 16, 18 e 20. Os genes desses 20 subconjuntos estão relacionados no anexo C.

O subgrupo 11 compreendeu três dos genes diferencialmente expressos, quais sejam FAM3D, NPY e S100A8.

Figura 11. Grupamento hierárquico de genes diferencialmente expressos no “pool” de tumores dos portadores de diabetes melito e no “pool” de tumores de indivíduos normotolerantes à glicose. DM: Diabetes melito; ND: Não-diabéticos

Figura 12. Distribuição dos subconjuntos de genes diferencialmente expressos no “pool” de tumores dos portadores de diabetes melito e no “pool” de tumores de indivíduos normotolerantes à glicose. DM=Diabetes melito; ND=Não-diabéticos.

4.3 EXPRESSÃO DE mRNA DOS GENES FAM3D, NPY E S100A8 POR RT-qPCR.

Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos nos microarranjos, foram selecionados os genes do FAM3D, do inglês *Famliy with Sequence Similarity number 3*, do neuropeptídeo Y (NPY) e da proteína de ligação do cálcio S100A8 para serem investigados em uma série de 12 adenocarcinomas pancreáticos de pacientes com graus variados de tolerância à glicose (Anexo B). O critério de escolha destes genes foi a maior expressão na lâmina sondada com RNA do “pool” dos diabéticos em relação ao “pool” dos normotolerantes, e a participação desses genes em processos que interferem com a homeostase glicêmica⁴⁷⁻⁵¹. O FAM3D estava 11,75 vezes mais expresso na lâmina dos pacientes portadores de diabetes melito, o NPY estava 5,48 vezes mais expresso na lâmina destes pacientes, e o S100A8 4,98 vezes mais expresso nesta lâmina.

O FAM3D pertence a uma família de proteínas envolvidas com diminuição da secreção de insulina e apoptose de células beta^{47,52,53}. Na RT-qPCR, a expressão do FAM3D foi 4070 (1000-37588) nos tumores de portadores de diabetes e 109 (10-1112) nos indivíduos não-diabéticos ($p < 0.05$) (Figura 13).

A expressão do mRNA do FAM3D também foi avaliada em outros tecidos que não adenocarcinoma de pâncreas e placenta, sendo realizada em pâncreas não-tumoral de um paciente com carcinoma mucinoso ductal, em tumor neuroendócrino não-secretor, em insulinoma, em metástase de

carcinoma de hipófise, e em sangue periférico total de dois pacientes, um com e outro sem adenocarcinoma de pâncreas. A expressão neste grupo de diferentes tecidos foi 0,23 (0,0-4,0) (Tabela 9), sendo significativamente menor do que a observada nos 12 casos de adenocarcinomas de pâncreas ($p < 0,05$).

O NPY foi estudado por estar envolvido com anormalidades na homeostase glicêmica⁴⁸⁻⁵⁰. A expressão do NPY foi 0,46 (0,19-0,91) nos portadores de diabetes melito, 0,32 (0,21-0,58) nos indivíduos não-diabéticos ($p = \text{NS}$) (Figura 14).

A expressão do gene S100A8 (Calgranulina A) no presente estudo foi 0,29 (0,15-0,41) no grupo de portadores de diabetes melito e 0,18 (0,08-0,56) no grupo de indivíduos não-diabéticos (Figura 15). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = \text{NS}$).

Tabela 7 - Características clínicas e achados cirúrgicos dos 12 pacientes cujos tumores foram estudados por RT-qPCR

Caso	Idade	Sexo	IMC (kg/m ²)	DIABETES MELITO				Localização do tumor
				Antecedentes Familiares	Tempo de diagnóstico (meses)	Grau de tolerância à glicose	Terapia	
1*	63	M	21,5	Sim	12	DM	SU+MET	Cabeça
2*	69	M	19,4	Não	120	DM	SU+INS	Cabeça
3	72	F	21,6	Sim	144	DM	SU+MET	Cabeça
4	60	F	22,1	Sim	1	DM	MET	Cabeça
5	48	F	30,8	Sim	-	IGT		Cabeça
6	43	F	30,0	Sim	-	IGT		Cabeça
7	67	F	36,9	Sim	-	IGT		Cabeça
8*	57	M	23,2	Não	-	Normal		Cabeça
9*	54	M	28,1	Não	-	Normal		Cabeça
10	49	M	29,0	Sim	-	Normal**		Cabeça
11	67	M	19,1	Não	-	Normal**		Cabeça
12	69	M	29,1	Não	-	Normal**		Cabeça

DM=Diabetes Melito, IGT=Intolerância à glicose, SU=Sulfoniluréia, MET=Metformina, INS=Insulina. ND=Não disponível.

* Pacientes cujos tumores foram usados na análise dos microarranjos de oligonucleotídeos.

** Não foi submetido a GTTO. Glicemia de jejum <126 mg/dL.

Tabela 8 - Expressão de mRNA dos genes FAM3D, NPY e S100A8 nas amostras de tumores dos pacientes estudados

Caso	Grau de tolerância à glicose	EXPRESSÃO DE mRNA		
		FAM3D	NPY	S100A8
1*	DM	4446	0,47	0,27
2*	DM	3693	0,46	0,52
3	DM	37588	0,19	0,60
4	DM	1000	0,91	...
5	IGT	10	0,48	0,30
6	IGT	178	0,22	0,16
7	IGT	178	0,34	0,28
8*	NT	1112	0,30	0,24
9*	NT	30	0,21	0,34
10	NT	852	0,58	0,64
11	NT	38	0,40	1,44
12	NT	39	0,23	0,61

DM=Diabetes Melito; IGT=Intolerantes; NT: Normotolerante.

* Pacientes cujos tumores foram usados na análise dos microarranjos de oligonucleotídeos.

Tabela 9 - Expressão de mRNA do gene FAM3D em sangue periférico de portador de adenocarcinoma ductal de pâncreas e em amostras de tumores e sangue periférico de pacientes com outras neoplasias

Caso	Descrição	Expressão do FAM3D
A	Pâncreas não-tumoral	4,00
B	Tumor neuroendócrino não-secretor	0,60
C	Insulinoma	0,10
D	Metástase de carcinoma de hipófise	0,35
E	Sangue periférico de portador de adenocarcinoma de pâncreas não-diabético	0,00
F	Sangue periférico de portador de neoplasia benigna	0,10

Figura 13. Expressão normalizada do mRNA do gene FAM3D em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NDM: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito.

Figura 14. Expressão normalizada do mRNA do gene NPY em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NDM: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de miabetes melito.

Figura 15. Expressão normalizada do mRNA do gene S100A8 em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NDM: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de diabetes melito.

4.4 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA O FAM3D

A análise imunohistoquímica para o FAM3D foi realizada em amostras de tecido tumoral de 10 dos 12 pacientes nos quais havia sido realizado RT-qPCR e em uma lâmina de pâncreas normal não-tumoral. Como controle positivo utilizaram-se tecidos de cólon normal e placenta normal.

O padrão observado na lâmina de cólon normal caracterizou-se por positividade no citoplasma do epitélio colônico, com padrão granuloso (Figura 16). Na placenta, não se observou imunorreatividade no trofoblasto, havendo positividade somente nas células dos vilos, com padrão nuclear difuso (Figura 17).

No pâncreas normal (não-tumoral), não houve imunorreatividade nos ácinos, observando-se marcação nas ilhotas, com um padrão citoplasmático difuso (Figura 18), e nas células ductais, com um padrão citoplasmático granuloso semelhante ao observado no epitélio colônico (Figura 19).

Nos adenocarcinomas de pâncreas o padrão de marcação para o FAM3D foi heterogêneo (Figuras 20 e 21). Na maioria dos tumores, observou-se um padrão nuclear, semelhante ao observado nos vilos placentários, associado a positividade citoplasmática. Em algumas células tumorais, porém, observou-se apenas padrão citoplasmático granuloso, semelhante ao observado no epitélio colônico e no epitélio ductal normal. Não houve diferença de imunorreatividade entre as lâminas dos portadores de diabetes melito e as dos não-diabéticos.

Figura 16. Expressão do FAM3D em tecido de cólon normal humano na imunohistoquímica. As células epiteliais colônicas se coram fortemente no citoplasma.

Figura 17. Expressão do FAM3D em tecido de placenta humana normal na imunohistoquímica. As células dos vilos se coram fortemente no núcleo. No trofoblasto não se observa células coradas com o anticorpo contra o FAM3D.

Figura 18. Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em ilhotas pancreáticas humanas normais. As células das ilhotas pancreáticas se coram fortemente no citoplasma, com padrão difuso.

Figura 19. Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em ductos pancreáticos humanos normais. As células dos ductos pancreáticos se coram fortemente no citoplasma, com padrão granuloso.

Figura 20. Expressão do FAM3D na imunohistoquímica em adenocarcinoma ductal de pâncreas. Em alguns tumores observa-se um padrão nuclear e citoplasmático para o FAM3D nas células tumorais.

Figura 21. Expressão do FAM3D em adenocarcinoma ductal de pâncreas. Em alguns tumores observa-se apenas um padrão citoplasmático granuloso, semelhante ao observado no cólon normal e nos ductos pancreáticos normais.

5. DISCUSSÃO

Observou-se neste estudo que portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas apresentaram alterações na homeostase glicêmica que incluíam resistência insulínica e tendência ao comprometimento da secreção insulínica em resposta à glicose. Entre o diagnóstico de diabetes melito e o diagnóstico do tumor houve um período bastante curto, sugerindo que a neoplasia teve participação nas alterações da homeostase glicêmica observadas na maioria destes pacientes.

Tumores de portadores de diabetes melito expressaram genes que não foram expressos nos tumores dos indivíduos não-diabéticos, entre os quais o gene do FAM3D, pertencente à uma família de proteínas semelhantes a citocinas envolvida em alterações da homeostase glicêmica, e cuja expressão protéica foi observada em tecidos epiteliais, incluindo vilos placentários, epitélio do cólon, ilhotas pancreáticas, ductos pancreáticos normais e, também, adenocarcinoma pancreático do tipo ductal.

Os fatores envolvidos nas alterações da homeostase glicêmica em portadores de doenças malignas incluem perda de peso, estresse oxidativo e ação de citocinas^{14,54-56}.

Indivíduos com caquexia paraneoplásica têm maior produção endógena de glicose, menor secreção de insulina em resposta à glicose, resistência à insulina e menor quantidade de glicogênio hepático^{11,12,14,54}. A perda de peso induzida pelo tumor parece, portanto, contribuir para a

alteração na homeostase glicêmica observada nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas.

Nos portadores de adenocarcinoma de pâncreas, tem-se investigado as causas que determinam alterações na homeostase glicêmica⁵⁷⁻⁵⁹, porém os resultados até o momento não apontam um fator único.

A possibilidade de a disglícemia ser resultado da destruição das ilhotas pancreáticas pelo tumor já foi aventada, porém Bell⁶ observou que a maioria dos portadores de diabetes melito apresentam tumor na cabeça do pâncreas, e não no corpo e na cauda onde está a maioria das ilhotas pancreáticas. Observou, também, que não havia diferença entre a destruição de ilhotas causada pelos tumores dos portadores de diabetes e a causada pelos tumores de indivíduos não diabéticos. As ilhotas persistiam nas áreas atróficas do pâncreas não-tumoral e as células beta continuavam preenchidas com grânulos de insulina⁶. Portanto, é pouco provável que um fator anatômico pudesse ser responsável pelo comportamento da homeostase glicêmica em portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas.

A melhora da tolerância à glicose após pancreatectomia parcial³¹ para retirada do tumor sugere que fatores produzidos pelo tumor sejam os responsáveis pelo diabetes associado ao adenocarcinoma de pâncreas.

Basso et al.⁵⁷, analisando soro de portadores de adenocarcinoma de pâncreas e extratos condicionados de linhagens celulares de câncer de pâncreas por eletroforese de duas dimensões e análise por espectrometria de massa, encontraram um peptídeo com peso molecular de 2030 Da com

maior concentração em soro de portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes melito do que nos que não tinham diabetes. Valerio et al.⁵⁸, utilizando-se da mesma técnica, analisaram extratos condicionados de linhagens celulares de câncer de pâncreas e soro portal de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas, e observaram no soro portal um peptídeo com peso molecular de 5002 Da que se relacionava diretamente com diabetes melito e outros seis peptídeos que se relacionavam inversamente com diabetes.

Estudo utilizando microarranjos comparou adenocarcinoma de pâncreas, pancreatite crônica e pâncreas normal, e foi descrito aumento de 26,7 vezes na expressão de conexina 26 no tecido carcinomatoso pancreático comparado ao tecido pancreático normal. A expressão de conexina 26 ocorria primariamente nas ilhotas pancreáticas existentes no tumor, e foi observada correlação de 0,62 entre a expressão de conexina 26 e a glicemia de 2 h no teste oral de tolerância à glicose⁵⁹.

Tais fatores, descritos nestes três estudos, podem estar relacionados ou não à resistência insulínica e à disfunção das células beta observadas nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas e merecem, portanto, ser melhor analisados através de ensaios experimentais apropriados.

Diabetes melito se desenvolve em indivíduos cuja secreção de insulina é relativamente insuficiente para atender a demanda do organismo. Se existe um limite para a secreção insulínica pela célula beta, ou se esta restrição na resposta insulínica só ocorre nos indivíduos geneticamente predispostos a ter diabetes melito, e nos casos dos pacientes com

adenocarcinoma de pâncreas, por algum fator circulante, são questões que ainda estão a serem respondidas.

No presente estudo, o gene considerado de maior pertinência dentre os mais expressos nos adenocarcinomas de pâncreas de portadores de diabetes melito foi o FAM3D, que faz parte de uma subfamília de proteínas semelhantes as citocinas conhecidas como *Family with Sequence Similarity 3* (FAM3), na qual cada membro contém 224-235 aminoácidos com um peptídeo sinalizador. O gene do FAM3D está localizado no cromossomo 3, posição 3p14.2. Seu peso molecular calculado é de 24.832 Da. A comparação da sequência de aminoácidos entre os 4 membros dessa subfamília, FAM3A, FAM3B, FAM3C e FAM3D revela uma identidade variando entre 31,6 a 53,3%, sem homologia com qualquer outra citocina conhecida⁴⁷. Essa família de proteínas tem, no entanto, um domínio GG semelhante ao observado nas proteínas POMGnT1, KIAA1199 e TMEM2, relacionadas a doenças como “doença músculo-olho-cérebro” (*muscle-eye-brain disease*) (POMGnT1) e perda auditiva não sindrômica (*non-syndromic hearing loss*) (KIAA1199)⁶⁰. FAM3A e FAM3C são expressos em quase todos os tecidos, enquanto que FAM3B é fortemente expresso em células beta e alfa das ilhotas pancreáticas, e o FAM3D é altamente expresso em placenta⁴⁷. Apesar da expressão do FAM3D em um tecido hiperproliferativo como a placenta sugerir um papel para este gene na proliferação celular, seu papel fisiológico bem como os processos patológicos nos quais está envolvido ainda não são conhecidos. A exposição prolongada de células beta ao FAM3B (também conhecido como “PANcreatic DERived factor”,

PANDER) causa inibição dose-dependente da secreção basal de insulina, porém, sem efeitos sobre a secreção de insulina induzida por glicose⁴⁷. Sugere-se, portanto, que o FAM3B pode ser um regulador negativo da função das células beta e, além disso, o FAM3B está relacionado à apoptose de células beta^{52,53}.

Considerando a homologia entre o FAM3B e o FAM3D, supor-se-ia que a superexpressão do FAM3D nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas associado à diabetes melito poderia influir sobre a secreção de insulina, e sobre o número de células beta dentro do tumor e no tecido pancreático peri-tumoral.

A presença do FAM3D nos adenocarcinomas pancreáticos está de acordo tanto com a hipótese de que estes tumores surgem a partir de células das ilhotas pancreáticas^{9,26}, quanto da que eles surgem a partir das células ductais¹, pois como observado no estudo por imunohistoquímica, tanto as ilhotas pancreáticas quanto as células ductais expressam FAM3D.

Não há descrição conhecida de imunohistoquímica para o FAM3D. A observação de positividade para esta proteína nas ilhotas pancreáticas, à semelhança do que ocorre com o FAM3B também aponta para a possibilidade de o FAM3D exercer alguma função sobre as células das ilhotas pancreáticas, e portanto, sobre a secreção insulínica.

A presença do FAM3D no núcleo das células tumorais, à semelhança do que ocorre nos vilos placentários, faz com que se avenge também a possibilidade de esta proteína ter ação intrácrina, participando em processos nucleares, como por exemplo, transcrição gênica.

Variações nas concentrações de citocinas em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas podem influenciar a apresentação clínica. Em portadores deste tipo de tumor, elevações nas concentrações séricas de interleucina-6 (IL-6) estão associadas a pior prognóstico⁶¹.

As citocinas também podem interferir na homeostase glicêmica. Existe associação entre citocinas inflamatórias e diabetes, como observado no estudo *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*, que revelou associação entre a elevação combinada de interleucina-1 beta e de IL-6 e maior risco de diabetes tipo 2⁶². Kim et al.⁶³, por sua vez, demonstraram que a IL-6 provoca diminuição da ação da insulina no fígado e no músculo esquelético.

O papel do FAM3D, proteína semelhante a citocina, sobre a secreção de e sobre a resistência à insulina necessita maiores esclarecimentos no que tange a seu papel sobre o controle da homeostase glicêmica.

Solmi et al.⁶⁴ quantificaram o mRNA de FAM3D no sangue periférico para tentar rastrear câncer de cólon, porém nenhum valor de “cut-off” foi encontrado. O maior conteúdo de FAM3D nos tumores pancreáticos, tanto de portadores de diabetes melito quando de indivíduos sem diabetes sugere a possibilidade de o FAM3D ser utilizado como marcador para rastreamento de câncer pancreático.

A secreção de insulina pelas células beta parece estar sobre influência regulatória de vários peptídeos, incluindo o neuropeptídeo Y (NPY). Há indícios de participação no NPY em alterações da homeostase glicêmica. Um polimorfismo do NPY foi associado a diabetes⁶⁵. Um aumento do

mRNA do NPY foi observado em pâncreas de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina⁶⁶ e, além disso, a exposição de ilhotas pancreáticas de doadores humanos cultivadas em presença de NPY resulta em diminuição da secreção de insulina, sugerindo um papel parácrino para este peptídeo sobre o pâncreas endócrino⁴⁸. Esta ação pode ser via inibição da atividade adenil-ciclase dependente de proteína G1, segundo Morgan et al.⁴⁹. Porém, o presente estudo, não sugere associação entre a expressão de NPY e as alterações na homeostase glicêmica associada a adenocarcinoma de pâncreas.

A proteína de ligação do cálcio S100A8 liga-se a outras proteínas de ligação do cálcio, como a S100A9, que se expressa mais no adenocarcinoma de pâncreas do que no pâncreas normal⁶⁷. Outras proteínas de ligação do cálcio, como a S100A6 também têm sido relacionadas a tumorigênese e a prognóstico em portadores de adenocarcinoma de pâncreas^{68,69}. Basso et al.⁵¹ observaram que o peptídeo N-terminal de uma proteína de ligação do cálcio S100 estava expresso apenas em tumores de pâncreas de indivíduos que tinham diabetes melito e não nos tumores dos indivíduos sem diabetes, e que esse peptídeo era capaz de reduzir a utilização de glicose por mioblastos em cultura. Não se pode, no entanto, supor que a proteína de ligação do cálcio S100A8 seja a proteína S100 descrita por Basso et al.⁵¹, visto que aquela não estava diferencialmente expressa entre portadores e não-portadores de diabetes melito no presente estudo.

As baixas expressões de FAM3D e de NPY nos tumores de pacientes com intolerância à glicose poderiam estar relacionadas a etiopatogenia do tumor neste subgrupo de pacientes. Os pacientes intolerantes eram obesos, tinham frequência maior de relato de história familiar de diabetes, e eram mais jovens, não se podendo, portanto, descartar que obesidade tenha desencadeado tanto a intolerância à glicose quanto o tumor, já que indivíduos obesos apresentam maior risco de adenocarcinoma de pâncreas^{70,71}. Nesse caso, o tumor não seria o responsável pela intolerância à glicose, logo não se esperaria maior expressão dos genes analisados.

Os resultados encontrados no presente estudo abrem perspectivas para o papel de uma proteína, FAM3D, sobre a homeostase glicêmica. Embora não se possa atribuir exclusivamente a ela o aparecimento de diabetes melito em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas, talvez possa ser um fator que contribui para tais alterações em indivíduos com esse tipo de tumor. O efeito do FAM3D sobre as ilhotas pancreáticas e outros tecidos epiteliais merece, portanto, ser melhor avaliado, principalmente no que diz respeito ao metabolismo e à proliferação celular.

Além disso, a utilização do FAM3D como marcador de adenocarcinoma ductal de pâncreas merece ser mais amplamente investigada, pois a detecção do tumor através de uma proteína circulante ou no suco pancreático permitiria seu diagnóstico precoce, num estágio em que ainda houvesse possibilidade de cura.

6. CONCLUSÕES

Entre os pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas estudados, encontrou-se alteração na homeostase da glicose caracterizada por resistência à insulina com uma tendência a deficiência na secreção de insulina.

A prevalência de diabetes melito de curta duração foi bastante elevada. Nos portadores de diabetes, o índice de massa corporal foi menor e a perda ponderal foi maior do que entre os indivíduos não-diabéticos.

Existem vários genes diferencialmente expressos entre tumores de portadores de adenocarcinoma de pâncreas que têm diabetes melito comparados aos tumores de indivíduos não-diabéticos, entre os quais alguns relacionados à homeostase glicêmica.

Não houve diferença de expressão dos genes NPY e S100A8 entre os tumores de indivíduos com diabetes melito e não-diabéticos.

O mRNA do FAM3D foi mais expresso nos adenocarcinomas de pâncreas estudados do que em amostras de pâncreas não-tumoral, insulinoma, metástase de carcinoma de hipófise, tumor neuroendócrino não-secretor do pâncreas, e sangue periférico.

Na análise por imunohistoquímica, observou-se que pâncreas humano normal, assim como adenocarcinoma de pâncreas, apresentam imunorreatividade para a proteína FAM3D, pertencente a uma família de proteínas semelhantes a citocinas. A expressão de seu mRNA associou-se a diabetes melito nos pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas

estudados, visto que o mRNA do FAM3D foi mais expresso nos tumores dos portadores de diabetes do que nos tumores de indivíduos não-diabéticos.

7. ANEXOS

Anexo A

Anexo B

* Dois foram submetidos ao GTT; Os outros 3 pacientes tinham glicemia de jejum normal (< 100 mg/dL), porém não foram submetidos ao teste.

Anexo C

Tabela dos genes selecionados no agrupamento hierárquico

Grupo	Nº Identificação Unigene	Abreviatura	Descrição	Q_DM-Q_ND
1	Hs.89717	CPA2	<i>Homo sapiens carboxypeptidase A2 (pancreatic) (CPA2), mRNA</i>	-0,990
1	Hs.158308	SERPINI2	<i>Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 2 (SERPINI2), mRNA</i>	-0,930
1	Hs.102876	PNLIP	<i>Homo sapiens pancreatic lipase (PNLIP), mRNA</i>	-0,873
1	Hs.293902	FLJ32115	<i>Homo sapiens hypothetical protein FLJ32115 (FLJ32115), mRNA</i>	-0,868
1	Hs.169271	CELL	<i>Homo sapiens carboxyl ester lipase-like (bile salt-stimulated lipase-like) (CELL), mRNA</i>	-0,852
1	Hs.180884	CPB1	<i>Homo sapiens carboxypeptidase B1 (tissue) (CPB1), mRNA</i>	-0,842
1	Hs.8709	CTRC	<i>Homo sapiens chymotrypsin C (caldecrin) (CTRC), mRNA</i>	-0,803
1	Hs.1340	CLPS	<i>Homo sapiens colipase, pancreatic (CLPS), mRNA</i>	-0,782
1	Hs.3191	REGL	<i>Homo sapiens regenerating islet-derived-like, pancreatic stone protein-like, pancreatic thread protein-like (rat) (REGL), mRNA</i>	-0,781
1	Hs.176658	AQP8	<i>Homo sapiens aquaporin 8 (AQP8), mRNA</i>	-0,774
1	Hs.44317	SOX10	<i>Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 10 (SOX10), mRNA</i>	-0,767
1	Hs.4158	REG1B	<i>Homo sapiens reg gene homologue, complete cds</i>	-0,767
1	NULL	NULL	<i>Homo sapiens genomic DNA, chromosome 22q11.2, IGLL region, clone:KB318B8</i>	-0,707
1	Hs.6788	ASTN	<i>Homo sapiens mRNA for KIAA0289 gene, partial cds</i>	-0,684
2	Hs.351719	FABP1	<i>Homo sapiens fatty acid binding protein 1, liver (FABP1), mRNA</i>	0,645
2	Hs.46319	SHBG	<i>Homo sapiens sex hormone-binding globulin (SHBG), mRNA</i>	0,579
2	Hs.3221	RGS6	<i>Homo sapiens G protein signaling 6 regulator (RGS6) mRNA, complete cds</i>	0,548
2	NULL	NULL	<i>wk28g08.x1 NCL CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2413694 3', mRNA sequence</i>	0,537
2	Hs.76159	ATP6V0C	<i>Homo sapiens, ATPase, H⁺ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 16kD, clone MGC:12873 IMAGE:4127653, mRNA, complete cds</i>	0,534
2	Hs.75244	BCL2L2	<i>Homo sapiens BCL2-like 2 (BCL2L2), mRNA</i>	0,520
2	Hs.17775	NGFRAP1	<i>Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1 (NGFRAP1), mRNA</i>	0,511
2	Hs.43005	RAB9B	<i>Homo sapiens RAB9B, member RAS oncogene family (RAB9B), mRNA</i>	0,504
2	Hs.150595	CYP26A1	<i>Homo sapiens cytochrome P450, subfamily XXVIA, polypeptide 1 (CYP26A1), transcript variant 1, mRNA</i>	0,502
3	Hs.169234	ELA2B	<i>Homo sapiens pancreatic elastase IIB (LOC51032), mRNA</i>	-0,722
3	Hs.269914	ZNF397	<i>Homo sapiens zinc finger protein 397 (ZNF397), mRNA</i>	-0,691
3	Hs.423	PAP	<i>Human pancreatitis associated protein mRNA, complete cds</i>	-0,686
3	Hs.139410	DBT	<i>Homo sapiens dihydroipoamide branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease) (DBT), mRNA</i>	-0,613
3	NULL	NULL	<i>Protein with high similarity to group V phospholipase A2 (mouse Pla2g2c), which hydrolyzes phospholipid sn-2 ester bonds, has roles in arachidonic acid release and prostaglandin production, member of the phospholipase A2 family</i>	-0,608
3	Hs.50151	KCNJ16	<i>Homo sapiens potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16 (KCNJ16), mRNA</i>	-0,598
3	Hs.323715	MAT1A	<i>Homo sapiens methionine adenosyltransferase I, alpha (MAT1A), mRNA</i>	-0,591
3	Hs.65135	KIAA0913	<i>Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E0121 (from clone DKFZp434E0121)</i>	-0,563
3	NULL	NRXN3	<i>Homo sapiens neurexin III-alpha gene, partial cds</i>	-0,551
3	Hs.16603	C9orf12	<i>Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 12 (C9orf12), mRNA</i>	-0,530
3	Hs.144914	GNMT	<i>Homo sapiens glycine N-methyltransferase (GNMT), mRNA</i>	-0,525
3	Hs.107	FGL1	<i>Homo sapiens fibrinogen-like 1 (FGL1), mRNA</i>	-0,516
3	Hs.339818	sdolf	<i>Homo sapiens olfactory receptor sdolf (sdolf), mRNA</i>	-0,509
3	Hs.99915	AR	<i>Homo sapiens androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; testicular feminization; spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease) (AR), mRNA</i>	-0,500

Tabela dos genes selecionados no grupamento hierárquico (continuação)

Grupo	Nº Identificação Unigene	Abreviatura	Descrição	Q_DM-Q_ND
4	Hs.102482	MUC5B	<i>Homo sapiens gallbladder mucin MUC5B mRNA, partial cds</i>	0,584
4	Hs.396160	NULL	<i>Homo sapiens clone 23u-1 immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) mRNA, partial cds</i>	0,581
4	Hs.54431	SGP28	<i>Homo sapiens specific granule protein (28 kDa) (SGP28), mRNA</i>	0,515
4	Hs.114005	FLJ23259	<i>Homo sapiens hypothetical protein FLJ23259 (FLJ23259), mRNA</i>	0,506
5	Hs.1340	CLPS	<i>Human colipase mRNA, complete cds</i>	-0,754
5	NULL	NULL	NULL	-0,697
5	Hs.279307	DKFZP434I2117	<i>Homo sapiens hypothetical protein DKFZp434I2117 (DKFZP434I2117), mRNA</i>	-0,669
5	Hs.307013	KRTAP9-2	<i>Homo sapiens keratin associated protein 9.2 (KRTAP9.2), mRNA</i>	-0,603
5	Hs.233363	GUCA1C	<i>Homo sapiens guanylate cyclase activator 1C (GUCA1C), mRNA</i>	-0,521
5	Hs.9613	ANGPTL4	<i>Homo sapiens angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), transcript variant 2, mRNA</i>	-0,509
5	Hs.408050	CPT1A	<i>Homo sapiens carnitine palmitoyltransferase I, liver (CPT1A), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA</i>	-0,509
5	Hs.25956	DKFZp564D206	<i>Homo sapiens CDA019 mRNA, complete cds</i>	-0,502
6	Hs.171825	BHLHB2	<i>Homo sapiens BHLHB2 gene for bHLH transcriptional factor DEC1, complete cds</i>	0,732
6	Hs.56407	PSPH	<i>Homo sapiens phosphoserine phosphatase (PSPH), mRNA.</i>	0,706
6	Hs.74070	KRT13	<i>Homo sapiens keratin 13 (KRT13), mRNA</i>	0,623
6	Hs.46320	NULL	<i>small proline-rich protein SPRK [human, odontogenic keratocysts, mRNA Partial, 317 nt]</i>	0,606
6	NULL	NULL	<i>Protein with very strong similarity to albumin (rat Alb), which is a blood plasma protein, human ALB is associated with familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia and analbuminemia, member of the serum albumin family</i>	0,564
6	Hs.129327	MGC13057	<i>Homo sapiens hypothetical protein MGC13057 (MGC13057), mRNA</i>	0,554
6	Hs.193161	NULL	<i>601679068F1 Homo sapiens cDNA 5' end</i>	0,542
6	Hs.20166	PSCA	<i>Homo sapiens prostate stem cell antigen (PSCA), mRNA.</i>	0,515
6	Hs.70937	H3FK	<i>Homo sapiens, H3 histone family, member A, clone MGC:4577 IMAGE:3030790, mRNA, complete cds</i>	0,506
7	Hs.150601	CTRL	<i>Homo sapiens chymotrypsin-like (CTRL), mRNA.</i>	-0,606
7	Hs.73923	PNLIPRP1	<i>Homo sapiens pancreatic lipase-related protein 1 (PNLIPRP1), mRNA</i>	-0,599
7	Hs.992	PLA2G1B	<i>Homo sapiens phospholipase A2, group IB (pancreas) (PLA2G1B), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA</i>	-0,591
7	Hs.2879	CPA1	<i>Homo sapiens carboxypeptidase A1 (pancreatic) (CPA1), mRNA.</i>	-0,591
7	Hs.143113	PNLIPRP2	<i>Homo sapiens pancreatic lipase-related protein 2 (PNLIPRP2), mRNA</i>	-0,560
7	Hs.144699	CPA5	<i>Homo sapiens carboxypeptidase A5 (CPA5), mRNA</i>	-0,541
7	Hs.4158	REG1B	<i>Homo sapiens regenerating islet-derived 1 beta (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) (REG1B), mRNA.</i>	-0,530
7	Hs.181289	ELA3A	<i>Homo sapiens elastase 3A, pancreatic (protease E) (ELA3A), mRNA.</i>	-0,502

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological patterns of primary nonendocrine human pancreas carcinoma. *Cancer Res.* 1975;35:2234–48.
2. Kern SE, Goggins MG, Hruban RH. Pancreas Cancer: Molecular biology and genetics. In: Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE. *Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice.* 1st ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
3. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/, based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER web site 2005.
4. Klimstra DS & Adsay NV. Pancreas Cancer: Pathology. In: Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE. *Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice.* 1st ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
5. Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985–1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg.* 1999;189:1–7.
6. Bell ET. Carcinoma of the pancreas. I. A clinical and pathologic study of 609 necropsied cases. II. The relation of carcinoma of the pancreas to Diabetes Melito. *Am J Pathol.* 1957;33:499-523.
7. Brooks AD, Conlon KC. Pâncreas Câncer: Staging Systems and Techniques. In: Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE. *Gastrointestinal Oncology: Principles & Practice.* 1st ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
8. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ. Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors. *J Surg Res.* 1996;63:310-3.
9. Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ, Adrian TE, Pour PM. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology.* 2001;120:1263-70.
10. Glicksman AS, Rawson RW. Diabetes and altered carbohydrate metabolism in patients with cancer. *Câncer.* 1956;9:1127-34.
11. Bennegard K, Lundgren F, Lundholm K. Mechanisms of insulin resistance in cancer associated malnutrition. *Clin Physiol.* 1986;6:539-47.
12. Copeland GP, Leinster SJ, Davis JC, Hipkin LJ. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. *Br J Surg.* 1987;74:1031-6.
13. Lundholm K, Edstrom S, Ekman L, Karlberg I, Schersten T. Metabolism in peripheral tissues in cancer patients. *Cancer Treat Rep.* 1981;65(Suppl 5):79-83.
14. Holroyde CP, Skutches CL, Boden G, Reichard GA. Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 1984;44(12 Pt 1):5910-3.
15. Soler NG, Exon PD, Paton A. Carbohydrate tolerance and insulin responses in obstructive jaundice. *Br Med J.* 1974;4:447-9
16. Kessler II. Cancer mortality among diabetics. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44:673-86.
17. Ragozzino M, Melton LJ 3rd, Chu CP, Palumbo PJ. Subsequent cancer risk in the incidence cohort of Rochester, Minnesota, residents with diabetes mellitus. *J Chronic Dis.* 1982;35:13-9.
18. Frye JNR, Inder WJ, Dobbs BR, Frizelle FA. Pancreatic cancer and diabetes: Is there a relationship? A case-controlled study. *Aust N Z J*

Surg. 2000;70:722-4.

19. Schwartz SS, Zeidler A, Moossa AR, Kuku SF, Rubenstein AH. A prospective study of glucose tolerance, insulin, C-peptide, and glucagons responses in patients with pancreatic carcinoma. *Dig. Dis.* 1978;23:1107-14.
20. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnqvist HJ, Larsson J. Pancreatic cancer is associated with impaired glucose metabolism. *Eur J Surg.* 1993; 159:101-7.
21. Permert J, Larsson J, Fruin AB, Tatemoto K, Herrington MK, von Schenck H, Adrian TE. Islet hormone secretion in pancreatic patients with diabetes. *Pancreas.* 1997;15:60-8.
22. Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal Glucose Metabolism and Pancreatic Cancer Mortality. *JAMA.* 2000;283:2552-8.
23. Chow W, Gridley G, Nyré O, Linet MS, Ekbom A, Fraumeni, Jr. JF, Adami H. Risk of Pancreatic Cancer Following Diabetes Melito: A Nationwide Cohort Study in Sweden. *J Nat Cancer Inst.* 1995;87:930-1.
24. Batty GD, Shipley MJ, Marmot M, Smith GD. Diabetes status and post-load plasma glucose concentration in relation to site-specific cancer mortality: findings from the original Whitehall study. *Cancer Causes Control.* 2004;15: 873-81.
25. Everhart J, Wright D. Diabetes Melito as a Risk Factor for Pancreatic Cancer. A Meta-analysis. *JAMA.* 1995;273:1605-9.
26. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ. Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors. *J Surg Res.* 1996 Jun; 63(1): 310-3.
27. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ. Reversal of enhanced pancreatic cancer growth in diabetes by insulin. *Surgery.* 1995;118:453-8.
28. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Italian Pancreatic Cancer Study Group. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Eng J Med.* 1994;331:81-4.
29. Basso D, Brigato L, Veronesi A, Panozzo MP, Amadori A, Plebani M. The pancreatic cancer cell line MIA PaCa2 produces one or more factors able to induce hyperglycemia in SCID mice. *Anticancer Res.* 1995;15:2585-8.
30. Valerio A, Basso D, Brigato L, Ceolotto G, Baldo G, Tiengo A, Plebani M. Glucose metabolic alterations in isolated and perfused rat hepatocytes induced by pancreatic cancer conditioned medium: a low molecular weight factor possibly involved. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:622-8.
31. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnqvist HF, Larsson J. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1993;80:1047-50.
32. Chari ST, Zapiach M, Yadav D, Rizza RA. Beta-cell function and insulin resistance evaluated by HOMA in pancreatic cancer subjects with varying degrees of glucose intolerance. *Pancreatolgy.* 2005;5:229-33.
33. Souza JJS, Pereira MAA, Nery M, Corrêa-Giannella MLC, Cunha JEM, Jukemura J, Machado MCC, Giannella-Neto D. Análise retrospectiva da prevalência de Diabetes Melito em portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas no HCFMUSP – Análise de 166 casos. 2005. XV Congresso da Sociedade Brasileira de Endocrinologia. Anais.
34. Green Jr. RC, Baggenstoss AH, Sprague RG. Diabetes mellitus in association with primary carcinoma of the pancreas. *Diabetes.* 1958;7:308-11.
35. Murphy R, Smith FH. Abnormal carbohydrate metabolism in pancreatic carcinoma. *Med Clin North Am.* 1963;47:397-405.

36. Liu J, Knezetic JA, Strömmer L, Permert J, Larsson J, Adrian TE. The Intracellular Mechanism of Insulin Resistance in Pancreatic Cancer Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;85:1232-8
37. Isaksson B, Strommer L, Friess H, Buchler MW, Herrington MK, Wang F, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Larsson J, Permert J. Impaired insulin action on phosphatidylinositol 3-kinase activity and glucose transport in skeletal muscle of pancreatic cancer patients. *Pancreas.* 2003;26:173-7.
38. Schmied BM, Ulrich AB, Matsuzaki H, Li C, Friess H, Bochler MW, Andron-Sandberg A, Adrian TE, Pour PM. Alteration of the Langerhans islets in pancreatic cancer patients. *Int J Pancreatol.* 2000;28:187-97.
39. American Diabetes Association. Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2005;28(Suppl 1): S37-42.
40. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. & Turner, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-9.
41. Haffner, S.M., Miettinen, H. & Stern, M.P. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care.* 1997;20:1087-92.
42. Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M, Zhu X, Patterson M, Shippy R, Sendera TJ, Mazumder A. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e30.
43. Rozen S & Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (capítulo 20). In: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*, v. 132, Totowa, New Jersey, Human press. P. 365-86, 2000. Available from: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
44. Ginzinger, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 2002;30:503-12.
45. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.
46. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genome wide studies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9440-5.
47. Zhu Y, Xu G, Patel A, μLaughlin MM, Solveman C, Knecht KA, Sweitzer S, Li Z, μDonnell P, Mirabile R, Zimmerman D, Boyce R, Tierney LA, Hu E, Livi GP, Wolf BA, Abdel-Meguid SS, Rose GD, Aurora R, Hensley P, Briggs M, Young PR. Cloning, expression and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. *Genomics.* 2002;80:144-50.
48. Bennet WM, Wang ZL, Jones PM, Wang RM, James RF, London NJ, Ghatei MA, Bloom SR. Presence of neuropeptide Y and its messenger ribonucleic acid in human islets: evidence for a possible paracrine role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2117-20.
49. Morgan DG, Kulkarni RN, Hurley JD, Wang ZL, Wang RM, Ghatei MA, Karlens AE, Bloom SR, Smith Diabetes Melito. Inhibition of glucose stimulated insulin secretion by neuropeptide Y is mediated via the Y1 receptor and inhibition of adenylyl cyclase in RIN 5AH rat insulinoma cells. *Diabetologia.* 1998;41:1482-91.
50. Cho YR, Kim CW. Neuropeptide Y promotes beta-cell replication via extracellular signal-regulated kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:773-80.
51. Basso D, Greco E, Fogar P, Pucci P, Flagiello A, Baldo G, Giunco S, Valério A, Navaglia F, Zambon CF, Pedrazzoli S, Plebani M. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: an open field for proteomic

applications. *Clin Chim Acta*. 2005;357:184-9.

52. Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Bell E, Campbell D, Zhu Y, Young R, Trucco M, Markmann JF, Naji A, Wolf BA. Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting beta cells. *Diabetes*. 2003;52:2296-303.
53. Cao X, Yang J, Burkhardt B, Gao Z, Wong RK, Greene S, Wu J, Wolf BA. Effects of over-expression of Pancreatic-Derived Factor (FAM3B) in isolated mouse islets and insulin secreting β TC3 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289:E543-50.
54. Eden E, Edstrom S, Bennegard K, Schersten T, Lundholm K. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. *Cancer Res*. 1984;44:1718-24.
55. Pi-Sunyer FX. Overnutrition and undernutrition as modifiers of metabolic processes in disease states. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(2 Suppl):533S-7S.
56. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95.
57. Basso D, Valerio A, Seraglia R, Mazza S, Piva MG, Greco E, Fogar P, Gallo N, Pedrazzoli S, Tiengo A, Plebani M. Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 MW peptide. *Pancreas*. 2002;24:8-14.
58. Valerio A, Basso D, Fogar P, Falconi M, Greco E, Bassi C, Seraglia R, Abu-Hilal M, Navaglia F, Zambon CF, Gallo N, Falda A, Pedrazzoli S, Plebani M. Maldi-TOF analysis of portal sera of pancreatic cancer patients: identification of diabetogenic and antidiabetogenic peptides. *Clin Chim Acta*. 2004;343:119-27.
59. Pfeffer F, Koczan D, Adam U, Benz S, von Dobschuetz E, Prall F, Nizze H, Thiesen HJ, Hopt UT, Lobler M. Expression of connexin26 in islets of Langerhans is associated with impaired glucose tolerance in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;29:284-90.
60. Guo J, Cheng H, Zhao S, Yu L. GG: A domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases. *FEBS Letters*. 2006; 580:581-584.
61. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer*. 2004;101:2727-36.
62. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003;52:812-7.
63. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004;53:1060-7.
64. Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, Coppola D, Yeatman TJ, Lenzi L, Caira A, Zanotti S, Taffurelli M, Carinci P, Valvassori L, Strippoli P. Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int J Oncol*. 2004;25:1049-56.
65. Nordman S, Ding B, Ostenson CG, Karvestedt L, Brismar K, Efendic S, Gu HF. Leu7Pro Polymorphism in the Neuropeptide Y (NPY) Gene is Associated with Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes in Swedish Men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005;113:282-7.
66. Fu M, Li X, Zhang M, Xian Y. Increased expression of neuropeptide Y and its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*. 2002;115:690-5.

67. Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics*. 2004; 4:3975-88.
68. Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Fujii K, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. The Role of S100A6 in Pancreatic Cancer Development and Its Clinical Implication as a Diagnostic Marker and Therapeutic Target. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7785-93.
69. Vimalachandran D, Greenhalf W, Thompson C, Luttges J, Prime W, Campbell F, Dodson A, Watson R, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine N, Neoptolemos J, Costello E. High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients. *Cancer Res*. 2005;65:3218-25.
70. Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003;89:519-23.
71. Hanley AJ, Johnson KC, Villeneuve PJ, Mao Y; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Physical activity, anthropometric factors and risk of pancreatic cancer: results from the Canadian enhanced cancer surveillance system. *Int J Cancer*. 2001;94:140-7.

Apêndice

ANEXO I

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
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 ()

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DIABETOGENICOS ASSOCIADOS AO ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

2. PESQUISADOR: Jean Jorge Silva de Souza

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pós-graduando INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 95966

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas da 2ª Clínica Cirúrgica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

III –REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo esclarecer porque pessoas com tumores de pâncreas podem ter diabetes Melito. Participam deste estudo somente pacientes que já tem indicação de cirurgia por doença no pâncreas. Neste estudo serão realizados exames de sangue no(a) Senhor(a), os quais serão colhidos das veias dos braços, e exames de urina. Durante a sua cirurgia, será colhido material da parte doente do pâncreas que for retirada pela equipe cirúrgica. Neste material serão realizados exames para saber a causa genética do diabetes Melito nos tumores de pâncreas. Os pacientes que tiverem diabetes Melito e que desejarem serão acompanhados e receberão tratamento clínico do diabetes no Serviço de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP. O(A) Senhor(a) pode ter informações, a qualquer momento, sobre os procedimentos, os riscos e os benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida. O(A) Senhor(a) pode retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo ao seu atendimento médico no Hospital das Clínicas. Todas as informações obtidas no estudo são confidenciais, sendo mantidos o sigilo e a privacidade. Se eventualmente ocorrer algum dano à sua saúde decorrente do estudo, o(a) Senhor(a) receberá atendimento no Hospital das Clínicas até sua recuperação. O(A) Senhor(a) poderá ser indenizado(a) se ocorrer algum dano à sua saúde decorrente da pesquisa.

IV. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Jean Jorge Silva de Souza, Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 4305. Tel.: 3066-7467

V. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VI. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, e ter entendimento o que me foi explicado consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

assinatura do sujeito ou responsável legal

assinatura do pesquisador
Jean Jorge Silva de Souza CRM 95966