

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**BIOMARCADORES E NOVAS TERAPIAS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO
DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO: ESTUDOS DE
EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA CELULAR**

PATRICIA IZETTI RIBEIRO

Porto Alegre, abril de 2014.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**BIOMARCADORES E NOVAS TERAPIAS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO
DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO: ESTUDOS DE
EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA CELULAR**

PATRICIA IZETTI RIBEIRO

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Ashton-Prolla

Porto Alegre, abril de 2014.

APRESENTAÇÃO

O presente estudo compreende duas abordagens paralelas de identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce do câncer de pâncreas e o desenvolvimento de novas drogas em modelos *in vitro*. Conforme formato requerido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, esta tese está dividida em: Introdução; Objetivos; Capítulos (que substituirão as seções de Material e Métodos e Resultados descritas sob forma de artigos científicos publicados ou submetidos); Discussão e Conclusões.

O desenvolvimento desse estudo ocorreu a partir de uma colaboração entre o Laboratório de Medicina Genômica, o Laboratório de Pesquisas em Câncer, o Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, Lyon - França). Os estudos foram orientados pela Prof^a. Patrícia Ashton-Prolla, co-orientados pelo Prof. Rafael Roesler e supervisionados pelo Prof. Alessandro Osvaldt e Prof. Pierre Hainaut. O recrutamento dos indivíduos e/ou amostras biológicas incluídos nesse projeto foi realizado no Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O presente trabalho foi realizado com fomento recebido do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, projeto GPPG 10-0162) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo Edital MCT/CNPq/CT-AGRO/CT-BIOTEC nº 442/2099 - Rede Genoprot. A aluna Patrícia Izetti recebeu bolsa de doutorado no Programa Doutorado em Pesquisa Médica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***“We must believe that we are gifted for something
and that this thing, at whatever cost, must be attained.”***

*Marie Curie, insigne mulher e pesquisadora,
prêmio Nobel de Física em 1903 e Química em 1911.*

Dedicatória

*À minha mãe, Míriam Lisboa Izetti Ribeiro (in memorian);
ao meu pai, Ricardo Antonio Izetti Ribeiro;
ao meu irmão, Lucas Quadros Ribeiro e
a todos os pacientes que lutam diariamente contra o câncer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Patricia Ashton-Prolla, pela orientação, pelo aprendizado e estímulo constantes, pela dedicação e contribuição ímpar para o meu crescimento acadêmico-científico.

Ao Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, pela colaboração na idealização do presente estudo e participação irrestrita em sua concepção, desenvolvimento e conclusão. Também pela amizade, incentivo e apoio sempre incondicionais.

Ao Prof. Dr. Rafael Roesler, pelo exemplo de dinamismo e competência científica, pelos ensinamentos transmitidos, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Pierre Hainaut, pela receptividade em seu grupo de pesquisas em Lyon, pelo conhecimento compartilhado, pelo estímulo e pelo exemplo de brilhantismo científico.

À Prof. Dra. Maria Isabel Edelweiss, pela colaboração e pelo exemplo de sinceridade e personalidade, bem como pela confiança em mim sempre depositada. À Dra. Camila Juliano, pela colaboração, parceria, lealdade e amizade.

Às colegas e amigas Jamile Abud e Dra. Patrícia Koehler, pessoas fundamentais para a conclusão desse projeto, pela amizade incondicional, estímulo incessante, carinho, amparo e força, especialmente nas fases mais difíceis desse doutoramento. À Dra. Juliana Giacomazzi, pela amizade e apoio durante toda essa trajetória e companheirismo durante os experimentos em Lyon.

À Bárbara Alemar, pela colaboração em partes fundamentais desse projeto e à Cleandra Gregório, pela atuação exemplar como aluna de iniciação científica. Também à Dra. Ana Abujamra pela iniciação nas técnicas de cultura celular, por sua incansável dedicação e disponibilidade. À Dra. Caroline Brunetto, pelo auxílio

e ensinamentos nos diferentes momentos desse projeto. À Dra. Aline Jade Mendonça e ao Rafael Canto, pela colaboração na fase inicial do projeto com biomarcadores salivares.

Aos demais colegas do Laboratório de Medicina Genômica: Dr. Diego d'Ávila Paskulin, Gabriel Macedo, Dra. Ingrid Petroni Ewald, Dra. Silvia Liliana Cossio, Mariana Fitarelli Kiehl, Júlia Protas, Patrícia Silva, Dra. Ana Paula Brandalize e Igor Araújo Vieira, pelo apoio, disponibilidade e troca de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Guido Lenz, pelos ensinamentos e pela colaboração nos estudos com linhagens celulares e à Prof. Dra. Úrsula Matte, pela introdução nas técnicas de qRT-PCR.

À Dra. Célia Maria Paes Viegas, pela inspiração e exemplo de dedicação médico-científica e ao meu padrinho, César Armando Izetti Ribeiro, pelo apoio irrestrito.

Aos colegas, amigos e "irmãos" Dra. Geórgia Dorigon, Dr. João Leonardo Pietrobelli e Dra. Manoela Regina Alves Correa, pelo amor, carinho e apoio imensuráveis. Também às amigas e "irmãs" Nina Fiúza e Alessandra Barbagallo, pela eterna amizade que supera qualquer distância.

Aos meus ex-colegas de graduação, especialmente os amigos do grupo de internato Dr. Maurício Farenzena, Dra. Melina Canterji, Dr. Iuri Goemann, Dr. Stefano Blessmann Milano e Dra. Fairuz de Castro, pela parceria, suporte e auxílio nos momentos iniciais desse projeto, quando precisei conciliar as responsabilidades científicas com a fase de maior responsabilidade da nossa difícil graduação. Também aos atuais colegas de residência médica do Instituto Nacional de Câncer, que tiveram total compreensão na reta final desse projeto, especialmente Dr. Alfredo Merlos Akinaga Cordeiro e Dra. Juliana Maia de Holanda. Também aos colegas médicos do grupo MGC, exemplos de médicos e companheiros inigualáveis.

À Dra. Vivian Bersch, ao Prof. Dr. Carlos Otávio Corso e ao Dr. Juliano Martini, médicos do serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela colaboração na identificação e inclusão de pacientes. Também aos oncologistas Dr. Rui Weschenfelder, Dr. Guilherme Geib, Dra. Janaína Brolllo e Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann, pelas contribuições para a minha formação e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Jeferson Beck, Everaldo Almeida e Roger Mendes Pascoal, pelo auxílio inestimável em diferentes momentos desse projeto. À Maria Angela Zambonin, pelo carinho e companhia durante as noites no laboratório.

Ao Elmo Cardoso, do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, pelo dinamismo e suporte nos diferentes momentos do meu doutoramento.

Aos órgãos que fomentaram esse estudo, CNPq e CAPES, pelos recursos destinados.

Finalmente, agradeço às pessoas mais importantes dessa trajetória: minha mãe, pelo amor e carinho, pelo exemplo de força e luta contra o câncer e, especialmente, pelos sonhos depositados em mim. E ao meu pai, pela amizade, apoio e amor sempre incondicionais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Epidemiologia do câncer de pâncreas	20
1.2. Aspectos da patologia dos tumores pancreáticos	25
1.2.1. Características anátomopatológicas e moleculares dos adenocarcinomas ductais pancreáticos	26
1.3. Aspectos moleculares da carcinogênese do adenocarcinoma ductal pancreático	29
1.3.1. Modelo de carcinogênese das PanINs	29
1.3.2. Modelo de carcinogênese dos IPMNs	32
1.3.3. Outros modelos de carcinogênese	33
1.3.4. O gene <i>TP53</i> e a proteína p53 na carcinogênese pancreática	33
1.4. Estudos de expressão gênica no câncer de pâncreas	39
1.5. Modificações epigenéticas	39
1.5.1. Modificações de histonas	40
1.6. Papel dos microRNAs no câncer de pâncreas	41
1.7. Biomarcadores para o diagnóstico precoce	43
1.7.1. Biomarcadores séricos e plasmáticos	43
1.7.2. Biomarcadores salivares	45
1.8. Fatores e marcadores prognósticos	46
1.8.1. Estadiamento do câncer de pâncreas	47
1.8.2. Biomarcadores prognósticos	49
1.9. Novas terapias no tratamento do câncer de pâncreas	49
1.9.1. Novas drogas alvo-moleculares	50
1.9.2. p53 como alvo terapêutico	51
1.9.3. Drogas moduladoras de modificações epigenéticas	53
2. OBJETIVOS	56
3. CAPÍTULO I	57
3.1. Is there a role for <i>KRAS</i> as a salivary biomarker for pancreatic cancer detection	57

4. CAPTÍTULO II	73
4.1. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines	73
5. CAPTÍTULO III	101
5.1. The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Enhances the Effects of PRIMA-1 in Pancreatic Cancer Death Inducion.....	101
6. DISCUSSÃO	119
6.1. Estudo de biomarcadores salivares em pacientes com doença pancreática.....	119
6.2. Avaliação de novas drogas para o tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático	122
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	125
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
9. ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO	138
10. ANEXOS	141
10.1 ANEXO A - Carta de aprovação do Projeto (GPPG 10-0162).....	142
10.2 ANEXO B - Termo de consentimento – casos de câncer.....	143
10.3 ANEXO C - Termo de consentimento – casos de pancreatite	146
10.4 ANEXO D - Termo de consentimento – controles	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** – *Adrenocorticotropic hormone*
- ACRV1** – *Acrosomal vesicle protein 1*
- BCL-2** – *B-cell CLL/lymphoma 2*
- BRCA1** – *Breast Cancer type 1 susceptibility protein*
- BRCA2** – *Breast Cancer type 2 susceptibility protein*
- BRDU** – *5-bromo-2-deoxyuridine*
- CA19-9** – *Antígeno Carboidrato 19-9*
- CDKN2A** – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
- CFTR** – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*
- c-MYC** – *Myelocytomatosis oncogene*
- CTCs** – *Circulating Tumor Cells*
- DNA** – *Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)*
- DPC4** – *Decapentaplegic homolog 4*
- DPM1** – *Dolichol-phosphate mannosyltransferase*
- EGF** – *Epidermal Growth Factor*
- EGFR** – *Epidermal Growth Factor Receptor*
- ESTs** – *Expressed Sequence Tags*
- FAMM** – *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*
- FANCC** – *Fanconi anemia, complementation group C*
- FANCG** – *Fanconi anemia, complementation group G*
- FOS** – *FBJ osteosarcoma oncogene*
- GNAS** – *GNAS complex locus*
- HAT** – *Histona acetiltransferase*
- HBOC** – *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*
- HDAC** – *Histona desacetilase*
- HER2-2/neu** – *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*
- iHDAC** – *Inibidor de histona desacetilases*
- IARC** – *International Agency for Research on Cancer*
- INCA** – *Instituto Nacional de Câncer*
- IPMN** – *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*
- KRAS** – *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*

MBD3L2 – Methyl-CpG binding domain protein 3-like 2
mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)
miRNA – microRNA
tiRNA – *Transcription initiation RNAs*
MCN – *Mucinous Cystadenoma*
MTT – 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MUC1 – *Mucin 1*
MUC5A – *Mucin 5A*
NFKb2 – *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*
OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*
PanIN – *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*
PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*
piRNA – *Piwi-interacting RNAs*
PRIMA-1 – *p53 reactivation and induction of massive apoptosis*
qRT-PCR – PCR quantitativo por transcrição reversa (*Quantitative Reverse Transcription PCR*)
RNA – Ácido Ribonucleio (*Ribonucleic Acid*)
snRNA – *Small nuclear RNAs*
snoRNA – *Small nucleolar RNAs*
SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression*
SBRT – *Stereotactic Body Radiation Therapy*
SHH – *Sonic Hedgehog*
SMAD4 – *SMAD Family member 4*
STK11 – *Serine/threonine kinase 11*
TMA – *Tissue Microarray*
TP53 – *Tumor Protein 53*
VHL – *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*
VIP – *Vasoactive intestinal peptide*
TGF-β – *Transforming Growth Factor β*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de mortalidade por câncer de pâncreas, por 100.000 habitantes, entre os anos de 2001 e 2011. Adaptada do Atlas de Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer 2013.....	20
Figura 2. Principais alterações nas vias de sinalização celular detectadas no adenocarcinoma ductal pancreático.....	28
Figura 3. Modelo de progressão das PanINs para o adenocarcinoma ductal pancreático.....	30
Figura 4. Representação esquemática da frequência de mutações somáticas nos diferentes códons do gene <i>TP53</i> , dos éxons 1 a 11 do gene <i>TP53</i> e dos respectivos domínios funcionais da proteína p53	36
Figura 5. Espectro das mutações no gene <i>TP53</i> no câncer de pâncreas	37
Figura 6. Mecanismos ativadores da proteína p53 e suas atividades supressoras tumorais.....	38
Figura 7. Alterações na conformação da cromatina pelas enzimas modificadoras de histonas.....	40
Figura 8. A) Curva ROC para o painel de 4 biomarcadores salivares (<i>KRAS</i> , <i>MBD3L2</i> , <i>ACRV1</i> e <i>DPM1</i>). B) Comparação entre os resultados do qRT-PCR para os quatro biomarcadores combinados no grupo de pacientes sem câncer (pancreatite crônica e controles saudáveis) e com câncer de pâncreas. (Zhang et al., 2010).	46
Figura 9. Drogas ativadoras da proteína p53 e os seus diferentes mecanismos de ação	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síndromes de predisposição hereditária associadas ao câncer de pâncreas	23
Tabela 2. Categorias dos pacientes segundo o risco de desenvolverem câncer de pâncreas em relação à população geral	24
Tabela 3. Tumores neuroendócrinos do pâncreas.....	26
Tabela 4. A) Classificação TNM pela AJCC/UICC. B) Estadiamento do câncer de pâncreas.....	48

RESUMO

O adenocarcinoma ductal pancreático é uma neoplasia cuja incidência é quase igual à mortalidade. Os principais fatores que contribuem para a baixa sobrevida no câncer de pâncreas incluem a sua biologia tumoral agressiva, o diagnóstico tardio e a baixa eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis. Com o presente estudo, objetivamos identificar biomarcadores com potencial diagnóstico, bem como novas terapias que possam contribuir para o controle do câncer de pâncreas. Para isso, foram propostas duas diferentes linhas de investigação: o estudo de biomarcadores salivares como possíveis ferramentas para a detecção do câncer de pâncreas e a avaliação de novas drogas (isoladas e em combinação) em linhagens de adenocarcinoma ductal pancreático. Dessa forma, os objetivos específicos desse trabalho foram: 1) estudar a expressão dos genes *KRAS* e *DPM1* na saliva de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático, pancreatite crônica e controles sem doença pancreática; 2) avaliar a reativação farmacológica da proteína p53 mutante pelo composto PRIMA-1 em linhagens tumorais de adenocarcinoma ductal pancreático e 3) investigar o efeito da combinação do composto PRIMA-1 com o inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio.

Para os estudos de expressão gênica, foram conduzidas análises por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para determinar a expressão dos genes *KRAS* e *DPM1* em amostras de saliva. Em relação aos estudos com linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático, foram selecionadas três tipos com diferentes padrões de expressão da proteína p53: PANC-1 (*TP53* p.R273H), CAPAN-2 (*TP53 wild-type*) e BxPC-3 (*TP53* p.Y220C) foram utilizadas como modelos *in vitro*. Para avaliar a resposta celular às drogas, foram realizados estudos de viabilidade celular (MTT), apoptose (AnexinaV/FITC), ciclo celular (BrDU), western-blot e transfecção por siRNAs.

Em relação às análises de expressão gênica em saliva, encontramos uma diferença significativa na expressão de *KRAS* em amostras de câncer de pâncreas, quando comparado aos níveis de expressão em amostras de indivíduos controles. No entanto, uma alta expressão foi detectada também em amostras de

pacientes com pancreatite crônica, sugerindo uma baixa especificidade para esse marcador. Nos estudos com novas terapias, observamos que o emprego do composto PRIMA-1 induziu a apoptose de forma seletiva nas células com p53 mutante (PANC-1), redução na síntese de DNA e parada no ciclo celular (G2/M) 12h após o tratamento na dose de 75 μ M, efeito que foi intensificado pela associação com o inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio.

Os resultados encontrados indicam que o gene *KRAS* pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico não invasivo de doenças pancreáticas, merecendo estudos complementares e com um número maior de amostra. Também indicam que o composto PRIMA-1 é capaz de controlar a proliferação e induzir apoptose de forma sustentada em células de câncer de pâncreas com mutações no gene *TP53*, sugerindo um novo alvo potencial para o tratamento dessa neoplasia, especialmente em combinação com outros compostos como os inibidores de desacetilases de histonas.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma is a cancer for which incidence rates are almost equal to mortality. The main factors that contribute to the poor survival in pancreatic cancer include its aggressive tumor biology, its late diagnosis and low efficacy of currently available treatments. In this study, we aimed to identify biomarkers with diagnostic and prognostic potential as well as new therapies for pancreatic cancer control. In order to achieve this goal, two different strategies were proposed: the evaluation of salivary biomarkers as potential tools for the detection of pancreatic cancer and the evaluation of new drugs - alone and in combination - in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. Thus, the specific aims of this study were: 1) to study the expression of *KRAS*, *DPM1*, *MBD3L2* and *ACRV1* mRNAs in salivary samples from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, chronic pancreatitis and controls without pancreatic lesions; 2) to evaluate pharmacological reactivation of mutant p53 by PRIMA-1 in pancreatic cancer cell lines and 3) to investigate the effect of combining PRIMA-1 with the histone deacetylase inhibitor Sodium Butyrate.

For gene expression studies, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analyses were performed to determine the expression of *KRAS*, *DPM1*, *MBD3L2* and *ACRV1* mRNAs in salivary samples. The *in vitro* studies were conducted in three different types of cell lines: PANC-1 (*TP53* p.R273H), Capan-2 (wild-type *TP53*) and BxPC-3 (*TP53* p.Y220C). Studies of cell viability (MTT), apoptosis (Annexin-V / FITC), cell cycle (BrDU), western blot and transfection by siRNAs were performed in order to evaluate the cell lines response to PRIMA-1.

A significant difference in *KRAS* expression was found when comparing samples of pancreatic cancer with those from subject controls. However, a high expression was also detected in samples from chronic pancreatitis patients, suggesting a low specificity for this marker. In the study with new therapies, we observed that PRIMA-1 induced apoptosis selectively in cells with mutant p53 (PANC -1), as well as reduction in DNA synthesis and cell cycle arrest (G2/M) after 12h treatment at the dose of 75 μ M. Furthermore, PRIMA-1 effects were enhanced by combination with the MDM2/p53 interaction inhibitor Nutlin-3, with

several chemotherapeutic compounds and with the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate.

Our results indicate that the *KRAS* gene may be a potential biomarker for the non-invasive diagnosis of pancreatic disease, deserving further studies in larger series. They also indicate that PRIMA-1 is able to control the proliferation and to induce apoptosis in a sustained manner in pancreatic cancer cells with *TP53* mutations, suggesting a potential new target for the treatment of this tumor, especially in combination with different compounds such as histone deacetylase inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas é uma neoplasia cuja incidência é quase igual à mortalidade. Nos Estados Unidos, as estimativas para o ano de 2013 indicavam 45.220 novos casos de neoplasia de pâncreas e 38.460 mortes, configurando a quarta causa de morte entre todos os cânceres (*American Cancer Society*, 2013). No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam que o câncer de pâncreas represente 2% de todos os tipos de câncer e que seja responsável por 4% do total de mortes por câncer (INCA, 2014).

Aproximadamente 95% dos tumores pancreáticos têm origem no pâncreas exócrino e são histologicamente classificados como adenocarcinoma ductal pancreático, sendo que os demais 5% são tumores originados de células endócrinas e acinares. A sobrevida em 5 anos do adenocarcinoma ductal pancreático é baixa quando comparada a outros tipos tumorais, variando de 5 a 10% de acordo com diferentes séries e sendo de aproximadamente 2% nos casos metastáticos ao diagnóstico (Jemal et al., 2011). Os principais fatores que contribuem para esta baixa sobrevida são a biologia tumoral agressiva, o diagnóstico tardio e a baixa eficácia dos tratamentos em casos avançados. Poucos são os casos (15-20%) em que há condições de ressecabilidade cirúrgica no momento do diagnóstico. A maioria dos pacientes apresenta sintomas mais específicos somente em fases tardias, não havendo um método rotineiro de rastreamento que possa identificá-los em um estágio precoce da doença. Estudos com ecoendoscopia em pacientes de alto risco têm obtido resultados promissores na identificação de lesões precursoras, no entanto, mais estudos são necessários para avaliar o impacto sobre a sobrevida desses pacientes (Canto et al., 2013). Em relação ao tratamento clínico, diferentes estudos com novas terapias têm sido conduzidos para a definição do melhor tratamento adjuvante e paliativo para o câncer de pâncreas, mas poucos têm tido êxito na diminuição das taxas de progressão, recidiva e óbito por essa neoplasia (Ghosn et al., 2014).

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PÂNCREAS

No Brasil, não dispomos de publicações rotineiras e atualizadas sobre a ocorrência do câncer de pâncreas, uma vez que as taxas de incidência desse tumor registradas pelo INCA não são publicadas junto à estimativa anualmente liberada das 10 neoplasias mais frequentes no país. Em relação à taxas brasileiras de mortalidade, entre os anos de 2001 e 2011, o câncer de pâncreas foi a sexta causa de morte por câncer entre os homens, atrás do câncer de pulmão, próstata, estômago, esôfago e do câncer colorretal (Atlas de Mortalidade por Câncer do INCA, 2013). Já entre as mulheres, o câncer de pâncreas foi o sétimo em mortes por câncer, seguindo o câncer de mama, pulmão, colorretal, colo de útero e estômago. Os estados do Sul do Brasil apresentam as maiores taxas de mortalidade entre homens e mulheres por câncer de pâncreas: Rio Grande do Sul (5,78/100.000), Santa Catarina (4,69/100.000) e Paraná (4,65/100.000). A Figura 1 mostra a representação espacial das taxas de mortalidade por câncer de pâncreas divididas por sexo e estado.

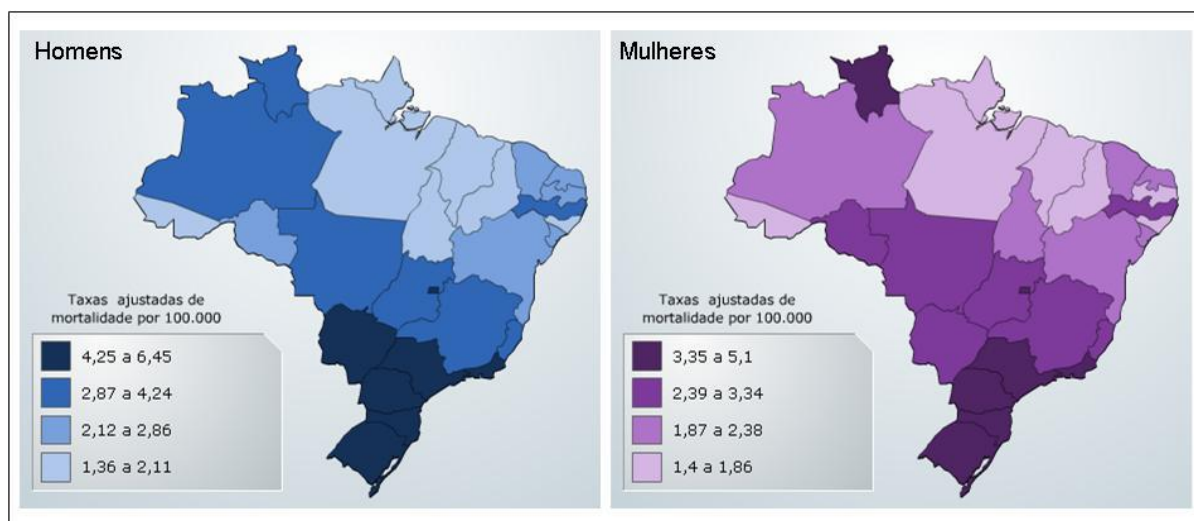


Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de mortalidade por câncer de pâncreas, por 100.000 habitantes, entre os anos de 2001 e 2011. Adaptada do Atlas de Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer 2013.

Os principais fatores de risco relacionados ao câncer de pâncreas incluem: idade avançada, sexo masculino, tabagismo, etnia afro-americana, obesidade, diabetes, história pessoal de pancreatite crônica, alcoolismo, história familiar, exposição ocupacional a solventes à base de hidrocarbonetos clorados e fibrose cística (Wynder et al., 1973; Gold et al., 1998; Ardengh et al. 2008; Vincent et al., 2011). Alguns estudos têm identificado também os grupos sanguíneos não-O e a ocorrência de infecção pelo *Helicobacter pylori* como fatores de risco. A idade avançada é o fator de risco demográfico mais relevante, com 80% dos carcinomas pancreáticos ocorrendo em indivíduos entre 60 e 80 anos. Em relação aos fatores ambientais, o tabagismo é o fator de risco mais importante e consistente. Estudos epidemiológicos sugerem que até 30% dos casos de câncer de pâncreas podem ser associados ao cigarro, estimando-se um risco relativo de 10 vezes para tabagistas que consomem mais de 40 cigarros durante o dia (Lowenfells e Maisonneuve, 2004). O alcoolismo é outro fator que tem sido associado ao câncer de pâncreas, porém de forma mais inconsistente. Apenas no grupo de indivíduos tabagistas essa relação tem sido descrita de forma mais consoante entre os diferentes estudos (Lowenfells e Maisonneuve, 2004).

Considerando estudos envolvendo pacientes com pancreatite crônica, os riscos relativos descritos variam de 4 a 14 vezes em relação a indivíduos saudáveis. Observa-se um aumento da incidência proporcional ao tempo de evolução da doença, sendo que a cada década há aumento no risco de aproximadamente 2%. A incidência é de 1,8% aos 10 anos após o diagnóstico de pancreatite e 4% após 20 anos. (Malka et al., 2005). A pancreatite hereditária, também denominada pancreatite familiar, está associada a mutações no gene *PRSS1* e acrescenta um risco ainda mais significativo (53 vezes) de desenvolvimento do câncer de pâncreas. A pancreatite hereditária deve ser suspeitada em pacientes com uma idade precoce ao diagnóstico (<25 anos), dois episódios prévios de pancreatite aguda sem etiologia definida, história familiar positiva e ausência de outras causas, como alcoolismo e cálculos biliares (Lowenfells et al., 1997; Brand et al., 2007). O padrão de herança é autossômico dominante com penetrância incompleta (Joergensen et al., 2010).

Em relação à história familiar de câncer de pâncreas, 10% dos pacientes com esse diagnóstico têm ou terão um parente de primeiro ou segundo grau acometido por esse tumor (Brand et al., 2000). Indivíduos com mais de três familiares de 1º grau com o diagnóstico apresentam um risco 32 vezes maior de desenvolver a doença. Pelo menos sete síndromes de predisposição hereditária ao câncer estão associadas a um risco elevado para o câncer de pâncreas: Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC, do inglês *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), Síndrome de Lynch, Síndrome do Melanoma Múltiplo Familiar Atípico (FAMM, do inglês *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*), Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes, Síndrome de Von-Hippel Lindau e Anemia de Fanconi (Tabela 1). Pacientes afetados pela síndrome de Peutz-Jeghers apresentam um risco cumulativo vital para o desenvolvimento de câncer de pâncreas de 36% (Giardiello et al., 1987) e, de acordo com uma metanálise englobando seis estudos, apresentam um risco 132 vezes maior para o desenvolvimento dessa neoplasia (Giardiello et al., 2000). A segunda principal síndrome de predisposição hereditária ao câncer de pâncreas, a Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários, eleva o risco de desenvolvimento da neoplasia em 3-9 vezes quando detectadas mutações no gene *BRCA2* (van Aaperen et al., 2005). Já em famílias com a Síndrome do Melanoma Múltiplo Familiar Atípico, caracterizada pela presença de 50 ou mais nevos displásicos e melanoma maligno em dois ou mais familiares de primeiro e/ou segundo graus, observa-se um risco cumulativo para a ocorrência do câncer de pâncreas de 17%, em grande parte relacionado a mutações germinativas no gene *CDKN2A* (Vasen et al., 2000).

A fibrose cística, condição genética autossômica recessiva associada a mutações no gene *CFTR*, leva à insuficiência pancreática e também está associada a um aumento no risco de câncer de pâncreas, de aproximadamente 2,6 vezes (Maisonneuve et al., 2003).

Tabela 1. Síndromes de predisposição hereditária associadas ao câncer de pâncreas.*

Síndrome	Gene Mutado	Principais características
Peutz-Jeghers	<i>LKB1/STK11</i>	Hamartomas gastrointestinais, pigmentação mucocutânea, câncer de mama, colorretal, ovário, testículos e pâncreas.
Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC)	<i>BRCA2/PALB2</i>	Câncer de mama, ovário, próstata, melanoma e pâncreas.
Síndrome de Lynch	<i>MLH1/MSH2/MSH6/PMS2</i>	Câncer colorretal, duodeno, pâncreas e vias biliares, ovário e endométrio.
Síndrome do Melanoma Múltiplo Familiar Atípico (FAMM)	<i>p16/CDKN2A</i>	Nevos atípicos múltiplos, melanoma e câncer de pâncreas
Síndrome de Li-Fraumeni e variantes	<i>TP53</i>	Sarcomas, câncer de mama, sistema nervoso central, próstata, melanoma, pâncreas, leucemia e carcinoma adrenocortical.
Von-Hippel Lindau	<i>VHL</i>	Hemangioblastomas de sistema nervoso central e retina, carcinoma renal, cistos renais, feocromocitoma, tumores císticos e sólidos de pâncreas, cistoadenoma de epidídimo e tumores de saco endolinfático.
Anemia de Fanconi	<i>FANCC/FANCG</i>	Baixa estatura, anomalias esqueléticas, leucemia e anemia aplástica, câncer de mama e pâncreas.

* Referências: *Gatti et al., 1999; Lowenfells e Maisonneuve, 2004, Brand et al., 2007 e Gonzalez et al., 2009.*

Os fatores de risco, uma vez identificados, podem ser categorizados em três escalas de risco para o câncer de pâncreas conforme a força de associação com o tumor: baixo, moderado e alto. O risco baixo é aquele aumentado de 1 a 5 vezes, o moderado de 5 a 10 vezes e o elevado, superior a 10 vezes se comparado à população geral (Ardengh et al., 2008). A Tabela 2 detalha essa categorização.

Tabela 2. Categorias dos pacientes segundo o risco de desenvolverem câncer de pâncreas em relação à população geral (Brand et al., 2007; Ardengh et al., 2008).

Risco baixo (aumentado 1-5 vezes)

Sexo masculino

Negros

Judeus de ascendência Ashkenazi

Obesos

Fumantes

Diabéticos

Indivíduos com infecção por *Helicobacter pylori*

Indivíduos com história de qualquer tipo de câncer em um parente de 1º grau

Indivíduos com câncer colorretal (não polipose)

Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em um parente de 1º grau

Indivíduos com mutação genética em *BRCA1*

Risco moderado (aumentado 5-10 vezes)

Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em dois parentes de 1º grau

Indivíduos com fibrose cística

Indivíduos com pancreatite crônica

Indivíduos com mutação genética *BRCA2* ou *PALB2*

Risco alto (aumentado mais de 10 vezes)

Indivíduos com síndrome de Peutz-Jeghers

Indivíduos com pancreatite hereditária

Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em dois parentes de primeiro grau, diabéticos há 3 anos ou menos e fumantes

Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em três ou mais parentes de 1º, 2º ou 3º grau

Possivelmente: indivíduos com mutações *BRCA1* e *BRCA2*, com pelo menos um parente de 1º e 2º grau com câncer de pâncreas

1.2. ASPECTOS DA PATOLOGIA DOS TUMORES PANCREÁTICOS

Entre os diferentes tipos histológicos, o adenocarcinoma ductal pancreático é a neoplasia pancreática mais comum, correspondendo a 90-95% de todos os tumores pancreáticos e originando-se de células ductais que compõem o pâncreas exócrino. Em relação aos demais tumores malignos originados de componentes exócrinos, algumas variantes histológicas de carcinoma podem ser encontradas, tais como: carcinoma adenoescamoso (associada a um pior prognóstico), carcinoma coloidal, carcinoma medular, carcinoma com células em anel de sinete, carcinoma com células gigantes semelhantes a osteoclastos e subtipo indeterminado. As neoplasias endócrinas, por sua vez, são representadas pelos tumores originários e não-originários das ilhotas pancreáticas. Insulinomas, glucagonomas, somatostatínomas, VIPomas e PPomas são exemplos de tumores endócrinos originários das células das ilhotas de Lagerhans, enquanto gastrinomas, tumores produtores de ACTH e os tumores carcinóides fazem parte do grupo não-originário das ilhotas (Tabela 3). As neoplasias pancreáticas endócrinas são relativamente raras, apresentando uma incidência de 1 caso por 100.000 pessoas ao ano, mas têm um melhor prognóstico que os tumores exócrinos do pâncreas (Tejani and Saifi, 2014).

Tabela 3. Tumores neuroendócrinos do pâncreas.*

Tipo Histológico	Peptídeos biologicamente ativos secretados	Malignidade	Principais sinais e sintomas
Insulinoma	Insulina	10%	Sintomas hipoglicêmicos
Glucagonoma	Glucagon	75%	Eritema migratório necrolítico, intolerância à glicose, perda ponderal.
Somatostatinoma	Somatostatina	>70%	Diabetes mellitus, colelitíase, diarreia
VIPoma	VIP	50%	Diarréia profusa, hipocalcemia, desidratação.
PPoma	-	90%	Dor abdominal, icterícia, perda ponderal.
Gastrinoma	Gastrina	50%	Dor abdominal, diarreia, ulcerações pépticas, refluxo gastroesofágico.
ACTHoma	ACTH	>95%	Síndrome de Cushing.
Tumor carcinóide	Serotonina, taquicinas	60-88%	Diarréia, rubor, dor, asma, cardiopatia.

* Adaptada de Jensen RT. Endocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Harrison's principles of internal medicine. 17 th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p. 2347-58.

1.2.1 Características anatomopatológicas e moleculares dos adenocarcinomas ductais pancreáticos

O adenocarcinoma ductal pancreático é uma neoplasia de características infiltrativas que comumente apresenta-se com invasão vascular e perineural na avaliação anátomo-patológica. A maioria dos tumores ocorrem na cabeça do pâncreas (65%) e associam-se a uma apresentação clínica mais precoce, com ocorrência de icterícia obstrutiva e pancreatite secundária. Já os tumores de corpo (15%) e cauda (10%) costumam ter um diagnóstico mais tardio, apresentando um pior prognóstico (Corbo et al.; 2012). Dois aspectos são

característicos dos adenocarcinomas ductais pancreáticos: alta invasividade e intensa reação não-neoplásica no tecido adjacente, composta por fibroblastos linfócitos e matriz extracelular (denominada “reação desmoplásica”). Microscopicamente, observa-se a formação de estruturas tubulares ou agregados celulares, exibindo um padrão de crescimento invasivo e infiltrante em camadas profundas do tecido epitelial. As glândulas malignas são atípicas, irregulares, pequenas e geralmente revestidas por células epiteliais cubóides a colunares anaplásicas.

Os tumores compatíveis com a histologia de adenocarcinoma ductal pancreático são compostos por diferentes elementos, incluindo células neoplásicas malignas, células tronco tumorais e componentes estromais. Estudos recentes sugerem que as células malignas costumam apresentar mais de 60 alterações genéticas, as quais podem ser agrupadas em 12 principais vias de sinalização (Jones et al., 2008 – Figura 2). Tais achados sugerem que o câncer de pâncreas seja uma neoplasia extremamente complexa e heterogênea do ponto de vista molecular, possível razão pela sua agressividade e alta taxa de resistência a diferentes terapias. Dessa forma, tratamentos combinados com diferentes alvos e tratamentos individualizados de acordo com o perfil molecular tumoral de cada paciente podem ser a única forma efetiva de controle dos casos inoperáveis, progressões e recidivas.

Em relação às células tronco tumorais pancreáticas, sabe-se que elas compõem aproximadamente 5% do tecido tumoral, sendo capazes de gerar tanto células malignas maduras, quanto novas células tronco tumorais. Essas células tronco tumorais são altamente resistentes às diferentes terapias, mas alterações mais comuns nesse grupo celular, como mutações nos genes *Wnt/B-catenina*, *Notch* e *Sonic Hedhog*, podem ser alvos terapêuticos em potencial.

Os adenocarcinomas ductais pancreáticos também são caracterizados por um estroma denso, pouco vascularizado, composto de elementos celulares e não celulares, responsáveis pela secreção autócrina e parácrina de fatores de crescimento tais como: PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *Platelet-Derived Growth Factor*) e TGF-B (do inglês *Transforming Growth Factor B*). As células pancreáticas estreladas também são elementos de grande

importância no estroma tumoral. Sob o estímulo dos fatores de crescimento, essas células produzem fibras de colágeno que contribuem para a hipóxia tumoral.

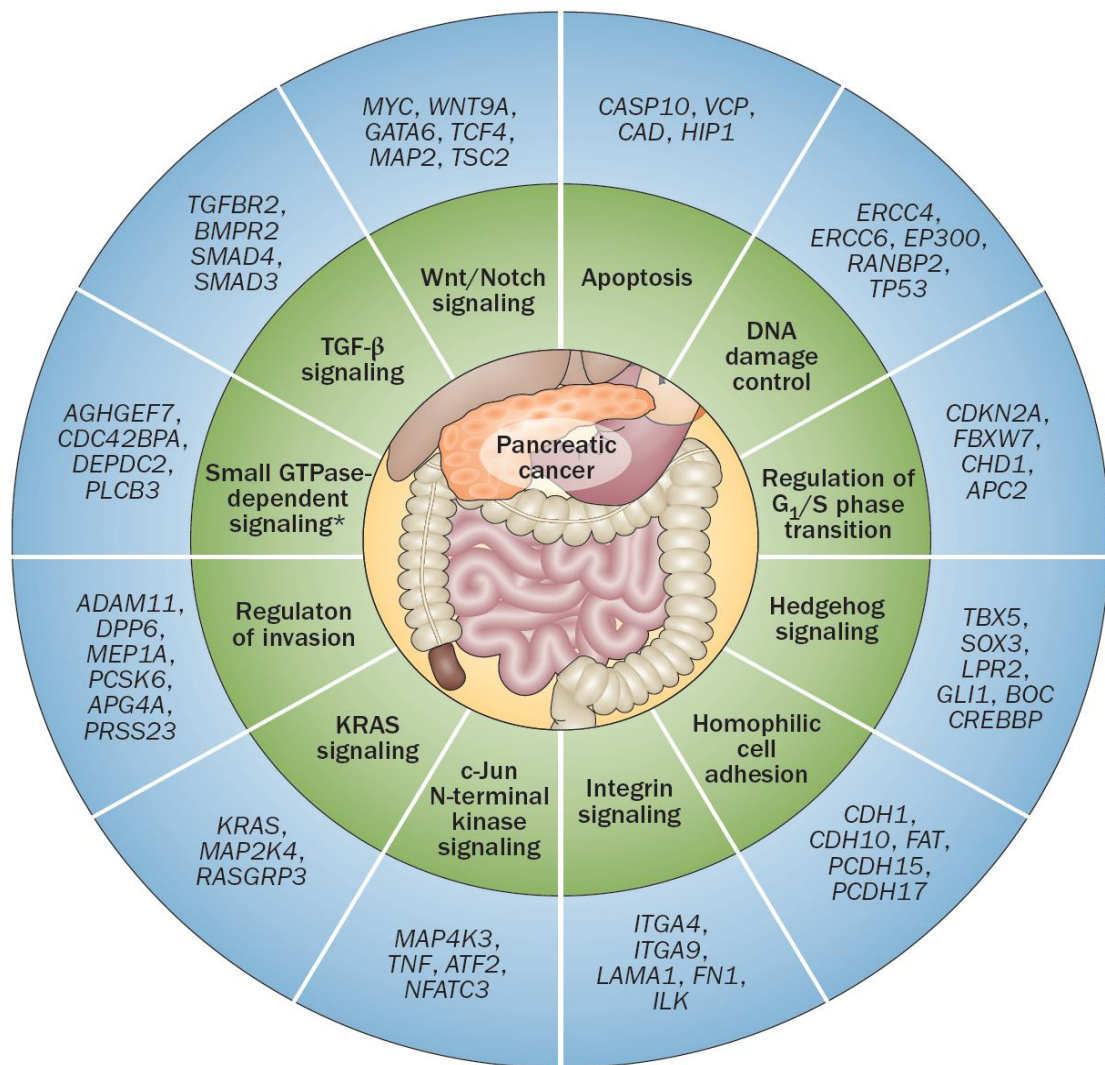


Figura 2. Principais alterações nas vias de sinalização celular detectadas no adenocarcinoma ductal pancreático (Samuel e Hudson, 2012).

1.3. ASPECTOS MOLECULARES DA CARCINOGENESE DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

Atualmente existem claras evidências da progressão do epitélio pancreático não-neoplásico para lesões precursoras não-invasivas e adenocarcinomas invasivos. A primeira evidência clínica e morfológica da relação entre as lesões precursoras e a ocorrência do adenocarcinoma ductal pancreático foi descrita há mais de um século, com a identificação de lesões pancreáticas intraductais sincrônicas e adjacentes a lesões de adenocarcinoma no tecido ductal pancreático (Hulst, 1905). Apesar do imenso hiato temporal, apenas nas últimas duas décadas conseguiu-se um avanço significativo na compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese pancreática, bem como em relação às alterações moleculares relacionadas ao processo tumorigênico. As três principais lesões precursoras relacionadas à progressão para o adenocarcinoma invasor são as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanINs, do inglês “*pancreatic intraepithelial neoplasia*”), as neoplasias císticas intraductais mucinosas papilíferas (IPMNs, do inglês “*intraductal papillary mucinous neoplasm*”) e os cistoadenomas mucinosos (MCN, do inglês “*mucinous cystadenoma*”). A detecção e eliminação dessas lesões precursoras podem impedir o aparecimento do adenocarcinoma invasivo, contribuindo para a redução da mortalidade relacionada ao câncer pancreático.

1.3.1 Modelo de carcinogênese das PanINs

As PanINs são as lesões pancreáticas precursoras mais comuns e costumam ser divididas em quatro principais categorias: PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2 e PanIN 3. Com base nos perfis genéticos e histológicos dessas lesões precursoras, foi desenvolvido um modelo de progressão do ducto pancreático normal para displasias de baixo grau (PanIN 1A e 1B), displasias de alto grau (PanIN 2 e 3) e, finalmente, para o adenocarcinoma ductal pancreático (Hubran et al, 2000) (Figura 3).

As lesões precursoras PanIN 1A e 1B são caracterizadas pelo crescimento das células ductais com uma abundante produção de mucina e, no caso das PanINs 1B, a arquitetura papilar substitui a arquitetura plana. Além da presença de mutações em proto-oncogenes, essas lesões são caracterizadas pela ativação da via de sinalização autócrina do fator de crescimento epidermal EGF, com a superexpressão de ligantes como o fator de transformação do crescimento, TGF- α e de receptores como o EGFR. Com a progressão das lesões, as células adquirem alterações nucleares moderadas (PanIN 2) e mais severas, com mitoses anormais e invasão do lúmen (PanIN 3) (Schneider et al, 2005).

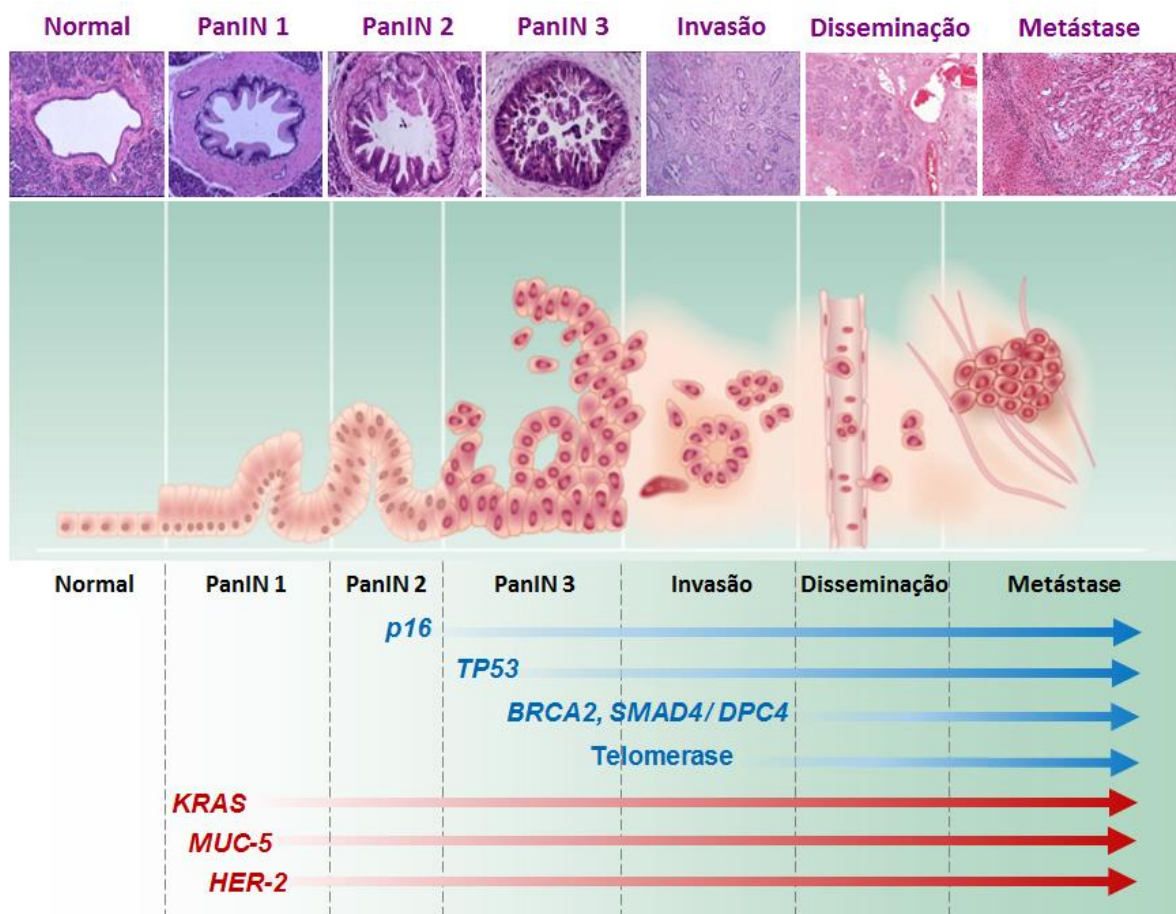


Figura 3. Modelo de progressão das PanINs para o adenocarcinoma ductal pancreático. Adaptado de Corbo et al., 2012.

Em relação às principais alterações moleculares detectadas nessas lesões precursoras, sabe-se que as mutações ativadoras do oncogene *KRAS* são as primeiras e principais alterações genéticas detectadas durante a progressão

tumoral, ocorrendo em 90-95% dos adenocarcinomas ductais pancreáticos. As proteínas codificadas por este gene pertencem à classe monomérica das GTPases e, dessa forma, mutações no gene *KRAS* resultam em um ganho de função constitutivo, pois a proteína RAS permanece em seu estado ativo mesmo na ausência de sinais externos, favorecendo a proliferação celular e supressão da apoptose. De forma semelhante, a hiperexpressão da glicoproteína transmembrana HER-2, codificada pelo gene *HER-2/neu (ErbB2)* é uma alteração precoce, já sendo detectada nas PanINs 1A e hiperplasias sem atipia. Outra alteração detectada já nas PanINs 1 e 2 é a hiperexpressão do gene *SHH*, o qual codifica a proteína sinalizadora Sonic Hedgehog.

No que concerne às alterações em genes supressores de tumor, 80 a 95% dos adenocarcinomas ductais pancreáticos apresentam perda de função do gene supressor *p16INK4A*, também denominado *CDKN2A*. A proteína codificada pertence à família dos inibidores de quinase dependentes de ciclina, e atua impedindo a fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB1) e consequente liberação dos fatores de transcrição E2F. Esses fatores, quando liberados, ativam a transcrição de um conjunto de genes cujos produtos são essenciais à progressão para a fase de síntese do ciclo celular (S). Desse modo, a inativação do gene *p16INK4A* resulta na fosforilação inadequada da proteína RB1, facilitando a progressão do ciclo celular de G1 para S (Maitra e Hruban, 2008). O gene *p16INK4A* pode estar inativado no câncer de pâncreas por deleções homozigóticas (40%), mutações intragênicas com perda do segundo alelo (40%) e silenciamento gênico por hipermetilação da região promotora (15%) (Caldas et al., 1994). Essa inativação ocorre a partir das PanINs 1B, sendo detectada em 50% das PanINs 2 e 85% das PanINs 3.

O gene *TP53*, um dos principais genes supressores tumorais, encontra-se mutado em 50-75% dos casos de câncer de pâncreas (Rozenblum et al, 1997). Tais mutações são eventos mais tardios na transformação neoplásica, assim como as alterações nos genes *BRCA2* e *SMAD4/DPC4*. As modificações no gene *TP53* e suas consequências, bem como o potencial da proteína p53 como alvo terapêutico, serão discutidas mais adiante.

Outra alteração encontrada com frequência ao longo do processo da carcinogênese pancreática é a perda de função do gene supressor *SMAD4/DPC4*, o qual codifica a proteína SMAD4, um importante componente da via de sinalização TGF- β que regula negativamente a proliferação de células epiteliais. Essa regulação se dá pelo bloqueio da transição G1/S e pela promoção da apoptose. Sabe-se que o gene *SMAD4/DPC4* encontra-se em uma região que está deletada em 28% das PanINs 3 e aproximadamente 30% dos casos de adenocarcinoma ductal pancreático, sendo considerada uma alteração mais tardia.

1.3.2 Modelo de carcinogênese dos IPMNs

Os IPMNs são lesões precursoras que ocorrem no ducto pancreático principal ou em suas ramificações. Em geral, esse tipo de lesão é mais frequentemente encontrada na cabeça do órgão pancreático e, em um terço dessas lesões, encontra-se um componente de carcinoma invasivo (Matthaei et al., 2011). Aproximadamente 60% dos IPMNs localizados no ducto principal apresentam displasia de alto grau e 45%, um componente de carcinoma invasor. A importância clínica da detecção precoce desse tipo de lesão já foi demonstrada por diferentes estudos, em que pacientes com IPMNs não invasivos submetidos à ressecção cirúrgica apresentaram taxa de sobrevida em 5 anos acima de 90%, enquanto pacientes que apresentavam IPMNs já com componente invasivo detectável, apresentaram uma sobrevida de apenas 50% em 5 anos (Salvia et al., 2004; Sohn et al., 2004). Em revisão publicada recentemente, Yamaguchi e colaboradores sugeriram que adenocarcinomas ductais pancreáticos originados de lesões IPMN são menos agressivos que os originados de PanINs, apresentando uma taxa de sobrevida média em torno de 47 meses (Yamaguchi et al., 2011).

Em 2006, foram definidos os Critérios de Sendai para nortear o manejo dos IPMNs considerando a possibilidade de progressão para adenocarcinoma. Tais critérios recomendam a ressecção cirúrgica nos casos de: 1) IPMN de ducto principal ou 2) IPMN de ducto secundário sintomático, > 3 cm, com nódulo mural

associado ou dilatação ductal. Além disso, também deve ser indicada intervenção cirúrgica nos casos de citológico sugestivo de atipia nuclear (Tanaka et al., 2006).

Estudos recentes com análises de exoma identificaram 26 mutações somáticas recorrentes entre os IPMNs (Wu et al., 2011a). As alterações mais comuns foram detectadas no códon 12 do genes *KRAS* e, em menor frequência, no códon 13 do mesmo gene (Wu et al., 2011b). O segundo gene mais acometido por mutações foi o *GNAS*, oncogene que atua como um transdutor de sinal entre receptores hormonais e adenilil ciclases. Em estudo posterior, do mesmo grupo, foi sugerido que mutações no gene *GNAS* sejam específicas de lesões pancreáticas do tipo IPMN, uma vez que não foram identificadas em outros tipos de neoplasias pancreáticas e, no caso de adenocarcinomas, só o foram quando os mesmos eram provenientes de lesões precursoras do tipo IPMN (Wu et al., 2011b).

1.3.3 Outros modelos de carcinogênese

Outro possível modelo de progressão do adenocarcinoma pancreático ocorre a partir de lesões do tipo cistoadenoma mucinoso (MCN), mais raras que as PanINs e os IPMNs (Crippa et al., 2010). As alterações moleculares identificadas na progressão dessas lesões são muito semelhantes às apresentadas pelas PanINs, com a ativação do gene *KRAS* já sendo observada nas displasias de baixo grau e mutações nos genes *TP53* e *SMAD4/DPC4* ocorrendo em displasias mais avançadas. A expressão aumentada dos genes *MUC5A* e *MUC* está associada a características não invasivas das MCNs, enquanto a expressão dos genes *MUC1* associa-se a propriedades invasivas (Luttges et al., 2002).

1.3.4 O gene *TP53* e a proteína p53 na carcinogênese pancreática

O gene supressor tumoral *TP53* (OMIM #191170), que codifica a proteína p53, ocupa uma posição de destaque nesse complexo processo de carcinogênese. Inicialmente identificado como um gene com função de reparo do

DNA, o *TP53* foi intitulado “Guardião do Genoma”, termo utilizado para ressaltar a sua importante função como supressor tumoral, uma vez que está envolvido no bloqueio do processo de proliferação em células com alterações gênicas, levando à parada no ciclo celular e/ou apoptose. Está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e possui onze exons, sendo o primeiro não codificante.

O gene *TP53* é um dos mais frequentemente afetados no adenocarcinoma ductal pancreático, sendo inativado por mutações do tipo “*missense*”, ou perda de sentido, com a substituição de um único aminoácido que não impede a produção de uma proteína completa e relativamente estável. Essas mutações podem ser classificadas em dois grandes grupos estruturais, de acordo com o seu efeito na estabilidade da proteína p53: mutações de contato com o DNA e mutações conformacionais. As mutações de contato ocorrem por uma alteração em um resíduo diretamente envolvido na interação da proteína p53 com o DNA, porém sem afetar a estrutura protéica. Já nas mutações conformacionais, ocorre uma modificação em um determinado resíduo que afeta dramaticamente a conformação da região de ligação com o DNA, expondo resíduos que não estão normalmente expostos na conformação selvagem da proteína p53. Em ambos os grupos, independente do tipo de mutação, a proteína resultante perde a sua capacidade de ligar-se aos seus genes alvos como fator de transcrição. Como resultado, ocorre uma perda de função, com consequente diminuição na capacidade de supressão tumoral (Joerger e Fersht, 2007; Joerger e Fersht, 2008; Oren e Rotter, 2010).

Além da perda da atividade normal da proteína p53, alguns mutantes podem apresentar um efeito dominante negativo sobre a forma selvagem da p53, quando tem-se alelos selvagem e mutado. Nesses casos, pode ocorrer a formação de homodímeros com moléculas mutantes e selvagens de p53, resultando na conformação de heterotetrâmeros que, mesmo contendo moléculas selvagens, não apresentam função transcricional (Chan et al., 2004; Lubin et al., 2010). Dessa forma, a estrutura mutante tem a capacidade de “sequestrar” as formas selvagens, mantendo-as em heterotetrâmeros defeituosos de p53.

Por fim, além da perda de função e do efeito dominante negativo, algumas proteínas mutantes adquirem uma nova atividade transcricional, além de

propriedades distintas daquelas observadas na molécula selvagem, conferindo uma estrutura mutante com ganho de função. Esse ganho de função pode conferir propriedades oncogênicas ao mutante. Acredita-se que esse efeito oncogênico observado ocorre principalmente pela regulação positiva ou negativa de genes como *MAP23K3*, *c-myc*, *PCNA*, *FOS*, *BCL-2*, *NFKb2* e diversos outros associados a proliferação, migração, invasão, resistência a quimioterápicos e progressão tumoral (Deb et al., 1992; Frazier et al., 1998; Brosh e Rotter, 2009; Dell'Orso et al., 2011).

Em relação à estrutura da proteína p53, cinco são os domínios existentes, cada um responsável por funções específicas (Hollstein et al., 2010 - Figura 4). A região N-terminal da proteína possui dois subdomínios iniciais de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação da proteína MDM2 e um domínio rico em prolina, envolvido na interação proteína-proteína e na função pró-apoptótica da proteína p53. Na região central, há um domínio de ligação ao DNA, altamente conservado evolutivamente, que inclui os exons 5 ao 8 e é responsável pela ligação da proteína p53 aos seus genes alvos. A região C-terminal é formada pelo domínio de oligomerização, o qual possui papel fundamental para a conformação quaternária da proteína p53. Por fim, há um domínio final de regulação, região relacionada à fosforilação da proteína p53 (Levine, 1997; Hollstein et al., 2010)

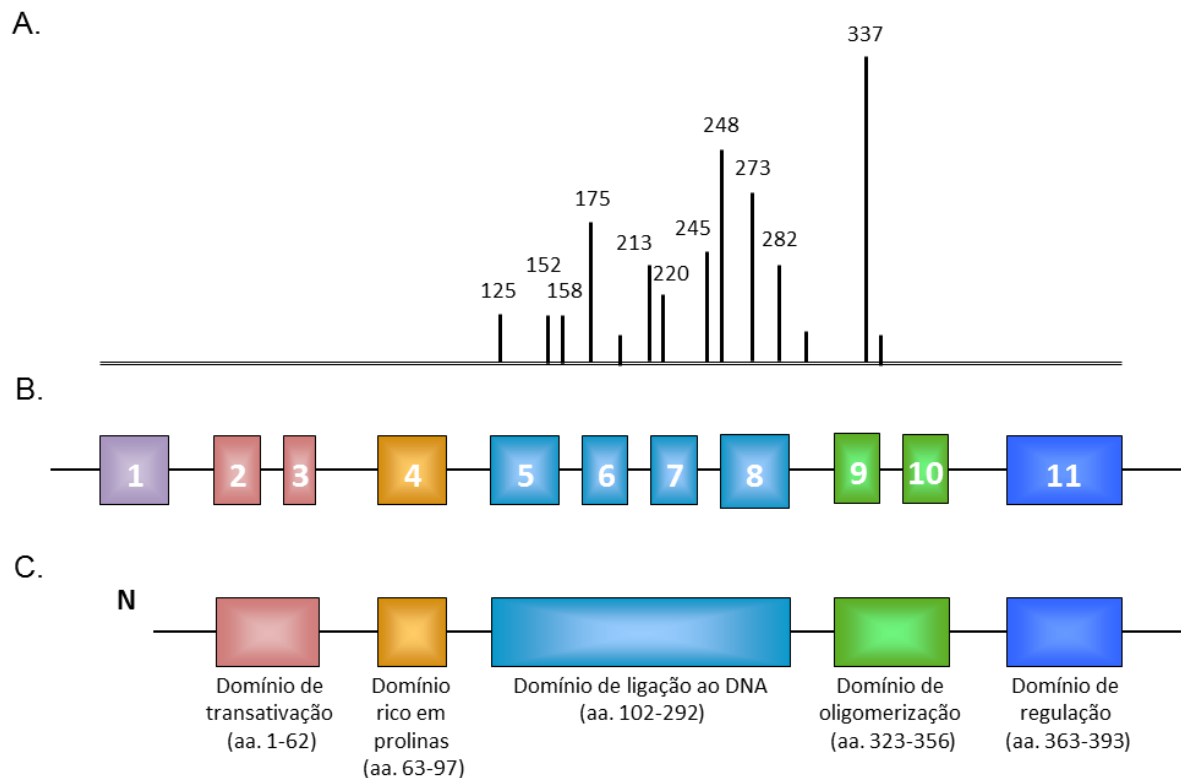


Figura 4. **A)** Representação esquemática da frequência de mutações somáticas recorrentes nos diferentes códons do gene *TP53*. Modificado de IARC *TP53* database 2014. **B)** Representação dos éxons 1 a 11 do gene *TP53* e **C)** representação da proteína p53 com seus respectivos domínios funcionais. Cada cor corresponde ao domínio da proteína e seus respectivos éxons codificantes.

Alterações somáticas no gene *TP53* ocorrem em praticamente todos os tipos tumorais, sendo descritas em 50-70% dos tumores pancreáticos (Redston et al., 1994; Rozemblum et al., 1997) e 30-50% dos tumores de ovário, esôfago, cólon, cabeça e pescoço e pulmão (Olivier et al., 2010). Aproximadamente 90% das mutações no gene *TP53* encontram-se entre os códons 125 e 300, em regiões denominadas “hotspots”. Essa região gênica compreende os éxons 5 ao 8 que correspondem ao domínio de ligação da proteína p53, e mutações nessa região prejudicam a função da proteína como fator de transcrição. No câncer de

pâncreas, as principais mutações ocorrem em três códons preferenciais: 175, 248 e 273 (IARC TP53 Database, 2014) (Figura 5).

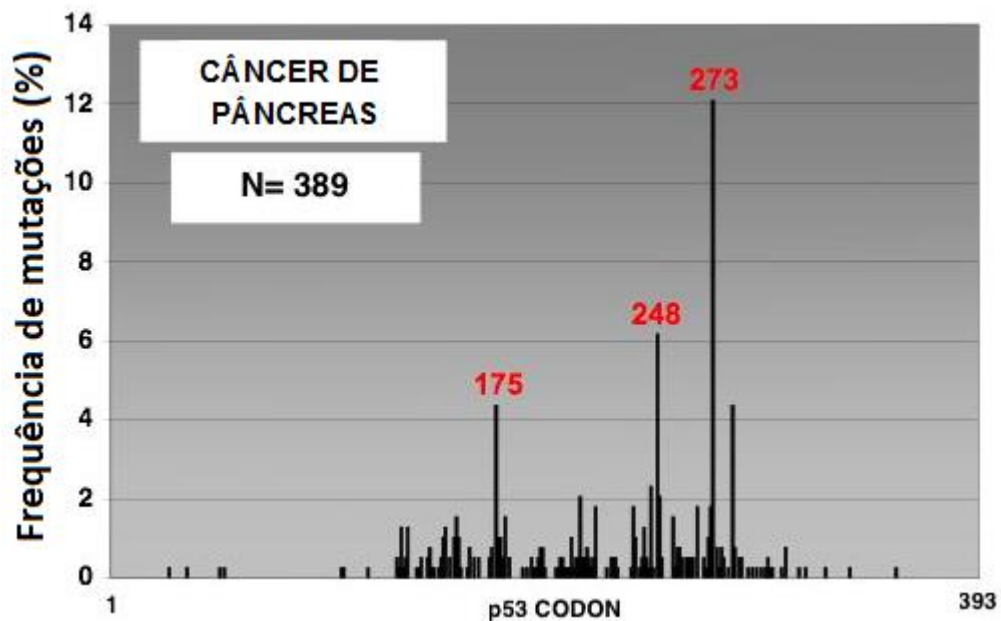


Figura 5. Espectro das mutações no gene *TP53* no câncer de pâncreas. Adaptado de “*The Universal Mutation p53 Database*” (<http://p53.iarc.fr>).

A proteína p53 atua como um fator de transcrição ativada por danos ao DNA, hipóxia, estresse oxidativo, deprivação energética, encurtamento telomérico, entre outros (Figura 6). Alguns fatores como a natureza e a intensidade do estresse e o tipo celular determinam o tipo de resposta celular a a ser desencadeada. Uma das principais formas de controle tumoral pela proteína p53 se dá pelo bloqueio do ciclo celular e pela indução de apoptose. Quando ativada por quebras bifilamentares no DNA, a proteína ATM fosforila e estabiliza a proteína p53, a qual induz a transcrição do gene *p21* que será responsável pela indução da parada no ciclo celular. Outra importante atividade supressora de tumor mediada pela proteína p53 é a inibição do crescimento e proliferação celular pela ativação dos genes *Gadd45* e *14-3-3 sigma*. A senescência, um mecanismo de parada do ciclo celular até o momento tido como irreversível, também pode ser induzida via p53. Lesões pré-malignas, por exemplo, parecem

ser eficientemente desviadas da progressão maligna por senescência mediada pela proteína p53.

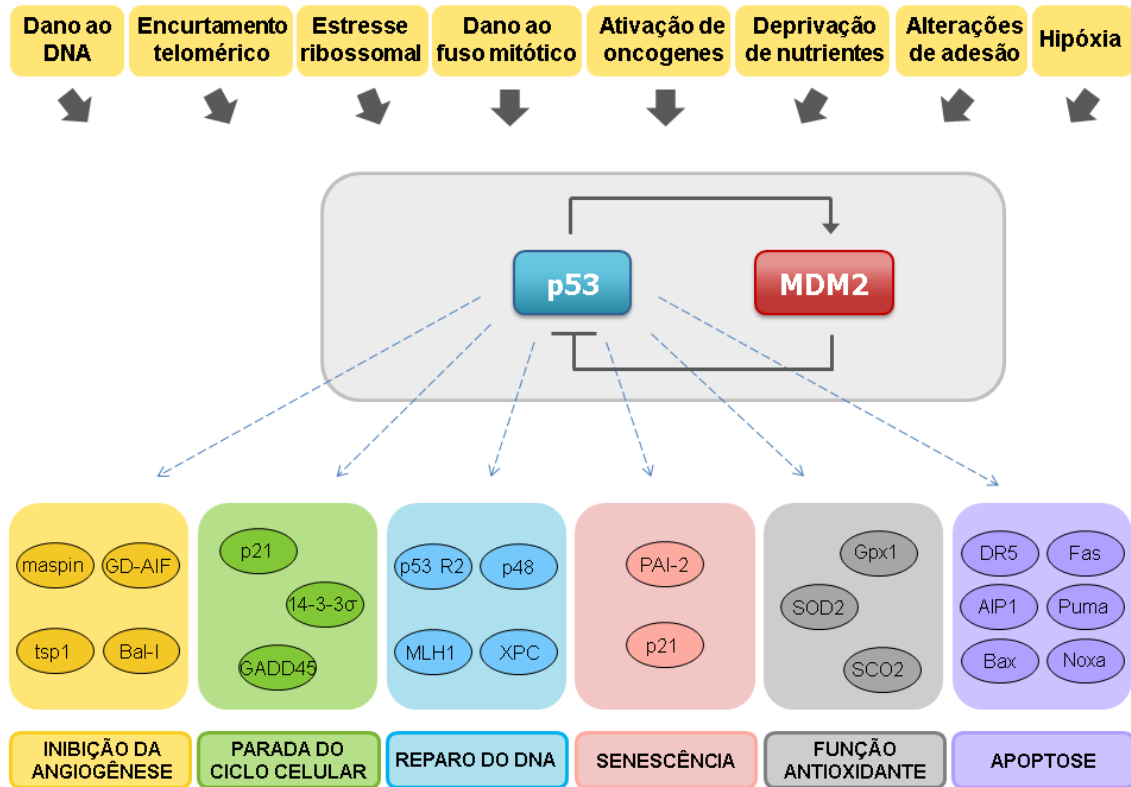


Figura 6. Mecanismos ativadores da proteína p53 e suas atividades supressoras tumorais.

Em condições normais, a proteína p53 encontra-se em baixos níveis celulares, e seu principal regulador é a proteína Mdm2 pela formação de um complexo p53/Mdm2. Este complexo possibilita o redirecionamento da proteína p53 do núcleo para o citoplasma, onde a proteína Mdm2 age como uma ubiquitina-ligase, possibilitando a degradação da p53 pelos proteossomos.

Na presença de situações de estresse celular que levam ao dano do DNA, a p53 é rapidamente induzida e as células normais aumentam sua expressão para que o ciclo celular seja bloqueado até que haja o reparo do DNA. Por outro lado, proteínas p53 mutantes podem se tornar mais estáveis ou escapar ao mecanismo regulatório da proteína Mdm2, acumulando-se na célula.

1.4 ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO CÂNCER DE PÂNCREAS

Um dos estudos mais relevantes para a compreensão da biologia molecular do câncer de pâncreas foi conduzido por Jones e colaboradores e publicado em 2008 (Jones et al., 2008), tendo identificado 63 alterações genéticas recorrentes no adenocarcinoma ductal pancreático, na maioria mutações pontuais que afetam 12 principais vias de sinalização. Metodologias de análise em larga escala baseadas em plataformas de microarranjos para avaliar os padrões de expressão gênica têm sido usadas extensivamente para a busca de genes diferencialmente expressos no câncer de pâncreas. Desde a publicação de Gress e colaboradores (Gress et al., 1996), a qual identificou 369 ESTs (do inglês “*Expressed Sequence Tags*”) diferencialmente expressos no adenocarcinoma ductal pancreático, o uso de plataformas de microarranjos tem sido aplicada recorrentemente (Buchholz et al., 2001, Badea et al., 2008; Sergeant et al., 2012). Além da plataforma de microarranjos, outras técnicas como a análise de transcriptoma utilizando *SAGE* (do inglês “*Serial analysis of gene expression*”) também têm encontrado resultados promissores para a melhor compreensão do câncer de pâncreas (Hustinx et al., 2004; Yang et al., 2010).

1.5 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

Existem dois principais mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese: as modificação no padrão de acetilação das histonas e a metilação do DNA. A metilação do DNA, na qual grupos metila quimicamente se ligam à citosina, é o processo epigenético mais bem estudado, inclusive no câncer de pâncreas (Tan et al., 2009), estando associada ao silenciamento da expressão gênica e à progressão tumoral. A metilação ocorre quase que exclusivamente nas repetições de citosinas ao lado de guaninas - as chamadas ilhas CpG – e, quando o DNA encontra-se hipermetilado, a cromatina fica inativa, impedindo a transcrição dos genes. Já os mecanismos de modificação das histonas reestruturam a conformação da cromatina, o que interfere na regulação da transcrição de genes localmente ou globalmente. A cromatina contendo lisinas

hipoacetiladas nas caudas das histonas possui uma estrutura compacta repressiva da transcrição. Por outro lado, a presença de certas lisinas acetiladas na cauda das histonas está associada com cromatina menos condensada (eucromatina) e genes transcricionalmente ativos (Figura 7). No contexto de silenciamento por desacetilação de histonas, os genes supressores de tumor se tornam inativos, o que contribui para o desenvolvimento tumoral (Koutsounas, et al. 2013; Womann et al., 2013; Menditi et al., 2007).

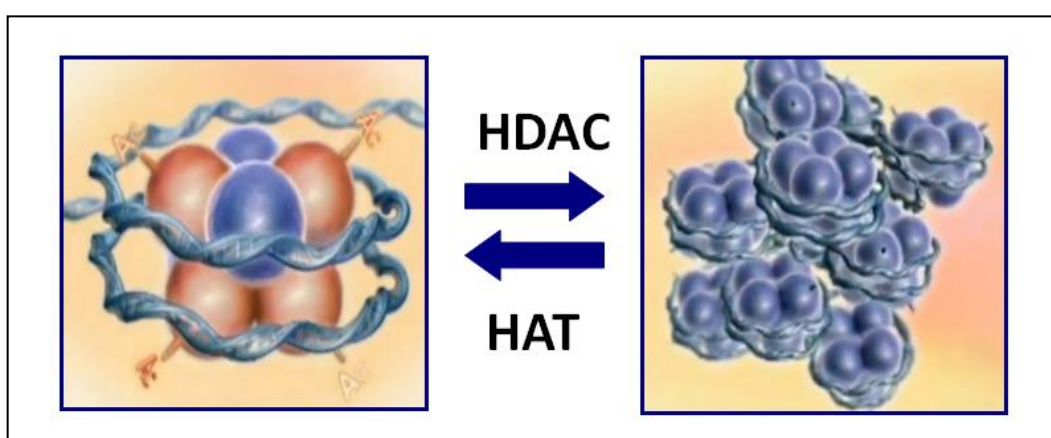


Figura 7. Alterações na conformação da cromatina pelas enzimas modificadoras de histonas. HDAC: histonas desacetilases; HAT: histonas acetiltransferases.

1.5.1 Modificações em histonas

Níveis estacionários de acetilação no núcleo das histonas resultam do balanço das atividades antagonistas das histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (Wade et al., 2001) (Figura 6). O desequilíbrio no processo de acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras, apresentado por várias classes de tumores, contribui para a desregulação da expressão gênica e associa-se à carcinogênese e progressão do câncer, tornando-se alvo de intensa investigação nos últimos anos (Lehrmann et al., 2002; Villar-Garea et al., 2004). A consequência da atividade alterada dessas enzimas modificadoras de histonas levando a uma maior acetilação ou desacetilação e

consequente expressão de oncogenes ou silenciamento de genes supressores de tumor ainda não é bem compreendida no processo de carcinogênese pancreática (Seligson et al., 2005). Já existem várias evidências indicando que a desregulação no processo de acetilação das histonas contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer de pâncreas (Peulen et al., 2013), mas mais estudos sobre o seu papel no diagnóstico, prognóstico e tratamento são necessários.

Diferenças nos níveis de expressão das histonas modificadas possuem relação com desfechos clínicos avaliados em certos tipos de câncer, tais como próstata, rim, pulmão, estômago, ovário e câncer de mama (Seligson et al., 2009; Elsheikh et al., 2009). Elsheikh et al. (2009), por exemplo, investigou o padrão de expressão das histonas acetiladas H3K9ac, H3K18ac e H4K12ac em 880 amostras de câncer de mama, tendo encontrado uma correlação significativa com variáveis clínico-patológicas e prognóstico. Níveis baixos a moderados de acetilação foram observados em carcinomas com prognóstico mais reservado.

Em relação ao câncer de pâncreas, apenas um estudo prévio avaliou a correlação entre a expressão de histonas acetiladas detectadas por imunohistoquímica em amostras de câncer de pâncreas com o prognóstico observado (Manuyakorn et al., 2010). Nesse estudo observou-se que níveis baixos de histonas 3 acetiladas na lisina 18 (H3K18ac) foram preditores independentes de sobrevida, bem como de uma pior resposta ao tratamento com 5-fluorouracil, no caso de pacientes estágio I e II. No entanto, nenhum estudo posterior foi conduzido para avaliar a acetilação em outras lisinas e outras histonas descritas como biomarcadores em outros tipos de tumores, nem em pacientes com doença pancreática avançada (estádios III e IV).

1.6 PAPEL DOS MICRORNAS NO CÂNCER DE PÂNCREAS

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs de fita simples, de 18 a 25 nucleotídeos de tamanho, resultantes de uma sequência de clivagens enzimáticas a partir de uma molécula precursora. Esses pequenos

RNAs fazem parte da classe de RNAs não codificantes (ncRNAs), os quais são categorizados em função do seu tamanho: RNAs longos (lncRNAs) possuem tamanho maior do que 200 nucleotídeos e os RNAs curtos, menores que 200 nucleotídeos (Clark and Mattick, 2011). Os principais ncRNAs curtos identificados até o momento incluem os *micro RNAs* (miRNAs), *small nuclear RNAs* (snRNAs), *small nucleolar RNAs* (snoRNAs), *Piwi-interacting RNAs* (piRNA) e os *transcription initiation RNAs* (tiRNAs).

A organização genômica dos miRNAs é bastante diversa e representa 1-4% do genoma humano, estimando-se que regulem aproximadamente 30% de todos os transcritos gênicos. Estudos recentes sugerem que 70% dos genes codificadores de miRNAs localizam-se em introns e éxons e os 30% restantes, em regiões intergênicas (Rachagani et al, 2010). Esses genes também parecem estar frequentemente localizados em regiões genômicas associadas ao câncer e em pontos de quebra cromossômicos, bem como em regiões de frequente perda de heterozigosidade, sugerindo um possível envolvimento dos miRNAs na iniciação e na progressão de diversos tumores humanos (Rachagani *et al*, 2010).

A associação entre miRNAs e câncer foi proposta pela primeira vez em 2002, em um estudo envolvendo leucemia linfocítica crônica e a deleção cromossômica 13q14. Em relação ao adenocarcinoma ductal pancreático, um dos primeiros estudos foi publicado em 2006, por Lee e colaboradores (Lee et al., 2006), e encontrou um aumento na expressão dos miRNAs -155, -21, -221, -424, -301 e -100.

O miRNA mais extensivamente estudado no câncer de pâncreas, até o momento, é o miR-21, que também tem sido associado a muitas outras neoplasias. O miR-34a, componente da via de p53, é outro miRNA com importante papel no adenocarcinoma ductal pancreático, parecendo atuar como um supressor tumoral e encontrando-se subexpresso nesses tumores (Chang et al, 2007; Tarasov et al 2007; Hermeking, 2010). Atualmente sabe-se que existem diversos mecanismos responsáveis pela redução nos níveis de expressão de miR-34a, como a supressão do gene *TP53* (Chang et al, 2007), a deleção da região genômica responsável por sua transcrição (Calhoun et al, 2006) e a metilação aberrante do seu promotor (Lodygin et al, 2008). Em um estudo com

linhagens de câncer de pâncreas com mutações no gene *TP53*, a transfecção de miR-34a foi capaz de restaurar a função supressora de tumor da proteína p53 e de inibir a expressão de Bcl-2, diminuindo assim as taxas de crescimento celular e invasão e induzindo a apoptose e parada no ciclo celular (Ji, 2009). Estudos posteriores mostraram que pacientes cuja expressão tecidual de miR-34a é alta, apresentam melhor prognóstico após ressecção cirúrgica, com maior sobrevivência do que os pacientes com baixos níveis de miR-34a (Jamieson et al, 2012).

1.7 BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE

Poucos são os métodos diagnósticos atualmente disponíveis capazes de detectar com precisão e precocemente o adenocarcinoma ductal pancreático na população geral, antes do início dos sintomas. Na sua fase inicial, o câncer pancreático pode gerar apenas um desconforto na região epigástrica, associada ou não à irradiação para a região dorsal. Com a sua progressão, sintomas mais perceptíveis como perda ponderal, fraqueza, náuseas e vômitos, icterícia e acolia podem ocorrer. Diferentes técnicas para a identificação do adenocarcinoma ductal pancreático em fase inicial têm sido testadas, como a realização de ecoendoscopia em pacientes de alto risco, mas os resultados ainda são iniciais e controversos. Testes com biomarcadores (proteínas, mRNAs, microRNAs e outras moléculas) também têm sido desenvolvidos e propostos para o diagnóstico de lesões pancreáticas precursoras, na tentativa de detectar o tumor em estádios ressecáveis e curáveis. Biomarcadores podem ser detectados no soro, plasma, tecido, saliva, urina, entre outros fluídos e materiais biológicos. No caso de tumores malignos, os biomarcadores podem, ainda, ser capazes de auxiliar no estadiamento, predição de prognóstico e resposta terapêutica, bem como na detecção de recidivas.

1.7.1 Biomarcadores séricos e plasmáticos

Entre os vários biomarcadores circulantes identificados até o momento, o CA19-9 (antígeno carboidrato 19-9) tem sido o mais extensamente estudado no câncer de pâncreas, embora também possa estar elevado em pacientes com câncer de esôfago, estômago, vias biliares e câncer colorretal (Kannagi, 2007), além de condições benignas como pancreatite crônica, cistos de ovário, insuficiência cardíaca, tireoidite de Hashimoto, artrite reumatóide, diverticulite e hiperbilirubinemia (Kim et al. , 2004). O CA 19-9 é um carboidrato relacionado ao grupo sanguíneo Lewis, apresentando como valor de referência o limite de 37U/ml. Cerca de 5% da população é Le (a-b-), ou seja, incapaz de expressar o marcador CA 19-9.

Devido aos seus baixos valores de sensibilidade (70-80%) e especificidade (68-91%), o CA19-9 não é um marcador indicado para o rastreamento do câncer de pâncreas, nem mesmo em pacientes de alto risco, servindo apenas para complementação na avaliação clínica durante o processo diagnóstico e para a predição de recidivas ou metástases após o tratamento cirúrgico, quimio ou radioterápicos (Passerini et al., 2012).

Estudos mais recentes têm tentado avaliar o papel da expressão de miRNAs circulantes como possíveis marcadores diagnósticos para a detecção do câncer de pâncreas. Em 2012, uma análise genômica de larga escala realizada em amostras de soro de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático, identificou 44 miRNAs superexpressos e 19 miRNAs subexpressos, sendo que apenas sete apresentavam níveis de expressão significativamente diferentes entre casos e controles: miR-20a, -21, -24, -25, -99a, -185 e -191. O estudo mostrou, ainda, que pacientes com altos níveis de miR-21 exibiam uma menor taxa de sobrevida quando comparados a pacientes com baixos níveis de expressão. Os autores criaram, então, um painel com os sete miRNAs diferencialmente expressos e avaliaram a sua expressão em um grupo de 55 pacientes com suspeita de adenocarcinoma ductal pancreático. O painel demonstrou uma sensibilidade de 83,6% para o diagnóstico da neoplasia nesses pacientes, valor superior às taxas de sensibilidade do marcador CA19-9 (56,4%) e do CEA (36,4%) encontradas nestas mesmas amostras (Liu et al, 2012).

1.7.2 Biomarcadores salivares

Os achados iniciais com biomarcadores séricos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo genômico e proteômico e, nesse contexto, a avaliação de biomarcadores presentes na saliva surge como uma metodologia interessante, considerando a não invasividade do método e o relativo baixo custo.

Os primeiros estudos a avaliarem a expressão de biomarcadores na saliva de pacientes com câncer oral foram publicados há mais de duas décadas (Negri et al., 1988; Therkildsen et al., 1993), mas apenas no ano 2000 foi publicado o primeiro trabalho demonstrando uma associação entre um biomarcador salivar e um câncer em sítio distante da cavidade oral (Streckfus et al., 2000). Nesse estudo, Streckfus e colaboradores identificaram níveis significativamente mais altos da proteína Her-2/neu em amostras de saliva de pacientes com câncer de mama, quando comparadas a pacientes saudáveis. Desde então, diferentes estudos têm avaliado alterações genômicas, proteômicas, epigenéticas e transcriptômicas na saliva de pacientes afetados por câncer (Bonne et al., 2012), incluindo adenocarcinoma ductal pancreático (Zhang et al., 2010; Sugimoto et al., 2010). No entanto, entre todas as metodologias para detecção de biomarcadores salivares descritas até o momento, as análises de transcriptoma têm apresentado as maiores taxas de sensibilidade e especificidade, apresentando maior potencial de translação para a prática clínica (Bonne et al., 2012).

O único estudo de análise transcriptômica em saliva de pacientes com câncer de pâncreas, publicado por Zhang et al. (2010), encontrou um perfil significativamente diferente entre pacientes com câncer e controles sem câncer, obtendo uma sensibilidade de 90% e especificidade de 95% a partir da detecção dos mRNAs *KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* e *DPM1* (Figura 8). Tais resultados foram considerados animadores e sugerem um papel importante da avaliação de biomarcadores salivares na investigação de tumores do pâncreas.

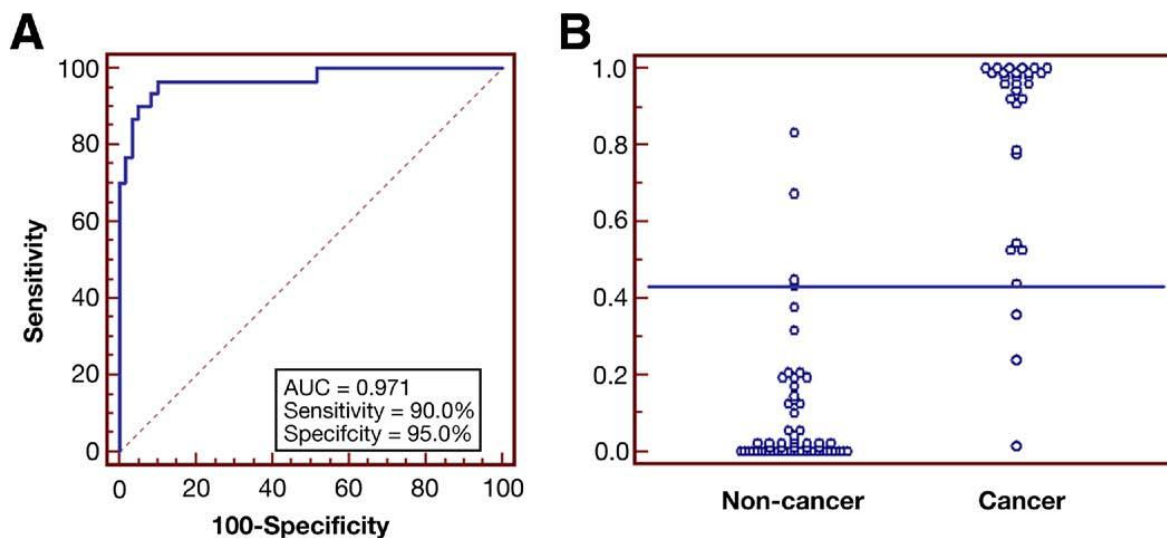


Figura 8. A) Curva ROC para o painel de 4 biomarcadores salivares (*KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* e *DPM1*) descrito por Zhang e colaboradores (2010). **B)** Comparação entre os resultados do qRT-PCR para os quatro biomarcadores combinados no grupo de pacientes sem câncer (pancreatite crônica e controles saudáveis) e com câncer de pâncreas.

1.8 FATORES E MARCADORES PROGNÓSTICOS

Vários são os fatores determinantes de prognóstico no adenocarcinoma ductal pancreático: localização, extensão do tumor primário, grau histológico, presença ou ausência de invasão perineural, ocorrência de metástases linforregionais e à distância. Parâmetros laboratoriais, como baixos níveis de hemoglobina (<12g/dl) e albumina (<2,8g/dl) pré-operatórios, também são descritos como relacionados a um pior prognóstico (Ruiz-Tovar et al., 2011). No pós-operatório, a identificação de margens positivas na análise anátomo-patológica também está associada a um prognóstico mais reservado.

Estudos mais recentes têm sugerido que a identificação de células tumorais circulantes (CTCs, do inglês *circulating tumor cells*) na corrente sanguínea de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático pode ser um importante fator de mau prognóstico, merecendo ainda uma melhor

caracterização e análise em larga escala para que possa ser empregada na prática clínica (Tjensvoll K et al., 2014).

1.8.1 Estadiamento do câncer de pâncreas

O Comitê Conjunto Americano em Câncer (AJCC, do inglês *American Joint Committee on Cancer*) e a União Internacional para o Controle do Câncer (UICC, do inglês *Union for International Cancer Control*) estabeleceram a combinação do sistema de estadiamento TNM para o câncer de pâncreas, baseado no tamanho do tumor primário e/ou invasão de estruturas adjacentes e na presença ou ausência de metástases nodais ou à distância para propor um estadiamento que reflita essas diferenças em termos prognósticos entre os diferentes pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (Tabelas 4A e 4B).

Tabela 4A. Classificação TNM proposta pela AJCC/UICC.

Tumor Primário (T)	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor limitado ao pâncreas, ≤ 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor limitado ao pâncreas, > 2 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor que se estende além do pâncreas, mas sem envolvimento do plexo celíaco ou artéria mesentérica superior
T4	Tumor que envolve o plexo celíaco ou artéria mesentérica superior
Linfonodos (N)	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodos regionais*
Metástase à distância (M)	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

*Linfonodos regionais: linfonodos peripancreáticos superiores, inferiores, anteriores e posteriores, esplênicos e celíacos

Tabela 4B. Estadiamento do câncer de pâncreas.

Estadiamento			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIB	T1,T2,T3	N1	M0
Estádio III	T4	Qualquer N	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.8.2 Biomarcadores prognósticos

Poucos são os estudos de biologia molecular com amostras de adenocarcinoma ductal pancreático que identificaram painéis de expressão gênica e imunohistoquímica capazes de estratificar pacientes de acordo com o seu prognóstico. Winter e colaboradores (2012) analisaram a expressão por imunohistoquímica de 13 biomarcadores previamente descritos por Harsha et al (2009) como potenciais determinantes prognósticos, estratificando os pacientes em grupos de sobrevida <12 meses e >30 meses. Ao final do estudo, que envolveu a técnica de “*Tissue Microarray*” (TMA), os pesquisadores identificaram os marcadores MUC1 e mesotelina como os melhores preditores de sobrevida entre todos os marcadores analisados. O estudo encontrou, ainda, uma maior associação entre os biomarcadores MUC1, MSLN e MUC2 e a sobrevida dos pacientes avaliados quando comparados com fatores preditores clínico-patológicos (tamanho tumoral, grau, positividade de linfonodos e margens). Outro estudo mais recente, realizado em amostras de suco pancreático coletadas do ducto pancreático principal no intraoperatório, identificou uma associação entre altos níveis das proteínas S100A8, A9 e mucinas com pior prognóstico (Chen et al., 2014).

Em relação aos fatores prognósticos associados à resistência terapêutica, Tsiaousidou e colaboradores (2013) identificaram três biomarcadores (B7H4, DJ-1 e HSP27) associados à resistência ao tratamento com gencitabina e pior sobrevida. No entanto, mais estudos são necessários a fim de determinar o real valor desses biomarcadores na prática clínica.

1.9 NOVAS TERAPIAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PÂNCREAS

Mais de 70 anos após a primeira descrição da técnica da duodenopancreatectomia por Whipple e colaboradores (1935), a resecção pancreática ainda permanece como a única modalidade terapêutica com potencial curativo no tratamento do câncer de pâncreas. Devido à extensão locorregional

e/ou disseminação metastática, até 80% dos tumores são irresssecáveis no momento do diagnóstico. Além disso, mesmo quando submetidos à cirurgia, apenas 20% dos pacientes ainda estão vivos ao final de 5 anos, devido às altas taxas de recidiva locorregional ou à distância (Kyriazanos et al., 2011).

Mesmo estando claro que a cirurgia isolada não é capaz de curar a maioria dos casos ressecáveis, não há um consenso com relação à melhor estratégia para o tratamento adjuvante desses casos. Atualmente, o tratamento quimioterápico com gencitabina é tido como padrão, mas novos agentes e esquemas de quimio e radioterapia, incluindo associações como o FOLFIRINOX (5-fluouracil, oxaliplatina e irinotecano), têm obtido resultados promissores, embora ainda sejam poucas as perspectivas terapêuticas para os casos irresssecáveis e/ou inoperáveis, bem como recidivados (Conroy et al., 2011; Ghosn et al., 2014). Em relação à radioterapia, estudos mais recentes com técnicas de radiocirurgia esterotáxica corpórea (SBRT) - a qual consiste na administração de altas doses de radiação consideradas ablativas apenas na região tumoral - têm conseguido altas taxas de controle local (Trakul et al., 2014), mas mais estudos e um maior tempo de follow-up são necessários para definir o real benefício desse tipo de tratamento.

1.9.1 Novas drogas alvo-moleculares

As drogas alvo-moleculares compreendem substâncias que agem destruindo células tumorais por meio de moléculas específicas que interferem no crescimento e na proliferação da célula neoplásica. Nas últimas duas décadas, foram desenvolvidas drogas como os inibidores de tirosina-quinases, que bloqueiam o processo de multiplicação celular (ex. erlotinib, imatinib, sorafenib), e os anticorpos monoclonais, que reconhecem e se ligam a locais específicos da membrana celular impedindo o envio de sinais de estímulo para a multiplicação e/ou sobrevivência celular (ex. trastuzumab, rituximab e cetuximab). Já os inibidores da angiogênese possuem o potencial de diminuir e/ou prevenir a formação de novos vasos tumorais, os quais permitem o crescimento e invasão

das células neoplásicas (ex. bevacizumab). No tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático, a droga alvo molecular mais investigada e com os melhores resultados obtidos até o momento é o erlotinib, inibidor do receptor de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês “*epidermal growth fator receptor*”). Além disso, alguns estudos também demonstraram um potencial sinergismo das drogas erlotinib e cetuximab (também inibidor do EGFR) com a radioterapia em casos avançados, sugerindo que a inibição da via de sinalização EGFR possa contribuir para a reversão da radioresistência típica dos tumores pancreáticos (Silvestris et al., 2014).

1.9.2 p53 como alvo terapêutico

Tratamentos farmacológicos que têm a proteína p53 como alvo incluem terapias direcionadas à proteína p53 mutante e à proteína p53 selvagem (Figura 9). Diferentes compostos foram identificados com potencial para reativação da proteína p53 mutante a partir de estudos estruturais, funcionais e regulacionais. Um dos primeiros compostos descobertos foi a Elipticina (*Ellipticine*), um alcalóide que demonstrou efeitos citotóxicos e antiproliferativos especificamente em células com mutação no gene *TP53* (Shi et al., 1998; Peng et al., 2003). Estudos posteriores, no entanto, mostraram que tal composto apresentava muitos efeitos não direcionados ao alvo principal, atuando também sobre outras enzimas, entre elas a topoisomerase II. Em 1999, outro composto reativador da proteína p53 mutante foi descoberto, o CP-31398, com capacidade de estabilizar o domínio de ligação da proteína mutante, induzir genes alvos da p53 como o p21 e reduzir o crescimento tumoral (Foster et al., 1999; Takimoto et al., 2002). Outras drogas identificadas e desenvolvidas com propriedades semelhantes, mas menos estudadas até o momento, incluem os compostos SCH529074, MIRA-1, MIRA-3, STIMA-1, RETRA e NSC319726 (Zache et al., 2008; Demma et al., 2010; Yu et al., 2012).

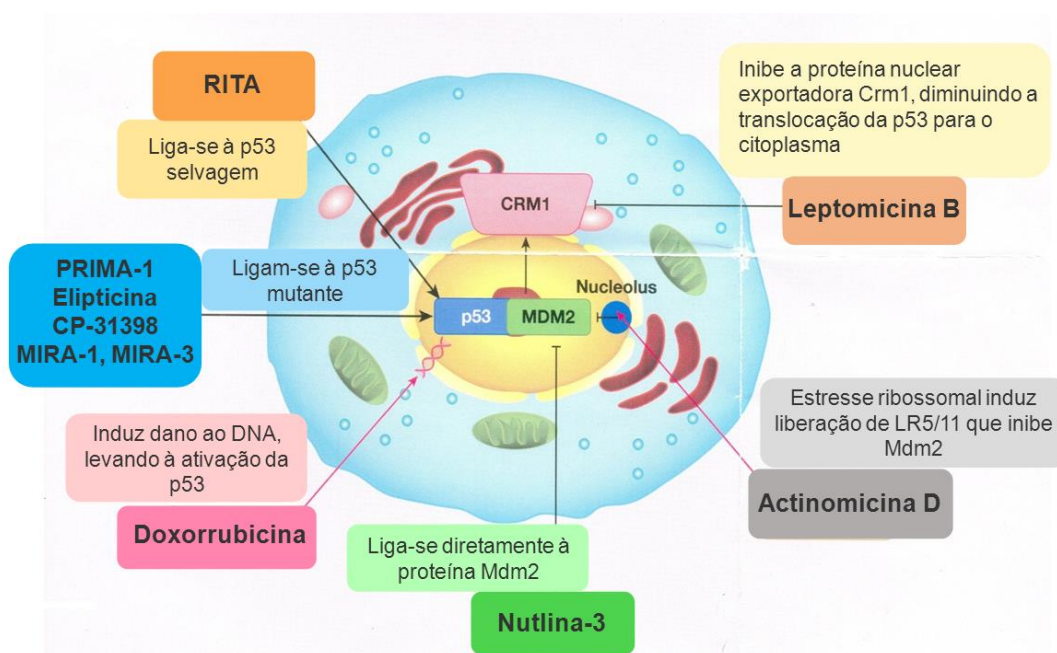


Figura 9. Drogas ativadoras da proteína p53 e os seus diferentes mecanismos de ação.

Há pouco mais de 10 anos, outra molécula restauradora da função supressora da proteína p53 foi descrita por Bykov e colaboradores (Bykov et al., 2002) e denominada PRIMA-1 (do inglês *p53-dependent reactivation and induction of massive apoptosis*). PRIMA-1 é um composto de baixo peso molecular que restaura a conformação selvagem à proteína p53 mutante, possibilitando a sua ligação ao DNA, com consequente indução de genes alvos e apoptose em células tumorais com mutações no gene *TP53* (Bykov et al., 2002; Bykov et al., 2005; Wiman, 2010). Um dos mecanismos de ação propostos para o composto PRIMA-1 inclui a modificação covalente dos grupos tióis no domínio de ligação da proteína p53 mutante (Lambert et al., 2009)

Diferentes estudos têm demonstrado o efeito da PRIMA-1 em linhagens de leucemia (Nahi et al., 2006), hepatocarcinoma (Shi et al., 2008), câncer de mama (Liang et al., 2007; Liang et al., 2009), cabeça e pescoço (Roh et al., 2011), tireóide (Messina et al., 2012) e pulmão (Magrini et al., 2008). Até o momento, nenhum estudo avaliou a resposta de linhagens celulares de adenocarcinoma

ductal pancreático com p53 mutante a esse composto, o que seria de grande interesse considerando a alta frequência de mutações no gene *TP53* entre os tumores malignos do pâncreas.

De todas as moléculas reativadoras da proteína p53 mutante, o composto PRIMA-1 parece apresentar o maior potencial para a translação para a prática clínica, uma vez que resultados preliminares de um ensaio clínico Fase 1 demonstraram ser uma droga segura, sem grandes toxicidades e com um perfil farmacodinâmico favorável (Lehmann et al., 2012).

Em relação às drogas que têm como alvo a proteína p53 selvagem, os compostos que atuam na via de sinalização da proteína Mdm2 com a p53 são as que vêm demonstrando um maior potencial terapêutico, sendo as principais a Nutlina-3 e o composto RITA (do inglês “*reactivation of p53 and induction of tumor apoptosis*”). A Nutlina-3 é uma imidazolina que interage com a proteína Mdm2, especificamente na região de ligação à proteína p53, impedindo a interação entre as duas proteínas e permitindo maior atividade à proteína p53 (Essmann & Schulze-Osthoff, 2011). Já o composto RITA, identificado por Issaeva e colaboradores em 2004, apresenta a capacidade de ligar-se à região N-terminal da proteína p53, induzindo uma mudança conformacional que impede a sua ligação à proteína reguladora Mdm2. Dessa forma, a proteína p53 selvagem permanece livre para exercer seus efeitos de indução de apoptose na células neoplásica. Alguns estudos mais recentes têm sugerido que o composto RITA também pode apresentar um potencial de reativação das proteínas p53 mutantes por conta dessa mudança conformacional que ele induz, mas mais estudos são necessários para confirmar esse outro possível modelo de ação (Zhao et al., 2010).

1.9.3 Drogas moduladoras de modificações epigenéticas

As enzimas desacetilases de histonas (HDACs) podem ser divididas em quatro diferentes classes e têm sido minuciosamente estudadas devido a dois motivos principais: por interferirem na rota de tumorigênese de diversos tipos de

câncer e porque pequenas moléculas inibidoras das HDACs (iHDAC) possuem a capacidade de interferir na atividade destas enzimas e atingir efeitos biológicos significativos em modelos pré-clínicos de câncer, tornando-se novos potenciais terapêuticos (Iwanoto et al., 2013).

Os inibidores das HDACs permitem a acetilação das histonas e convertem a heterocromatina em uma estrutura menos condensada, possibilitando a codificação de vários genes supressores envolvidos na inibição do crescimento tumoral (Ouasssi et al., 2008), incluindo o gene *TP53* (Bukreeva et al., 2009). Aproximadamente 60% dos tumores de pâncreas apresentam expressão da enzima HDAC1 detectada por imunohistoquímica, mas os estudos sobre o envolvimento dessa enzima na carcinogênese pancreática, bem como o seu papel como alvo terapêutico, ainda são limitados. Estudos prévios com iHDACs em linhagens de câncer de pâncreas encontraram respostas satisfatórias no seu uso isolado (Ouasssi et al., 2011; Wang et al., 2012), mas publicações recentes têm sugerido que tais inibidores tenham um potencial ainda maior como adjuvante em tratamentos combinados com quimioterápicos e/ou drogas alvo-moleculares (dos Santos et al., 2009; Abujamra et al., 2010; Sung et al., 2011; Venkannagari et al., 2012; Qiao et al., 2013).

A acetilação das histonas induzida pelos iHDACs leva a um aumento na expressão de genes supressores de tumor e uma diminuição na proliferação celular por uma parada no ciclo celular na fase G1 e/ou G2 do ciclo celular, com conseqüente apoptose e diferenciação terminal de células transformadas. Alguns estudos em pacientes com leucemia aguda, em que a expressão alterada de determinados genes está claramente relacionada ao início e à progressão da doença, demonstraram efeitos positivos com o emprego dos inibidores de desacetilases de histonas, inclusive como monoterapia (Leone et al., 2008). Estudos clínicos em andamento nos Estados Unidos já comprovaram a segurança desses compostos, inclusive com uma baixa taxa de efeitos adversos, o que favorece a sua aplicabilidade na prática clínica.

Existem diferentes compostos inibidores das desacetilases de histonas: 1) ácidos graxos de cadeia curta (derivados do ácido butírico e ácido valpróico); 2) ácidos hidroxâmicos (SAHA, do inglês "*Suberoylanilide Hydroxamic Acid*",

Piroxamida, Tricostatina A e ácido cinâmico-bishidroxâmico); 3) tetrapeptídeos cíclicos (Trapoxin, Apicidin e depsipeptídeo) e 4) benzamidas (Entinostat, entre outros). O butirato de sódio, derivado do ácido butírico, é um dos principais ácidos graxos de cadeia curta e evidências recentes têm sugerido que ele pode atuar reduzindo e inibindo a formação de neoplasias.

Em relação ao câncer de pâncreas, alguns estudos *in vitro* demonstraram o potencial *in vitro* do butirato de sódio, reduzindo a capacidade de invasão das células pancreáticas (Farrow et al., 2003) e tornando-as mais suscetíveis às vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose (Natoni et al. 2005). No entanto, nenhum estudo avaliou o seu papel como adjuvante no tratamento com drogas reativadoras de genes supressores, o que poderia ser interessante, uma vez que entre os seus mecanismos de ação está o aumento da transcrição desses genes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo consistiu em identificar biomarcadores e novas terapias para o câncer de pâncreas. Para isso, avaliamos o papel de biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce e a resposta ao tratamento com drogas alvo-moleculares em modelos *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- 2.1 Estudar a expressão dos genes *KRAS*, *DPM1*, *MBD3L2* e *ACRV1* na saliva de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático, pancreatite crônica e controles sem evidências de lesões pancreáticas;
- 2.2 Avaliar a reativação farmacológica da proteína p53 mutante pelo composto PRIMA-1 em linhagens tumorais de adenocarcinoma ductal pancreático,
- 2.3 Investigar o efeito da combinação do composto PRIMA-1 com o inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio.

Is there a role for KRAS as a salivary biomarker for pancreatic cancer detection?

Autores: Patricia Izetti, Bárbara Alemar, Cleandra Gregório, Úrsula Matte, Alessandro Bersch Osvaldt, Patricia Ashton-Prolla

Periódico: Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention

Situação: Em processo de submissão

Is there a role for KRAS as a salivary biomarker for pancreatic cancer detection?

Patricia Izetti^{1,2}, Bárbara Alemar^{1,2}, Cleandra Gregório^{1,2}, Úrsula Matte^{2,3}, Alessandro Bersch Osvaldt⁴, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,5},

1 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

2 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

3 Unidade de Análises Moleculares e Proteínas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

4 Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

5 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

Corresponding author:

Patricia Izetti, MD

Instituto Nacional de Câncer

Praça da Cruz Vermelha, nº 23

20230-130 - Rio de Janeiro – RJ, Brazil

e-mail: patriciaizetti@gmail.com

Phone number: + 55 213207-1660

ABSTRACT

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a leading cause of cancer-related deaths worldwide and detection of early disease through screening is likely the best way to meaningfully prolong survival. The development of biomarkers for screening holds enormous promise for increasing early detection and impacting mortality, and salivary mRNAs could be an interesting alternative in this scenario. In this study, we have assessed the expression of four salivary biomarkers for pancreatic cancer previously described in the literature.

Methods: We analyzed the expression levels of *KRAS*, *DPM1*, *ACRV1* and *MBD3L2* mRNAs in salivary samples from 25 patients with PDAC, 10 chronic pancreatitis and 10 control subjects. mRNA expression was assessed by qRT-PCR using TaqMan mRNA Assays.

Results: High levels of *KRAS* expression differentiated pancreatic cancer from controls, with a 72% sensitivity and 80% specificity (AUC=0.808, 95% CI: 0.662 – 0.954, $P=0.005$). However, no differences were observed when comparing *KRAS* expression levels in PDAC and chronic pancreatitis patients, suggesting that this marker may not have the power to distinguish malignant from benign diseases. *DPM1* was not differentially expressed across the groups and no detectable expression of *ACRV1* and *MBD3L2* was observed.

Conclusion: Our results suggest that salivary *KRAS* expression may possess a discriminatory power for the detection of patients with pancreatic disease, but not for distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis patients. This preliminary report provide evidence for the extended investigation of *KRAS* as a salivary biomarker for pancreatic diseases, contributing for the development of clinical validation studies in combination with other markers to increase its specificity.

Keywords: Salivary biomarkers; *KRAS*; pancreatic ductal adenocarcinoma.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive malignant tumors and a leading cause of cancer-related deaths worldwide. The reason behind the dismal prognosis of PDAC is multifactorial, being related to late-stage presentation, lack of effective treatment protocols, early locoregional recurrence and absence of clinically useful biomarkers that can detect pancreatic cancer in its precursor forms or earliest stages (Ballehaninna et al., 2012).

The early detection of pancreatic cancer offers the promise of improved mortality rates through surgical resection, but the current strategies lack the necessary sensitivity and specificity to make widespread screening applicable. The search for potentially useful biomarkers for pancreatic cancer is further complicated by the existence of several benign pancreatic disorders such as chronic pancreatitis, which has a significant phenotypic and even genetic overlap with early pancreatic cancer. Considering the need for non-invasive and accurate methods to detect PDAC in its early stages, saliva has been suggested as an advantageous sample for use in easy, safe and non-invasive diagnostic assays (Lee and Wong, 2009).

Salivary constituents (including DNA, RNA, protein and bacteria) have been linked to several systemic diseases and, more recently, to non-oral cancers (Brooks et al., 2008; Xie et al., 2013; Lau et al., 2013). The composition of saliva is thought to vary according to the disease status, with changes corresponding to immunological, hormonal and cancer biomarker levels in the body. Since saliva is readily accessible by noninvasive methods, it holds a potential promise for a simple non-invasive source of biologic material for the study of diagnostic and prognostic biomarkers (Farrel et al., 2012). Recently, Zhang and cols. (2010) demonstrated that four messenger-RNAs (mRNAs *KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* and *DPM1*) detected in salivary samples could correctly distinguish pancreatic cancer patients from cancer unaffected subjects with a sensitivity and specificity of 90% and 95%, respectively. In this study we aimed to replicate the findings of Zhang et al. (2010) in a different population set and determine whether these four salivary

biomarkers, individually or in combination, could be useful as diagnostic tools for pancreatic cancer detection.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), under the registration number 10-0162, and followed the principle of prospective specimen collection and retrospective evaluation design. Written informed consent and questionnaire data sheets were obtained from all individuals who agreed to enter the study. Three different groups of patients were studied: (1) patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, (2) patients with chronic pancreatitis and (3) controls without evidence of pancreatic disease. Inclusion criteria for the PDAC group consisted of histopathologically confirmed diagnosis and no previous chemo or radiation therapy prior to saliva collection. Patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer were included. For patients who underwent surgery, definitive tumor stage was established on the basis of operative findings and complementary exams. For those patients unsuitable for surgical treatment, tumors were staged by means of computed tomography and/or magnetic resonance imaging, as well as histological evaluation of biopsy samples. Criteria for recruitment of individuals to the control group included absence of clinical symptoms of inflammatory or neoplastic pancreatic disease and a normal abdominal computed tomography scan obtained within the last six months before recruitment.

Clinical data (age at diagnosis, gender, comorbidities, smoking and drinking history, tumor differentiation, TNM category, staging and resectability) were obtained from patient interviews and review of medical records. Participants were not allowed to eat, drink, smoke or perform oral hygiene one hour prior to saliva collection. Whole saliva was collected between 9 and 11 a.m. and preserved using the RNA Oragene kit RE-100 (DNA Genotek Inc.), according to the manufacturer's

instructions. mRNA purification was done using the mirVana PARIS kit (Ambion), starting from 500 µl of saliva and eluting the extracted material into 50 µl of pre-heated RNase-free water, according to the manufacturer's instructions for liquid samples. All samples were quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

mRNA detection

mRNA expression was quantified in duplicates by qRT-PCR using human TaqMan RNA Assay kits (Applied Biosystems). The reverse transcription reaction was carried out using a TaqMan reverse-transcription kit (Applied Biosystems), following manufacturer's instructions. After reverse transcription, 1 µl cDNA solution was amplified using 5µl of Taqman 2x Universal Master Mix with no AmpErase UNG (Applied Biosystems), 0.5µl of gene specific primers/probe and 3.5µl nuclease-free water, in a final volume of 10µl. Quantitative PCRs were run on a StepOne Real-Time PCR system (qRT-PCR) (Applied Biosystems). The reaction mix was incubated as recommended by the manufacturer. mRNA expression was normalized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak et al., 2001; Schmittgen et al., 2008).

Statistical analyses

Considering the non-parametric characteristic of our samples, Mann-Whitney test was used to evaluate differences in mRNAs expression across different study groups. All statistical significance tests were two-sided and *P*-values <0.05 were considered significant. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were used to assess the feasibility of using *KRAS* and *DPM1* mRNA expression for detecting PDAC. The sensitivity and specificity for the biomarkers were estimated by identifying the cutoff point of the predicted probability that yielded the highest sum of sensitivity and specificity. All analyses were performed using the IBM Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software version 22.0.

To perform univariate logistics, we categorized absolute expression values, considering all samples above the median as “high expression” and all below the

median as “low expression”. We also categorized the following clinical features: differentiation grade (moderate/well differentiated vs. poorly differentiated); Ca19-9 seric levels (≤ 37 U/ml vs. > 37 U/ml); clinical staging (I/II vs. III/IV), presence or absence of metastatic disease (M0 vs. M1) and tumor resection.

RESULTS

A total of 45 subjects were recruited for this study, including 25 patients with PDAC, 10 patients with chronic pancreatitis and 10 controls. The information on individual characteristics, such as age, gender, smoking and drinking history is presented in Table 1. No significant differences was observed in age, gender and tobacco/alcohol use among the individuals included in the three groups.

mRNA expression profiles in salivary samples

The median value of *KRAS* and *DPM1* fold-change expression was 6.78 (mean 8.02 ± 7.26 , minimum 0.03, maximum 30.72) and 3.16 (mean 4.30 ± 4.01 , minimum 0.06, maximum 19.34), respectively. *KRAS* expression was significantly higher in patients with pancreatic cancer ($P=0.011$) when compared with the controls (median fold changes 7.37 and 2.97, respectively), but its expression levels were very heterogeneous and also elevated in the salivary samples from patients with chronic pancreatitis (median fold change 7.73) (Figure 1). *DPM1* expression, on the other hand, was more equally distributed across the different groups (Figure 2), not reaching a statistically significant difference among groups. The mRNA levels of the *ACRV1* and *MBD3L2* genes were also evaluated by qRT-PCR, but no expression was found in any of the samples, even after 45 cycles (data not shown).

The clinical utility of *KRAS* and *DPM1* mRNAs biomarkers for PDAC detection was further assessed by ROC curve analysis (Table 2). For the diagnostic discrimination between pancreatic cancer patients vs. controls, the sensitivity for the *KRAS* salivary detection was 72% and the specificity, 80%, with an area under the curve (AUC) value of 0.808 (95% CI: 0.662 – 0.954, $P=0.005$).

However, the *KRAS* biomarker failed to discriminate patients with pancreatic cancer from patients with chronic pancreatitis, yielding an AUC value of 0.548 (95% CI: 0.353 – 0.743, $P=0.661$), a sensitivity of 56% and specificity of 50%. For pancreatic cancer vs. noncancer subjects (chronic pancreatitis + controls), the AUC value was 0.678 (95% CI: 0.523 – 0.833; $P = 0.042$), yielding a sensitivity of 60% and specificity of 65%. For patients with pancreatic disease (cancer + chronic pancreatitis) vs. controls, *KRAS* expression levels yielded a ROC-plot AUC value of 0.811 (95% CI: 0.677– 0.946; $P = 0.003$), with 74.3% sensitivity and 80% specificity.

The AUC values for *DPM1* expression are described in Table 2, but did not reach any statistical significance due to its low discriminatory power. When the logistic regression model was performed with the combination of *KRAS* and *DPM1* mRNA biomarkers, the AUC value for discriminating pancreatic cancer from noncancer patients raised to 0.722 (95% CI: 0.573 – 0.871; $P = 0.011$) with 64% sensitivity and 65% specificity, and for patients with pancreatic disease vs. controls, the AUC raised to 0.860, yielding a sensitivity value of 77.1% and specificity of 80%.

***KRAS* gene expression and clinical features in PDAC patients**

Finally, we sought to investigate the association between *KRAS* salivary expression and clinical variables, such as age at diagnosis, Ca19-9 levels, tumor differentiation, staging and resectability in the group of patients with PDAC, but no correlation was observed (Table 3). There was a slight difference at the age at diagnosis, with patients with high levels of *KRAS* mRNA (>6.78) being diagnosed at an early age when compared with patients presenting low levels of expression, but this difference did not reach statistical significance (53.82 ± 11.3 vs. 57.48 ± 15.3 , respectively, $P=0.145$). Patients with advanced disease (III/IV) also presented higher levels of *KRAS* when compared with patients at early stages (I/II), but no statistical difference was found (50% vs. 22.2%, $P=0.174$).

DISCUSSION

Salivary biomarkers for the detection of systemic diseases have emerged in the last decade with the availability of high throughput omics technologies and systems biology tools (Lau et al., 2013). Because collection is noninvasive and easily performed, using saliva for the early detection of systemic diseases could be a significant advantage, especially for tumors with a challenging assessment such as pancreatic cancer. In this preliminary study, we found that *KRAS* was significantly more expressed in patients with PDAC when compared with controls subjects ($P=0.011$), as previously suggested by Zhang et al. (2010). The ROC curve analysis indicated 72% sensitivity and 80% specificity (AUC = 0.808, 95% CI: 0.662–0.954) for the diagnostic discrimination between pancreatic cancer patients and non-affected controls with the *KRAS* salivary expression ($P=0.005$). However, *KRAS* mRNA levels were also elevated in patients with chronic pancreatitis, suggesting that this biomarker may not possess the power to discriminate patients with malignant disease from patients with benign pancreatic disorders (AUC= 0.548, 95% CI: 0.353 – 0.743, $P=0.661$). Even when combined with *DPM1* results, no differences were found between patients with PDAC and chronic pancreatitis. Finally, *MBD3L2* and *ACRV1* expression was undetectable in our sample set.

Taken together, the majority of our findings was not consistent with the previous study from Zhang et al. (2010), which found that the combination of *KRAS*, *DPM1*, *MBD3L2* and *ACRV1* RNA biomarkers could differentiate pancreatic cancer patients from noncancer subjects with a 90% sensitivity and 95% specificity. When analyzing the ROC-curve results for the combination of *KRAS* and *DPM1* mRNA biomarkers, we found an AUC value of only 0.722 for discriminating pancreatic cancer patients from noncancer subjects, with a 64% sensitivity and 65% specificity rates. For discriminating patients with pancreatic disease (PDAC + chronic pancreatitis) vs. controls, the AUC value was 0.860 in our sample, yielding a sensitivity value of 77.1% and specificity of 80%.

Regardless of successfully discovering and validating discriminatory salivary biomarkers for cancers, including pancreatic, ovarian, breast, and lung

cancer, it is not yet known how a disease developing distally from the oral cavity could exert its profile into the saliva (Zhang et al., 2010; Lee et al., 2012; Xiao et al., 2012). Lau et al. (2013) have recently demonstrated that tumor-derived exosomes, which are cell-derived vesicles that contain proteins and functional mRNAs, could provide the scientific and mechanistic rationale for the systemic connection between pancreatic tumors and salivary secretions, since the suppression of exosome biogenesis in an engineering *in vivo* model resulted in the ablation of salivary biomarkers development.

Although this preliminary report may be limited by small sample size, our results suggest that *KRAS* mRNA is significantly and differentially expressed in saliva from patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis, when compared with individuals with no evidence of pancreatic disease. Despite its relatively low sensitivity and specificity rates, this salivary marker could become a suitable tool for the screening of patients with pancreatic disease, deserving further investigation. This study provides a preliminary basis for future studies that should be designed to better elucidate the potential of *KRAS* as a salivary diagnostic biomarker.

Acknowledgements: This work was supported by CNPq/RedeGenoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES and Fundo de Incentivo à Pesquisa - FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant #10-0162). Patricia Ashton-Prolla, Ursula Matte and Alessandro Bersch Osvaldt are investigators of CNPq. We are very grateful to Juliano Martini, Vivian Pierri Bersch, Carlos Otavio Corso, Raphael Canto and Aline Jade Mendonça for their excellent assistance in participants recruitment and to Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Nefrologia and Unidade de Análises Moleculares e Proteínas from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their laboratorial assistance.

Table 1. Demographic information of subjects included in the study.

Characteristics	Pancreatic Cancer (n=25)	Chronic Pancreatitis (n=10)	Control (n=10)	P value
Age (years)				
≤ 70	19 (76%)	10 (100%)	10 (100%)	0.063
> 70	6 (24%)	0 (0%)	0 (0%)	
Sex				
Male	10 (40%)	8 (80%)	7 (70%)	0.057
Female	15 (60%)	2 (20%)	3 (30%)	
Smoking				
Yes	9 (36%)	5 (50%)	1 (10%)	0.151
No	16 (64%)	5 (50%)	9 (90%)	
Drinking				
Yes	5 (20%)	6 (60%)	2 (20%)	0.488
No	20 (80%)	4 (40%)	8 (80%)	

SD = standard deviation

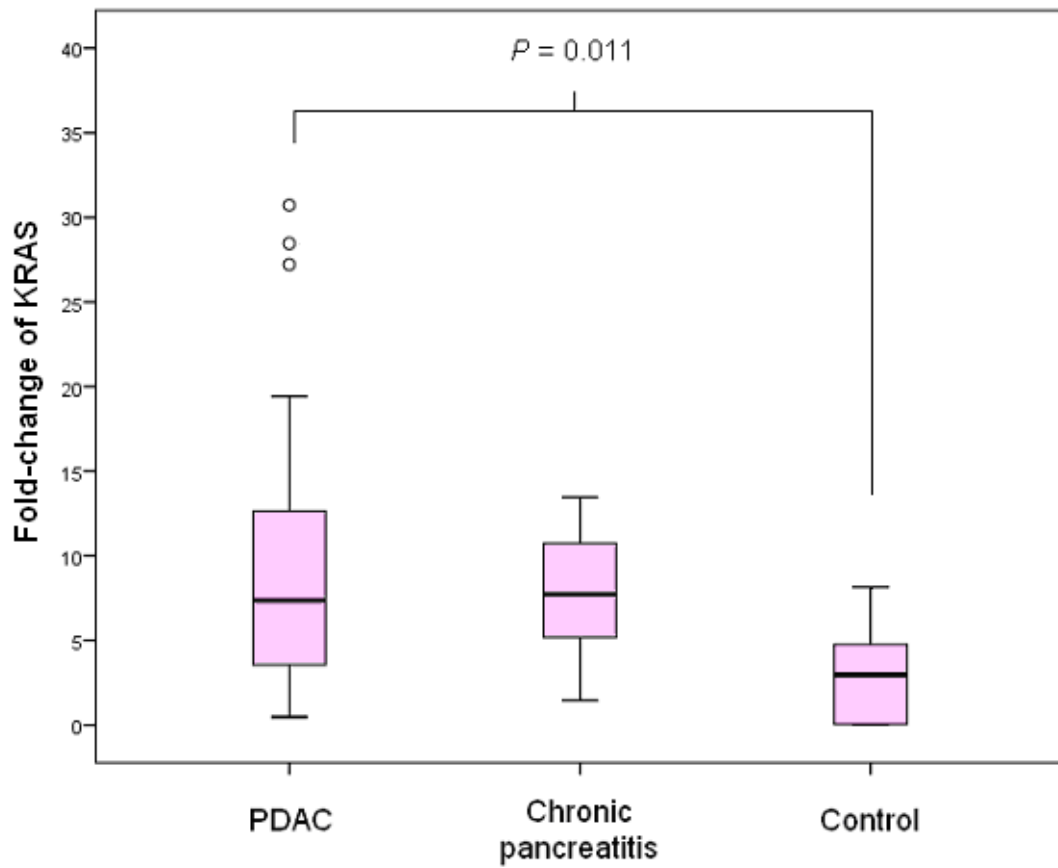


Figure 1. Relative fold change of *KRAS* mRNAs in the saliva of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, chronic pancreatitis and controls.

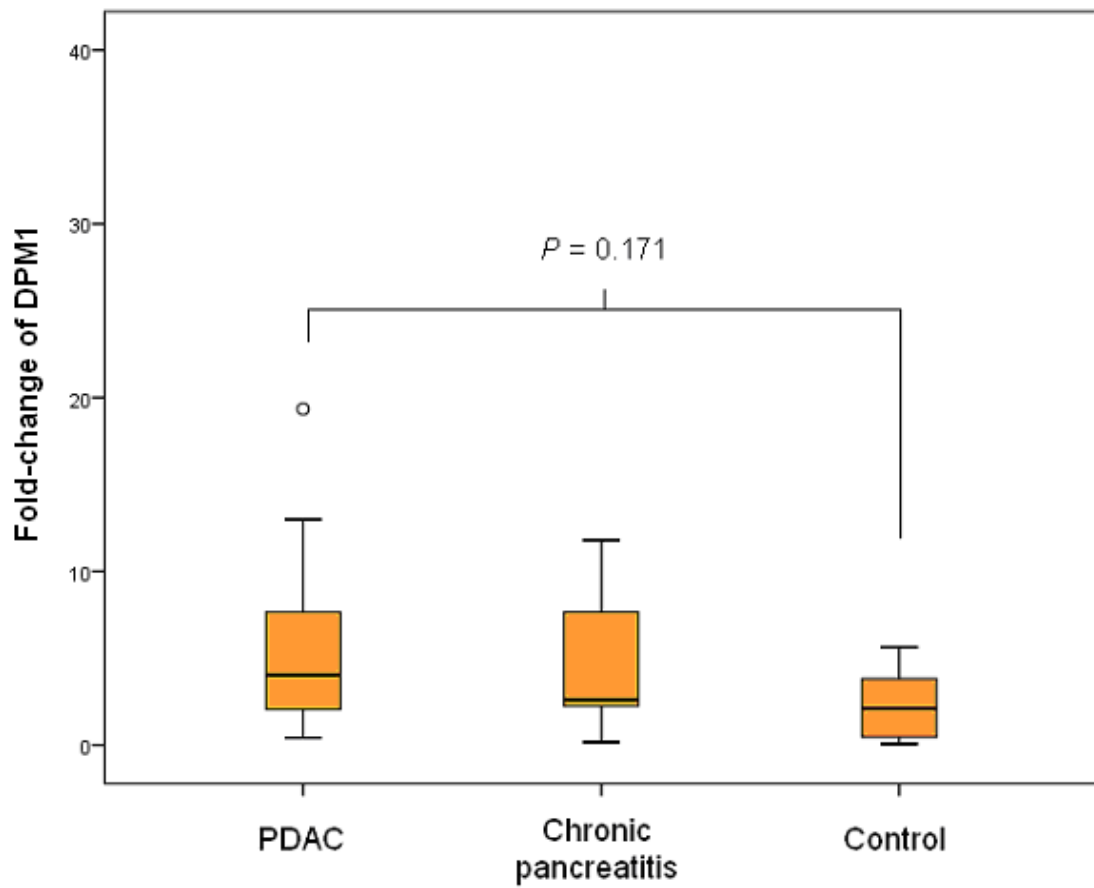


Figure 2. Relative fold change of *DPM1* mRNAs in the saliva of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, chronic pancreatitis and controls.

Table 2. ROC-curve results for *KRAS*, *DPM1* and the combination of both markers in PDAC detection.

Groups and biomarker evaluated*	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	Fold- change	P value
Pancreatic cancer vs. controls (<i>KRAS</i>)	0.808 (0.662 – 0.954)	72%	80%	4.85	0.005
Pancreatic cancer vs. noncancer subjects (<i>KRAS</i>)	0.678 (0.523 – 0.833)	60%	65%	6.85	0.042
Pancreatic disease vs. controls (<i>KRAS</i>)	0.811 (0.677 – 0.946)	74.3%	80%	4.85	0.003
Pancreatic cancer vs. controls (<i>DPM1</i>)	0.704 (0.524 – 0.884)	64%	70%	3.14	0.063
Pancreatic cancer vs. noncancer subjects (<i>DPM1</i>)	0.636 (0.472 – 0.800)	64%	70%	3.22	0.120
Pancreatic disease vs. controls (<i>DPM1</i>)	0.686 (0.508 – 0.864)	57.1%	60%	2.97	0.076
Pancreatic cancer vs. controls (<i>KRAS and DPM1</i>)	0.856 (0.728 0 0.984)	76%	80%	7.62	0.001
Pancreatic cancer vs. noncancer subjects (<i>KRAS and DPM1</i>)	0.722 (0.573 – 0.871)	64%	65%	9.50	0.011
Pancreatic disease vs. controls (<i>KRAS and DPM1</i>)	0.860 (0.746 – 0.974)	77.1%	80%	7.38	0.001

* Noncancer subjects: chronic pancreatitis patients and controls; pancreatic disease: pancreatic cancer and chronic pancreatitis patients

Table 3. Pancreatic cancer patients characteristics (n=25).

Variables	KRAS mRNA expression		P value
	Low (n=15)	High (n=10)	
Mean age at diagnosis (\pmSD)	57.48 \pm 15.3	53.82 \pm 11.3	0.145
Ca19-9 seric level			
\leq 37 U/ml	12 (66.7%)	6 (33.3%)	0.399
$>$ 37 U/ml	3 (20%)	4 (14.3%)	
Tumor differentiation*			
Well and moderate	6 (60%)	4 (40%)	0.597
Poor	3 (75%)	1 (25%)	
Tumor Stage			
I-II	7 (77.8%)	2 (22.2%)	0.174
III-IV	8 (50%)	8 (50%)	
Metastasis status			
M0	5 (55.6%)	4 (44.4%)	0.734
M1	10 (66.7%)	6 (60%)	
Tumor resection			
Yes	5 (71.4%)	2 (28.6%)	0.399
No	10 (55.6%)	8 (44.4%)	

SD = standard deviation

* Assessed only in cases with primary tumor tissue, not described in metastatic tissues.

References

Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence based appraisal. *J GastrointestOncol.* 2012;3(2):105-19.

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

Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut.* 2012;61(4):582–8.

Lau C, Kim Y, Chia D, Spielmann N, Eibl G, Elashoff D, Wei F, Lin YL, Moro A, Grogan T, Chiang S, Feinstein E, Schafer C, Farrell J, Wong DT. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. *J Biol Chem.* 2013 288(37):26888-97

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

Lee YH, Kim JH, Zhou H, Kim BW, Wong DT (2012) Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl).* 90(4):427-34.

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

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

Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT (2012) Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 11(2):M111.012112.

Xie Z, Chen G, Zhang X, Li D, Huang J, Yang C, Zhang P, Qin Y, Duan Y, Gong B, Li Z. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PLoS One.* 2013;8(4):e57502.

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

PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines

Autores: Patricia Izetti, Agnes Hautefeuille, Ana Lucia Abujamra, Caroline Brunetto de Farias, Juliana Giacomazzi, Bárbara Alemar, Guido Lenz, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann, Alessandro Bersch Osvaldt, Pierre Hainaut, Patricia Ashton-Prolla

Periódico: Investigational New Drugs

Situação: Publicado.

PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines

Patricia Izetti^{1,2,3}, Agnes Hautefeuille⁴, Ana Lucia Abujamra^{3,5,6}, Caroline Brunetto de Farias^{3,5,6}, Juliana Giacomazzi¹, Bárbara Alemar^{1,2}, Guido Lenz⁷, Rafael Roesler^{3,6,8}, Gilberto Schwartzmann^{3,6,9}, Alessandro Bersch Osvaldt¹⁰, Pierre Hainaut¹¹, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,12}

1 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

2 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

3 Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

4 International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 - Lyon, France. Zip code: 69372

5 Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

6 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

7 Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43431 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

8 Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 - Sala 211 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90050-170

9 Serviço de Oncologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

10 Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

11 International Prevention Research Institute, 95 Cours Lafayette, 69006 - Lyon, France. Zip code: 69006

12 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

Corresponding author:

Patricia Izetti, MD

Laboratório de Medicina Genômica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre RS Brazil

e-mail: patriciaizetti@gmail.com

Phone number: + 55 51 3359-7661

Fax number: +55 51 3359-8000

ABSTRACT

TP53 mutation is a common event in many cancers, including pancreatic adenocarcinoma, where it occurs in 50-70% of cases. In an effort to reactivate the p53 mutant protein (mtp53), several new drugs are being developed, including PRIMA-1 and PRIMA-1^{Met}/APR-246 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*). PRIMA-1 has been shown to induce apoptosis in tumor cells by reactivating the mutant p53, but its effect in pancreatic cancer remains unclear. Here we investigated the effects of PRIMA-1 on cell viability, cell cycle and expression of p53-regulated proteins in PANC-1 and BxPC-3 (mutant *TP53*), and CAPAN-2 (wild-type *TP53*) pancreatic cancer cell lines. Treatment with PRIMA-1 selectively induced apoptosis and cell cycle arrest in mtp53 cells compared to CAPAN-2 cells. The growth suppressive effect of PRIMA-1 was markedly reduced in mtp53 transfected with p53 siRNA, supporting the role of mutant p53 in PRIMA-1 induced cell death. Moreover, treatment with the thiol group donor N-acetylcysteine completely blocked PRIMA-1-induced apoptosis and reinforced the hypothesis that thiol modifications are important for PRIMA-1 biological activity. In combination treatments, PRIMA-1 enhanced the anti-tumor activity of several chemotherapeutic drugs against pancreatic cancer cells and also exhibited a pronounced synergistic effect in association with the Mdm2 inhibitor Nutlin-3. Taken together, our data indicate that PRIMA-1 induces apoptosis in p53 mutant pancreatic cancer cells by promoting the re-activation of p53 and inducing proapoptotic signaling pathways, providing *in vitro* evidence for a potential therapeutic approach in pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer, p53, PRIMA-1, apoptosis

INTRODUCTION

Pancreatic cancer is the fourth-leading cause of cancer deaths in the United States and the only of the most commonly diagnosed cancers for which both the incidence and death rates are increasing, despite advances in cancer therapy [1]. The impairment of drug delivery caused by the low density of vasculature within pancreatic tumors, the multiple subsets of genes undergoing genetic changes [2] and the existence of cancer stem cells that aberrantly activate developmental signaling pathways [3] make pancreatic cancers highly resistant to treatment. Some recent therapeutic agents and different combination chemotherapy regimens such as FOLFIRINOX (5-Fluorouracil/Irinotecan/Oxaliplatin) have shown some promise in increasing the response rate to pancreatic adenocarcinoma treatment [4], but the results are still modest and new therapies capable of extending survival and down-staging inoperable tumors are needed. Sequential stages of disease progression have been well characterized at the molecular level, involving activating mutations in oncogenes (e.g. *K-RAS*) and inactivation of tumour-suppressor genes (e.g. *TP53*, *DPC4*, *p16/CDKN2A* and *BRCA2*) [5]. The development of molecular profiling technologies has fueled efforts to personalize cancer treatment and target specific somatic alterations present in these cancers [6].

TP53 is the most frequently mutated gene identified in human cancer and is inactivated in 50–70% of the pancreatic adenocarcinomas, ranking this disease among those with the highest frequency of *TP53* inactivation [7-8]. Most *TP53* mutations are missense and result in accumulation of mutant p53 protein, with potentially gain-of-function and dominant-negative properties. Mutations in *TP53* clearly occurs in the progression of precursors lesions to pancreatic adenocarcinoma [9], and the p53 mutant phenotype, rather than genetic loss of *TP53*, associates with promotion of metastasis in murine models [10].

The development of new therapies that are able to selectively kill cancer cells is a very attractive scenario for resistant diseases such as pancreatic cancer, and targeting the p53 mutant protein could represent a unique model for the treatment

of this particular cancer. PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*) is a small molecule that has the ability to convert mutant p53 to an active conformation, restoring DNA binding and transcriptional activity [11-12]. PRIMA-1 and its methylated form PRIMA-1^{Met}/APR-246 have been shown to induce p53-mediated apoptosis and cell-cycle arrest in different types of cancer, such as leukaemia [13], breast [14], head and neck [15], melanoma [16] and thyroid carcinoma [17], and to suppress the growth of tumor xenografts carrying mutant p53 proteins *in vivo* [16,18]. More recently, PRIMA-1 was also linked to autophagy induction in breast and colon cancer cells [19].

Given the number and complexity of roles that p53 plays in tumorigenesis and aggressive tumor biology, the use of PRIMA-1 to restore the suppressive activity of mutant p53 could be a powerful strategy to control pancreatic cancer progression and to improve the effectiveness of existing chemotherapeutic regimens. We have tested this hypothesis by examining the effects of PRIMA-1, alone or in combination with different types of drugs, on the growth and survival of pancreatic adenocarcinoma cell lines with different p53 mutation status. Our results demonstrate that PRIMA-1 suppresses the growth of pancreatic cancer cells expressing mutant p53 *in vitro* by reactivating the p53 pathway, inducing p53-dependent growth arrest and apoptosis, and enhancing the antitumor activity of several chemotherapeutic agents currently used in this type of cancer.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture, transfections and drugs. The mutant p53 (mtp53) expressing pancreatic cancer cell lines PANC-1 (p.R273H) and BxPC-3 (p.Y220C) and the wild type p53-expressing Capan-2 cells (wtp53) were used in this study. The three cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and were sequenced to confirm mutation and wild type status. PANC-1 and Capan-2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with L-glutamine and 4.5g/L of D-Glucose (Gibco®, Life Technologies, USA) and BxPC-3 cells were grown in

RPMI-1640 Medium (LGC Biotechnologia), all supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, USA), gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Brazil), and Fungizone (250 mg/kg; Invitrogen, USA). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. All cell lines were tested with the VenorGeM Mycoplasma PCR-based Detection Kit and confirmed to be free of Mycoplasma spp. contamination (Sigma-Aldrich, USA). For siRNA silencing of *TP53* mRNA in PANC-1, cells were plated in six-well plates at 3 x 10⁵ cells per well and transfected with 5nM p53-specific siRNA (Cell Signaling, USA) or a scrambled siRNA control (Cell Signaling, USA) using Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen, Germany) in optiMEM medium (Gibco, Invitrogen, UK). Two subsequent transfections at 1 day intervals were performed to obtain maximum *TP53* mRNA inhibition. PRIMA-1 was obtained from Sigma-Aldrich® (USA) and dissolved in 100% dimethyl sulphoxide (DMSO) for cellular treatments.

Direct sequencing of *TP53* mutations Genomic DNA was extracted from untreated cells and the exonic and flanking intronic regions of the *TP53* gene were amplified by PCR according to the protocol used at the International Agency for Research on Cancer (IARC) (<http://www-p53.iarc.fr/p53sequencing.html>). The resulting PCR products were sequenced and the locations and types of mutation were determined and confirmed by a second PCR reaction and sequencing.

MTT assay. Cell viability was measured by MTT assay (Sigma-Aldrich, USA) after treatment with PRIMA-1. Briefly, cells were seeded in each well of 96-well plates in 100 µl culture medium and incubated overnight at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The next day, the medium was removed and cells washed with PBS and treated with vehicle control (DMSO, dimethylsulfoxide) or different concentrations of PRIMA-1 for 12 to 48h; the medium was replaced with MTT solution diluted in medium once the treatment was completed. The plates were further incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 h and then left at room temperature until completely dry. DMSO was then added and the absorbance was read at 492 nm using a microplate enzyme-linked immunoassay reader (ELISA). The relative growth

activity was determined as the percentage absorbance of treated cells compared to those of vehicle treated cells (control).

Cell apoptosis and death assay. The Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences, USA) was used to detect apoptosis and propidium iodide (PI) to detect DNA fragmentation or cell death. Cells were grown in 6-well plates overnight and the next day, the medium was removed and cells washed and treated with 25-100 μ M PRIMA-1 for 6, 24 and 48h. Once the treatment was completed, cells were harvested and washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 1x binding buffer, and stained with Annexin V-FITC and PI, according to the manufacturer's instructions. The percentage of Annexin V-FITC-positive and PI-positive cells was determined from the fluorescence of 10,000 cells by a BD FACSCanto (BD Biosciences, USA). Data were analysed using the CellQuest™ software (BD Biosciences, USA).

BrdU Incorporation Assay. BrdU incorporation assay (BD Pharmingen, USA) was used to evaluate the synthesis of DNA. Cells were seeded in a 6-well plate, followed by treatment with PRIMA-1 at 25, 50 and 75 μ M or vehicle control for 12, 16, 24 and 36h. Cells were incubated with BrdU 10 mM for 2 h before completion of the treatment schedule, followed by fixation with cold ethanol 70%. Later than, cells were washed with PBS and incubated with 2 M HCl for 20 min at room temperature. After this, cells were washed twice with PBS and incubated with 0.1 M sodium borate (Na₂B₄O₇, pH 8.5), for 3 min at room temperature. Finally, cells were incubated with the anti-BrdU FITC-conjugated antibody for 20 min in the dark, co-stained with PI and analyzed by flow cytometry.

Western blotting. Cells were treated with vehicle control, 50 and 75 μ M PRIMA-1 before harvesting after 24 h treatment. Whole-cell lysates were prepared using RIPA-like buffer. For the detection of p53, Mdm2, p21/waf1, Bax, cleaved caspase-3 and actin, western blotting was performed according to standard procedures. Briefly, the proteins were separated using polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane using a Trans-Blot

transfer system from Bio-Rad®, blocked overnight in PBS containing 1% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20, and incubated for 1 h with primary antibodies. After rinsing the membrane to remove unbound primary antibody, the membrane was incubated with a secondary antibody for 1 h and rinsed. Proteins were detected by ECL chemiluminescence and bands were quantified using ImageJ densitometry software. The values obtained from densitometric analysis were used to make relative comparisons of band intensity between lanes.

Clonogenic assay. Cells were treated with 10-25 μ M of PRIMA-1 or vehicle control (DMSO) for 48h, harvested, and then plated in triplicate culture dishes. The cells were then cultured in drug-free medium for 10-14 days until colony counts had stabilized. Colonies were counted after fixation with 70% ethanol and staining with 0.5% crystal violet (Sigma, USA), and the number of colonies in each drug-treatment group was expressed as a percentage of the number of colonies in vehicle-treated control dishes. Only colonies containing 50 or more cells were scored.

Statistical analysis. Values were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) number of cells. The mean values for control cells were taken as 100% in MTT analyses. Drug interaction was assessed at different concentration ratios using the combination index (CI) [20-21], where $CI < 1$, $CI = 1$ and $CI > 1$ indicate synergistic, additive and antagonistic effects, respectively. Data were treated with one-way analysis of variance (ANOVA) and non-parametric tests if needed. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. SPSS version 16.0 was used for data handling and statistical analyses.

RESULTS

***TP53* status and p53 protein expression in pancreatic cancer cell lines**

Direct sequencing of *TP53* confirmed the presence of the p.R273H mutation in PANC-1 cells (Fig. 1A), the p.Y220C mutation in BxPc-3 (Fig. 1A) and the *TP53* wild-type status in Capan-2 cells. A summary of the mutations in the three

pancreatic cancer cell lines is presented in Fig. 1B. Information on the genotype of these cell lines provides a background for understanding how alterations in these pathways contribute to the different responses seen with PRIMA-1 treatment. p53 protein was detected in the three cell lines by Western blotting, independent of the p53 mutation status (Fig. 1C).

PRIMA-1 inhibits the growth of pancreatic cancer cell lines

Incubation of cells with PRIMA-1 for 24 h was associated with an inhibitory effect on growth, which was more prominent in cell lines with *TP53* mutations (PANC-1 and BxPC-3, $p < 0.05$). PANC-1 cells, which also harbor a mutation in the oncogene *KRAS* (mutated in 90% of pancreatic cancers), showed a slightly increased response compared to BxPC-3, with IC_{50} values for PRIMA-1 treatment of 65.6 μ M and 68.7 μ M, respectively (Fig. 2A). PRIMA-1 at 75 μ M reduced cell growth by 66% and 56.5% in PANC-1 and BxPC-3 cells, respectively, compared to 30% in Capan-2 cells ($p < 0.05$). The time-response analysis showed that whereas the number of p53-mutated pancreatic cancer cells continuously declined during the entire time course measured (from 12 to 48 h), Capan-2 cells were only slightly affected from 12 to 36 h after treatment and moderately reduced after 36 h (Fig. 2B).

Reactivation of p53 by PRIMA-1 decreases the long-term clonogenic potential of pancreatic cancer cells

The extent to which clonogenic PANC-1, BxPC-3 and Capan-2 cells survived growth inhibition following treatment for 48h with PRIMA-1 was also measured. PANC-1 and BxPC-3 viable vehicle-treated cells were associated with a greater number of residual clonogenic cells, compared with the same cells treated with 50 and 75 μ M PRIMA-1 (Fig. 2C). In contrast, no significant reduction of clonogenic potential was seen in Capan-2 cells (wtp53).

PRIMA-1 induces cell cycle arrest and decreases DNA synthesis

Next, we tested if PRIMA-1 was able to modulate cell cycle dynamics in pancreatic cancer cells. Treatment of mtp53 PANC-1 cells with 75 μ M PRIMA-1 for 16h caused a G2/M arrest, but no effect was seen in wtp53 Capan-2 cells (Fig. 3A). The increase of PANC-1 cell population at the G2/M phase (29.3 to 53.4%, Fig. 3B) was accompanied by a slight decrease of cell population in the G1 phase. Time-response analysis in Capan-2 cells showed that even when treated for 36h, the G2/M arrest was only observed with higher PRIMA-1 doses (75 μ M and 100 μ M, data not shown).

PRIMA-1 also induced a time-dependent reduction of BrdU incorporation in PANC-1 treated cells, characterizing slow or impaired DNA replication 16h after treatment (Fig. 4). BrdU incorporation was barely detected in S and G2 phases after 24hour-treatment. At this point, with 75 μ M PRIMA-1 treatment, PANC-1 cells arrested in G2 and BrdU incorporation was decreased (Fig. 4). This behavior is consistent with a fast progression of PANC-1 cells through S phase supporting a cytostatic effect of the p53 reactivating drug.

PRIMA-1 selectively induces apoptosis and cell death in mutant p53-expressing pancreatic cancer cells

Treatment of PANC-1 cells (*TP53*-p.R237H) for 24 hours increased the proportion of early apoptotic cells (Annexin+/PI-) from 1.8% at vehicle-control treatment to 10.4% at 100 μ M PRIMA-1 treatment (Fig. 5A, $P < 0.05$). The proportion of late stage apoptotic and necrotic cells (Annexin+/PI+) also increased significantly from 2.0% to 73.1% at 100 μ M treatment (Fig. 5A, $p < 0.01$). The high percentage of Annexin V+/PI+ marked cells at 100 μ M, with practically no cells in a viable state, suggests that 100 μ M might be a highly toxic dose. When comparing the Annexin-V results for PANC-1 and Capan-2 (*TP53* wild-type) cell lines, we observed a significantly reduced response in the wtp53 cells (Fig. 5B), reinforcing the p53-mutant dependent effect of PRIMA-1.

siRNA silencing of *TP53-R237H* PANC-1 cells decreased responsiveness to PRIMA-1 treatment

To determine whether p53 was actually responsible for the main mechanism of PRIMA-1 cytotoxicity observed in PANC-1 cells, we used a small interfering RNA (sip53) to transiently knock-down the expression of mutant *TP53* mRNA in PANC-1 cells, before PRIMA-1 treatment (Fig. 5B). The inhibitory effect of siRNA transfection on the expression of p53 protein in PANC-1 cells is shown in Figure 5C. FACS analysis demonstrated that PRIMA-1 treatment at 25, 75 and 100 μ M for 24 h had no impact on the apoptotic rate of sip53-transfected cells, as compared with cells transfected with scramble siRNA, non-transfected, and cells carrying a wild-type *TP53* gene (Capan-2, Fig. 5B). These results suggest that PRIMA-1 exerts its antitumor effect essentially through p53-dependent pathways in pancreatic cancer cells.

N-acetylcysteine suppresses PRIMA-1-induced cytotoxicity and apoptosis

One of the main mechanisms involved in the mutant p53 reactivation includes covalent modification of thiol groups in the mutant protein core domain [22]. To investigate whether modification of thiols played a role on the biological effects of PRIMA-1 in pancreatic cancer, we pretreated PANC-1 cells with 5mM of the thiol antioxidant N-acetylcysteine (NAC) followed by addition of 100 μ M PRIMA-1. NAC completely blocked PRIMA-1 induced growth suppression and apoptosis (Fig. 5D, Fig. 5E), supporting the hypothesis that thiol modifications are important for PRIMA-1 biological activity also in pancreatic cancer cells. In addition, these results also suggest that PRIMA-1 may exert its effect in part through restoring redox-dependent effects to mutant p53, since p53-induced apoptosis requires oxidative activation of certain downstream targets, which are blocked with low intrinsic oxidative levels within the cells.

PRIMA-1 leads to activation of p53-dependent apoptotic pathways

Treatment of the PANC-1 cells with PRIMA-1 for 24h activated the intrinsic (mitochondrial mediated) apoptotic pathway by increasing Bax protein expression and enhancing caspase-3 cleavage in a dose-dependent manner, as confirmed through densitometric analysis (Fig. 6A). The same effect was not observed in the time-dependent analysis, with Bax protein presenting stable levels from 6 to 48h treatment and cleaved caspase-3 levels showing only a small increase (Fig. 6A), suggesting that these effects are more dose than time-dependent. Interestingly, p21/waf1 expression decreased in a dose-dependent way with PRIMA-1 treatment, probably in response to caspase-3 activation. This p21/waf1 down-regulation may explain the lack of G1/S arrest and the progression to a G2/M arrest, also contributing to convert growth arrest into apoptosis. PRIMA-1 significantly increased Mdm2 protein levels, probably through restoration of the p53 wild-type function and upregulation of *MDM2* gene. A small reduction in the expression of p53 protein was observed at 75 μ M (Fig. 6A), perhaps because *MDM2* increased levels resulted in augmented proteasomal degradation of p53.

PRIMA-1 enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic agents active against mutant p53 pancreatic cancer cells

Concurrent treatment with PRIMA-1 25 μ M (IC_{20}) and cisplatin (CDDP) resulted in a synergistic antitumor effect in PANC-1 cells (Fig. 6B, 6C), with increased apoptosis induction. A synergistic effect was also observed when PRIMA-1 at 25 μ M was combined with gemcitabine (pyrimidine analog) and erlotinib (tyrosine kinase inhibitor), drugs that are currently mainstays of pharmacological treatment in pancreatic cancer, but not with irinotecan, a topoisomerase I inhibitor (Fig. 6C). The combination of PRIMA-1 with proteasome inhibitor bortezomib also induced a synergistic growth inhibition of pancreatic cancer cells; synergism that has not been previously described for PRIMA-1 molecules.

Nutlin-3 increases PRIMA-1 responses in PANC-1 cells

Next, since Mdm2 was upregulated with PRIMA-1 treatment, consequently decreasing the reactivated p53 protein levels, we sought to determine whether

Nutlin-3, a molecule that binds in the p53-binding pocket of Mdm2 and displaces p53 from the complex, could increase the responses to PRIMA-1. The mtp53 PANC-1 cell lines were exposed to serial concentrations of PRIMA-1 (25-100 μ M) and Nutlin-3 (1-20 μ M), either alone or in combination, and analyzed by MTT assay after 24h of treatment. Only a small response was observed with Nutlin-3 treatment alone, but a significant synergism was detected with the combined Nutlin-3 and PRIMA-1 treatment, especially at 5 μ M and 50 μ M, respectively (Fig. 6D).

DISCUSSION

The p53 protein plays multiple suppressive roles and is involved as effector in nearly each of the “hallmarks of cancer” [23]. Thus, therapeutic strategies for restoring p53 function in tumor cells are promising and may synergize with many forms of therapies specifically addressing particular hallmarks. These strategies include increasing the activity of wild-type p53 in cells that retain wild-type alleles, and/or restoring the suppressive activity of mutant p53. Such strategies could significantly improve response in challenging malignancies such as pancreatic ductal adenocarcinoma, which is refractory to most chemotherapeutic agents. In this study, we evaluated the response of pancreatic cancer cells to the small molecule PRIMA-1, currently considered the p53 reactivating molecule with the highest potential to translate into the clinical setting and impact on cancer treatment [24,25]. Here we show that PRIMA-1 effectively restored p53-dependent suppression, inducing apoptosis and inhibiting tumor growth in pancreatic cancer cells with mutant *TP53*. PRIMA-1 treatment resulted in p53-dependent transactivation and increased expression of target genes, such as *BAX* and *MDM2*. This is in agreement with previous reports that p53 reactivating molecules reestablish the DNA binding activity of mutant p53, restoring its capacity to transactivate downstream genes [17,26].

Treatment with PRIMA-1 showed different responses according to the mutational status of *TP53* in the three cell lines used. The p53 reactivating molecule caused

prominent growth inhibition and effectively induced apoptosis in mutant *TP53*-bearing cells, similarly to previous reports [12,15], but no response was seen in Capan-2 cells (wild type *TP53*) up to 75uM treatment. High-dose treatment with PRIMA-1(100 uM) induced cell death to some degree in Capan-2 cells, suggesting that PRIMA-1 may exert a discreet effect in wild-type cells, but only in higher doses. Moreover, the experiments conducted with the sip53 transfection suggest that the effects of PRIMA-1 in PANC-1 cells were indeed dependent on p53, since efficient depletion of mutant p53 by siRNA significantly reduced the cytotoxic effects of PRIMA-1 (Fig. 5B). Similar results were also observed in previous reports [15], but further studies are required to elucidate the underlying mechanism.

Restoration of functional p53 with PRIMA-1 treatment led to the activation of the proapoptotic protein Bax and the cleavage of caspase-3 (Fig. 6A). Previous reports have shown that p53 reactivation by small molecules triggers transcription-dependent apoptosis through pathways involving TRAIL or FasL [27-28], as well as transcription-independent apoptosis [29]. A decrease in p21/waf1 expression with PRIMA-1 treatment was also observed through western blot analysis, in a dose and time-dependent way (Fig. 6A). This observation is somewhat surprising, since the p53 response element in p21/waf1 promoter is considered as a high-affinity target for wild-type p53 binding and transcriptional activation. A possible explanation may involve caspase-3 activation, which cleaves p21 and may thus prevent p21/waf1-mediated growth arrest, thus leading cells to enter apoptosis [30]. This could also explain why cells passed through G1/S checkpoint and S phase and arrested at G2/M despite p53 downstream effects. Several studies have suggested that p21/waf1 exerts a negative regulation effect on p53-dependent apoptosis [31], and p21/waf1 reduction could actually contribute to an increased apoptotic response following PRIMA-1 treatment. Defects in p53-dependent induction of p21/waf1 or deficiency in caspase-mediated cleavage of p21/waf1 usually results in increased p53-dependent apoptosis [30]. Similarly, p53 point mutants that cannot transactivate the *p21* gene are more potent inducers of apoptosis than wild-type p53 [32-33].

By co-treating PANC-1 cells with NAC during PRIMA-1 treatment, we found that this antioxidant was able to prevent the apoptotic response in cells exposed to different concentrations of the p53-reactivating molecule. Apoptosis is induced by multiple pathways [34], but reactive oxygen species (ROS) metabolism seems to be central in the apoptotic process that is triggered in response to PRIMA-1 treatment. Previous studies have also reported that NAC completely inhibits PRIMA-1-induced apoptosis [22], primarily by forming adducts with the Michael acceptor methylene quinuclidinone (MQ), one of the decomposition products of PRIMA-1.

An interesting synergism of PRIMA-1 with gemcitabine, erlotinib, cisplatin, doxorubicin, and bortezomib was observed after co-treatment for 24h. Regimens based on the first two drugs have become the mainstay of chemotherapeutic treatment in pancreatic cancer, but the clinical results are still unsatisfactory. The co-treatment with PRIMA-1, especially at lower doses, could reduce the dose of chemotherapeutic drugs used in the clinical setting, minimizing potential side effects in cancer patients. The ability of p53 reactivating molecules to synergize with DNA-damaging drugs such as cisplatin (CDDP) has been well-established previously [15,18,35], and it can be partially explained by the induction of mutant p53 levels through increased p53 phosphorylation that results from DNA-damage responses. The synergism between PRIMA-1 and the proteasome inhibitor bortezomib, conversely, has been less evaluated and deserves further assessment. The increased response following bortezomib and PRIMA-1 treatment may be associated to a reduction on proteasomal degradation of the reactivated p53 protein, which is then able to exert its functions and induce growth inhibition and apoptosis. The reason for the lack of synergism involving PRIMA-1 and irinotecan also deserves further exploration, but it could potentially be explained by antagonistic effects between the reactivated p53 protein and irinotecan, since wild-type p53 leads to activation of topoisomerase I while irinotecan inhibits this enzyme [36].

Finally, based on our hypothesis of degradation of the reactivated p53 protein by the upregulated Mdm2, we considered combining PRIMA-1 with Nutlin-3 in order to increase pancreatic cancer cells responses to PRIMA-1 treatment. Nutlin-3 is a molecule that targets the p53-binding pocket of Mdm2 and inhibits p53/Mdm2 interaction, diminishing ubiquitination and proteasomal degradation of p53, leading to its stabilization and activation of its pathway. Our results showed that the combination of PRIMA-1 50 μ M with Nutlin-3 5 μ M for 24h was very synergic (Fig. 6D), presenting practically the same response as PRIMA-1 at 100 μ M (Fig. 2A).

Our data suggest that PRIMA-1 restores p53 pathways in pancreatic cancer cells with mutant *TP53*, resulting in cell-cycle arrest and apoptosis. This small reactivating molecule also enhanced the inhibitory effects of chemotherapeutic drugs that are currently used to treat pancreatic cancer, in addition to a synergistic effect in co-treatment with the Mdm2 inhibitor Nutlin-3. Whether these results can be generalized to other types of p53 reactivating molecules is unknown, but it certainly provides the basis for testing these compounds in pancreatic cancer models, especially those with similar mechanisms of action. However, some limitations of this study should be considered while interpreting these findings. First, the experiments were limited to three cell lines. Second, only one siRNA was used to silence the *TP53* gene and, although a scrambled siRNA was used as control, we cannot rule out the occurrence of other off-target effects of the sip53 influencing the results. Third, only two methods were used to assess apoptosis: Annexin V-FITC assay and Caspase-3 cleavage detection by Western blotting. Other forms of non-apoptotic programmed cell death could be involved in the response to PRIMA-1 treatment, deserving further investigation. Russo et al. [19] recently showed that PRIMA-1 was linked to autophagy induction in breast and colon cancer cells, finding a pronounced effect in mutant p53 cells and an enhanced cytotoxic effect of PRIMA-1 in cells lacking the p53 protein, concluding that a deregulated autophagy could favor cell death induced by this molecule. Finally, an important issue that remains to be addressed is the effect of PRIMA-1 against pancreatic cancer *in vivo*. PRIMA-1 has already been used in xenograft mouse models, with a good correlation between data obtained in cell cultures and

in the xenografts [16,18,37], but no studies have been performed to confirm its effects on mouse models of pancreatic cancer. The first clinical study with the methylated form of PRIMA-1, APR-246, has been recently published and showed that this drug is safe and presents a favorable pharmacokinetic profile in humans [38]. In summary, our study shows that targeting mutant p53 may become an interesting therapeutic option for pancreatic cancer and provides an experimental basis for future *in vivo* studies and future clinical testing of PRIMA-1 in pancreatic cancer.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES (Brazil) and the International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO). Patricia Ashton-Prolla, Guido Lenz, Rafael Roesler and Gilberto Schwartzmann are investigators of CNPq. Patricia Izetti received a grant from CAPES and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

We thank Ms. Ghyslaine Martel-Planche from International Agency for Research on Cancer (IARC) for help with sequencing, Ms. Marie-Piere Cros from IARC for excellent technical assistance during immunofluorescence studies, Rio de Janeiro Cell Bank for assistance with acquisition and establishment of the cell lines in culture and Eduardo Chiela from Universidade Federal do Rio Grande do Sul for help with Western Blotting experiments.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

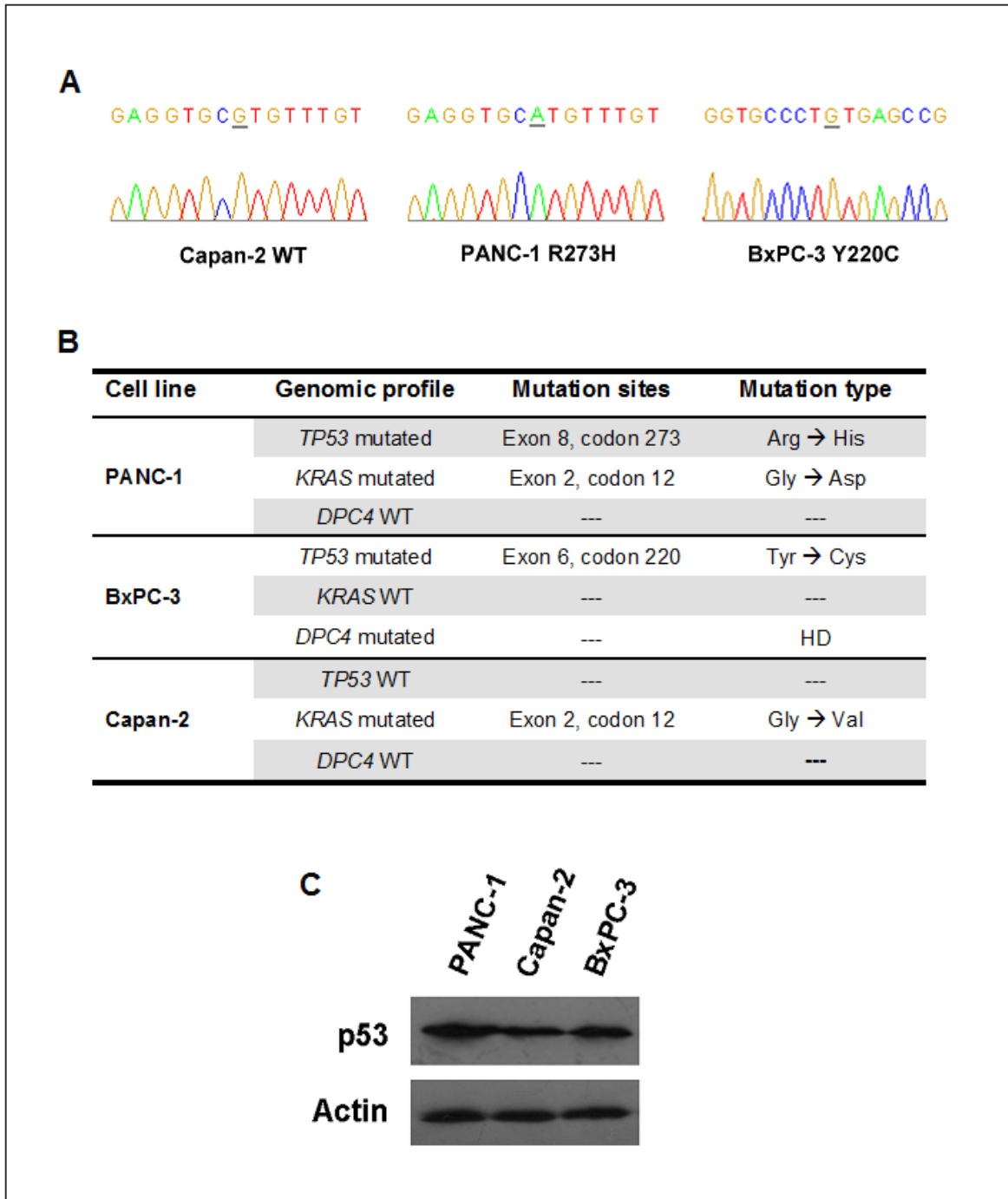


Fig.1 A) Electropherogram displaying the Capan-2 status, the p.R273H mutation in PANC-1 cells and the p.Y220C mutation in BxPc-3 cells; **B)** Genotype of the three pancreatic cancer cells lines studied according to the literature (Deer et al., 2010). WT - wild-type, HD - homoizogous deletion. **C)** Detection of p53 protein by Western-blotting in PANC-1, Capan-2 and BXPC-3 cells.

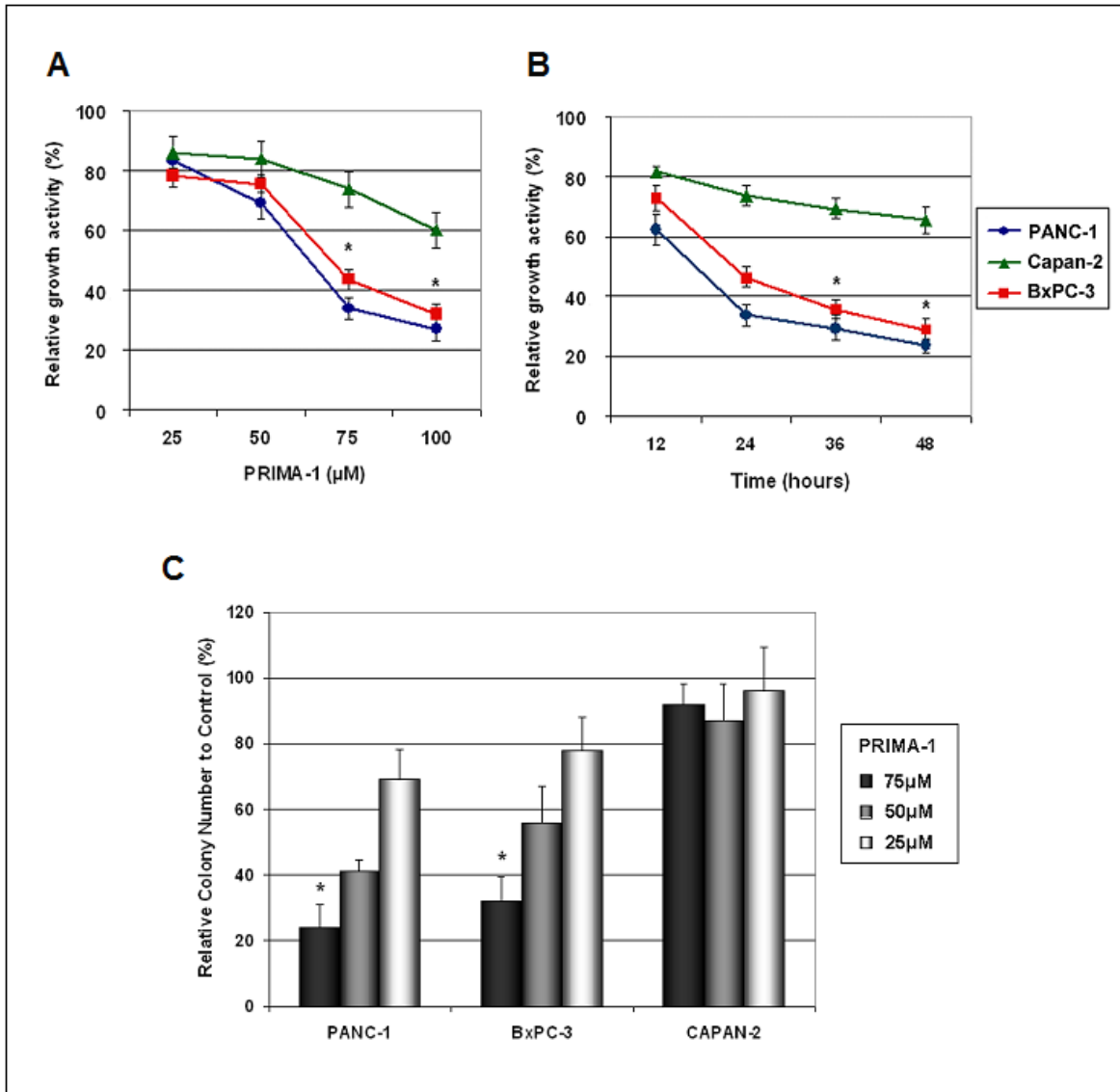


Fig.2 A) Dose–response of the MTT assays with wild type and mtp53 pancreatic cancer cell lines treated for 24h with different concentrations of PRIMA-1; **B)** Time course of the MTT assays of cells treated with PRIMA-1 75 μM. **C)** Colony forming assays 14 days after treatment for 48h. *indicates statistical significance ($p<0.05$). Error bars represent standard error of the mean.

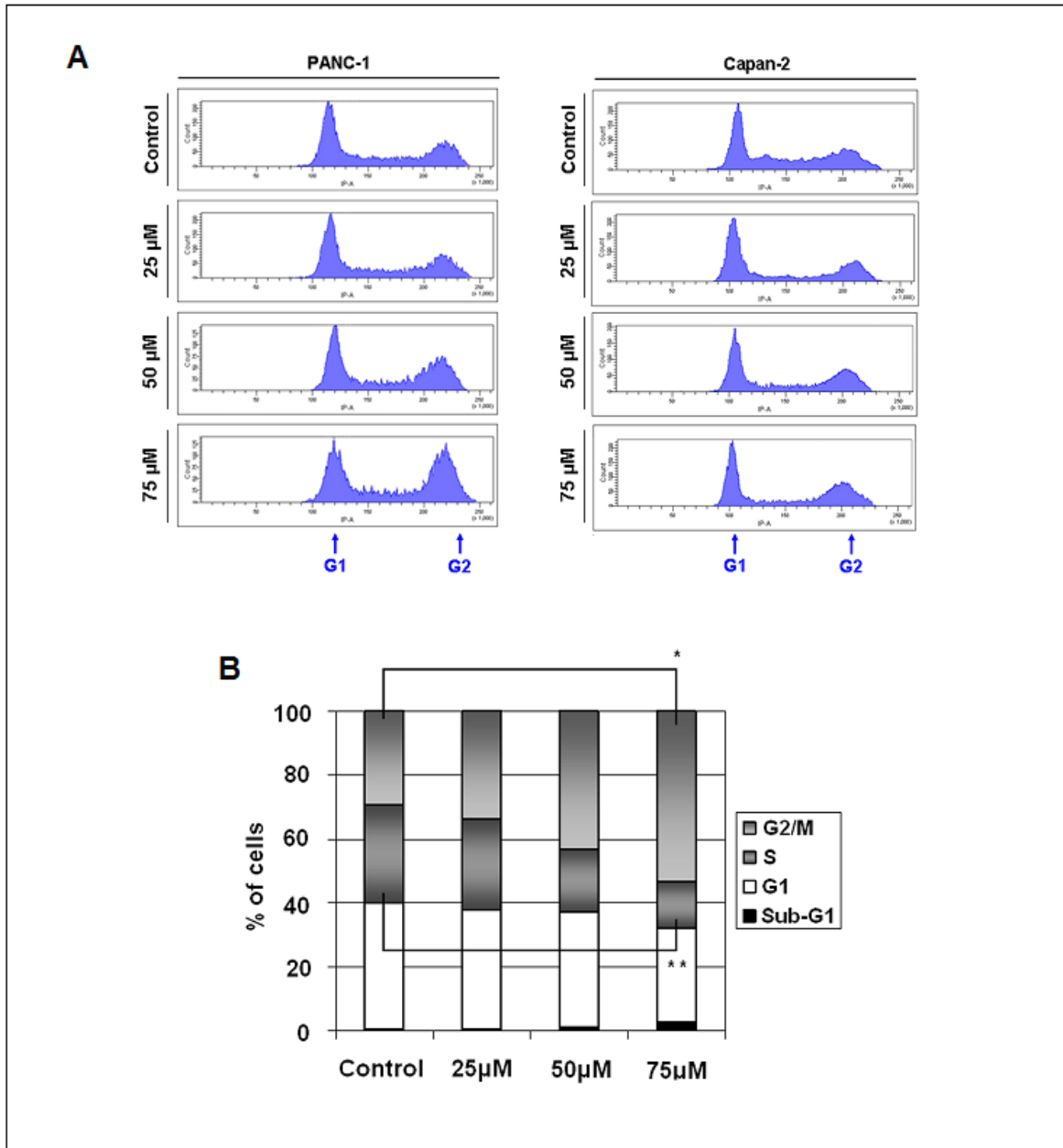


Fig.3 A) Cell-cycle changes examined by propidium iodide staining of PANC-1 cell lines after treatment for 16h, compared with Capan-2 cells. Controls were treated with an equivalent volume of DMSO. **B)** Cell cycle analysis by cytometry. * indicates statistical significance ($p < 0.05$) and ** $p < 0.001$. Error bars represent standard error of the mean.

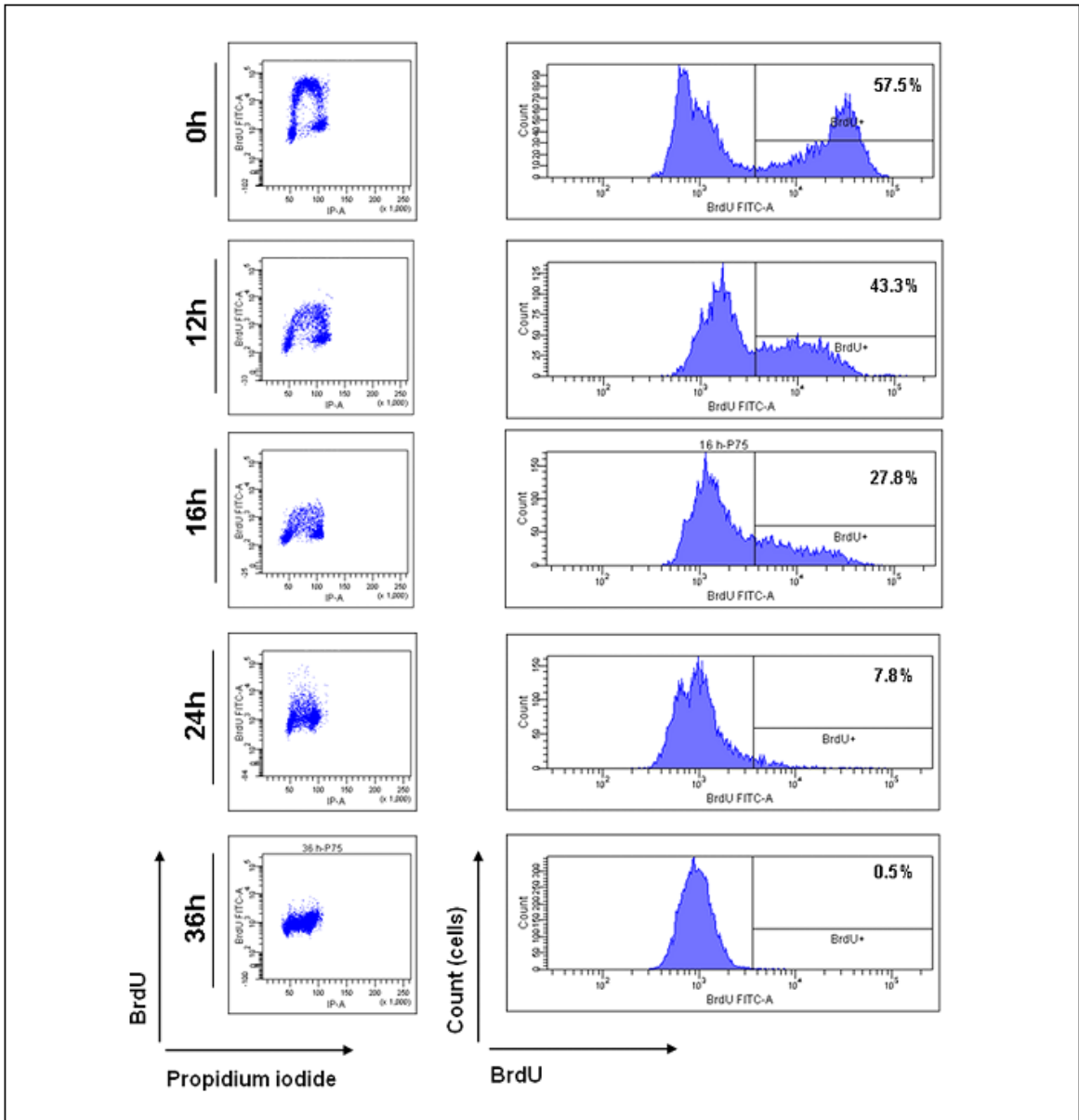


Fig.4 Time-response analysis of 75µM PRIMA-1 treatment on BrdU incorporation in PANC-1 cells. Analysis was performed by measurement of BrdU uptake using flow cytometry.

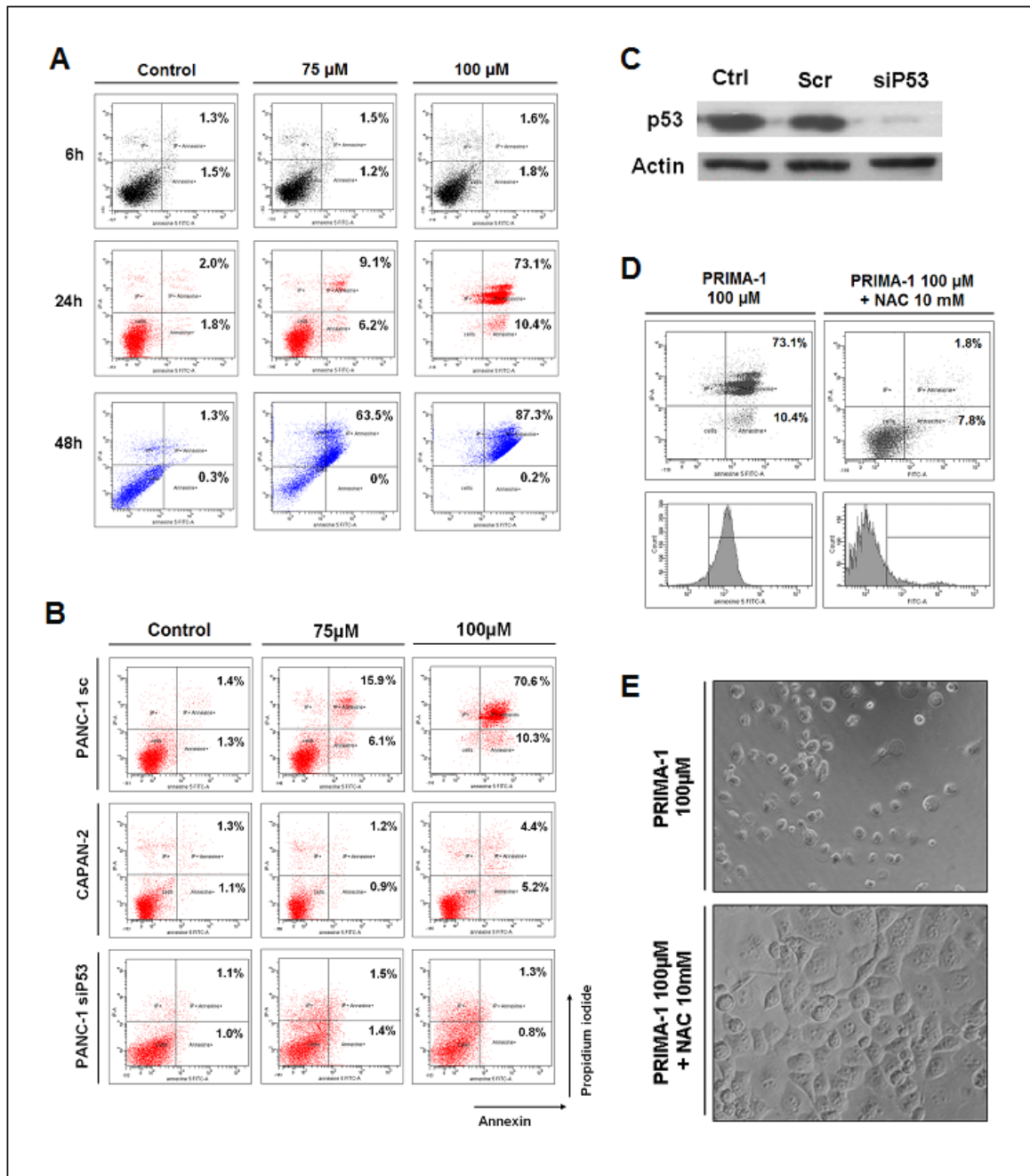


Fig.5 A) Time and dose-dependent apoptosis effects by PRIMA-1 in mtp53 PANC-1 cells following treatment for 6, 24 and 48h. **B)** Flow cytometry cell-cycle profiles of PANC-1 scramble-transfected cells, CAPAN-2 untransfected cells and PANC-1 siP53 transfected cells treated with 25, 75 and 100 μ M PRIMA-1 for 24 h. **C)** Total protein extracts were prepared from control, scramble (Scr) and p53 siRNA-transfected (siP53) cells and analyzed for p53 presence by Western Blotting. **D)** NAC 10mM effects on apoptosis induction in PANC-1 cells and **E)** morphological aspects of NAC treated cells compared with 100 μ M PRIMA-1 treated ones (original magnification 20x).

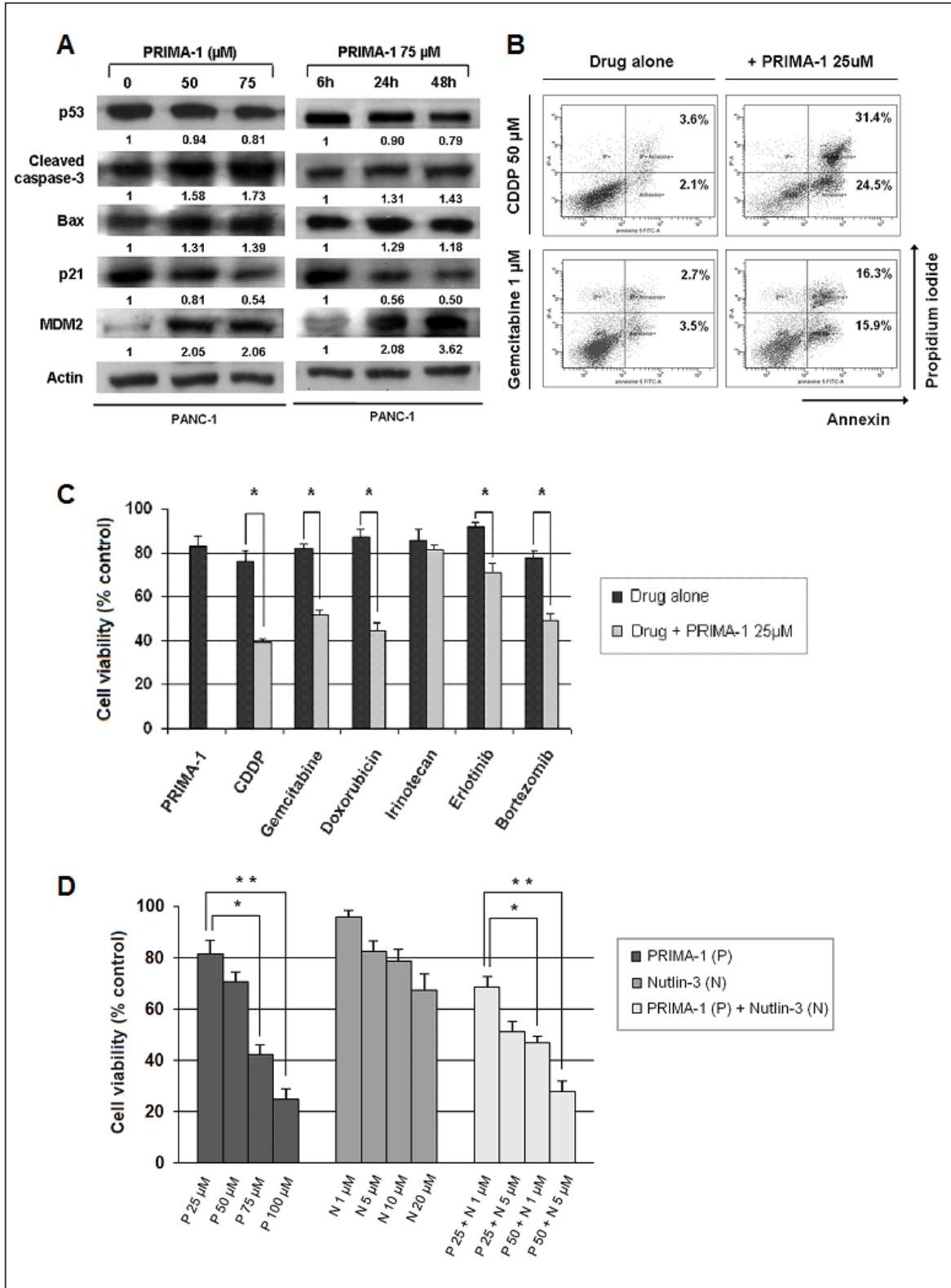


Fig.6 A) Western blotting analysis of PANC-1 cells after treatment with PRIMA-1 for 24 h in different concentrations and after treatment at 75 μM for 6 h, 24 h and 48 h. Numbers indicate the relative comparisons of band intensity between lanes. **B)** Apoptosis induction

in PANC-1 cell increased by combined treatment for 24 h with PRIMA-1 + CDDP and, to a lesser extent, with PRIMA-1 + Gemcitabine, compared with either agent alone. **C)** Growth inhibition relative to control, assayed by MTT, after treatment with PRIMA-1 and chemotherapeutic agents alone or in combination with 25 μ M PRIMA-1 for 24 h. The IC₂₀ concentrations were chose: PRIMA-1 25 μ M, CDDP 50 μ M, Gemcitabine 1 μ M, Doxorubicin 1 μ M, Irinotecan 100 μ M, Erlotinib 25 μ M, Bortezomib 1 μ M. **D)** The effects of the MDM2 inhibitor Nultin-3 were examined in PANC-1 cells treated for 24 h, alone and in combination with PRIMA-1 at several concentrations.

* indicates statistical significance ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean.

REFERENCES

1. Hoos WA, James PM, Rahib L, Talley Aw, Fleshman JM, Matrisian LM (2013) Pancreatic cancer clinical trials and accrual in the United States. *J Clin Oncology* 31(27):3432-8.
2. Sarkar FH, Banerjee S, Li Y (2007) Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 1;224(3):326-36.
3. Simeone DM (2008) Pancreatic Cancer Stem Cells: Implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14:5646-5648.
4. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364 :1817-1925.
5. Maitra A, Hruban RH (2008) Pancreatic cancer. *Ann Rev Pathol* 3: 157–188
6. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S et al (2011) Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 10(1):3-8.
7. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE (1994) p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):3025-33.
8. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997) Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731–1734.
9. Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P, Kala Z (2008) Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:732-9.
10. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Evans TR, Sansom OJ (2010) Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5;107(1):246-51.
11. Liang Y, Besch-Williford C, Benakanakere I, Hyder SM (2007) Re-activation of the p53 pathway inhibits in vivo and in vitro growth of hormone-dependent human breast cancer cells. *Int J Oncol* 31: 777-784.
12. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, Bergman J, Wiman KG, Selivanova G (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8: 282-288.

13. Nahi H, Lehmann S, Mollgard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG, Paul C, Merup M (2004) Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* 127(3):285-91.
14. Russo D, Ottaggio L, Penna I, Foggetti G, Fronza G, Inga A, Menichini P (2010) PRIMA-1 cytotoxicity correlates with nucleolar localization and degradation of mutant p53 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402(2):345-50.
15. Roh JL, Kang SK, Minn IL, Califano JA, Sidransky D et al (2011) p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 47(1): 8–15
16. Bao W, Chen M, Zhao X, Kumar R, Spinnler C, Thullberg M, Issaeva N, Selivanova G, Strömblad S (2011) PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo. *Cell Cycle*. 15;10(2):301-7.
17. Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, Gianì F, Vigneri R, Frasca F (2012) Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer* 15;130(10):2259-70.
18. Bykov VJ, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG (2005) PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 24(21):3484–3491.
19. Russo D, Ottaggio L, Foggetti G, Masini M, Masiello P, Fronza G, Menichini P (2013) PRIMA-1 induces autophagy in cancer cells carrying mutant or wild type p53. *Biochim Biophys Acta* S0167-4889(13)00121-3.
20. Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ (1994) Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* 86: 1517-1524.
21. Mercalli A, Sordi V, Formicola R, Dandrea M, Beghelli S, Scarpa A et al (2007) A preclinical evaluation of pemetrexed and irinotecan combination as second-line chemotherapy in pancreatic cancer. *Br J Can* 96:1358-1367.
22. Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerbäck D, Bergman J, Fersht AR, Hainaut P, Wiman KG, Bykov VJ (2009) PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 15(5): 376-388.
23. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 4;144(5):646-74.
24. Wang Z, Sun Y (2010) Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl Oncol* 3(1):1-12.
25. Saha MN, Qiu L, Chang H (2013) Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 6:23.

26. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286(5449):2507–2510.
27. Maecker HL, Koumenis C, Giaccia AJ (2000) p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res* 60(16):4638–4644.
28. Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Xu J, Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, El-Deiry WS. (2008) TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol Ther* 7(12):2034–2038.
29. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M (2003) Pharmacologic activation of p53 elicits Bax dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4(5):371–381.
30. Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T (1999) Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18(5):1131–1138.
31. Gartel AL, Tyner AL (2002) The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol Cancer Therapeutics* 1; 639-649.
32. Kaneuchi M, Yamashita T, Shindoh M, Segawa K, Takahashi S, Furuta I, Fujimoto S, Fujinaga K (1999) Induction of apoptosis by the p53–273L (Arg→Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sdi1 and bax. *Mol Carcinog* 26: 44 –52, 1999.
33. Okaichi, K., Wang, L. H., Sasaki, J., Saya, H., Tada, M., and Okumura, Y (1999) A point mutation of human p53, which was not detected as a mutation by a yeast functional assay, led to apoptosis but not p21Waf1/Cip1/Sdi1 expression in response to ionizing radiation in a human osteosarcoma cell line, Saos-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45: 975 –980.
34. Li J, Lee B, Lee AS (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 281: 7260-7270
35. Kobayashi N, Abedini M, Sakuragi N, Tsang BK (2013) PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *J Ovarian Res* 26;6(1):7.
36. Gobert C, Andrzej S, Larsen AK (1999) The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *PNAS*. 96(18):10355-103600.
37. Wiman KG (2010) Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29;29(30):4245-52
38. Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, Andrén O, Cherif H, Tidefelt U, Uggla B, Yachnin J, Juliusson G, Moshfegh A, Paul C, Wiman KG, Andersson PO (2012) Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 30(29):3633-9.

***The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate
enhances PRIMA-1 anticancer activity in p53
mutant pancreatic cancer cells***

Autores: Patricia Izetti, Agnes Hautefeuille, Ana Lucia Abujamra, Rafael Roesler, Pierre Hainaut, Patricia Ashton-Prolla

Situação: Em submissão para o periódico Anticancer Drugs

The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances PRIMA-1 anticancer activity in p53 mutant pancreatic cancer cells

Patricia Izetti^{1,2,3}, Agnes Hautefeuille⁴, Ana Lucia Abujamra^{3,5,6},
Rafael Roesler^{3,6,7}, Pierre Hainaut⁸, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,9}

1 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

2 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

3 Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

4 International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 - Lyon, France. Zip code: 69372

5 Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

6 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90035-003

7 Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 - Sala 211 - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 90050-170

8 International Prevention Research Institute, 95 Cours Lafayette, 69006 - Lyon, France. Zip code: 69006

9 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M - Porto Alegre-RS, Brazil. Zip code: 91501-970

Corresponding author:

Patricia Izetti, MD

Instituto Nacional de Câncer

Praça da Cruz Vermelha, nº 23

20230-130 - Rio de Janeiro – RJ, Brazil

e-mail: patriciaizetti@gmail.com

Phone number: + 55 213207-1660

ABSTRACT

PRIMA-1, a small-molecule that reactivates the mutant p53 protein, is an appealing candidate for the treatment of highly resistant tumors with p53 mutations, such as pancreatic cancer. However, use of PRIMA-1 as single agent in a safe dosage may be insufficient for cancer therapy. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are a class of targeted agents that can modulate epigenetic changes and affect gene expression. Because of their broad antineoplastic activity and few side effects, HDACis have been candidates for use in combination with anticancer agents in several types of cancer, but no previous studies have evaluated its synergism with pharmacological reactivators of the mutant p53 protein. In the present study, we explored whether the anticancer effects of the mutant p53 reactivating molecule PRIMA-1 could be enhanced by the HDACi sodium butyrate (NaB). PANC-1 cells (p53 mutant) were treated with NaB alone or in combination with PRIMA-1, and the effects on proliferation and cell death were analyzed. The co-treatment with PRIMA-1 (25 µg/ml) and NaB (5 mmol/l) significantly increased the growth-inhibitory effect and apoptosis on pancreatic cancer cells, in comparison with single agent NaB or PRIMA-1 treatments. The combination also appears to induce senescence, as observed by the increased number of cells positive for β-galactosidase. To shed light on the underlying mechanism of the synergistic action of NaB and PRIMA-1, we determined *TP53* mRNA levels by real-time qRT-PCR and observed that NaB significantly induced mutant *TP53* gene expression, especially after 48 h treatment ($p < 0.05$). In conclusion, NaB significantly improved the antitumor effect of PRIMA-1 on p53 mutant pancreatic cancer cells, providing an alternative strategy for pancreatic cancer control.

Key words: pancreatic cancer, histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, PRIMA-1, p53

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive human malignancies and is quite resistant to conventional treatments. Gemcitabine, the standard chemotherapeutic agent for PDAC, and emerging combinations such as FOLFIRINOX, offer only a small benefit, slightly affecting the course of this disease (Conroy et al., 2011). The development of new effective treatments, capable of reversing the biology of this aggressive disease, without increasing toxicity, remains a critical requirement (Koutsounas et al., 2013).

Mutation of the *TP53* tumor suppressor gene is the most common genetic alteration in human cancer, and 50-70% of all pancreatic cancers carry point mutations in the *TP53* gene (Lacroix et al., 2006). Mutations in the p53 pathway are thought to play a key role in promoting tumor cell survival and tumor cell resistance to chemotherapeutic drugs. Therefore, restoring wild-type p53 function to the mtp53 seems a promising avenue of research for cancer therapy (Foster et al., 2002; Wang et al., 2003). PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*) is a small molecule that has the ability to convert mtp53 to an active conformation, restoring sequence-specific DNA binding and transcriptional activation of mtp53 and leading to p53-mediated cell-cycle arrest and death (Bykov et al., 2002). Thus, it seems an interesting alternative for pancreatic cancer treatment, since its target is inactivated in up to 70% of pancreatic ductal adenocarcinomas.

Histone deacetylases (HDAC) represent a family of enzymes that regulate paramount cellular activities including epigenetic silencing of tumor suppressor genes and modulation of protein functions. Several HDAC inhibitors (HDACi) have been recently approved for the treatment of hematological malignancies, however, in solid malignancies, the HDACis have shown limited efficacy when used in monotherapy, including in pancreatic cancer (de Bono et al., 2008; Zafar et al., 2012). As an alternative, a growing body of evidence has tested HDACi compounds in combined therapy strategies (Ellis et al., 2010), with promising effects in pancreatic cancer *in vitro* (Piacentini et al., 2006; Bai et al., 2006; Chun et al., 2009; Iwahashi et al., 2011) and in experimental tumors (Donadelli et al.,

2007). Unfortunately, these results have not yet translated into clinical trials (Pili et al., 2012).

Sodium butyrate (NaB), an HDACi that targets the zinc-dependent histone deacetylases (Class I and II HDACs), increase the expression of several genes involved in cell cycle and apoptosis, including *TP53* (Bukreeva et al., 2009). Considering that PRIMA-1 could have its effects enhanced by the induction of the mutant p53 protein, we sought to investigate whether the combination with NaB could have synergistic effects on proliferation, apoptosis and senescence of p53 mutant pancreatic cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and drugs. The mutant p53 (mtp53) expressing pancreatic cancer cell line PANC-1 (p.R273H) was used in this study. The cell line was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and sequenced to confirm p53 mutation status. PANC-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with L-glutamine and 4.5g/L of D-Glucose (Gibco®, Life Technologies, USA), 10% fetal bovine serum (Life Technologies, USA), gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Brazil), and fungizone (250 mg/kg; Invitrogen, USA). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. PRIMA-1 and NaB were acquired from Sigma® and dissolved in 100% dimethyl sulphoxide (DMSO) for cellular treatments.

Cell viability assay. Cell viability was measured by MTT assay (Sigma-Aldrich, USA) after treatment with PRIMA-1 and NaB. Briefly, cells were seeded in each well of 96-well plates in 100 µl culture medium and incubated overnight at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The next day, the medium was removed and cells washed with PBS and treated with vehicle control (DMSO, dimethylsulfoxide), PRIMA-1 and/or NaB for 12 to 48h at different concentrations and then the medium was replaced with MTT solution diluted in medium once the treatment was completed. The plates were further incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 h

and then left at room temperature until completely dry. DMSO was then added and the absorbance was read at 492 nm using a microplate enzyme-linked immunoassay reader (ELISA). Viability was determined as the percentage absorbance of treated cells compared to those of vehicle treated cells (control).

Cell apoptosis and death assay. The Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences, USA) was used to detect apoptosis and propidium iodide (PI) to detect DNA fragmentation or cell death. Cells were grown in 6-well plates overnight and the next day, the medium was removed and cells washed and treated with 25-100 μ M PRIMA-1 and/or with NaB 1-10 mM for 24 h. Once the treatment was completed, cells were harvested and washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 1x binding buffer, and stained with Annexin V-FITC and PI, according to the manufacturer's instructions. The percentage of Annexin V-FITC-positive and PI-positive cells was determined from the fluorescence of 10,000 cells by a BD FACSCanto (BD Biosciences, USA). Data were analysed using the CellQuest™ software (BD Biosciences, USA).

Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining PANC-1 cells cultured on chamber slides were fixed in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde after NaB, PRIMA-1 and cotreatment for 72h. SA- β -gal staining was performed using a SA- β -gal staining kit (Sigma, USA).

qRT-PCR qRT-PCR was carried out using a TaqMan RNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems). The cDNA solution was amplified using TaqMan 2x Universal Master Mix with no AmpErase UNG (Applied Biosystems) and the quantitative PCR run on a StepOne real-time PCR System (Applied Biosystems). The reaction mix was incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The expression of the *TP53* gene was normalized using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using GAPDH expression as endogen control.

Statistical analysis. Values were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) number of cells. The mean values for control cells were taken as 100% in MTT analyses. Drug interaction was assessed at different concentration ratios using the combination index (CI) (Chou et al., 1994; Mercalli et al., 2007), where $CI < 1$, $CI = 1$ and $CI > 1$ indicate synergistic, additive and antagonistic effects, respectively. Data were treated with one-way analysis of variance (ANOVA) and

non-parametric tests if needed. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. SPSS version 18.0 was used for data handling and statistical analyses.

RESULTS

HDAC inhibition and mutant p53 reactivation reduced pancreatic cancer cell growth *in vitro*

To evaluate the role of HDAC inhibition in the mutant p53 pancreatic cancer cells, we first examined their time-dependent and concentration-dependent growth inhibition in the presence of NaB (Figure 1A). Our results showed only a small inhibitory effect of NaB treatment alone on PANC-1 cells (*TP53*-p.R237H), with a 23% growth reduction observed at 5 mM and 37% at 10 mM. Incubation of cells with PRIMA-1 75 μ M for 24 h was associated with a significant inhibitory effect, showing a growth reduction of almost 70% in PANC-1 cells (Figure 1B). However, the same was not observed with 25 and 50 μ M treatments, which showed a growth reduction of approximately 20 and 30%, respectively.

In order to explore whether HDAC inhibition could enhance the anticancer effects of PRIMA-1, we evaluated the combination of NaB at 5 mM with PRIMA-1 at 25 μ M, which significantly increased the growth-inhibitory effect on mutant p53 pancreatic cancer cells, in comparison with single agent NaB or PRIMA-1 treatments (Figure 1C). Combining a higher dose of NaB (10 mM) with PRIMA-1 25 μ M caused an even higher response, with a 70% growth reduction in PANC-1 cells, similarly to the response seen with PRIMA-1 75 μ M.

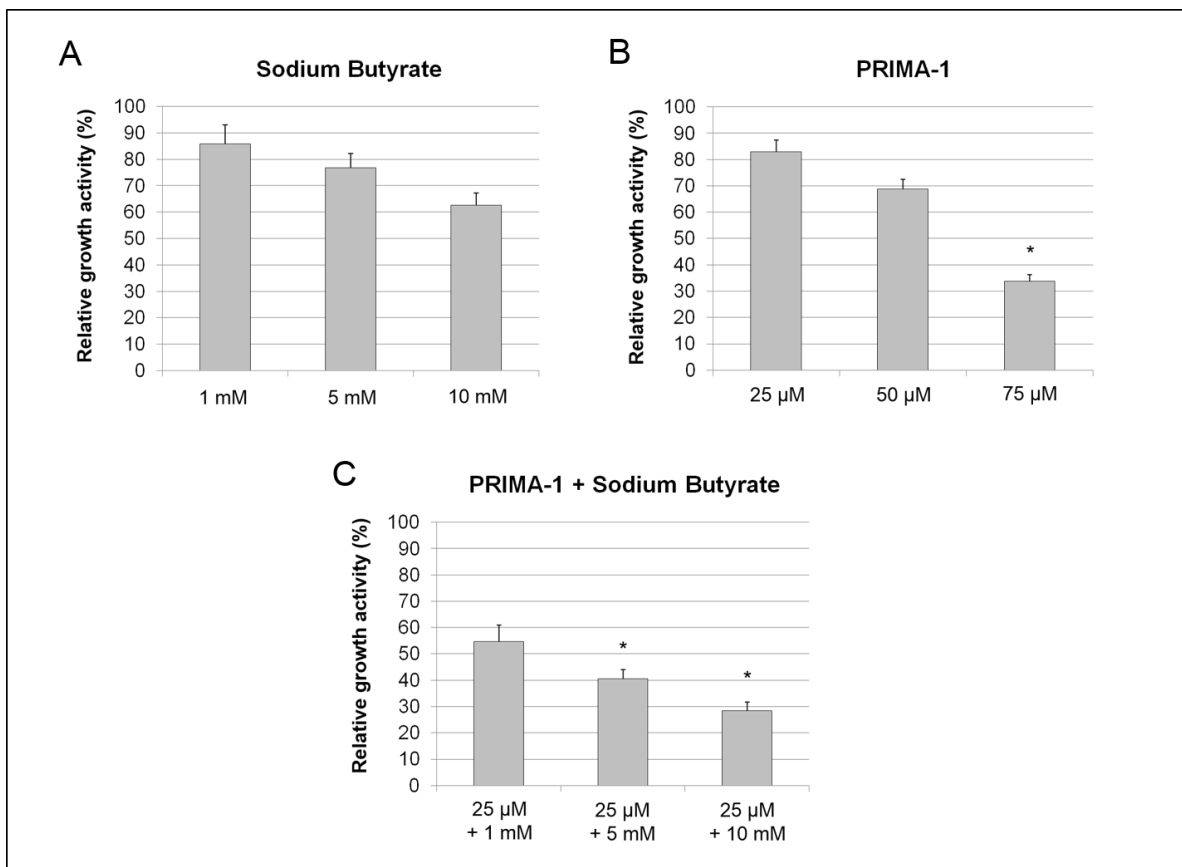


Figure 1. A) Dose–response of the MTT assay with mtp53 cell lines treated with different concentrations of NaB for 24h. **B)** Dose–response of the MTT assay after treatment with different concentrations of PRIMA-1. **C)** Dose–response of the MTT assay after treatment with PRIMA-1 and NaB. (*) indicates statistical significance ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean.

PRIMA-1 and NaB synergize to induce apoptosis and cell death in PANC-1 cells

Treatment of PANC-1 cell lines with NaB 5mM for 24h caused a small increase in Annexin-V positive cells when compared with NaB 1mM, which was maintained constant even with higher doses (10mM). However, when NaB 5mM was combined with PRIMA-1 25 μM, a significant increase in the proportion of early apoptotic (Annexin+/PI-) and late stage apoptotic/necrotic cells (Annexin+/PI+) was observed (Figure 2). The cotreatment with NaB 5 mM and

PRIMA-1 50 μM presented a proportion of apoptotic cells very similar to the treatment with PRIMA-1 alone at 100 μM , suggesting that this combination could be very interesting for decreasing the toxicity related with PRIMA-1 treatment.

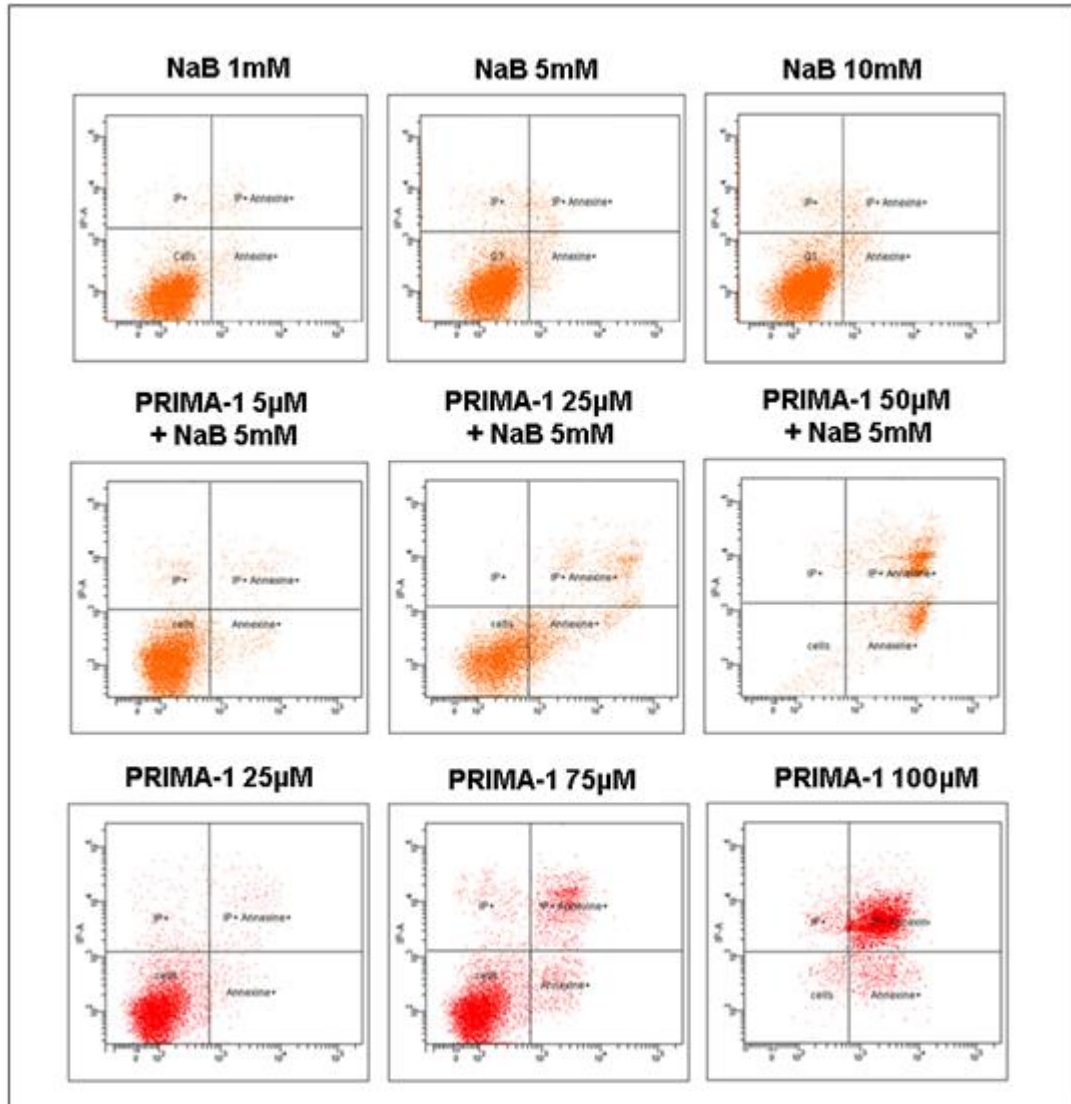


Figure 2. Flow cytometric analysis of cells undergoing apoptosis after different treatment strategies for 24h.

Co-treatment with NaB and PRIMA-1 induces senescence in mutant p53 cancer cells

Recent studies have proposed that the induction of premature senescence is an important mechanism by which HDAC inhibitors exert their anticancer effect, including NaB (Xiao et al., 1997; Terao et al., 2001). We then sought to examine if

the combination of the p53 reactivating molecule with NaB could induce senescence in PANC-1 cells. As shown in Figure 3, the results indicate that the number of SA- β -gal positive senescent cells was markedly increased with higher doses of NaB/PRIMA-1 treatment, as well as the percentage of positive cells, endorsing that this combination can induce senescence in mtp53 cancer cells in a dose-dependent manner (Figure 4).

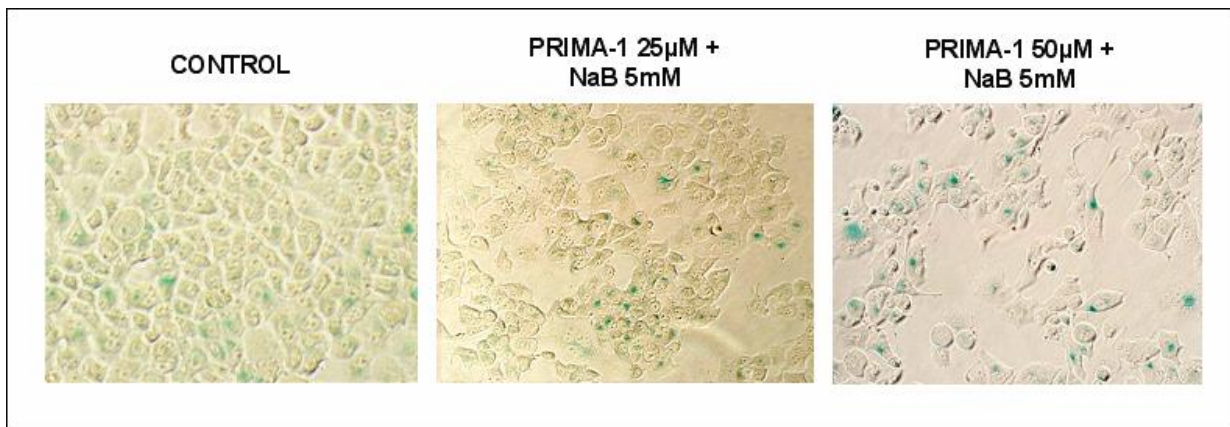


Figure 3. Effects of PRIMA-1 and NaB on pancreatic cancer cells senescence.

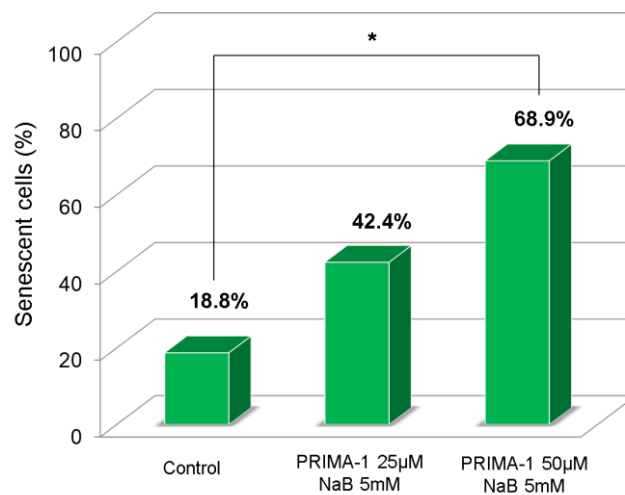


Figure 4. Percentage of senescent cells after treatment with NaB/PRIMA-1 combination. * $P < 0.05$

NaB enhances p53 mRNA expression

We then evaluated the effects of NaB on *TP53* mRNA expression levels, in order to investigate if the molecular mechanism by which NaB synergised with PRIMA-1 could be related to the modulation of gene expression by the deacetylase inhibitor. NaB 5mM significantly increased the expression of *TP53* mRNA following 12h of exposure (Figure 5A), increasing the levels of the targeted protein for PRIMA-1. Transcription induction secondary to NaB treatment was also time-dependent, with increasement in *TP53* mRNA levels after 6h of NaB treatment (Figure 5B).

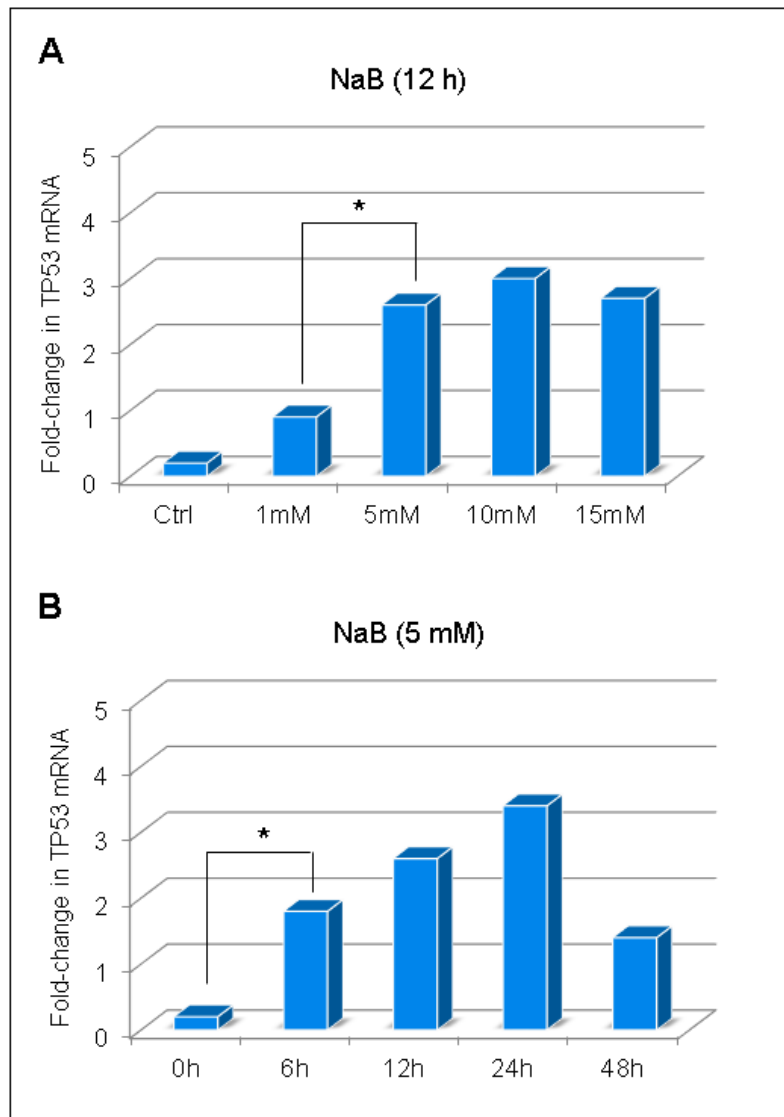


Figure 5. Fold-change levels of *TP53* mRNA expression secondary to NaB treatment. Ctrl: control. * $P < 0.05$

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to investigate the combined effect of PRIMA-1 and an HDACi on cancer cells. In this study, we have found that the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaB) cooperated with PRIMA-1 to affect p53 mutant pancreatic cancer cells. We have shown that the p53

reactivating molecule and NaB interacted to promote cell death, senescence and CI analysis indicated that this interaction was synergistic. These results are in concordance with a previous report on the cooperative induction of p53 target genes by Nutlin-3, a p53/MDM2 interaction inhibitor, with the histone deacetylase inhibitors NaB, vorinostat, MS-275 and apicidin in cancer cells lines (Palani et al., 2012).

To date, at least ten different HDACis, including NaB, valproic acid, MS-275, CI-994, FK228, belinostat and LAQ824 are in phase II or III clinical trials (Koutsounas et al., 2013). Among these, the short-chain fatty acid NaB induces apoptosis in a variety of cancer cells and different tissue-specific targets have been identified. Natoni et al., (2005) have previously demonstrated the ability of NaB to sensitize pancreatic cancer cells to both intrinsic and extrinsic apoptosis, representing a good adjuvant for anticancer treatment. This effect seems to be primarily exerted at the transcriptional level, as evidenced by previous qRT-PCR analysis (Xiao et al., 1997). Here we have showed that the mutant p53 reactivating molecular PRIMA-1 was able to significantly control pancreatic cancer cell growth when combined with NaB, in smaller doses than the necessary when used alone. Our results demonstrated that the co-treatment with NaB and PRIMA-1 resulted in increased levels of apoptosis in mutant p53 pancreatic cancer cells, highlighting a new interesting intervention for the treatment of pancreatic cancer.

Co-treatment with PRIMA-1 and NaB induced senescence in a dose-dependent manner, confirming previous reports on the induction of senescence with NaB and others types of HDACis (Terao et al., 2001). In order to investigate the ability of NaB to induce p53 mRNA expression, and to explain the observed synergism with PRIMA-1, a qRT-PCR analysis was conducted. A significant increase in p53 mRNA levels was detected with NaB treatment at 5 mM, in a time-dependent manner. Our results not only confirmed the transcriptional effects of NaB, but added new information to the possibilities of combined therapies involving HDAC inhibitors and mutant p53 reactivating drugs. Numerous studies have shown that the level of *TP53* mRNA generally increases after cell exposure to NaB (Bukreeva et al., 2009), but no previous study have confirmed these effects in pancreatic cancer cells with mutant *TP53*.

The reactivation of the p53 tumor pathway, mediated by agents such as PRIMA-1, is a promising strategy for anticancer therapy, including pancreatic cancer. However, the antineoplastic activity of PRIMA-1 applied as single agent may be insufficient for a significative tumor response or very toxic when delivered at high doses. Hence, PRIMA-1 may have to be combined with other treatment regimens to achieve a successful outcome. In a previous study from our group, Izetti et al. (in press) showed that the concurrent treatment with PRIMA-1 25 μ M and four different drugs (cisplatin, gemcitabine, erlotinib and the proteasome inhibitor bortezomib) induced a synergistic growth inhibition and apoptosis in p53 mutant pancreatic cancer cells. However, a synergistic effect with non-chemotherapeutic drugs such as sodium butyrate, which has showed to have less adverse effects in clinical studies, could be a more interesting approach. Herein, we have described that the antineoplastic efficacy of PRIMA-1 at lower doses can be considerably enhanced by cotreatment with sodium butyrate. In conclusion, our *in vitro* findings provide an alternative strategy for pancreatic cancer control that should be confirmed by future *in vivo* studies.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES (Brazil) and the International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO). P.A.P., G.L., R.R. are investigators of CNPq. P.I received a grant from CAPES and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

We thank Rio de Janeiro Cell Bank for assistance with acquisition and establishment of the cell lines in culture.

REFERENCES

- Bai J, Demirjian A, Sui J, Marasco W, Callery MP (2006) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A and proteasome inhibitor PS-341 synergistically induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1245–1253.
- Bots M, Johnstone RW (2009) Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin Cancer Res* 15: 3970–3977.
- Bukreeva EI, Aksenov ND, Bardin AA, Pospelov VA, Pospelova TV (2009) Effect of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaB) on transformants A1a+cHa+Ras expressing wild type p53 with suppressed transactivation function. *Cell Tissue Biology* 3(5):445-53.
- Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8: 282-288.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364 :1817-1925.
- Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ (1994) Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* 86:1517-1524.
- Chun SG, Zhou W, Yee NS (2009) Combined targeting of histone deacetylases and hedgehog signaling enhances cytotoxicity in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 8: 19–30.
- de Bono JS, Kristeleit R, Tolcher A, Fong P, Pacey S, et al. (2008) Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of LAQ824, a hydroxamate histone deacetylase inhibitor with a heat shock protein-90 inhibitory profile, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 14: 6663–6673.
- Donadelli M, Costanzo C, Beghelli S, Scupoli MT, Dandrea M, et al. (2007) Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1095–1106.
- Ellis L, Pili R (2010) Histone deacetylase inhibitors: Advancing therapeutic strategies in hematological and solid malignancies. *Pharmaceuticals* 3: 2441–2469.
- Foster BA, Coffey HA, Morin MJ and Rastinejad F (1999) Pharmacological rescue

of mutant p53 conformation and function. *Science* 286: 2507-2510.

Iwahashi S, Ishibashi H, Utsunomiya T, Morine Y, Ochir TL, et al. (2011) Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines. *J Med Invest* 58: 106–109.

Izetti P, Hautefeuille A, Abujamra AL, de Farias CB, Giacomazzi J, Alemar B, Lenz G, Roesler R, Schwartzmann G, Osvaldt AB, Hainaut P, Ashton-Prolla P (in press) PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. *Invest New Drugs*.

Koutsounas I, Giaginis C, Patsouris E, Theocharis S (2013) Current evidence for histone deacetylase inhibitors in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 19(6):813-28.

Lacroix M, Toillon RA and Leclercq G (2006) p53 and breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 13: 293-325.

Mercalli A, Sordi V, Formicola R, Dandrea M, Beghelli S, Scarpa A et al (2007) A preclinical evaluation of pemetrexed and irinotecan combination as second-line chemotherapy in pancreatic cancer. *Br J Can* 96:1358-1367.

Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Montani MSG (2005). Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochemica et Biophysica Acta* 1745: 318-329.

Palani CD, Beck JF, Sonnemann J (2012) Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. *Invest New Drugs* 30:25–36.

Piacentini P, Donadelli M, Costanzo C, Moore PS, Palmieri M, et al. (2006) Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation. *Virchows Arch* 448: 797–804.

Pili R, Salumbides B, Zhao M, Altiok S, Qian D, et al. (2012) Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 106: 77–84.

Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, Kato H, Furugen Y, Yoshida K, Kato K, Wake N (2001) Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int J Cancer* 94(2):257-67.

Wang W, Rastinejad F and El-Deiry WS (2003) Restoring p53- dependent tumor suppression. *Cancer Biol Ther* 2: S55-S63.

Xiao H, Hasegawa T, Miyaishi O, Ohkusu K, Isobe Ki (1997) Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 237(2):457-60.

Zafar SF, Nagaraju GP, El-Rayes B (2012) Developing histone deacetylase inhibitors in the therapeutic armamentarium of pancreatic adenocarcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 16: 707–718.

6. DISCUSSÃO

Os resultados desta tese serão discutidos separadamente para cada uma das linhas de investigação abordadas: 1) estudo de biomarcadores salivares como possíveis ferramentas para a detecção do câncer de pâncreas e 2) avaliação de novas drogas e combinações terapêuticas em linhagens de adenocarcinoma ductal pancreático.

6.1. Estudo de biomarcadores salivares em pacientes com doença pancreática

Muitos estudos têm demonstrado o potencial da saliva como fonte de material biológico para detecção de biomarcadores de diagnóstico de doenças sistêmicas, tais como síndrome de Cushing, hepatites virais, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e diferentes tipos de câncer (Wong et al., 2006; Bonne et al., 2012). A facilidade para a coleta da saliva e a não invasividade do método são aspectos atrativos para o seu uso na prática clínica, o que tem estimulado o interesse crescente e desenvolvimento de novas tecnologias para análises desse tipo de fluído.

Recentemente, Zhang et al. (2010) demonstraram que o perfil transcriptômico salivar de pacientes com câncer de pâncreas é significativamente diferente do perfil de controles sem câncer, obtendo uma sensibilidade de 90% e especificidade de 95% com a detecção de quatro principais biomarcadores mRNA: *KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* e *DPM1*. Com o estudo descrito no Capítulo I da presente tese, objetivamos validar o estudo de Zhang e colaboradores em uma amostra atendida e recrutada consecutivamente no Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a fim de determinar a aplicabilidade clínica desses quatro marcadores em nosso contexto. A análise desses resultados poderá permitir, além da validação, uma estimativa sobre o potencial uso dos mesmos em futuros estudos para rastreamento de pacientes de alto risco a partir do fluído salivar. Nossos resultados demonstraram uma clara associação entre a expressão do gene *KRAS* e o diagnóstico de adenocarcinoma

ductal pancreático, encontrando-se sete vezes mais expresso na saliva de pacientes acometidos do que na de controles sem lesão pancreática (fold-change de 7,37, $P=0,011$). No entanto, uma alta expressão também foi detectada em pacientes com pancreatite crônica (fold-change de 7,73), não sendo possível a discriminação, a partir da expressão de *KRAS*, entre afecções benignas e malignas do pâncreas. Em relação ao biomarcador *DPM1*, não foi possível estabelecer qualquer associação estatisticamente significativa entre os diferentes grupos, apenas quando interpolado com os resultados da expressão de *KRAS*. Nesse caso, encontramos uma sensibilidade de 77,1% e especificidade de 80% para a discriminação entre pacientes com doenças pancreáticas (câncer e pancreatite crônica) e controles sem doença (AUC=0.860, 95% CI: 0.746 - 0.974, $P=0.001$). Além disso, ao contrário do que fora descrito por Zhang e colaboradores, não encontramos níveis de expressão detectáveis dos genes *ACRV1* e *MBD3L2* em nenhuma das amostras de saliva avaliadas.

Estudos de transcriptoma com outros tipos tumorais confirmaram o potencial dos biomarcadores salivares como preditores diagnósticos. Zhang e colaboradores (2012), em um estudo envolvendo câncer de pulmão, identificaram um painel de sete mRNAs (*BRAF*, *CCNI*, *EGRF*, *FGF19*, *FRS2*, *GREB1* e *LZTS1*) capazes de discriminar pacientes afetados de controles saudáveis. Outro estudo, com câncer de ovário, também determinou um painel capaz de discriminar casos de controles saudáveis com uma sensibilidade de 85,7% e especificidade de 91,4% (mRNAs *AGPAT1*, *B2M*, *BASP2*, *IER3* e *IL1B*) (Lee et al., 2012).

Em relação às análises de metaboloma em conteúdo salivar, Sugimoto e colaboradores (2010) analisaram amostras de 18 pacientes com câncer de pâncreas em comparação a amostras de 87 indivíduos saudáveis, obtendo uma AUC (área sob a curva) de 0,993 para a discriminação dos casos com doença a partir de 57 metabólitos diferencialmente expressos. Apesar dos resultados relativamente promissores, os estudos de proteoma apresentam maior complexidade para translação à prática clínica, sendo normalmente preteridos em relação aos marcadores transcriptômicos.

O diagnóstico precoce é um fator chave para o controle de qualquer neoplasia, uma vez que permite o manejo da doença em momentos mais

suscetíveis a um tratamento curativo. Ter uma metodologia de fácil captação em larga escala e não onerosa como as análises de transcriptoma de fluído salivar, e que consiga altas taxas de sensibilidade e especificidade para a detecção de lesões em estádios precoce, é uma das principais esperanças para o efetivo controle do câncer. Muitos anos foram necessários para que se conseguisse tecnologias de estabilização do RNA presente no conteúdo salivar, uma vez que após a coleta se não for mantido de forma adequada, ocorre rápida fragmentação e perda da informação transcriptômica. Apenas na última década é que avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de reagentes e recipientes específicos para a estabilização do conteúdo coletado (Park et al., 2006), possibilitando resultados mais promissores a partir da análise de mRNAs salivares. Por esse atraso temporal, o maior número de estudos sobre análise salivar ainda são provenientes da proteômica (Streckfus et al., 2012), embora os estudos de transcriptoma venham apresentando as maiores taxas de sensibilidade e especificidade para a detecção de neoplasias, com maior probabilidade de translação para a prática clínica (Zhang et al., 2010; Lee et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Uma questão que ainda merece extensa investigação diz respeito aos mecanismos pelos quais o conteúdo secretado na saliva correlaciona-se à presença de uma neoplasia em sítio tão distante anatômica e vascularmente como o câncer de pâncreas. Recentemente, Lau e colaboradores (2013) demonstraram que exossomos derivados do tumor (contendo proteínas, mRNAs e microRNAs) poderiam ser a conexão entre tumores distantes da cavidade oral e as secreções das glândulas salivares. Em um estudo experimental com modelos *in vivo* com adenocarcinoma ductal pancreático, os pesquisadores observaram uma significativa redução nos níveis dos biomarcadores secretados na saliva após a supressão da biogênese dos exossomos. Dessa forma, hipotetizaram que tais exossomos poderiam ser liberados na corrente sanguínea, atingindo as glândulas salivares onde induziriam a secreção de conteúdos tumor-específicos.

6.2. Avaliação de novas drogas para o tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático

O desenvolvimento de novas drogas é parte importante do processo de controle do câncer e, nas últimas duas décadas, o principal foco tem sido as drogas alvo-moleculares. Nesse contexto foi identificado e desenvolvido o composto PRIMA-1 (ou sua forma metilada PRIMA-1^{MET}/APR-246), droga reativadora da proteína p53 mutante que apresenta um grande potencial para tratamento e, teoricamente, pouca influência em tecidos saudáveis sem mutação no gene *TP53*. Apesar de já ter sido testada em uma série de tumores, como leucemia (Nahi et al., 2004), câncer de mama (Russo et al., 2010), melanoma (Bao et al., 2011) e câncer de tireóide (Messina et al., 2012), nenhum estudo prévio avaliou o seu papel em linhagens de adenocarcinoma ductal pancreático, o que é de fundamental importância considerando que 50-70% desses tumores apresentam mutações no gene *TP53*. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com PRIMA-1 induziu a apoptose de forma seletiva nas células com proteína p53 mutante (PANC-1) quando comparado às células com p53 selvagem (CAPAN-2), em que apenas altas doses da droga (100 µM) foram capazes de induzir alguma resposta. Além disso, observamos parada no ciclo celular em G2/M após o tratamento com 75 µM por 12h e uma redução de 50% na síntese de DNA após o tratamento na mesma dose por 24h. O silenciamento do gene *TP53* por um siRNA reduziu significativamente o efeito tóxico da PRIMA-1, sugerindo que seus efeitos são p53-dependentes. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que encontraram resultados semelhantes em linhagens de câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão pequenas células e tireóide (Roh et al., 2011; Zandi et al., 2011, Messina et al., 2012;)

Para avaliar possíveis sinergismos entre o composto PRIMA-1 e outras drogas atualmente disponíveis na prática clínica, fizemos o tratamento combinado com seis diferentes quimioterápicos e drogas alvo-moleculares, obtendo um importante efeito sinérgico com cisplatina, gencitabina, erlotinibe, doxorubicina e bortezomibe em linhagens com p53 mutante. Apenas com o composto irinotecano não foi possível observar um aumento na resposta ao tratamento, talvez pelos

efeitos antagonistas entre as duas drogas: o irinotecano inibe a enzima topoisomerase I enquanto a proteína p53 reativada pela PRIMA-1 leva à sua ativação (Gobert et al., 1999). Roh e colaboradores (2011), ao estudar a ação de diferentes drogas ativadoras e reativadoras de p53 em linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, encontraram resultados semelhantes em relação aos sinergismos com cisplatina e erlotinibe, demonstrando um aumento no controle da proliferação. Além de avaliar a combinação com diferentes drogas quimioterápicas, também testamos a associação de PRIMA-1 com dois diferentes compostos: o inibidor da interação Mdm2/p53, Nultina-3 (Capítulo II), e o inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio (Capítulo III), combinações que até o momento não foram avaliadas em nenhum tipo tumoral e que também se demonstraram sinérgicas. No caso da combinação com o inibidor de HDACs butirato de sódio, além de redução na proliferação e indução de apoptose, observamos ainda a indução de senescência em células com a proteína p53 mutante, a qual aumentou de forma dose-dependente e atingiu resposta máxima na combinação de PRIMA-1 50 μ M com butirato de sódio 5mM.

A fim de confirmar se o mecanismo de ação do composto PRIMA-1 realmente envolve modificações nos grupos tióis, como previamente descrito (Lambert et al., 2009), incubamos as linhagens suscetíveis (PANC-1) por 24h com o antioxidante N-acetilcisteína e PRIMA-1 e avaliamos as taxas de resposta. Nossos experimentos com MTT e anexina-V/FITC demonstraram que a associação com o composto N-acetilcisteína bloqueou completamente a apoptose e a supressão da proliferação celular previamente induzidas por PRIMA-1. Tais resultados estão em concordância com um estudo publicado por Lambert e colaboradores em 2009, que demonstrou que o co-tratamento com a N-acetilcisteína reduzia significativamente a resposta das linhagens ao composto PRIMA-1 por conta da formação de adutos entre o seu produto de decomposição, MQ (do inglês "*methylene quinuclidinone*", responsável pelos efeitos biológicos da PRIMA-1), e a N-acetilcisteína, reação que se dá por duas principais modificações nos grupos tióis: substituição de um grupo metoxilo e adição nucleofílica a uma ligação dupla entre dois carbonos.

Em conjunto, os dados apresentados nos Capítulos II e III demonstram que o composto PRIMA-1 é capaz de controlar a proliferação e induzir a apoptose de forma sustentada em células de adenocarcinoma ductal pancreático com mutações no gene *TP53*, além de apresentar sinergismo com compostos quimioterápicos e alvo moleculares, produzindo evidência para futuros estudos *in vivo* e clínicos em câncer de pâncreas, de forma isolada ou em combinações.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

As considerações finais serão apresentadas separadas por grupo, de acordo com os resultados obtidos a partir dos objetivos propostos originalmente.

Com relação ao estudo da expressão dos genes *KRAS*, *DPM1*, *MBD3L2* e *ACRV1* na saliva de pacientes adenocarcinoma ductal pancreático, pancreatite crônica e controles sem evidências de lesões pancreáticas:

Nossos resultados sugerem que a detecção da expressão salivar de *KRAS* pode contribuir para a identificação de indivíduos acometidos por doenças pancreáticas, sem poder, no entanto, diferenciar pacientes com câncer pancreático de pacientes com doenças benignas como a pancreatite crônica. Dessa forma, estudos complementares são necessários, com um maior tamanho amostral e associação com outros possíveis marcadores, a fim de determinar o real potencial desse biomarcador para a detecção do câncer de pâncreas com alta sensibilidade e especificidade.

Na amostra avaliada, não houve uma diferença significativa entre os três grupos quanto à expressão do mRNA *DPM1* e não foram detectados quaisquer níveis de expressão dos mRNAs dos genes *MDBL2* e *ACRV1*.

Com relação à reativação farmacológica da proteína p53 mutante pelo composto PRIMA-1 em linhagens tumorais de adenocarcinoma ductal pancreático:

Identificamos um grande potencial para o tratamento do câncer de pâncreas com a droga reativadora de p53 PRIMA-1, com significativa redução da proliferação celular, indução de apoptose, parada no ciclo celular, indução de genes alvo e efeito sinérgico no controle tumoral quando associada a diferentes quimioterápicos. Também observamos um efeito sinérgico importante com o

composto inibidor da interação MDM2/p53 Nutlina-3. Tais achados dão suporte para o desenvolvimento de estudos complementares *in vivo*, bem como futuros ensaios clínicos envolvendo tumores pancreáticos.

Com relação ao efeito da combinação do composto PRIMA-1 com o inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio:

Além de uma resposta significativa no tratamento isolado em linhagens de câncer de pâncreas *TP53*-mutantes, o composto PRIMA-1 também apresentou uma resposta extremamente satisfatória quando combinada ao inibidor de desacetilase de histonas butirato de sódio. Foram observadas respostas semelhantes entre o tratamento isolado com PRIMA-1 na dose de 100 μ M e sua combinação na dose de 50 μ M e com butirato de sódio de 5mM. Tal achado tem grande importância para a futura translação do composto PRIMA-1 para a prática clínica, uma vez que a possibilidade de redução de dose pela combinação com o butirato de sódio reduz o risco de potenciais efeitos adversos, permitindo esquemas terapêuticos mais seguros e eficazes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abujamra AL, Dos Santos MP, Roesler R, Schwartzmann G, Brunetto AL (2010) Histone deacetylase inhibitors: a new perspective for the treatment of leukemia. *Leuk Res* 34(6):687-95.

American Cancer Society. Cancer Facts and Statistics. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/index>. Acessado em 16 de dezembro de 2013.

Atlas de Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer. <http://mortalidade.inca.gov.br/>. Acessado em 17 de dezembro de 2013.

Ardengh JC, Coelho N, Osvaldt AB (2008) Early pancreatic cancer. The methods currently available can identify this disease? *Arq Gastroenterol* 45(2):169-77.

Bao W, Chen M, Zhao X, Kumar R, Spinnler C, Thullberg M, Issaeva N, Selivanova G, Strömblad S (2011) PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo. *Cell Cycle*. 15;10(2):301-7.

Bonne NJ, Wong DTW (2012) Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Medicine* 4(10):82-93

Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, Neoptolemos JP, Whitcomb DC, Hruban RH, Brentnall TA, Lynch HT, Canto MI (2007) Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut* 56(10):1460-9.

Brand RE, Lynch HT (2000) Hereditary pancreatic adenocarcinoma: a clinical propective. *Med Clin North Am* 84:665-75.

Brosh R, Rotter V (2009) When mutants gain new powers: News from the mutante p53 field. *Nat Ver Cancer* 9:701-713.

Bukreeva EI, Aksenov ND, Bardin AA, Pospelov VA, Pospelova TV (2009) Effect of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaB) on transformants A1a+cHa+Ras expressing wild type p53 with suppressed transactivation function. *Cell Tissue Biology* 3(5):445-53.

Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG (2002) Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 23(12):2011-8.

Bykov VJ, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG (2005) PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 24(21):3484–3491.

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

Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley JW, Kamel I, Nio Y, Schulick RS, Bassi C, Kluijdt I, Levy MJ, Chak A, Fockens P, Goggins M, Bruno M; International Cancer of Pancreas Screening (CAPS) Consortium (2013) International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 62(3):339-47.

Chan KT, Lung ML (2004) Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 53:519-526.

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

Chen KT, Kim PD, Jones KA, Devarajan K, Patel BB, Hoffman JP, Ehya H, Huang M, Watson JC, Tokar JL, Yeung AT (2014) Potential prognostic biomarkers of pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014;43(1):22-7.

Clark MB, Mattick JS (2011) Long noncoding RNAs in cell biology. *Semin Cell Dev Biol* 22(4):366-76.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R et al. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364(19):1817-25.

Corbo V, Tortora G, Scarpa A (2012) Molecular pathology of pancreatic cancer: from bench-to bedside translation. *Curr Drug Targets* 13(6):744-52.

Deb S, Jackson CT, Subler MA, Martin DW (1992) Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol* 66:6164-6170.

Dell'Orso S, Fontemaggi G, Stambolsky P, Goeman F, Voellenkle C, Levrero M et al (2011) ChIP-on-Chip analysis of in vivo mutant p53 binding to selected gene promoters. *Omics J Int Biol* 15:1-8.

Demma M, Maxwell E, Ramos R, Liang L, Li C, Hesk D, Rossman R, Mallams A, Doll R, Liu M, Seidel-Dugan C, Bishop WR, Dasmahapatra B (2010) SCH529074, a small molecule activator of mutant p53, which binds p53 DNA binding domain (DBD), restores growth-suppressive function to mutant p53 and interrupts HDM2-

mediated ubiquitination of wild type p53. *J Biol Chem.* 2010 Apr 2;285(14):10198-212.

dos Santos MP, Schwartzmann G, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL (2009) Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. *Leuk Res* 33(2):218-21.

Elsheikh SE, Green AR, Rahka EA et al (2009) Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors and patient outcome. *Cancer Res* May 2009; 69(9): 3802-09

Essmann F, Schulze-Osthoff K (2012) Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *Br J Pharmacol* 165(2):328-44.

Farrow B, Rychahou P, O'Connor KL, Evers BM. (2003) Butyrate inhibits pancreatic cancer invasion. *J Gastrointest Surg* 7(7):864-70.

Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* 1999 Dec 24;286(5449):2507-10.

Frazier MW et al (1998) Activation of c-my gene expression. By tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol*18:3735-3743.

Gatti R, Pereira MAA, Gianella Neto D (1999) Síndrome de von Hippel-Lindau. *Arq Bras Endocrinol Metab* 43(5).

Ghosn M, Kourie HR, Karak FE, Hanna C, Antoun J, Nasr D (2014) Optimum chemotherapy in the management of metastatic pancreatic câncer. *World J Gastroenterol* 20(9):2352-57.

Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD (1987) Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med.* 316, 1511-4.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000) Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119:1447-53.21

Gobert C, Andrzej S, Larsen AK (1999) The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *PNAS.* 96(18):10355-103600.

Gold EB, Goldin SB (1998) Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 7:67-91.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS, Weitzel JN (2009) Beyond Li Fraumeni

Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 10;27(8):1250-6.

Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, et al. (2009) A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med* 6: e1000046.

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

Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *New Engl J Med* 362(17): 1605-17.

Hollstein M, Hainaut P (2010) Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol* 220:164-73.

Hough DM, Stephens DH, Johnson CD, Binkovitz LA (1994) Pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease: prevalence, clinical significance, and CT findings. *AJR Am J Roentgenol* 162(5):1091-4.

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

Hulst SPL (1905) Information on the genesis of the adenocarcinoma and carcinoma of the pancreas. *Virchows Archiv* 180:288–316.

Hustinx SR, Cao D, Maitra A, Sato N, Martin ST, Sudhir D, Iacobuzio-Donahue C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Mollenhauer J, Pandey A, Hruban RH (2004) Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* 3(12):1254-61.

IARC TP53 Database. <http://p53.iarc.fr>. Acessado em 10 de janeiro de 2014.

Instituto Nacional de Câncer.
<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>.
Acessado em 17 de dezembro de 2013.

Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, et al (2004) Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med* 10:1321-1328.

Iwamoto M, Friedman EJ, Sandhu P, Agrawal NG, Rubin EH, Wagner JA (2013) Clinical pharmacology profile of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(3):493-508.

Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, et al (2012) MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall

survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 18:534-545.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.

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

Joergensen M, Brusgaard K, Cruger D., Gerdes A., Schaffalitzky De Muckadell O. (2010) Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *Am J Gastroenterol* 105: 1876–1883.

Joerger AC, Fersht AR (2007) Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* 26:2226-2242.

Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77:557-582.

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 17 th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p. 2347-58.

Kannagi R (2007) Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 30(3):189-209.

Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW (2004) Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J Gastroenterol Hepatol* 19(2):182-6.

Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S (2013) Histone deacetylase inhibitors and pancreatic cancer: are there any promising clinical trials? *World J Gastroenterol* 28;19(8):1173-81.

Kyriazanos ID, Tsoukalos GG, Papageorgiou G, Verigos KE, Miliadis L, Stoidis CN (2011) Local recurrence of pancreatic cancer after primary surgical intervention: how to deal with this devastating scenario? *Surg Oncol* 20(4):e133-42.

Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerbäck D, Bergman J, Fersht AR, Hainaut P, Wiman KG, Bykov VJ (2009) PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 15(5): 376-388.

Lee YH, Kim JH, Zhou H, Kim BW, Wong DT (2012) Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl)* 90(4):427-34.

Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, Andrén O, Cherif H, Tidefelt U, Ugglå B, Yachnin J, Juliusson G, Moshfegh A, Paul C, Wiman KG, Andersson PO (2012) Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 30(29):3633-9.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division (1997) *Cell* 88:323-31.

Liang Y, Besch-Williford C, Benakanakere I, Hyder SM (2007) Re-activation of the p53 pathway inhibits in vivo and in vitro growth of hormone-dependent human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 31(4):777-84

Liang Y, Besch-Williford C, Hyder SM (2009) PRIMA-1 inhibits growth of breast cancer cells by re-activating mutant p53 protein. *Int J Oncol.* 35(5):1015-23. Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, et al. (2012) Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clinical Chemistry* 58: 610 – 618

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

Lowenfels A, Maisonneuve P, Dimagno E, Elitsur Y, Gates L Jr, Perrault J, et al. (1997) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89: 442–446.

Lowenfels A, Maisonneuve P (2004) Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 34(5):238-44.

Lubin DJ, Butler JS, Loh SN (2010) Folding of tetrameric p53: oligomerization and tumorigenic mutations induce misfolding and loss of function. *J Mol Biol* 395:705-716.

Magrini R, Russo D, Ottaggio L, Fronza G, Inga A, Menichini P (2008) PRIMA-1 synergizes with adriamycin to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *J Cell Biochem* 104(6):2363-73.

Maisonneuve P, Fitz Simmons SC, Neglia JP, Campbell PW, Lowenfels AB (2003) Cancer risk in nontransplanted and transplanted cystic fibrosis patients: a 10-year study. *J Natl Cancer Inst* ;95:381-7.

Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruszniewski P (2002) Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 51:849-52.

Menditi KBC, Kang HC (2007) O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Rev Brasil de Cancer* 53(4):453-460.

Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, Gianì F, Vigneri R, Frasca F (2012) Reactivation of p53 mutants by prima-1 in thyroid cancer cells. *Int J Cancer*. 2012 130(10):2259-70.

Nahi H, Merup M, Lehmann S, Bengtzen S, Möllgård L, Selivanova G, Wiman KG, Paul C (2006) PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol*. 132(2):230-6.

Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Gilardini Montani MS (2005) Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 1745(3):318-29.

Negri L, Pacchioni D, Calabrese F, Giacomasso S, Mastromatteo V, Fazio M (1988) Serum and salivary CEA and GICA levels in oral cavity tumours. *Int J Biol Markers*. 3(2):107-12.

Olivier M1, Hollstein M, Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1):a001008.

Oren M, Rotter V (2010) Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2):a001107.

Ouassi M, Giger U, Sielezneff I, Pirrò N, Sastre B, Ouassi A (2011) Rationale for possible targeting of histone deacetylase signaling in cancer diseases with a special reference to pancreatic cancer. *J Biomed Biotechnol*:315939

Ouaïssi M1, Cabral S, Tavares J, da Silva AC, Mathieu Daude F, Mas E, Bernard J, Sastre B, Lombardo D, Ouaïssi A (2008) Histone deacetylase (HDAC) encoding gene expression in pancreatic cancer cell lines and cell sensitivity to HDAC inhibitors. *Cancer Biol Ther* 7(4):523-31.

Park NJ, Yu T, Nabili V, Brinkman BM, Henry S, Wang J, Wong DT (2006) RNAprotect saliva: An optimal room-temperature stabilization reagent for the salivary transcriptome. *Clin Chem*. 52(12):2303-4.

Passerini R, Cassatella MC, Boveri S, Salvatici M, Radice D, Zorzino L, Galli C, Sandri MT (2012) The pitfalls of CA19-9: routine testing and comparison of two automated immunoassays in a reference oncology center. *Am J Clin Pathol* 138(2):281-7.

Peng Y, Li C, Chen L, Sebt S, Chen J (2003) Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene* 22(29):4478-87.

Qiao Z, Ren S, Li W, Wang X, He M, Guo Y, Sun L, He Y, Ge Y, Yu Q (2013) Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, synergistically enhances gemcitabine cytotoxicity in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434(1):95-101.

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

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

Roh JL, Kang SK, Minn I, Califano JA, Sidransky D, Koch WM (2011) p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 47(1):8-15

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997) Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731–1734.

Russo D, Ottaggio L, Penna I, Foggetti G, Fronza G, Inga A, Menichini P (2010) PRIMA-1 cytotoxicity correlates with nucleolar localization and degradation of mutant p53 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402(2):345-50.

Samuel N, Hudson TJ (2012) The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol & Hep.* 9:77-87.

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

Seligson DB, Horvath S, McBrien MA et al (2009) Global Levels of Histone modification predict prognosis in different cancers. *The Am Journal of Pathology* 174(5).

Shi H, Lambert JM, Hautefeuille A, Bykov VJ, Wiman KG, Hainaut P, Caron de Fromental C (2008) In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis*. 29(7):1428-34.

Shi LM, Myers TG, Fan Y, O'Connor PM, Paull KD, Friend SH, Weinstein JN (1998) Mining the National Cancer Institute Anticancer Drug Discovery Database: cluster analysis of ellipticine analogs with p53-inverse and central nervous system-selective patterns of activity. *Mol Pharmacol.* 53(2):241-51.

Silvestris N, Gnoni A, Brunetti AE, Vincenti L, Santini D, Tonini G, Merchionne F, Maiello E, Lorusso V, Nardulli P, Azzariti A, Reni M. Target therapies in pancreatic carcinoma. *Curr Med Chem.* 2014;21(8):948-65.

Streckfus CF, Arreola D, Edwards C, Bigler L (2012) Salivary Protein Profiles among HER2/neu-Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer Patients: Support for Using Salivary Protein Profiles for Modeling Breast Cancer Progression. *J Oncol.*:413256.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M (2010) Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 6(1):78-95.

Sung V, Richard N, Brady H, Maier A, Kelter G, Heise C (2011) Histone deacetylase inhibitor MGCD0103 synergizes with gemcitabine in human pancreatic cells. *Cancer Sci*. 102(6):1201-7.

Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, Solomon A et al. (2009) Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3(5-6):425-38.

Takimoto R, Wang W, Dicker DT, Rastinejad F, Lyssikatos J, el-Deiry WS (2002) The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biol Ther* ;1(1):47-55.

Tanaka M, Chari S, Adsay V et al (2006) International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* 6(1–2):17-32.

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

Tejani MA, Saif MW. Pancreatic neuroendocrine tumors: does chemotherapy work? *JOP*. 2014 Mar 10;15(2):132-4.

Therkildsen MH, Mandel U, Christensen M, Dabelsteen E (1993) Simple mucin-type Tn and sialosyl-Tn carbohydrate antigens in salivary gland carcinomas. *Cancer* 72(4):1147-54.

Tjensvoll K, Nordgård O, Smaaland R (2014) Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. *Int J Cancer* 1;134(1):1-8.

Trakul N, Koong AC, Chang DT (2014) Stereotactic Body Radiotherapy in the Treatment of Pancreatic Cancer. *Semin Radiat Oncol* 24(2):140-147.

Tsiaousidou A, Lambropoulou M, Chatzitheoklitos E, Tripsianis G, Tsompanidou C, Simopoulos C, Tsaroucha AK (2013) B7H4, HSP27 and DJ-1 molecular markers as prognostic factors in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2013 13(6):564-9.

Tzao C, Tung HJ, Jin JS et al (2009) Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mod Pathol*; 22:252-260

Vincent A, Herman J, Schulik R, Hruban RH, Goggins M (2011) Pancreatic Cancer. *Lancet* 378(9791): 607-20.

van Asperen CJ, Brohet RM, Meijers-Heijboer EJ, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Vasen HF, Ausems MG, Menko FH, Gomez Garcia EB, Klijn JG, Hogervorst FB, van Houwelingen JC, van't Veer LJ, Rookus MA, van Leeuwen FE; Netherlands Collaborative Group on Hereditary Breast Cancer (HEBON) (2005) Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet* 42:711-9.

Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W (2000) Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer*. 87, 809-11.

Venkannagari S, Fiskus W, Peth K, Atadja P, Hidalgo M, Maitra A, Bhalla KN (2012) Superior efficacy of co-treatment with dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and pan-histone deacetylase inhibitor against human pancreatic cancer. *Oncotarget* 3(11):1416-27.

Wade PA (2001) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 10(7):693-98.

Wang G, He J, Zhao J, Yun W, Xie C. et al (2012) Class I and class II histone deacetylases are potential therapeutic targets for treating pancreatic cancer. *PLOS ONE*: 7(12):e52095, Dec, 2012.

Wörmann SM, Algül H (2012) Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol* 18;3:282.

Wiman KG (2010) Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29;29(30):4245-52

Winter JM1, Tang LH, Klimstra DS, Brennan MF, Brody JR, Rocha FG, Jia X, Qin LX, D'Angelica MI, DeMatteo RP, Fong Y, Jarnagin WR, O'Reilly EM, Allen PJ (2012) A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers. *PLoS One* 7(7):e40157.

Wu J, Jiao Y, Dal Molin M et al (2011a) Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(52):21188–21193

Wu J, Matthaei H, Maitra A et al (2011b) Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med* 3(92):92ra66

Wynder EL, Mabuchi K, Maruchi N, Fortner J (1973) A case control study of cancer of the pancreas. *Cancer* 31: 641-648.

Wong DT (2006) Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *JADA* 137(3):313-321.

Yang CH, Chuang LY, Shih TM, Chang HW (2010) hSAGEing: an improved SAGE-based software for identification of human tissue-specific or common tumor markers and suppressors. *PLoS One* 17;5(12):e14369.

Yu X, Vazquez A, Levine AJ, Carpizo DR (2012) Allele-specific p53 mutant reactivation. *Cancer Cell*. 2012 May 15;21(5):614-25.

Zache N, Lambert JM, Rökaeus N, Shen J, Hainaut P, Bergman J, Wiman KG, Bykov VJ (2008) Mutant p53 targeting by the low molecular weight compound STIMA-1. *Mol Oncol*. 2(1):70-80.

Zandi R, Selivanova G, Christensen CL, Gerds TA et al (2011). PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clin Cancer Res* 17(9):2830-41.

Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, Chia D, Wong DT (2010). Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 138(3):949-57.

Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB, Yang J, Brinkmann O, Yan X, Akin D, Chia D, Elashoff D, Park NH, Wong DT (2012) Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci* 69(19):3341-50.

Zhao CY, Szekely L, Bao W, Selivanova G (2010) Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Res* 70:3372-3381.



Identification of patients at-risk for Lynch syndrome in a hospital-based colorectal surgery clinic

Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Izetti, Jamile Abud, Carlos Eduardo Pitroski, Sílvia Liliana Cossio, Suzi Alves Camey, Cláudio Tarta, Daniel C Damin, Paulo Carvalho Contu, Mario Antonello Rosito, Patricia Ashton-Prolla, João Carlos Prolla

Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Izetti, Jamile Abud, Carlos Eduardo Pitroski, Sílvia Liliana Cossio, Patrícia Ashton-Prolla, Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Patrícia Koehler-Santos, Carlos Eduardo Pitroski, Patrícia Ashton-Prolla, Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90035-003, Brazil

Patrícia Koehler-Santos, Sílvia Liliana Cossio, Patrícia Ashton-Prolla, National Institute for Populational Medical Genetics, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Patrícia Izetti, Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90035-003, Brazil

Jamile Abud, João Carlos Prolla, Post-Graduate Program in Gastroenterological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90035-003, Brazil

Suzi Alves Camey, Department of Statistics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91501-970, Brazil

Suzi Alves Camey, Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90035-003, Brazil

Suzi Alves Camey, Research and Post-Graduation Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Cláudio Tarta, Daniel C Damin, Paulo Carvalho Contu, Mario Antonello Rosito, Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Cláudio Tarta, Daniel C Damin, Paulo Carvalho Contu, Mario Antonello Rosito, Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90035-003, Brazil

Patrícia Ashton-Prolla, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Patrícia Ashton-Prolla, Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91501-970, Brazil

João Carlos Prolla, Service of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil

Author contributions: Koehler-Santos P identified and interviewed all consecutive colorectal cancer patients who agreed to participate in the study; Koehler-Santos P and Izetti P designed the database and performed the analysis under the supervision of Camey SA, and were directly involved in writing and editing

the manuscript; Abud J, Pitroski CE and Cossio SL helped with acquisition of the data from patient databases; Tarta C, Damin DC, Contu PC and Rosito MA are the primary physicians of all patients and participated in patient identification; Prolla JC and Ashton-Prolla P were directly involved with the concept and design of the study, evaluation of patients at-risk and editing of the manuscript.

Correspondence to: Patrícia Ashton-Prolla, MD, PhD, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil. pprolla@hcpa.ufrgs.br

Telephone: +55-51-33598011 Fax: +55-51-33598010

Received: February 8, 2010 Revised: March 23, 2010

Accepted: March 30, 2010

Published online: February 14, 2011

Abstract

AIM: To determine the prevalence of a family history suggestive of Lynch syndrome (LS) among patients with colorectal cancer (CRC) followed in a coloproctology outpatient clinic in Southern Brazil.

METHODS: A consecutive sample of patients with CRC were interviewed regarding personal and family histories of cancer. Clinical data and pathology features of the tumor were obtained from chart review.

RESULTS: Of the 212 CRC patients recruited, 61 (29%) reported a family history of CRC, 45 (21.2%) were diagnosed under age 50 years and 11 (5.2%) had more than one primary CRC. Family histories consistent with Amsterdam and revised Bethesda criteria for LS were identified in 22 (10.4%) and 100 (47.2%) patients, respectively. Twenty percent of the colorectal tumors had features of the high microsatellite instability phenotype, which was associated with younger age at CRC diagnosis and with Bethesda criteria ($P < 0.001$). Only



RESEARCH

Open Access

Prevalence of the *BRCA1* founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome

Ingrid P Ewald^{1,2}, Patrícia Izetti^{1,3}, Fernando R Vargas^{4,5}, Miguel AM Moreira^{5,6}, Aline S Moreira^{5,6}, Carlos A Moreira-Filho⁷, Danielle R Cunha⁸, Sara Hamaguchi⁸, Suzi A Camey⁹, Aishameriane Schmidt⁹, Maira Caleffi¹⁰, Patrícia Koehler-Santos^{1,2}, Roberto Giugliani^{2,11,12,13} and Patrícia Ashton-Prolla^{1,2,3,11,12,13*}

Abstract

About 5-10% of breast and ovarian carcinomas are hereditary and most of these result from germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. In women of Ashkenazi Jewish ascendance, up to 30% of breast and ovarian carcinomas may be attributable to mutations in these genes, where 3 founder mutations, c.68_69del (185delAG) and c.5266dup (5382insC) in *BRCA1* and c.5946del (6174delT) in *BRCA2*, are commonly encountered. It has been suggested by some authors that screening for founder mutations should be undertaken in all Brazilian women with breast cancer. Thus, the goal of this study was to determine the prevalence of three founder mutations, commonly identified in Ashkenazi individuals in a sample of non-Ashkenazi cancer-affected Brazilian women with clearly defined risk factors for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome. Among 137 unrelated Brazilian women from HBOC families, the *BRCA1*c.5266dup mutation was identified in seven individuals (5%). This prevalence is similar to that encountered in non-Ashkenazi HBOC families in other populations. However, among patients with bilateral breast cancer, the frequency of c.5266dup was significantly higher when compared to patients with unilateral breast tumors (12.1% vs 1.2%, $p = 0.023$). The *BRCA1* c.68_69del and *BRCA2* c.5946del mutations did not occur in this sample. We conclude that screening non-Ashkenazi breast cancer-affected women from the ethnically heterogeneous Brazilian populations for the *BRCA1* c.68_69del and *BRCA2* c.5946del is not justified, and that screening for *BRCA1*c.5266dup should be considered in high risk patients, given its prevalence as a single mutation. In high-risk patients, a negative screening result should always be followed by comprehensive *BRCA* gene testing. The finding of a significantly higher frequency of *BRCA1* c.5266dup in women with bilateral breast cancer, as well as existence of other as yet unidentified founder mutations in this population, should be further assessed in a larger well characterized high-risk cohort.

Keywords: Hereditary breast cancer, Hereditary breast and ovarian cancer Syndrome, Founder mutations, *BRCA1* gene, *BRCA2* gene

Introduction

Breast cancer is the most common non-cutaneous malignancy in Brazilian women of all ages. In the Southern and Southeastern States of Brazil, the estimated breast cancer incidence rates for 2010 reached 64.54 and 64.30 per 100,000 women, the highest in the country [1].

In spite of continuous efforts to improve early detection and treatment, breast cancer remains the leading cause of deaths by cancer in Brazilian women. Furthermore, mortality rates by this type of cancer are still increasing in the Southern States of the country [2,3].

It is estimated that 5-10% of breast cancers are hereditary, arising from highly penetrant germline mutations in cancer predisposition genes [4]. A significant proportion of individuals with hereditary breast cancer have mutations in the tumor suppressor genes *BRCA1* (OMIM # 113705) and *BRCA2* (OMIM # 600185) [5]. Carriers of

* Correspondence: pprolla@hcpa.ufrgs.br
Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



CHEK2 1100DEL C GERMLINE MUTATION: a frequency study in hereditary breast and colon cancer Brazilian families

Jamile ABUD¹, João Carlos PROLLA^{1,2} and
The Study Group on Hereditary Breast and Colorectal Cancer*

ABSTRACT - Context - *CHEK2* encodes a cell cycle checkpoint kinase that plays an important role in the DNA damage repair pathway, activated mainly by *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) in response to double-stranded DNA breaks. A germline mutation in *CHEK2*, 1100delC, has been described as a low penetrance allele in a significant number of families with breast and colorectal cancer in certain countries and is also associated with increased risk of contralateral breast cancer in women previously affected by the disease. About 5%-10% of all breast and colorectal cancers are associated with hereditary predisposition and its recognition is of great importance for genetic counseling and cancer risk management. **Objectives -** Here, we have assessed the frequency of the *CHEK2* 1100delC mutation in the germline of 59 unrelated Brazilian individuals with clinical criteria for the hereditary breast and colorectal cancer syndrome. **Methods -** A long-range PCR strategy followed by gene sequencing was used. **Results -** The 1100delC mutation was encountered in the germline of one (1.7%) individual in this high risk cohort. This indicates that the *CHEK2* 1100delC is not commonly encountered in Brazilian families with multiple diagnoses of breast and colorectal cancer. **Conclusion -** These results should be confirmed in a larger series of families and further testing should be undertaken to investigate the molecular mechanisms underlying the hereditary breast and colorectal cancer phenotype.

HEADINGS - Breast neoplasms, genetics. Colonic neoplasms, genetics. Protein-serine-threonine-kinase, genetics. Genetic predisposition to disease.

INTRODUCTION

The *CHEK2* gene (OMIM#604373, also known as *CHK2*) is the mammalian homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD53 and *Schizosaccharomyces pombe* Cds1 genes. In humans, it is located in 22q12.1, and encodes a cell cycle checkpoint kinase that is implicated in DNA damage responses^(9, 19). Following the occurrence of double-stranded DNA breaks, *CHEK2* is activated through phosphorylation by *ATM*. Activated *CHEK2* then phosphorylates critical cell-cycle proteins, including Cdc25A and Cdc25C phosphatases, PIK3 kinase and the E2F1 transcription factor, as well as proteins involved in DNA repair (such as brca1) and in regulation of cell death (such as p53-mdm2 and pml-1). This reflects the wide mediator role of *CHEK2* in the signaling pathways in response to DNA damage, with direct impact on downstream effectors within the cell cycle

checkpoints, DNA repair and apoptosis machineries. These findings have been well documented in cells with a functional deficiency of *CHEK2*^(20, 22).

CHEK2 has been considered a candidate tumor suppressor gene, and germline mutations in this gene seem to predispose to familial breast cancer (BC) and other malignancies^(2, 4). In 1999, germline mutations in *CHEK2* were associated with the Li-Fraumeni syndrome (LFS) phenotype⁽⁵⁾. However, a strong association with the syndrome and this variant has never been confirmed⁽²⁰⁾. Also in 1999, Bell et al.⁽³⁾ described for the first time the 1100delC mutation in exon 10 of *CHEK2* in families with breast and/or colorectal cancer, and association with an intermediate relative risk for the occurrence of these tumors has been confirmed in subsequent reports^(1, 24, 42). Meijers-Heijboer et al.⁽²⁴⁾ in the Netherlands investigated the frequency of *CHEK2* 1100delC in 55 families with multiple breast and colorectal cancer diagnoses and encountered the mutation

Declared conflict of interest of all authors: none

* Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Gastroenterológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS; ¹ Departamento de Medicina Interna, UFRGS; ² Faculdade de Medicina, UFRGS; ³ Laboratório de Medicina Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS; ⁴ Laboratório de Oncologia Molecular, Hospital do Câncer de Barretos, SP; ⁵ Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ; ⁶ Departamento de Estatística, UFRGS, Porto Alegre, RS; ⁷ Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, SP; ⁸ Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS; ⁹ Departamento de Genética, UFRGS; ¹⁰ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS; ¹¹ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Brazil; ¹² Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil; ¹³ Grupo de Estudos de Câncer de Mama e Câncer Colorretal Hereditário: Jamile Abud¹, João Carlos Prolla^{1,2}, Cristina Rossi^{3,4}, Ederlei Inez Palmero⁵, Fernando Regis Vargas⁶, Luciana Neves Nunes⁷, Maria Izabel Achatz⁸, Miguel Ângelo Moreira⁹, Patrícia Ashton-Prolla^{10,11,12}, Patrícia Izatti¹³, Silvia Líliana Cosso¹⁴
Correspondence: Dr. Jamile Abud - Laboratório de Medicina Genética - Centro de Pesquisas Experimentais - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Heringer Barcelos, 2350 - 90035-903 - Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: jamile.abud.genetica@gmail.com

10. ANEXOS

ANEXO A

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (GPPG 10-0162)



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

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

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

Projeto: 100162

Versão do Projeto: 17/06/2010

Versão do TCLE: 17/06/2010

Pesquisadores:

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

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

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

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular N° 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 01 de julho de 2010.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO B TERMO DE CONSENTIMENTO – CASOS DE CÂNCER DE PÂNCREAS

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Casos

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

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

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

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

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

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

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

WV 100162

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

sim não

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

sim não

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

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

sim (neste caso, indicar nome e telefone _____)

não

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

sim não

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

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

sim não

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

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

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29 / 03 / 2012

nr 100162

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

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

Nome do entrevistador Assinatura do entrevistador

Ass. _____
Assinatura do paciente

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____ Data: _____

Testemunha: _____
Nome e assinatura

Data: _____

Pesquisadores responsáveis: Em caso de dúvida os pesquisadores e o comitê de ética poderão fornecer esclarecimentos. Telefones para contato: Pesquisadores → Dr. Alessandro Osvaldt, Dra Patricia Ashton-Prolla, Dra. Patrícia Izetti e mestranda Bárbara Alemar: (51) 3359-7881
Comitê de Ética HCPA (51) 3359-8304.

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
29/03/2012
ME 100162

ANEXO C TERMO DE CONSENTIMENTO – CASOS DE PANCREATITE CRONICA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controle

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

Sub-projeto: Papel dos Biomarcadores Identificados em Saliva na Detecção Precoce do Câncer de Pâncreas

Autores: Patricia Izetti, Alessandro Bersch Osvaldt, Vivian Bersch, Guilherme Baldo, Gabriel Macedo, Bárbara Alemar, Úrsula Matte, Patrícia Ashton-Prolla, Gilberto Schwartzmann

Consentimento Informado para Armazenamento de Material Biológico e Estudos Moleculares em Saliva de Grupo Controle com Pancreatite Crônica

Estamos convidando indivíduos com pancreatite crônica e sem evidências clínicas ou radiológicas de câncer a doar amostras de saliva para estudos moleculares do material genético e proteômico (DNA, RNA e proteínas). A partir do estudo deste material, pretendemos correlacionar os achados moleculares em saliva de pacientes saudáveis, pacientes com pancreatite crônica e pacientes com câncer de pâncreas, a fim de identificar marcadores associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas benignas e malignas. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visem a detecção e o diagnóstico precoce do câncer de pâncreas, uma doença de alta mortalidade.

Este material será estocado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para futuros estudos sobre fatores genéticos associados a diversas doenças do pâncreas. Os dados pessoais e clínicos constantes do seu prontuário serão digitados em um banco de dados e mantidos sob sigilo. A quantidade de saliva doada para estes estudos futuros não irão prejudicar sua saúde. A saliva será coletada em apenas um momento, após evidências radiológicas de ausência de neoplasia pancreática.

Quaisquer perguntas que você tiver em relação a estas coletas e aos estudos que serão feitos no futuro poderão ser respondidos por membros da equipe de cirurgia que está lhe acompanhando. Se você deseja participar e concorda em doar estes materiais para futuros estudos, por favor responda às perguntas abaixo:

1. Você concorda que as suas amostras sejam armazenadas e utilizadas para estudos sobre doenças de pâncreas?

sim não

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

sim não

Se você respondeu sim será avisado sobre qualquer informação obtida nestes estudos.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
01/07/2010
nº 10-0162 S

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

- sim (neste caso, quem? _____)
 não

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

- sim não

Obs: Essas pesquisas não envolvem a doença que você está tratando/investigando e serão realizadas sem identificação da amostra, sem nenhum benefício direto para você ou seus familiares, mas com potencial benefício para o progresso médico e científico.

5. Você concorda que as suas amostras sejam enviadas para outros centros para pesquisa?

- sim não

Obs: Para eventual realização de exames com potencial benefício direto para você ou seus familiares; quando não houver benefício direto a amostra será enviada sem identificação.

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo adicional ou diferença na realização de seus exames/cirurgias ou outros tratamentos. O período de armazenamento é de 50 anos, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia, e neste caso as suas amostras serão destruídas. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados pessoais ou a liberação de amostras identificadas ou resultados para terceiros sem a sua autorização por escrito.

Declaro que li e compreendi as informações acima e tive minhas dúvidas esclarecidas por

Nome do entrevistador

Ass. _____
Assinatura do paciente

Nome completo: _____

Data: _____

Pesquisadores responsáveis: Dr. Alessandro Osvaldt e Dra Patrícia Ashton-Prolla
Telefone para contato: (51) 3359-7661

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVAC
01/10/2010

ANEXO D

TERMO DE CONSENTIMENTO – CONTROLES

ANEXO IV

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

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

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

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

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

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

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

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

29.10.2012

MC 100162

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

sim não

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

sim não

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

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

sim (neste caso, indicar nome e telefone _____)

não

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

sim não

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

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

sim não

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

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

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

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPGHCPA

VERSÃO APROVADA

29/03/2012

MC 100162

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

Nome do entrevistador Assinatura do entrevistador

Ass. _____
Assinatura do paciente

Nome completo: _____

Data de nascimento: _____ Data: _____

Testemunha: _____
Nome e assinatura

Data: _____

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

Rubrica do
paciente

Rubrica do
pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
29 / 03 / 2012
NE 102162