

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Carlos Del Cistia Donnarumma

**Perfil de RNA mensageiro de exossomas de soro de
indivíduos com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes
mellitus**

SÃO PAULO

2021

Carlos Del Cistia Donnarumma

**Perfil de RNA mensageiro de exossomas de soro de
indivíduos com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes
mellitus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

SÃO PAULO

2021

Donnarumma, Carlos Del Cistia.

Perfil de RNA mensageiro de exossomas de soro de indivíduos com adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus/ Carlos Del Cistia Donnarumma. 2021.

92 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

1. Adenocarcinoma ductal de pâncreas. 2. Diabetes mellitus. 3. Exossomas, 4. Transcriptoma.

I. Giannella, Maria Lúcia Cardillo Corrêa. II. Título

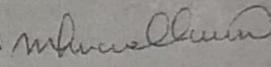


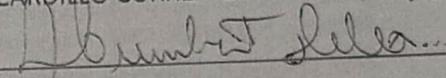
São Paulo 30 de junho de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

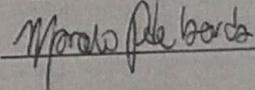
Aluno: CARLOS DEL CISTIA DONNARUMMA

Título da tese: PERFIL DE RNA MENSAGEIRO DE EXOSSOMAS DE SORO DE INDIVÍDUOS COM ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS COM DIABETES MELLITUS.

Presidente: PROFA. DRA. MARIA LUCIA CARDILLO CORRÊA GIANNELLA 

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ 

Membro: PROF. DR. RAMON ANDRADE BEZERRA DE MELLO _____

Membro: PROF. DR. MARCELO PITOMBEIRA DE LÁCERDA 

*Dedico esta tese aos meus pais, esposa, filhos,
amigos e pacientes.*

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella, por ter me guiado pelos caminhos da pós-graduação, sempre acolhedora e pronta para auxiliar nas mais diversas demandas. O sentimento é de gratidão por ter tido a oportunidade de compartilhar momentos ao lado de uma pessoa tão especial e generosa. Além de todos os adjetivos já citados, é uma pesquisadora incrível, com visão e “sacadas” que agregaram muito para a realização deste trabalho e de tantos outros. Não posso deixar de citar, que sempre com leveza e transparência, exerceu sua liderança pelo exemplo, só fazendo com que a admiração já existente aumentasse ainda mais.

Aos queridos pacientes que doaram material para a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço aos pacientes portadores de câncer de pâncreas. Em meio ao tratamento oncológico e suas incertezas, encontraram energia e motivação para doar tempo e vida para a concretização do trabalho. Obrigado!

A todos os funcionários envolvidos direta e indiretamente na coleta das amostras. Enfermeiros, auxiliares e técnicos de enfermagem e administrativos que recepcionaram e cordialmente guiaram nossos pacientes nessa etapa.

A enfermeira Deyse Lopes de Souza, que auxiliou no adequado preparo do material, em meio a correria das agendas de coleta. Sempre disposta a ajudar e com sorriso no rosto, tornou as manhãs de sábado mais leves.

A todo o time de oncologia da Prevent Senior, que auxiliou na captação dos pacientes.

A Prevent Senior, a qual abriu os caminhos para que esse momento se tornasse realidade. Obrigado pela visão e incentivo à inovação e pesquisa clínica dentro “nosso” sistema de saúde.

Aos parceiros de projeto, José Antônio Januário Neves e Mozania Reis, que me auxiliaram nas etapas iniciais dessa jornada.

A Renata D´Alpino Peixoto pela parceria nas coletas e consultas nas manhãs de sábado. Na corre-corre entre gelo seco e atendimento, estava sempre pronta para qualquer demanda.

Ao Luiz Henrique Gomes Matheus, pelo isolamento dos exossomas e padronização dos ensaios de expressão gênica. Obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê, que foi de enorme contribuição no exame de qualificação.

A Daniele Pereira dos Santos-Bezerra, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Dra. Sueli M. Oba-Shinjo, Profa. Dra. Suely K.N. Marie e Dr. Antonio Marcondes Lerário pela execução e análise dos dados do transcriptoma

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Aos meus amigos, vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Levo um pouco de cada um, muito obrigado. Em especial ao amigo Pedro Novis, que com suas

piadas futebolísticas trouxe mais leveza e alegria no meu dia a dia.

Ao meu sogro e minha sogra, cunhadas e concunhados, sobrinhas e sobrinhos. Obrigado pelo carinho e cuidado sempre. Carrego vocês comigo.

Aos meus avós (in memoriam), que inculcaram o senso de que só a educação é capaz de fazer transformações profundas individuais e na sociedade.

A minha irmã, cunhado e sobrinha, obrigado pelo apoio incondicional e por todo suporte aos finais de semana. A admiração é recíproca.

Aos meus pais, que mesmo diante de todas as adversidades do dia a dia, proporcionaram as melhores condições para que eu pudesse evoluir. Me deram voz, me deram ouvidos, me deram amor e segurança para seguir em frente. Acolheram minhas decisões, sempre com muito respeito e carinho. Apoiaram cada passo de minha jornada. Obrigado por acreditarem em mim.

A minha esposa, uma guerreira de coração sem tamanho. Mãe carinhosa, profissional exemplar, parceira que mesmo longe dos seus está sempre pronta a se doar. Obrigado pela compreensão e ajuda nos dias mais turbulentos, você é minha inspiração.

Aos meus filhos, vocês são minha vida e minha maior motivação.

RESUMO

O adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP) apresenta um prognóstico bastante reservado e raramente é diagnóstico precocemente. Existe uma estreita associação entre diabetes mellitus (DM) de início recente e essa neoplasia, sendo o DM considerado um biomarcador do CP. Em bases clínicas, é difícil diferenciar um DM secundário ao CP e o DM tipo 2 (DM2) e a identificação de marcadores que possam auxiliar nesse diagnóstico diferencial seria de grande auxílio na prática clínica. O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil de RNA mensageiro (mRNA) de exossomas extraídos de soro de três grupos de indivíduos; (1) com CP e DM de início recente, (2) com DM2 de longa duração e (3) sem essas duas condições clínicas (Grupo controle [C]). Para tanto, foram incluídos 20 indivíduos com CP e DM de início recente, 22 indivíduos com DM2 de longa duração e 13 indivíduos no Grupo C. Sangue periférico foi coletado para isolamento de exossomas a partir de 1 mL de soro; os exossomas foram submetidos à extração de RNA total, o qual foi utilizado para a construção de bibliotecas de DNA complementar, que foram sequenciadas. Como houve uma grande variabilidade no número de genes detectados entre as amostras, foram considerados na análise de genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram transcritos presentes em pelo menos 30 amostras, o que resultou em 113 genes. Dentre esses genes, foram selecionados os que apresentaram diferença estatisticamente significativa nas comparações entre os Grupos CP e C, CP e DM e DM e C, o que resultou em 40 genes. Um total de 19 genes foi diferencialmente expressos entre participantes com CP e DM: sete entre os Grupos CP e DM (*ASAH1*, *ULK4*, *TMSB4X*, *HBB*, *HBA2*, *YWHAB* e *B2M*), nove entre os Grupos CP e C e CP e DM (*GIGYF2*, *MTND1*, *MTND2*, *DNMT3A*, *SHISAL2B*, *MAP1B*, *RPS29*, *MTCO2* e

HBA1), dois entre os Grupos CP e DM e DM e C (*MTND3* e *DNASE1*) e um entre os Grupos CP e C, CP e DM e DM e C (*MTND5*). Dentre os 19 genes diferencialmente expressos, sete apresentaram um valor de $P < 0,05$ nas curvas ROC considerando os Grupos CP e DM2 (*ULK4*, *GIGYF2*, *YWHAB*, *MTND5*, *MTND1*, *HBB* e *DNASE1*) e poderiam ser usados para discriminar DM de início recente associado ao CP de DM2, especialmente se esses achados forem validados em uma população independente.

Palavras-chave: Adenocarcinoma ductal de pâncreas, Diabetes mellitus, Exossomas, Transcriptoma

ABSTRACT

Ductal adenocarcinoma of the pancreas (CP) has a very poor prognosis and is rarely diagnosed early. There is a close association between recent-onset diabetes mellitus (DM) and this neoplasm, with DM being considered a biomarker of CP. On a clinical basis, it is difficult to differentiate DM secondary to CP and type 2 DM (DM2) and the identification of markers that can help in this differential diagnosis would be of great help in clinical practice. The aim of the present study was to compare the messenger RNA (mRNA) profile of exosomes extracted from the serum from three groups of individuals; (1) with CP and recent-onset DM, (2) with long-standing DM2, and (3) without these two clinical conditions (Control group [C]). For this purpose, 20 individuals with CP and recent-onset DM, 22 individuals with long-standing DM2 and 13 control individuals were included. Peripheral blood was collected for isolation of exosomes from 1 mL of serum; exosomes were subjected to total RNA extraction for generation of complementary DNA libraries, which were sequenced. As there was a great variability in the number of genes detected between the samples, those transcripts present in at least 30 samples were considered in the analysis of differentially expressed genes (n=113 genes.) Among these genes, those that presented a statistically significant difference in the comparisons between Groups CP and C, CP and DM and DM and C were selected (n=40 genes). A total of 19 genes were differentially expressed between participants with CP and DM: seven between CP and DM Groups (*ASAH1*, *ULK4*, *TMSB4X*, *HBB*, *HBA2*, *YWHAB* and *B2M*), nine between CP and C and CP and DM Groups (*GIGYF2*, *MTND1*, *MTND2*, *DNMT3A*, *SHISAL2B*, *MAP1B*, *RPS29*, *MTCO2* and *HBA1*), two between CP and DM and DM and C Groups (*MTND3* and *DNASE1*) and one between CP and C, CP and DM and DM and C Groups (*MTND5*). Among the 19 differentially expressed genes, seven had

a *P* value < 0.05 in the ROC curves considering the Groups CP and DM2 (*ULK4*, *GIGYF2*, *YWHAB*, *MTND5*, *MTND1*, *HBB* and *DNASE1*) and could be used to discriminate recent-onset DM associated with CP from DM2, especially if these findings are validated in an independent population.

Key-words: Pancreatic ductal adenocarcinoma, Diabetes mellitus, Exosomes, Transcriptome

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Painel A: Imagens representativas da eletroforese de RNA total extraído de exossomas de soro de indivíduos incluídos no presente estudo. Painel B: Eletroforese de RNA total extraído de exossomas obtidos de soro (Adaptado de Tang e cols.,2017).
.....44
- Figura 2.** Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno HPRT1 e para os genes-alvo CTLA4, IDO1 e PD1 com o uso da transcriptase reversa High Capacity nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.....44
- Figura 3.** Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno ACTB (BACT) com o uso da transcriptase reversa High Capacity nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.45
- Figura 4.** Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno ACTB (BACT) com o uso da transcriptase reversa Superscript IV VILO nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.45
- Figura 5.** Análise da qualidade das bibliotecas de DNA complementar obtidas a partir de RNA total de exossomas de soro dos indivíduos incluídos no presente estudo. As amostras marcadas em vermelho foram reamplificadas e as amostras em verde foram purificadas.46
- Figura 6.** Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre os Grupos adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), diabetes mellitus tipo 2 (DM) e Controle (C).....48

Figura 7. Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão dos 40 genes diferencialmente expressos entre os Grupos adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), diabetes mellitus tipo 2 (DM) e controle (C) nos três grupos estudados. Os dados estão normalizados pelo Z-escore dos valores logaritmos das contagens por milhão. Cada coluna representa um participante e cada linha representa um gene. A cor azul representa uma expressão baixa e a cor vermelha representa uma expressão elevada. A cor verde indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e DM; a cor azul clara indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e C e a cor rosa indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos DM e C49

Figura 8. Painel A: Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP) e diabetes mellitus tipo 2 (DM) nos três grupos estudados. Os dados estão normalizados pelo Z-escore dos valores logaritmos das contagens por milhão. Cada coluna representa um participante e cada linha representa um gene. A cor azul representa uma expressão baixa e a cor vermelha representa uma expressão elevada. A cor verde indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e DM; a cor azul clara indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e C e a cor rosa indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos DM e C. Painel B: Logaritmo do fold-change (FC) da expressão de cada gene no Grupo CP em relação ao Grupo DM2 e ao Grupo Controle (C).....50

Figura 9. Expressão dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP) e diabetes mellitus tipo 2 (DM) nos três grupos estudados. C: Grupo Controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$ após análise pairwise realizada no pacote limma do R-Bioconductor. A linha horizontal dentro do box plot representa o valor da mediana, os limites do box plot referem-se aos percentis

25 e 75 e as barras do box plot referem-se aos percentis 10 e 90 para a expressão dos mRNAs	51
Figura 10. Interações proteína-proteína previstas pela plataforma STRING para os produtos dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas e diabetes mellitus tipo 2.	52
Figura 11. Curvas ROC que apresentaram um valor de $P < 0,05$ considerando o Grupo Adenocarcinoma ductal de pâncreas e o Grupo diabetes mellitus tipo 2.	53
Figura 12. Curvas ROC que apresentaram um valor de $P < 0,05$ considerando o Grupo Adenocarcinoma ductal de pâncreas e o Grupo Controle.	54
Figura 13. Diferença de expressão entre 179 amostras de adenocarcinoma ductal de pâncreas (disponíveis no The Cancer Genome Atlas) e 171 amostras de tecido pancreático normal (disponíveis no Gene and Tissue Expression).	57
Figura 14. Expressão do gene SHISAL2B disponível no The Cancer Genome Atlas (TCGA) em diferentes neoplasias.	58
Figura 15. Curvas de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a expressão do gene MTND1 (67)	61
Figura 16. Expressão da subunidade beta da hemoglobina (HBB, seta azul) no exossoma de indivíduos com diferentes doenças pancreáticas e de controles saudáveis. CP: pancreatite crônica, HC: controles saudáveis; P-NET: tumor neuroendócrino pancreático; PC: câncer de pâncreas; PCLs: lesões císticas pancreáticas (72).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos três grupos de indivíduos incluídos no estudo.	43
Tabela 2. Métrica do sequenciamento das bibliotecas de DNA complementar de exossomas obtidos de soro de indivíduos com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), com diabetes mellitus tipo 2 (DM) e de controles sem essas condições clínicas (C).	47

LISTA DE ABREVIações

ACTB	Gene que codifica a beta actina
ALT	Alanina aminotransferase
AKT	Proteína cinase B
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
B7-H3	<i>B7 Homolog 3 protein</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BD	Becton Dickinson
<i>BRCA1</i>	Gene <i>Breast cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	Gene <i>Breast cancer 2</i>
C	Grupo controle
CA 19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CA	Circunferência abdominal
CD73	<i>Cluster of differentiation 73</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
cDNA	DNA complementar
CEA	Antígeno carcinoembriogênico
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules</i>
CP	Adenocarcinoma ductal de pâncreas
cpm	Contagens por milhão
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CT	Colesterol total
CTLA4	Proteína T-linfócito-associada citotóxico 4
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>

DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
<i>DNASE1</i>	Gene que codifica a desoxirribonuclease 1
<i>DNMT3A</i>	Gene que codifica a DNA (citosina-5) -metiltransferase 3A
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
ESR2	Receptor de estrogênio beta
EUA	Estados Unidos da América
EVPs	Vesículas e partículas extracelulares
FAM3D	<i>Family with Sequence Similarity 3, Member D</i>
FC	<i>Fold-change</i>
<i>GAPDH</i>	Gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>GIGYF2</i>	Gene que codifica a <i>GRB10 Interacting GYF Protein 2</i>
GTEx	<i>Gene and Tissue Expression</i>
HBA1	Subunidade alfa 1 da hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HBB	Subunidade beta da hemoglobina
HBB2	Subunidade beta 2 da hemoglobina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
<i>HPRT1</i>	Gene que codifica a <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
IC	Intervalo de confiança
IDO	Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase
<i>IDO1</i>	Gene que codifica a Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase 1

IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL20RB	Cadeia beta do receptor da interleucina-20
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Log	Logaritmo
<i>MAP1B</i>	Gene que codifica a proteína 1B associada ao microtúbulo
min	Minutos
miRs	Micro-RNAs
mRNA	RNA mensageiro
<i>MTCO2</i>	Gene que codifica a proteína <i>Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I</i>
<i>MTND1</i>	Gene que codifica a proteína <i>Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1</i>
<i>MTND3</i>	Gene que codifica a proteína <i>Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 2</i>
<i>MTND5</i>	Gene que codifica a proteína <i>Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5</i>
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
nm	Nanômetros
PA	Pressão arterial
<i>PALB2</i>	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD1	Proteína de morte celular programada 1
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ácido ribonucleico

ROC	<i>Receiver operator characteristic</i>
rpm	Rotações por minuto
<i>RPS29</i>	Gene que codifica a Proteína ribossômica 40S S29
RQCD1	<i>Required for cell differentiation 1 homolog</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
<i>SHISAL2B</i>	Gene que codifica a proteína <i>Shisa Like 2B</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicérides
TGF β	Fator de crescimento transformante β
TNF	Fator de necrose tumoral
UBS	Unidade básica de saúde
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
VNI1	Vanina 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Adenocarcinoma ductal de pâncreas e diabetes mellitus	25
1.2 Exossomas, transcriptoma e câncer	28
2. OBJETIVOS	33
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1 Casuística	34
3.2 Métodos	36
3.2.1 Extração de exossomas de soro e confirmação da presença de mRNA nos exossomas	37
3.2.2 Preparo de bibliotecas de DNA complementar a partir de RNA total extraído de exossomas e sequenciamento	39
3.3 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos três grupos de pacientes	42
4.2 Expressão de mRNA em exossomas de soro.	43
4.3 Bibliotecas de cDNA a partir de RNA total extraído de exossomas	45
4.4 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA	46
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ANEXOS74

91

APÊNDICE92

1. INTRODUÇÃO

O pâncreas pode dar origem a diversas neoplasias malignas e benignas. Os termos comumente usados, "carcinoma do pâncreas" ou "câncer pancreático", geralmente se referem ao adenocarcinoma ductal de pâncreas (incluindo seus subtipos), que representa 85 a 90% de todas as neoplasias pancreáticas. As neoplasias pancreáticas exócrinas incluem todos os tumores que estão relacionados às células ductais e acinares pancreáticas. Mais de 95% das neoplasias malignas do pâncreas surgem de elementos exócrinos (1). Ela se constitui na quarta principal causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos da América (EUA), perdendo apenas para o câncer colorretal como causa de morte relacionada ao câncer do trato digestivo (2) e em alguns anos pode se tornar a segunda principal causa geral de morte relacionada ao câncer nesse país (3,4).

Nos últimos anos, a taxa de mortalidade por adenocarcinoma de pâncreas (CP) tem se mantido estável nos EUA e após cinco anos de seu diagnóstico, apenas 5,0% dos pacientes estão vivos (5,6). No Brasil, essa neoplasia é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e por 4% do total de mortes causadas pela doença (7). Em 2019, computou-se um total de mortes de 11.801, sendo 5.905 homens e 5.893 mulheres (8). É mais raro antes dos 30 anos, tornando-se mais comum a partir dos 60. Segundo a União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), os casos de CP aumentam com o avanço da idade: de 10/100.000 habitantes entre 40 e 50 anos para 116/100.000 habitantes entre 80 e 85 anos (9).

Com idade média ao diagnóstico de 70 anos, o CP acomete mais homens do que mulheres (5). Apenas 11% dos casos são diagnosticados em estágio inicial, com cerca de 30% apresentando disseminação para linfonodos regionais e mais de 50% já com doença metastática (5), refletindo a ausência de métodos de rastreamento (diagnóstico precoce) para tal neoplasia. Histologicamente, é caracterizado por glândulas atípicas envoltas por um denso

estroma fibrótico, que corresponde a cerca de 50% do tumor, o que torna difícil a obtenção de tecido carcinomatoso para fins de pesquisa e diagnóstico. Estruturas não-tumorais adjacentes estão frequentemente presentes dentro do tumor. Esses tumores podem expressar *mucin-related carbohydrate antigens*, tais como o antígeno carcino embriogênico (CEA) e o *carbohydrate antigen 19-9* (CA 19-9), além das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 (6).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do CP podem ser divididos em hereditários e não hereditários. Menor parcela advém de fatores hereditários, aproximadamente 10 a 15% dos casos (9). São exemplos de fatores de risco hereditários: câncer de mama e de ovário hereditários associados aos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2*, síndrome de Peutz-Jeghers e síndrome de pancreatite hereditária. Os fatores de risco não hereditários são, na sua grande maioria, associados ao estilo de vida e, dessa forma, são modificáveis. Dentre eles, destacam-se o tabagismo, a obesidade, a inatividade física, o diabetes mellitus (DM) e a pancreatite crônica não hereditária (9).

A apresentação inicial do CP varia de acordo com a localização do tumor. Aproximadamente 60 a 70% dos CP estão localizados na cabeça do pâncreas, enquanto 20 a 25% estão no corpo ou cauda e o restante envolve todo o órgão (10). Em comparação com os tumores do corpo e cauda da glândula, os tumores da cabeça do pâncreas cursam mais frequentemente com icterícia, esteatorreia e perda de peso (11). Sintomas inespecíficos, como astenia, perda de peso e dor abdominal, geralmente são encontrados nos pacientes com tumores de corpo e cauda de pâncreas e, por muitas vezes, podem passar despercebidos, culminando no diagnóstico mais tardio da doença (10).

A ressecção cirúrgica oferece a única chance de cura para o CP, mas apenas 15 a 20% dos casos são potencialmente ressecáveis na apresentação (12). A irresssecabilidade local é geralmente (mas nem sempre) devida à invasão vascular. Lamentavelmente, o

prognóstico é ruim, mesmo para aqueles submetidos à ressecção microscopicamente completa (R0). Dadas as altas taxas de recorrência sistêmica (> 80 %) e local (> 20%) após a cirurgia, quimioterapia sistêmica, radioterapia e as abordagens combinadas (quimiorradioterapia) têm sido usadas antes e após a ressecção cirúrgica, em um esforço para melhorar as taxas de cura (13).

1.1 Adenocarcinoma ductal de pâncreas e diabetes mellitus

O termo DM descreve doenças que envolvem o metabolismo anormal de carboidratos e que são caracterizadas por hiperglicemia. O DM tipo 2 (DM2) é o tipo mais comum de DM em adultos (> 90 por cento) e é caracterizado por hiperglicemia geralmente devido à perda progressiva da capacidade de secreção de insulina pela célula beta sobreposta a variados graus de resistência à insulina. Os pacientes são, em sua grande maioria, assintomáticos na apresentação, com hiperglicemia observada somente na avaliação laboratorial de rotina (14). O DM2 afeta aproximadamente 13% da população dos EUA, e a prevalência mundial é estimada em 9,3% em adultos, equivalente a 463 milhões de pessoas (15,16) e, frequentemente, se desenvolve em pacientes com mais de 45 anos.

Mais recentemente, o termo DM pancreatogênico ou DM tipo 3c tem sido utilizado para definir o DM que advém de disfunção pancreática exócrina direta, como por exemplo: pancreatite crônica (cerca de 80% dos casos), fibrose cística, hemocromatose e o CP (17). Estudo recente tentou encontrar características clínicas e laboratoriais que poderiam diferenciar o paciente com diagnóstico de DM2 *versus* o DM tipo 3c associado ao CP. Foi evidenciado que, para esta última condição clínica, os pacientes possuíam ao diagnóstico idade mais avançada, índice de massa corpórea (IMC) mais baixo, elevação de alanina aminotransferase (ALT) e menores

índices de hemoglobina glicada (HbA1c), além de manifestações clássicas do CP, como dor abdominal e perda de peso (17).

Diversos estudos mostram a estreita associação entre o CP e o DM e avaliações sistemáticas de tais estudos evidenciam um risco até duas vezes maior desta neoplasia em pacientes com DM2 de longa duração (maior que 5 anos). O DM2 cursa com obesidade e resistência insulínica, condições conhecidas para o risco de CP (11). O aumento das concentrações circulantes de insulina nos indivíduos com DM2 poderia ativar o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), o qual pode exercer efeitos mitogênicos em lesões pré-neoplásicas pancreáticas, acelerando o desenvolvimento do CP (18). O efeito estimulatório da insulina relacionado a proliferação celular é mediado pela transgelina 2, a qual encontra-se aumentada nos pacientes com CP e DM, implicando em um pior prognóstico oncológico; sua inibição poderá servir como alvo terapêutico em estudos futuros (19).

A associação entre CP é ainda mais estreita quando o DM tem uma duração menor do que cinco anos. A prevalência de DM e de tolerância à glicose diminuída em casos de CP chega a 80%. Na maioria dos casos, o DM associado ao CP é diagnosticado menos de dois anos antes do diagnóstico do câncer ou durante o curso da doença (20). Ben e cols. evidenciaram um risco relativo de 5,4 (intervalo de confiança [IC] de 95% de 2,5 a 8,3) de CP em indivíduos com DM de duração menor que um ano (21).

Os resultados de um estudo de coorte retrospectivo de 2.122 pacientes diabéticos sugeriram que o CP se desenvolveu dentro de três anos após o diagnóstico de DM em 1% dos pacientes que tinham pelo menos 50 anos de idade (22). Esta é aproximadamente a mesma taxa de detecção de câncer de cólon ou mama para

pacientes submetidos ao rastreamento colonoscópico ou mamográfico, respectivamente (23,24). Outros estudos evidenciaram prevalência maior, podendo chegar a até 13,6% (21).

Aproximadamente 80% dos pacientes com esse tipo tumoral têm glicemia de jejum alterada ou tolerância à glicose diminuída, independentemente do tamanho tumoral e de sua relação com estruturas adjacentes. Ademais, o diagnóstico do DM precede em até três anos o diagnóstico oncológico. Por fim, a remoção da neoplasia culmina em melhora ou resolução do DM de início recente (21).

Diante de tais achados, sugere-se que o DM seja um biomarcador do CP em estágio inicial. A identificação de indivíduos com DM de início recente associado ao CP ofereceria a oportunidade para a detecção precoce dessa neoplasia.

Algumas hipóteses são aventadas para explicar essa associação entre DM e CP, dentre elas:

- Destruição das células beta produtoras de insulina pelo tumor. Tal hipótese encontra pouco respaldo na literatura e apresenta dados conflitantes, uma vez que tumores pequenos podem também estar relacionados ao DM;
- Fatores de risco competitivos entre DM2 e CP: idade, obesidade e história familiar;
- Relação causal direta entre CP e DM, sendo este último considerado uma síndrome paraneoplásica.

Essa relação de causa e efeito parece estar associada à síntese e secreção de fatores diabetogênicos, os quais levariam a resistência à insulina e/ou disfunção das células beta secretoras de insulina pelo CP. Dentre as proteínas já identificadas e candidatas a mediar a menor secreção de insulina estão a adrenomedulina (25) e o FAM3D (26). Além disso, nota-se uma relação entre o status de DM e aumento do tamanho tumoral ao diagnóstico, assim como elevação do grau histológico do CP,

implicando diretamente em piores desfechos (27,28). Mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF) e marcadores de inflamação (proteína C reativa), estão em concentrações elevadas nos pacientes com CP e DM, em comparação com os indivíduos portadores de CP sem DM (29). A remoção do tumor leva à normalização de tais mediadores e, conseqüentemente, à resolução do DM, sugerindo que a inflamação possui papel na fisiopatologia do DM associado à neoplasia pancreática (29).

A depleção das células beta também é relatada como um dos possíveis mecanismos para explicar o desenvolvimento do DM em pacientes com diagnóstico de CP. Uma das principais vias envolvidas nesse processo é a ativação da sinalização celular mediada pelo fator de crescimento transformante beta ($TGF\beta$), o qual pode ser produzido tanto pelas células neoplásicas quanto pelas células estromais adjacentes (30), culminado em apoptose das células beta pancreáticas. Por fim, Kang e cols. reportaram que o biomarcador vanina 1 (VNI1), quando hiperexpresso nos indivíduos portadores de CP, pode causar uma maior disfunção das células beta e, conseqüentemente, explicar a presença de DM nessa população (31).

A suspeita clínica de que um DM de início recente seja, não um DM2, mas um DM secundário ao CP, tem implicações clínicas importantes, pois pode permitir a detecção precoce da neoplasia, uma vez que o DM surge entre 24 e 36 meses antes do diagnóstico do CP.

1.2 Exossomas, transcriptoma e câncer

Os exossomas consistem em nanovesículas (<150 nm) de origem endossomal, liberadas por células saudáveis e tumorais e possuem inúmeras funções relacionadas ao ambiente intra e extracelular. Em seu interior, podem ser encontrados

oligonucleotídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (mRNA), micro-RNAs (miRs), entre outros. Uma das principais funções dos exossomas é mediar a comunicação intercelular, tanto em âmbito fisiológico quanto patológico (32–34). Além disso, exossomas podem ser obtidos a partir de tecidos ou fluidos corporais de pacientes, com excelente biodistribuição e biocompatibilidade, o que permite um menor *clearance* pelo sistema fagocitário mononucleares (35).

No contexto do câncer, essas vesículas transferem macromoléculas para células-alvo, induzem hipóxia e proliferação celular e contribuem para a formação de um ambiente que favorece o desenvolvimento de metástases (36). Além disso, podem guiar alterações epigenéticas no microambiente tumoral e em órgãos à distância (37). Os exossomas estão diretamente ligados à tumorigênese de alguns tipos de neoplasia, tais como o câncer de cólon, o melanoma e o CP (38).

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm mostrado a importância e a aplicabilidade do estudo dos exossomas dentro do cenário oncológico, importância essa prognóstica e funcional, com participação ativa dos exossomas na regulação imunológica, na progressão da doença e no surgimento de metástases (39–42).

Os exossomas se constituem em um dos tipos de nanopartículas extracelulares, coletivamente chamadas de vesículas e partículas extracelulares (EVPs), que foram classificadas em três subpopulações distintas: os pequenos exossomas (60 a 80 nm), os grandes exossomas (90 a 120 nm) e os exômeros (< 50 nm). Apesar de diversas bases de dados de EVPs, algumas questões relacionadas a sua utilização e função ainda permanecem sem resposta:

- Quais marcadores permitem o isolamento confiável de EVPs em humanos, independentemente da fonte utilizada, como tecido ou plasma, por exemplo;

- Quais marcadores possibilitam a distinção entre câncer e não câncer e quais marcadores possibilitam sua detecção precoce;
- Quais marcadores únicos possibilitam especificar o sítio primário tumoral, seu local de origem (42).

Na tentativa de clarificar tais questões, Hoshino e cols. realizaram a análise de EVPs em 426 amostras de diversas células, tecidos e fluidos corporais, incluindo amostras obtidas de indivíduos com câncer e de indivíduos saudáveis. Os achados podem vir a permitir a utilização de proteínas tumorais associadas aos exossomas como possíveis biomarcadores para detecção precoce do câncer, para avaliação da resposta ao tratamento e para a identificação do sítio primário tumoral. Evidenciou-se, ainda, alta especificidade e sensibilidade para a detecção de estágios iniciais de câncer, seja empregando tecido ou plasma para análise dos EVPs. Um achado interessante foi que muitas das proteínas contidas nos EVPs derivados de plasma eram oriundas do tecido tumoral e de tecidos adjacentes ou distantes, mostrando que o microambiente tumoral é um dos maiores contribuidores para tais exossomas câncer-específicos encontrados no plasma. Dessa forma, os achados podem levar ao desenvolvimento de um novo método, baseado em exossomas plasmáticos, para rastreamento oncológico na prática clínica (43). Aventa-se também o desenvolvimento de drogas conjugadas a exossomas, direcionando a resposta para sítios específicos, poupando as células saudáveis e minimizando efeitos adversos (42).

Um achado que mostra a comunicação entre CP e ambiente estromal foi evidenciado pela análise de exossomas obtidos no líquido contido no ducto pancreático, que demonstrou a expressão tanto de moléculas carcinoembrionárias de adesão (CEACAMs ou antígeno carcinoembrionário) oriundas do epitélio pancreático, como proteínas da matriz extracelular (38). Sagar G. e cols. estudaram exossomas

(plasmáticos e teciduais) de pacientes portadores de CP, buscando averiguar a relação entre lipólise e perda ponderal precoce nesse subgrupo. Os achados mostraram o papel dos exossomas na mediação de tal processo, uma vez que eles transportavam adrenomedulina, que promove lipólise em adipócitos humanos (44).

As análises transcriptômicas visam capturar tanto RNA codificadores quanto não codificadores e quantificar a heterogeneidade da expressão gênica em células, tecidos, órgãos e até mesmo em um corpo inteiro. Esta análise também é importante porque fornece os primeiros passos para a caracterização funcional e anotação de genes / genomas previamente revelados por sequenciamento de DNA (45).

Uma vez que exossomas derivados de células oncológicas refletem o ambiente tumoral, a análise do transcriptoma dessas EVPs pode fornecer informações relevantes. Qadir e cols. realizaram a análise transcriptômica de queratinócitos orais humanos normais expostos a exossomas oriundos de queratinócitos normais e de queratinócitos isolados de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço. Tanto o exossoma normal quanto o derivado da célula oncológica modulou a expressão gênica dos queratinócitos normais. Esses dados sugerem que a célula neoplásica pode se utilizar do exossoma para reprogramar o transcriptoma de células distantes, levando a alterações patológicas que favorecem angiogênese, imunomodulação e metástases (46).

A identificação de um perfil de mRNA específico de uma neoplasia a partir de RNA total obtido de exossomas circulantes poderia ser útil no diagnóstico precoce em indivíduos de alto risco.

Na prática clínica do endocrinologista, existe uma dificuldade de diferenciar, em bases clínicas, um DM2 de um DM secundário a um CP e a identificação de marcadores que pudessem auxiliar nesse diagnóstico diferencial seria de grande auxílio. A hipótese

do presente trabalho é que exossomas circulantes de indivíduos com CP e DM tenham um perfil de mRNA diferente de exossomas circulantes de indivíduos com DM2.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de mRNA (transcriptoma) de exossomas isolados do soro de três grupos de indivíduos:

- Com CP e DM de início recente,
- Com DM2 de longa duração;
- Controles, sem CP e sem DM2.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente estudo foi submetido e aprovado pelos seguintes Comitês de Ética em Pesquisa:

- Universidade Nove de Julho – UNINOVE (2.962.389, Anexo 1);
- Hospital Alemão Oswaldo Cruz (3.323.054, Anexo 2);
- Hospital Santa Maggiore (3.111.704, Anexo 3);
- Unidade Básica de Saúde (UBS) da Estratégia de Saúde da Família Dr^a Ilza Weltman Hutzler (3.141.417, Anexo 4).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 5).

Indivíduos com CP foram selecionados no ambulatório dos Hospitais Santa Maggiore e do Hospital Oswaldo Cruz entre os meses de outubro de 2018 a outubro de 2019. Os critérios de inclusão para esse grupo foram:

1. Idade > 18 anos;
2. Diagnóstico histologicamente confirmado de CP e diagnóstico de DM de acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (Glicemia após jejum de 8 horas \geq 126 mg/dL ou HbA1c \geq 6,5%) até três anos antes do diagnóstico do adenocarcinoma ductal.

Não foram incluídos indivíduos com outros subtipos de câncer de pâncreas que não adenocarcinoma ductal.

Todos foram submetidos à mensuração do peso (kg) e da altura (m), aferidos para cálculo do IMC (em kg/m²) e da circunferência abdominal (CA, em cm), aferida com fita métrica flexível e inelástica.

Os seguintes exames bioquímicos foram realizados: glicemia de jejum (mg/dL), HbA1c (%), colesterol total (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), LDL-colesterol (mg/dL), triglicérides (TG) (mg/dL), insulina (μUI/mL), peptídeo C (ng/mL) e CA19-9 (U/mL).

Os seguintes dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos foram coletados a partir dos prontuários dos indivíduos com CP: idade, sexo, estágio da doença (I a IV), sítio do tumor primário (cabeça, corpo ou cauda pancreática), tratamentos já realizados ou em andamento, data do diagnóstico, história de tabagismo, diferenciação do tumor e performance *status* de acordo com a escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG).

Os indivíduos com DM2 (diagnóstico também baseado nos critérios da *American Diabetes Association*) foram selecionados na UBS da Estratégia de Saúde da Família Dr^a Ilza Weltman Hutzler, entre os meses de setembro de 2018 a fevereiro de 2019. Não foram incluídos indivíduos com DM tipo 1.

Os critérios de inclusão para esse grupo foram:

1. Idade > 18 anos;
2. DM2 há mais de três anos do momento da coleta de amostra.

Todos os indivíduos foram submetidos à mensuração do peso (kg) e altura (m) para cálculo do IMC (em kg/m²) e da CA.

Os seguintes exames bioquímicos foram realizados: glicemia de jejum (mg/dL), HbA1c (%), colesterol total (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), LDL-colesterol (mg/dL) e TG (mg/dL).

Os indivíduos do grupo Controle também foram selecionados na UBS da Estratégia de Saúde da Família Dr^a Ilza Weltman Hutzler, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2020. Os indivíduos foram submetidos às mesmas mensurações antropométricas e aos mesmos exames bioquímicos do Grupo com DM2.

Os seguintes critérios de não inclusão foram usados nos três grupos avaliados:

- Incapacidade de assinar o TCLE e
- Antecedente de outras neoplasias (exceto tumores de pele não-melanoma).

Perda de peso recente (últimos três meses) na ausência de um programa de reeducação alimentar e atividade física foi critério de não inclusão nos Grupos DM2 e C.

3.2 Métodos

O sangue periférico de todos os participantes da pesquisa foi coletado em um tubo BD de tampa amarela com gel de separação (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), específico para separação de soro. Após a coleta, o tubo foi centrifugado a 4°C por 20 min a 2.800 rotações por min (rpm) e o soro assim obtido foi armazenado a - 80° C até sua utilização.

3.2.1 Extração de exossomas de soro e confirmação da presença de mRNA nos exossomas

As amostras de soro foram mantidas em gelo até o descongelamento e para a padronização das metodologias, uma alíquota de 200 μ L e uma alíquota de 1 mL foram centrifugadas à temperatura ambiente, a 2.000g por 30 min para remoção de células /debris. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, onde foram adicionados 0,2 volumes do reagente *Total Exosome Isolation (from serum)* (Invitrogen). Após pipetagem para homogeneização, as amostras foram incubadas a 4 °C durante 30 min e, a seguir, centrifugadas a 10.000g, por 10 min, à temperatura ambiente. Os exossomas estão contidos no *pellet* formado nessa etapa. Esse estojo comercial isola nanopartículas menores do que 300 nm, estando a maioria delas entre 50 e 150 nm.

Com uma pipeta, os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* foram ressuspensos em *Exosome Resuspension Buffer* (Invitrogen) (200 μ L para cada 200 μ L de soro inicial) e posteriormente procedeu-se à extração do RNA dos exossomas, com a adição de 200 μ L de *2X Denaturing Solution* (Invitrogen) em cada amostra. Após serem misturadas vigorosamente, as amostras foram incubadas em gelo por 5 min. Um volume de 400 μ L de solução *acid-Phenol:Cloroform* foi adicionado a cada amostra e, após vórtex de 1 min, procedeu-se à centrifugação a 10.000g durante 5 min à temperatura ambiente. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 1,25 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente, sendo os tubos misturados vigorosamente.

Um total de até 700 μ L da solução álcool/lisato foi pipetado no “cartucho filtro”, o qual foi centrifugado a 10.000g durante 15 segundos. O volume filtrado foi descartado e o processo repetido até que todo volume fosse filtrado. A seguir, 700 μ L de *miRNA*

Wash Solution 1 (Invitrogen) foram adicionadas ao cartucho, que foi novamente centrifugado a 10.000g durante 15 segundos. O líquido filtrado foi descartado, foram adicionados 500 µL de *Wash Solution 2/3* (Invitrogen) e nova centrifugação foi realizada a 10.000g, por 15 segundos, com volume filtrado descartado. Esse procedimento foi repetido, e o cartucho novamente centrifugado por 1 min, a 10.000g para a remoção do tampão do filtro. O filtro foi transferido para um novo tubo e 50 µL de água *RNAase free*, à 95°C, foram adicionados ao centro do filtro e uma centrifugação durante 30 segundos foi realizada para recuperação do RNA. A eluição foi repetida e o volume eluído foi armazenado a -20°C.

A confirmação da presença de RNA foi realizada com o uso do estojo comercial *Eukaryote Total RNA Pico do Bioanalyzer* (Agilent). Para tanto, apenas algumas amostras foram submetidas à extração de RNA dos exossomas: duas do Grupo C, uma partindo de 200 µL de amostra (C4) e uma partindo de 1 mL de amostra (C4 1 mL) e duas amostras do Grupo CP (CP2 e CP26).

Inicialmente, a transcrição reversa foi realizada por meio do estojo comercial *High Capacity* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada para verificar a expressão de mRNA de três genes-alvo que seriam inicialmente avaliados nos exossomas dos três grupos de pacientes, quais sejam, *CTLA4*, *PD1* e *IDO*. A PCR foi realizada por meio do sistema Taqman (Applied Biosystem), com o uso do gene *HPRT1* como controle endógeno da reação, conforme as instruções do fabricante.

Como não foi possível observar a expressão dos genes-alvo e a expressão do gene controle endógeno também foi insatisfatória, outros dois genes endógenos foram testados, *ACTB*, que codifica a beta actina e *GAPDH*, que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Além disso, na tentativa de otimizar os resultados, também se optou pelo uso de uma transcriptase reversa mais eficiente, a enzima *Superscript IV VILO* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante.

3.2.2 Preparo de bibliotecas de DNA complementar a partir de RNA total extraído de exossomas e sequenciamento

O RNA total obtido dos exossomas de todas as amostras incluídas no estudo foi utilizado para o preparo de bibliotecas de *DNA complementar* (cDNA), com o uso do estojo comercial *QuantSeq 3'mRNA Seq Library Prep* (Lexogen), conforme as instruções do fabricante. Como durante a padronização, a amostra C4 1 mL foi a que apresentou maior quantidade de RNA, especialmente nas faixas de RNAs pequenos, o RNA total foi extraído de exossomas isolados de 1 mL de soro de cada um dos indivíduos incluídos no estudo. O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 no SELA (Sequenciamento em Larga Escala), um *Next Generation Sequence Facility Core* da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O programa STAR foi usado para o alinhamento das sequências com a versão GRCh38 do genoma humano, juntamente com a ferramenta *bamsort*, do *biobambam2*, para o processamento adicional dos dados. Para a contagem do número de sequências lidas que se sobrepõem em cada gene, foi utilizado o *featureCounts*. O arquivo GFF contendo os modelos de gene foram obtidos no <ftp.ensembl.org>. O *fastQC* e o RNASEQC foram usados para avaliar a qualidade das sequências e as métricas de alinhamento, respectivamente. A normalização foi realizada com o *edgeR*, usando o

método *trimmed-mean*. Para avaliar a expressão diferencial entre os grupos, foi utilizado o pacote *limma* do *R-Bioconductor*. O programa STRING (<https://string-db.org>) foi utilizado para avaliar as interações proteína-proteína.

Inicialmente, foram mantidos apenas genes com contagens mensuráveis em pelo menos 30 amostras, o que reduziu a análise para apenas 113 genes. A seguir, o método RLE foi implementado no *edgeR* para calcular os fatores de normalização específicos para as amostras, com o objetivo de contabilizar as diferenças de profundidade das bibliotecas. A função *voomWithQualityWeights* do *limma* foi usada para calcular os valores de logaritmo base 2 das contagens por milhão de pares de base ($\log_2\text{cpm}$) para cada gene. Para reduzir ainda mais a variabilidade, foi aplicada a normalização de quantis na função *voomWithQualityWeights*. A seguir foi realizada a análise de expressão gênica diferencial *pairwise*, com o uso do *limma*.

3.3 Análise estatística

Este estudo utilizou uma amostra de conveniência. Na análise dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos participantes do estudo, as variáveis contínuas estão expressas como mediana e intervalo interquartilico 25-75%, enquanto as variáveis categóricas estão expressas como porcentagem de indivíduos afetados. As variáveis contínuas relativas às características dos grupos estudados foram comparadas pelo teste de Wilcoxon com pós teste de Dunn, enquanto o teste do χ^2 de Pearson foi utilizado para avaliar as diferenças nas variáveis categóricas. Essas análises foram realizadas com o programa JMP (SAS Institute).

Curvas ROC foram construídas com o uso do programa SPSS Statistics (Versão 23.0), para determinar o valor diagnóstico de alguns mRNA diferencialmente expressos.

4. RESULTADOS

4.1 Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos três grupos de pacientes

Um total de 55 indivíduos foram incluídos no estudo, 20 com CP e DM de início recente, 22 com DM2 de longa duração e 13 controles sem essas duas condições clínicas. As características demográficas, clínicas e bioquímicas dos três grupos estão descritas na Tabela 1. Uma vez que os grupos foram pareados de acordo com idade e sexo, não houve diferenças significantes nessas variáveis. A mediana da duração do DM foi significativamente maior no Grupo DM2 (10 anos) em relação ao Grupo CP (2 anos). Indivíduos com DM2 apresentaram maiores valores de IMC ($30,3 \text{ kg/m}^2$) e CA (109 cm) em relação ao Grupo com CP ($24,1 \text{ kg/m}^2$ e 88 cm, respectivamente) e ao Grupo C ($28,3 \text{ kg/m}^2$ e 99 cm, respectivamente). Os valores de HbA1c foram significativamente maiores nos indivíduos com DM2 (7,2%) em relação ao Grupo C (5,5%). Os valores de colesterol LDL foram significativamente menores no Grupo com CP (75 mg/dL) em relação aos Grupos DM2 e C (119 mg/dL em ambos)

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos três grupos de indivíduos incluídos no estudo.

	Controle	Diabetes mellitus tipo 2	Adenocarcinoma ductal de pâncreas	Valor P
n	13	22	20	
Sexo (% mulheres)	64,3	63,6	75,0	0,69
Idade (anos)	66,0 (64,0 – 69,0)	67,0 (65,0 – 68,0)	66,5 (59,0 - 74,5)	0,92
Duração do DM2 (anos)	NA	10 (6,0 – 11,0)	2,0 (1,0 – 3,0)	< 0,0001
IMC (kg/m²)	28,3 (23,5 - 30,1)	30,3 (28,1 - 39,9) *. #	24,1 (20,7 - 27,9)	0,0004
CA (cm)	99,0 (90,0 – 106,0)	109,0 (100,0 - 121,5) *.&	88,0 (82,0 – 94,0)	<0,0001
Tabagismo (%)	0	4,5	45,0	0,0007
HbA1c (%)	5,5 (5,4 - 5,5)	7,2 (6,5 - 8,2) @	6,8 (5,4 - 8,9)	0,001
CT (mg/dL)	180 (152 - 218)	193 (158 - 217)	193 (158 - 217)	0,21
HDL (mg/dL)	49 (40 - 56)	47 (43 - 62)	49 (39 - 62)	0,97
LDL (mg/dL)	119 (100 - 122)	119 (93 - 151)	75 (55 - 99) \$.**	0,006
TG (mg/dL)	93 (80 - 165)	139 (119 - 170)	116 (97 – 173)	0,27

CA: Circunferência abdominal, IMC: Índice de massa corpórea, CT: Colesterol total, HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade, NA: Não se aplica; TG: Triglicérides. * $P < 0,0001$ versus Grupo com adenocarcinoma ductal de pâncreas; # $P = 0,0045$ versus Grupo Controle; & $P = 0,02$ versus Grupo Controle; @ $P < 0,0001$ versus Grupo Controle; \$ $P = 0,0048$ versus Grupo com Diabetes mellitus tipo 2; ** $P = 0,01$ versus Grupo Controle.

4.2 Expressão de mRNA em exossomas de soro.

As concentrações de RNA total obtidas nos exossomas de soro dos três grupos de indivíduos variaram de 4 a 92 pg/ μ L.

A eletroforese realizada com estojo comercial *Eukaryote Total RNA Pico do Bioanalyzer* (Agilent) não evidenciou as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S e nem os valores de *RNA integrity number* (RNA) na maioria das amostras de RNA extraído de exossomas (Figura 1A). No entanto, não se espera a presença das bandas correspondentes aos RNA ribossomais em exossomas obtidos de soro, conforme pode-se observar na Figura 1B, retirada de um manuscrito que avaliou o perfil de RNA extraído de exossomas (21).

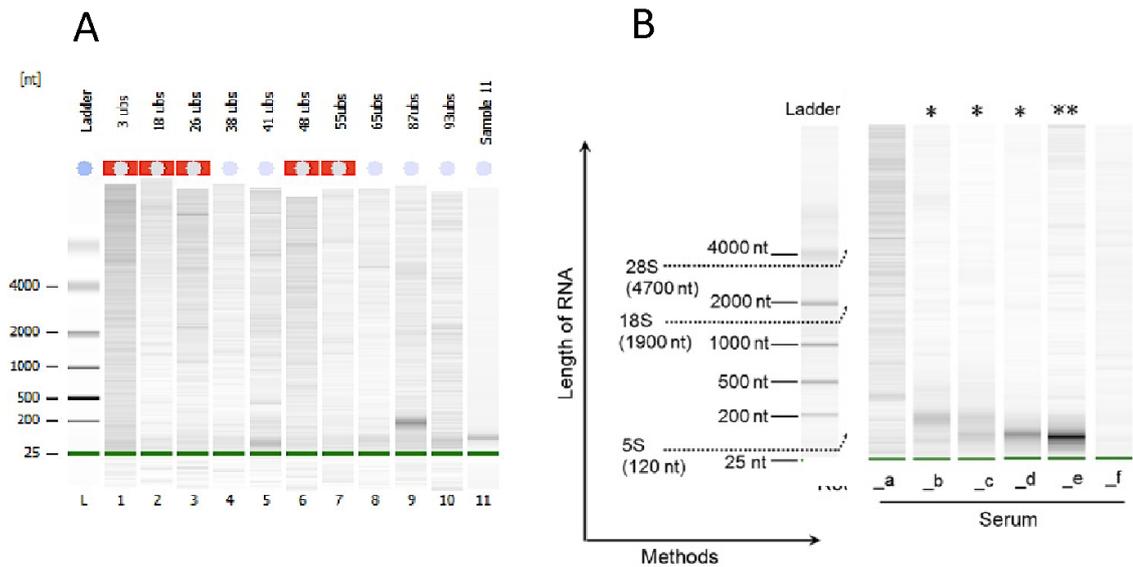


Figura 1. Paine A: Imagens representativas da eletroforese de RNA total extraído de exossomas de soro de indivíduos incluídos no presente estudo. Paine B: Eletroforese de RNA total extraído de exossomas obtidos de soro (Adaptado de Tang e cols.,2017).

A tentativa de amplificação dos genes-alvo e do gene controle endógeno *HPRT1* com o uso da transcriptase reversa *High Capacity* resultou em valores de *Cycle threshold* (CT) indeterminados ou muito elevados, conforme mostrado na Figura 2.



Figura 2. Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno *HPRT1* e para os genes-alvo *CTLA4*, *IDO1* e *PD1* com o uso da transcriptase reversa *High Capacity* nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.

A amplificação do mRNA da *ACTB* com o uso da enzima *High Capacity* resultou em CTs que variaram de indeterminados a 36,68 (Figura 3), enquanto o uso da enzima *Superscript IV VILO* diminuiu os valores do CT, que variaram de 30,01 a 37,04 (Figura 4). Os resultados obtidos com o gene endógeno *GAPDH* não foram muito diferentes daqueles observados com a *ACTB* (dados não mostrados)



Figura 3. Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno *ACTB* (BACT) com o uso da transcriptase reversa *High Capacity* nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.

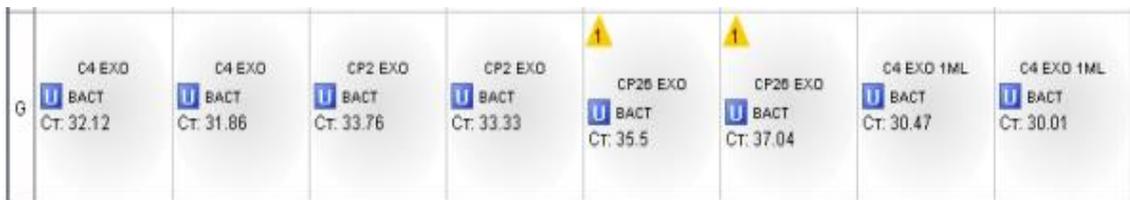


Figura 4. Imagens dos valores de cycle threshold (CT) observados na reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene controle endógeno *ACTB* (BACT) com o uso da transcriptase reversa *Superscript IV VILO* nas amostras C4, C4 1 mL, CP2 e CP26.

4.3 Bibliotecas de cDNA a partir de RNA total extraído de exossomas

A qualidade das bibliotecas de cDNA obtidas de cada uma das amostras de RNA total foi avaliada por eletroforese, com o uso do *RNA Screen Tape* (Agilent Technologies) (Figura 5). As bibliotecas não apresentaram o perfil considerado ideal para bibliotecas obtidas a partir de RNA total extraído de tecidos, que seriam bandas variando de 335 a 456 pares de base. Algumas amostras consideradas de pior qualidade foram purificadas ou reamplificadas, resultando em perfis de melhor qualidade (dados não mostrados).

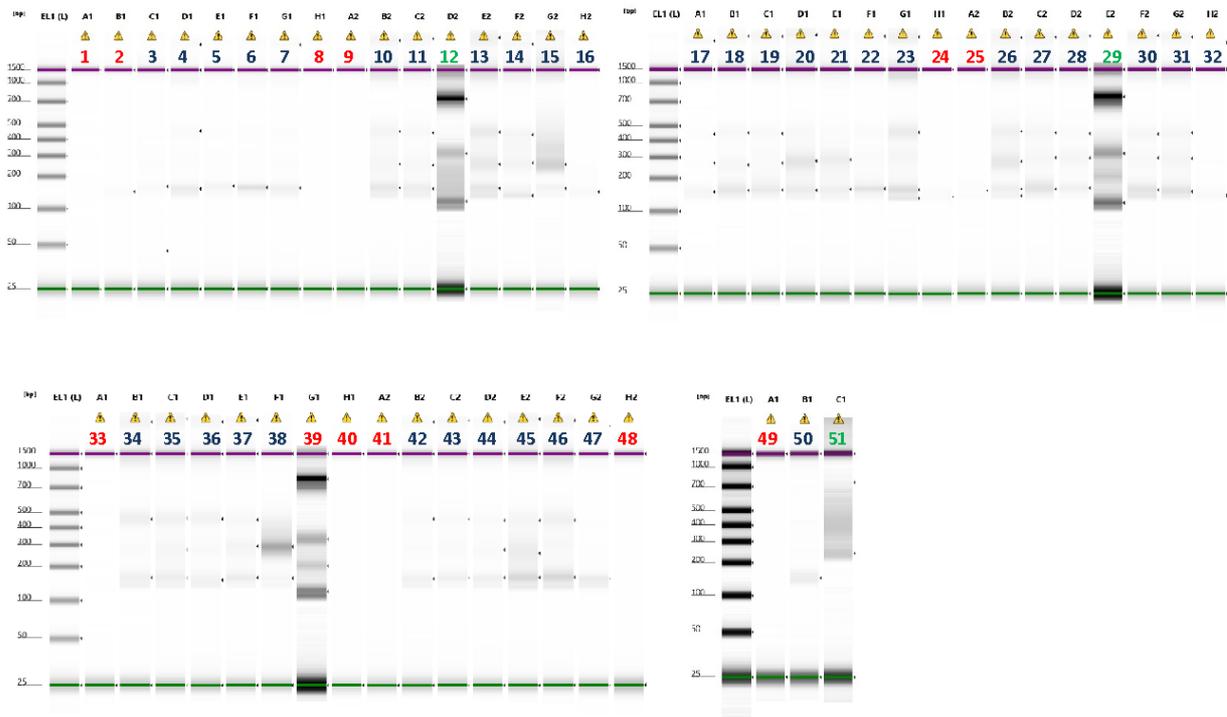


Figura 5. Análise da qualidade das bibliotecas de DNA complementar obtidas a partir de RNA total de exossomas de soro dos indivíduos incluídos no presente estudo. As amostras marcadas em vermelho foram reamplificadas e as amostras em verde foram purificadas.

4.4 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA

A métrica do sequenciamento, evidenciando o número de sequências lidas, a magnitude de duplicação, a contaminação com RNA ribossomal, a proporção de regiões intergênicas e de regiões intragênicas e o número de genes detectados está mostrada na Tabela 2. Pode-se observar uma grande variabilidade no número de genes detectados entre as amostras (22 até 8.227 genes), bem como uma alta taxa de duplicação de genes lidos.

Tabela 2. Métrica do sequenciamento das bibliotecas de DNA complementar de exossomas obtidos de soro de indivíduos com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), com diabetes mellitus tipo 2 (DM) e de controles sem essas condições clínicas (C).

Condição	Número de sequências lidas	Taxa de duplicação	Proporção de RNA ribossomal	Proporção intragênica	Proporção intergênica	Número de genes detectados
C	13,058	0.413	0.013	0.689	0.311	22
C	135,743	0.851	0.015	0.651	0.347	172
C	1,087,229	0.896	0.027	0.619	0.380	1,032
C	526,826	0.857	0.001	0.695	0.301	364
C	146,613	0.833	0.006	0.689	0.309	193
C	107,726	0.837	0.002	0.635	0.362	129
C	262,968	0.907	0.001	0.714	0.281	251
C	43,335	0.091	0.004	0.605	0.395	23
C	33,082	0.593	0.005	0.628	0.372	50
C	1,662,243	0.943	0.007	0.660	0.336	845
C	11,044,163	0.895	0.015	0.599	0.400	6,682
C	15,013,639	0.889	0.002	0.591	0.408	8,227
C	16,518,811	0.917	0.005	0.615	0.383	7,109
CP	1,123,633	0.941	0.017	0.680	0.318	583
CP	156,51	0.730	0.107	0.727	0.273	270
CP	1,762,656	0.941	0.017	0.637	0.361	740
CP	5,129,416	0.946	0.001	0.618	0.381	1,544
CP	9,045,644	0.941	0.007	0.604	0.394	2,646
CP	70,703	0.864	0.001	0.769	0.228	83
CP	327,473	0.899	0.005	0.695	0.301	403
CP	1,177,532	0.949	0.049	0.635	0.362	447
CP	633,531	0.913	0.001	0.679	0.318	359
CP	1,300,390	0.924	0.015	0.615	0.383	408
CP	1,518,663	0.964	0.012	0.608	0.390	350
CP	518,731	0.909	0.001	0.661	0.337	315
CP	1,060,964	0.944	0.001	0.733	0.262	553
CP	99,089	0.864	0.003	0.673	0.323	123
CP	474,42	0.916	0.008	0.621	0.377	331
CP	5,773,182	0.960	0.002	0.614	0.384	1,135
CP	1,302,202	0.943	0.001	0.668	0.328	577
CP	1,243,669	0.963	0.028	0.665	0.333	505
CP	171,339	0.865	0.003	0.652	0.346	279
CP	1,441,467	0.929	0.002	0.659	0.336	903
DM	1,459,118	0.950	0.046	0.679	0.318	563
DM	118,489	0.691	0.005	0.718	0.279	138
DM	19,481	0.275	0.017	0.670	0.330	29
DM	1,994,788	0.942	0.011	0.687	0.310	799
DM	2,105,051	0.959	0.014	0.654	0.343	659
DM	1,405,016	0.924	0.010	0.661	0.335	708
DM	1,798,052	0.959	0.050	0.672	0.325	548
DM	6,019,840	0.970	0.008	0.577	0.421	604
DM	729,592	0.902	0.077	0.673	0.326	443
DM	930,996	0.816	0.002	0.591	0.408	1,507
DM	26,962	0.220	0.016	0.639	0.361	37
DM	784,144	0.955	0.001	0.682	0.314	443
DM	1,170,597	0.922	0.003	0.667	0.330	481
DM	1,199,620	0.933	0.002	0.646	0.352	481
DM	2,473,363	0.962	0.000	0.602	0.396	577
DM	1,389,320	0.943	0.001	0.692	0.302	645
DM	344,55	0.861	0.001	0.724	0.270	296
DM	17,109	0.212	0.009	0.631	0.369	20
DM	17,468	0.461	0.020	0.656	0.344	39
DM	144,231	0.591	0.006	0.686	0.311	176
DM	10,249,362	0.886	0.004	0.615	0.384	6,661
DM	13,949,747	0.882	0.001	0.598	0.401	8,44

Como houve uma grande variabilidade no número de genes detectados entre as amostras, optou-se por considerar para análise dos genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram transcritos presentes em pelo menos 30 amostras (54,5% do total), o que resultou em 113 genes. A partir desses 113 genes, foram selecionados aqueles que apresentaram diferença estatisticamente significativa nas comparações entre os Grupos CP e C, CP e DM2 e DM2 e C, o que resultou em 40 genes. A Figura 6 ilustra o Diagrama de Venn, que mostra quantos genes foram diferencialmente expressos entre os Grupos avaliados. Oito genes foram diferencialmente expressos somente entre o Grupo CP e C (*SLC18A1*, *KLC1*, *PARVB*, *MED26*, *PTPRE*, *MTATP6*, *C11orf58* e *NF1*). Sete genes foram diferencialmente expressos somente entre os Grupos CP e DM2 (*ASAH1*, *ULK4*, *TMSB4X*, *HBB*, *HBA2*, *YWHAB* e *B2M*) e dois genes foram diferencialmente expressos somente entre os Grupos DM2 e C (*LINC02427* e *HLAE*).

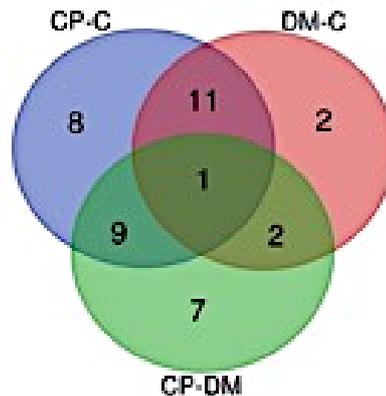


Figura 6. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre os Grupos adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), diabetes mellitus tipo 2 (DM) e Controle (C).

O agrupamento hierárquico realizado com esses 40 genes resultou no dendograma mostrado na Figura 7.

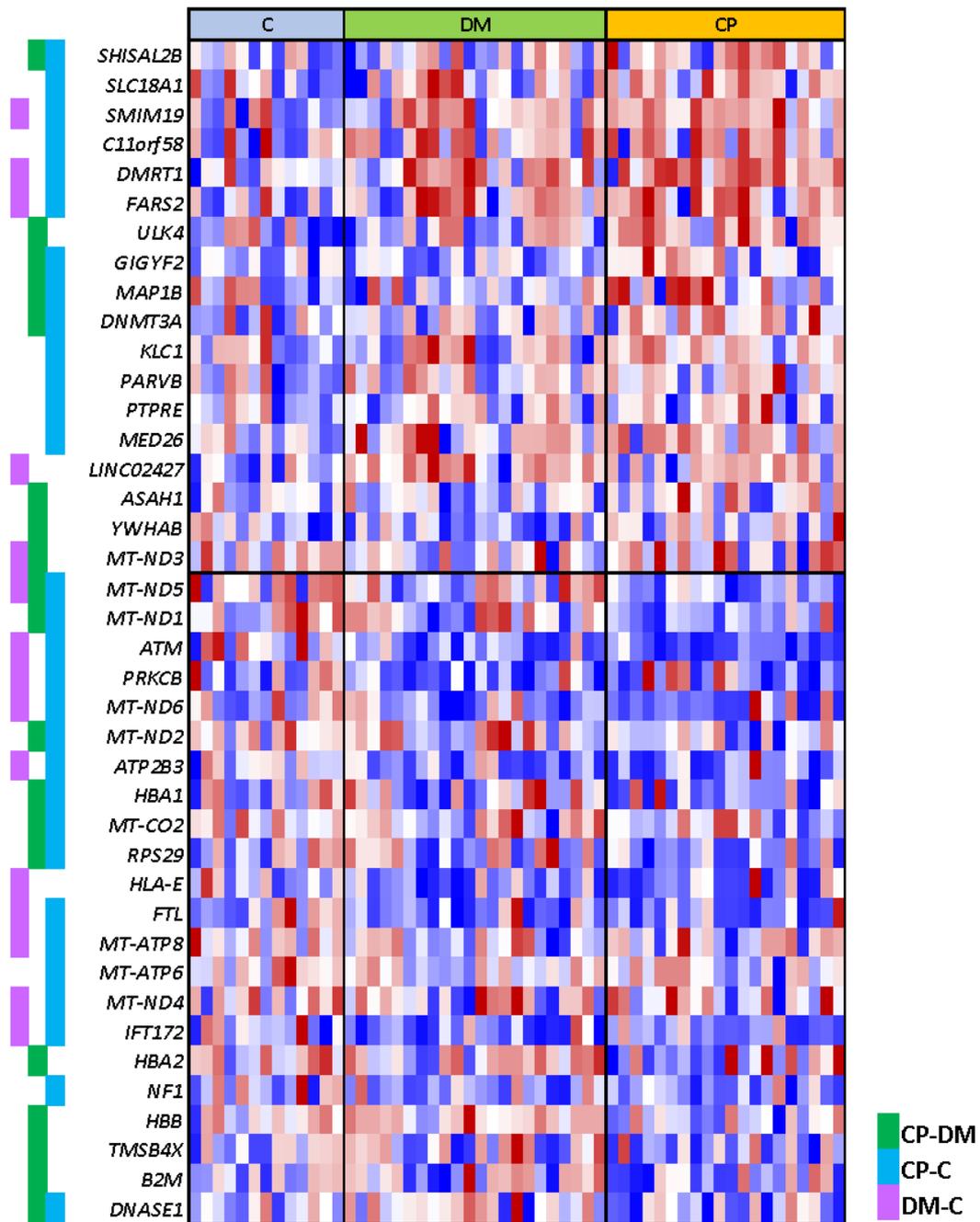


Figura 7. Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão dos 40 genes diferencialmente expressos entre os Grupos adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP), diabetes mellitus tipo 2 (DM) e controle (C) nos três grupos estudados. Os dados estão normalizados pelo Z-escore dos valores logaritmos das contagens por milhão. Cada coluna representa um participante e cada linha representa um gene. A cor azul representa uma expressão baixa e a cor vermelha representa uma expressão elevada. A cor verde indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e DM; a cor azul clara indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e C e a cor rosa indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos DM e C

Um total de 19 genes foi diferencialmente expressos entre participantes com CP e DM2: sete entre os Grupos CP e DM2, nove entre os grupos CP e C e CP e DM2 (*GIGYF2*, *MTND1*, *MTND2*, *DNMT3A*, *SHISAL2B*, *MAP1B*, *RPS29*, *MTCO2* e *HBA1*), dois entre os Grupos CP e DM2 e DM2 e C (*MTND3* e *DNASE1*) e um entre os Grupos CP e C, CP e DM2 e DM2 e C (*MTND5*). O agrupamento hierárquico realizado com esses 19 genes resultou no dendograma mostrado na Figura 8.

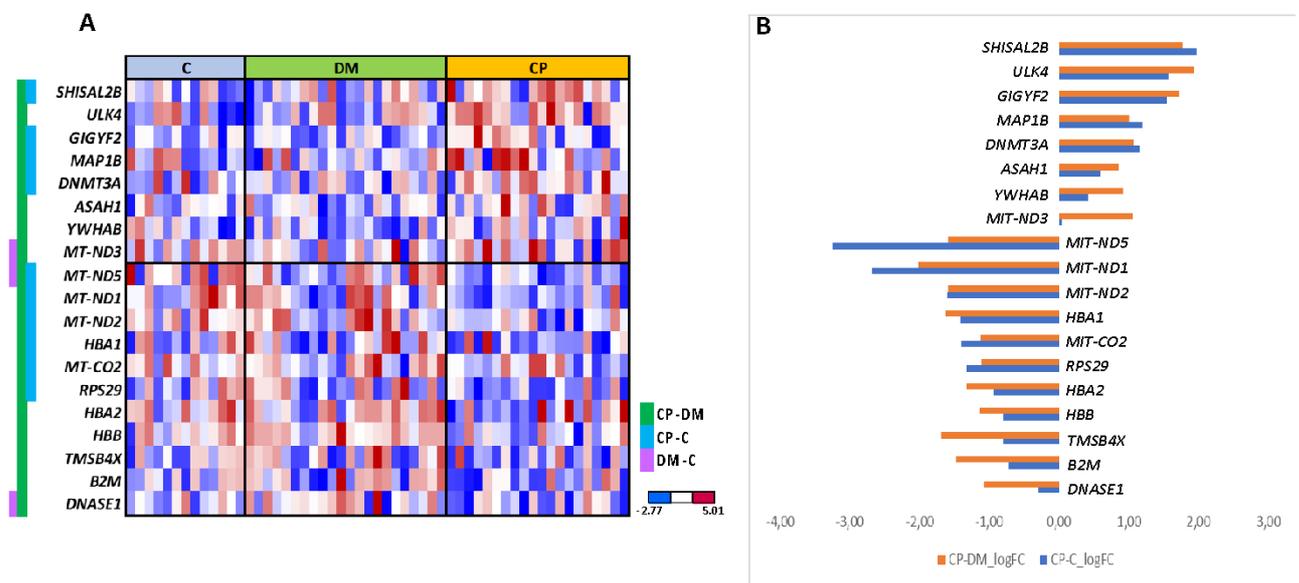


Figura 8. Painel A: Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP) e diabetes mellitus tipo 2 (DM) nos três grupos estudados. Os dados estão normalizados pelo Z-escore dos valores logaritmos das contagens por milhão. Cada coluna representa um participante e cada linha representa um gene. A cor azul representa uma expressão baixa e a cor vermelha representa uma expressão elevada. A cor verde indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e DM; a cor azul clara indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos CP e C e a cor rosa indica os genes diferencialmente expressos entre os Grupos DM e C. Painel B: Logaritmo do *fold-change* (FC) da expressão de cada gene no Grupo CP em relação ao Grupo DM2 e ao Grupo Controle (C).

A expressão de cada um desses 19 genes nos três Grupos estudados está mostrada na Figura 9.

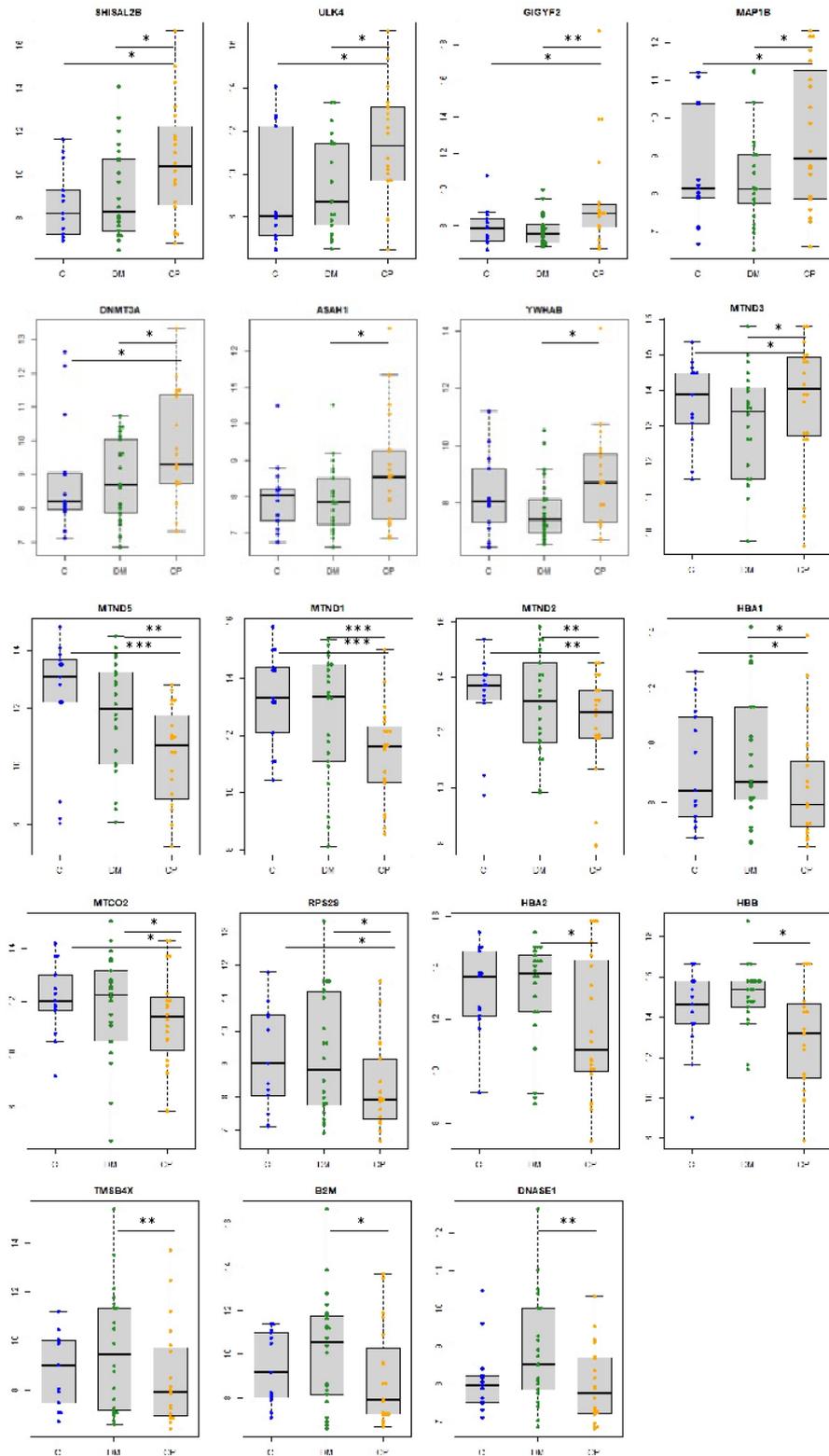
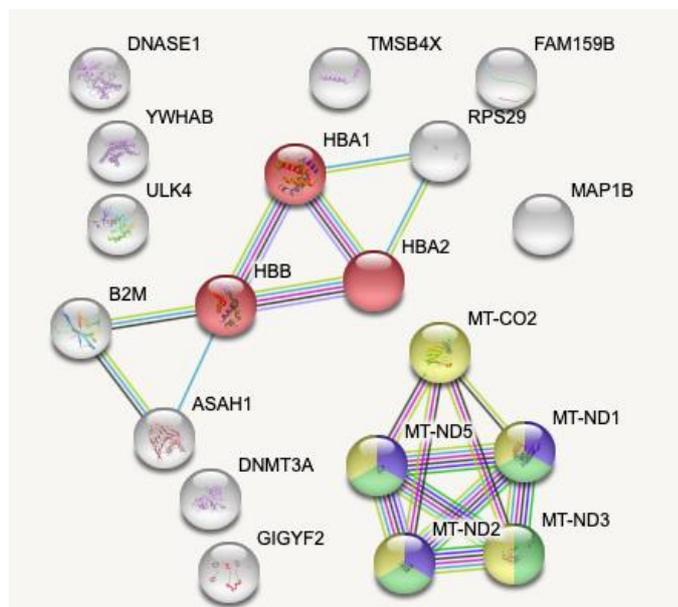


Figura 9. Expressão dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas (CP) e diabetes mellitus tipo 2 (DM) nos três grupos estudados. C: Grupo Controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$ após análise pairwise realizada no pacote *limma* do *R-Bioconductor*. A linha horizontal dentro do *box plot* representa o valor da mediana, os limites do *box plot* referem-se aos percentis 25 e 75 e as barras do *box plot* referem-se aos percentis 10 e 90 para a expressão dos mRNAs

A análise das interações proteína-proteína com o uso da plataforma STRING está mostrada na Figura 10. O número de interações encontrado foi significativamente maior do que o que seria esperado ($P= 2,78 \times 10^{-15}$) e as seguintes redes foram detectadas: Complexo haptoglobina-hemoglobina, Neuropatia óptica hereditária de Leber, Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e Respirassoma.



local network cluster (STRING)				
cluster	description	count in network	strength	false discovery rate
CL:23237	haptoglobin-hemoglobin complex, and Haemoglobin, beta-t...	3 of 5	2.79	2.78e-06
CL:22408	Leber hereditary optic neuropathy	3 of 5	2.79	2.78e-06
CL:22332	mitochondrial respiratory chain complex I	4 of 43	1.98	2.78e-06
CL:22328	respirasome	5 of 94	1.74	2.78e-06

Figura 10. Interações proteína-proteína previstas pela plataforma STRING para os produtos dos 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com adenocarcinoma ductal de pâncreas e diabetes mellitus tipo 2.

Para determinar o potencial dos 19 mRNAs diferencialmente expressos para o diagnóstico de CP, foram construídas curvas ROC considerando os Grupos CP e DM2. As curvas ROC para os genes que apresentaram um valor de $P < 0,05$ (*ULK4*, *GIGYF2*, *YWHAB*, *MTND5*, *MTND1*, *HBB* e *DNASE1*) estão mostradas na Figura 11.

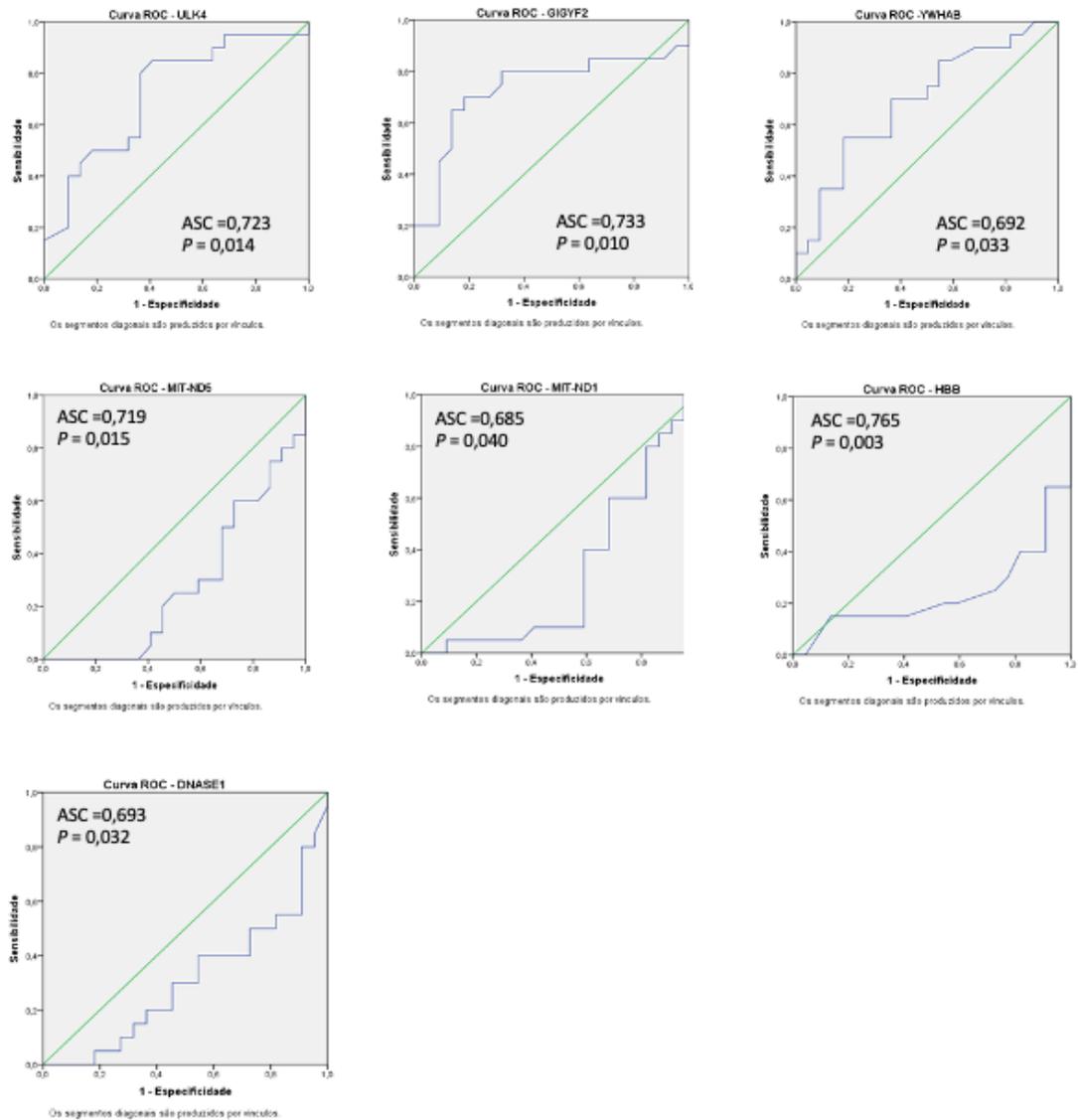


Figura 11. Curvas ROC que apresentaram um valor de $P < 0,05$ considerando o Grupo Adenocarcinoma ductal de pâncreas e o Grupo diabetes mellitus tipo 2.

Curvas ROC considerando os Grupos CP e C também foram construídas para determinar o potencial dos mesmos 19 mRNAs para o diagnóstico de CP. As curvas ROC para os genes que apresentaram um valor de $P < 0,05$ (*SHISAL2B*, *ULK4*, *GIGYF2*, *MTND5* e *MTND1*) estão mostradas na Figura 12.

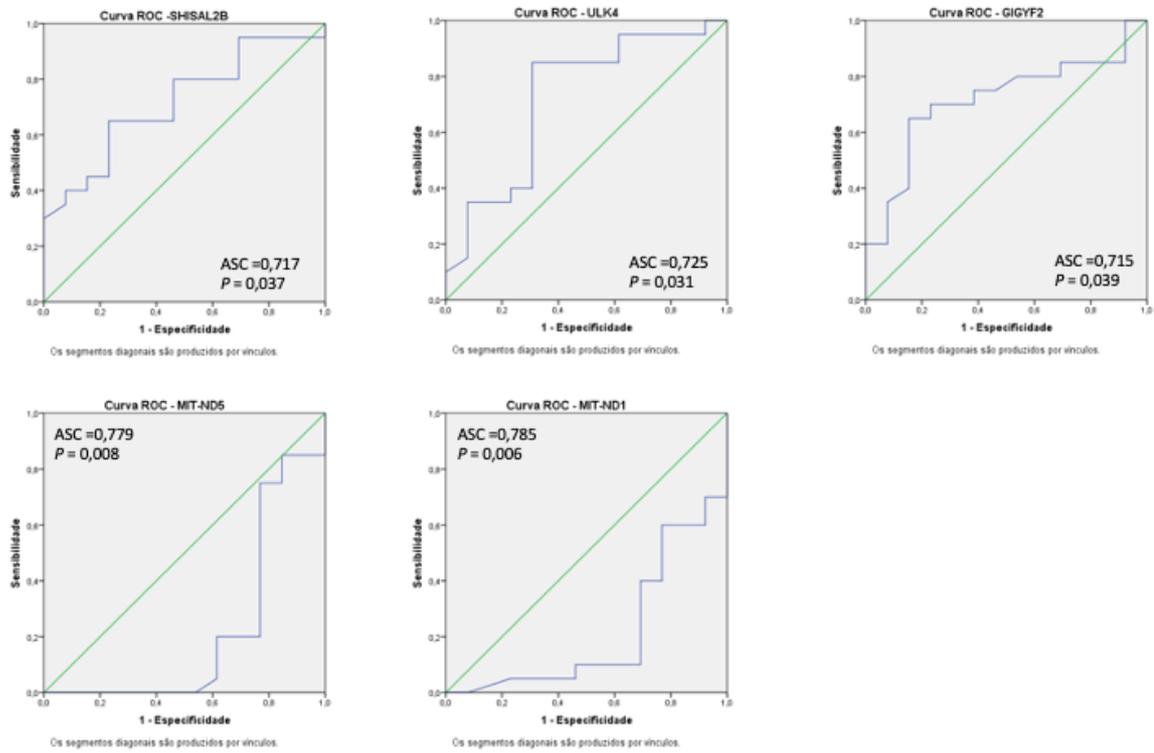


Figura 12. Curvas ROC que apresentaram um valor de $P < 0,05$ considerando o Grupo Adenocarcinoma ductal de pâncreas e o Grupo Controle.

5. DISCUSSÃO

O DM de início recente é considerado um marcador de CP (47,48), mas essa é uma causa de DM frequentemente negligenciada. Quando um indivíduo de meia idade apresenta hiperglicemia, ele, em geral, recebe o diagnóstico de DM2, especialmente se apresentar fatores de risco clássico para essa condição clínica, como a obesidade e a resistência à insulina. No entanto, a obesidade e a resistência à insulina, juntamente com a idade, também são fatores de risco para o CP (47). Portanto, idealmente, indivíduos com DM de início recente deveriam ser rastreados para CP, pois o diagnóstico precoce desta neoplasia aumentaria as chances de cura. A identificação de marcadores que possam auxiliar no diagnóstico diferencial entre o DM secundário a um CP e o DM2 seria de grande valor na prática clínica, e foi o que motivou a realização do presente estudo.

A biópsia líquida tem sido considerada uma promissora estratégia de diagnóstico e monitoramento de neoplasias, por meio da identificação de *cell-free DNA* circulante contendo mutações em genes associados ao câncer, de RNAs circulantes e também de DNA e RNA contidos em EVPs. Considera-se que as EVPs influenciam o microambiente tumoral como veículos para a comunicação célula-célula. Por essa razão, elas carregam um repertório diversificado de moléculas protegidas da degradação e que são representativas de suas células de origem (49).

No contexto do CP, San Lucas e cols. isolaram exossomas de dois pacientes com CP, um deles a partir de plasma e o outro a partir de derrame pleural associado a uma metástase pulmonar. O DNA e o RNA extraído desses exossomas foram utilizados para a realização do exoma e do transcriptoma, respectivamente. Várias mutações foram identificadas a partir do sequenciamento do DNA contido nos exossomas. No paciente que teve os exossomas extraídos do plasma (status glicêmico

não mencionado), foram identificados 6.047 transcritos; a análise da lista desses transcritos evidenciou a presença de oito genes identificados como diferencialmente expressos entre os participantes com CP e DM2 no presente estudo (*GIGYF2*, *ASAH1*, *MTND5*, *MTND1*, *MTND2*, *HBB*, *B2M* e *DNASE1*) (49).

Um estudo realizado por Melo e cols. (2015), utilizando espectrometria de massa e citometria de fluxo, identificou que exossomas circulantes de pacientes com CP são enriquecidos de uma proteoglicana presente na superfície celular, a glipicana 1. A pesquisa de exossomas positivos para a glipicana 1 em duas coortes independentes mostrou que esse marcador foi capaz de discriminar, com sensibilidade e especificidade de 100%, indivíduos saudáveis e com lesões pancreáticas benignas daqueles com estágios precoces e tardios de CP. Esse estudo, no entanto, não avaliou a expressão de mRNA da glipicana 1 nos exossomas (50) e, em teoria, a composição da membrana das EVPs não precisa estar relacionada ao seu conteúdo de mRNA. De qualquer forma, observamos que o mRNA que codifica a glipicana 1 foi detectado em poucas das amostras avaliadas no presente estudo (uma no Grupo C, uma no Grupo DM e duas no Grupo CP), não tendo sido incluída na lista dos 113 genes expressos em pelo menos 30 das amostras estudadas. No estudo de San Lucas e cols. (2016), o mRNA que codifica a glipitana 1 também não foi detectado (49).

Dentre os 19 mRNAs diferencialmente expressos entre os participantes com CP e DM2, sete resultaram em curvas ROC com um valor de $P < 0,05$ para discriminar indivíduos com CP daqueles com DM2 e cinco resultaram em curvas ROC com um valor de $P < 0,05$ para discriminar indivíduos com CP daqueles do Grupo C. A comparação da expressão desses genes entre 179 amostras de CP com dados disponíveis no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e 171 amostras de tecido

pancreático normal disponíveis no *Gene and Tissue Expression* (GTEx) está mostrada na Figura 13.

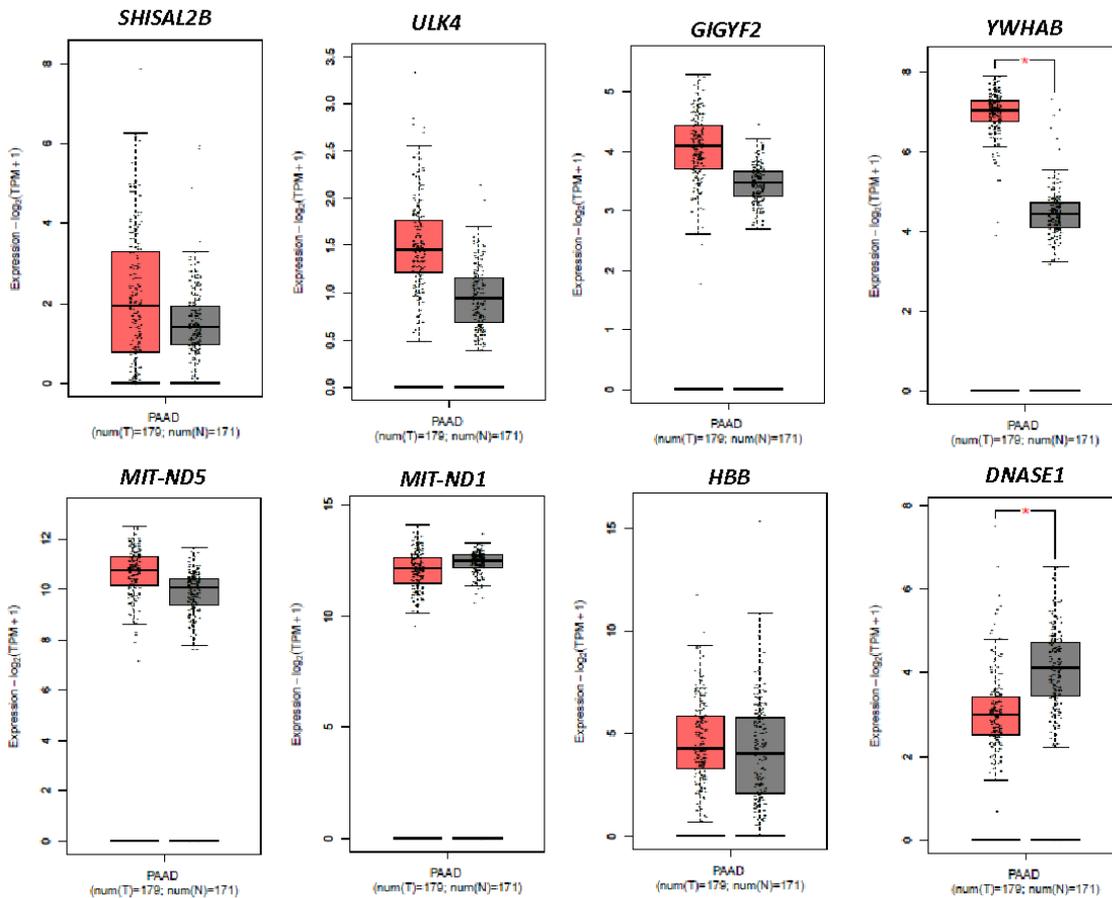


Figura 13. Diferença de expressão entre 179 amostras de adenocarcinoma ductal de pâncreas (disponíveis no *The Cancer Genome Atlas*) e 171 amostras de tecido pancreático normal (disponíveis no *Gene and Tissue Expression*).

Observa-se que as medianas da expressão do *SHISAL2B*, *ULK4* e *GIGYF2* foram maiores nas amostras tumorais em relação às amostras de tecido normal, sem, no entanto, alcançarem significância estatística. Na presente casuística, as expressões desses três genes foram significativamente maiores nos exossomas dos indivíduos do Grupo CP em relação ao Grupo C. A mediana da expressão de *DNASE1* foi significativamente menor nas amostras tumorais em relação às amostras de tecido normal e, na presente casuística, a expressão deste gene foi significativamente menor

nos exossomas dos indivíduos do Grupo CP em relação apenas ao Grupo DM2. Outros dois genes identificados dentre os 19 genes diferencialmente expressos entre os participantes com CP e DM2 apresentaram expressão aumentada nas amostras tumorais do TCGA em relação às amostras de tecido normal do GTEx, o *MAP1B* e o *DNMT3A*. Esses genes também apresentaram maior expressão nos exossomas dos indivíduos do Grupo CP em relação ao Grupo C.

O gene *SHISAL2B*, também conhecido como *FAM159B*, foi mais expresso no Grupo CP em relação aos Grupos DM2 e C. Ele codifica a proteína *Shisa like 2B*, e é altamente expresso no estômago e no pâncreas (51). Experimentos de *RNA single cell type* realizados em pâncreas evidenciaram a expressão desse gene apenas em células endócrinas (52), especificamente nas células beta produtoras de insulina (53). Não há trabalhos publicados sobre a função desse gene, mas, conforme dados do TCGA, sua expressão aumentada já foi detectada em algumas neoplasias, como CP, câncer de pulmão, câncer de endométrio e gliomas (52) (Figura 14).

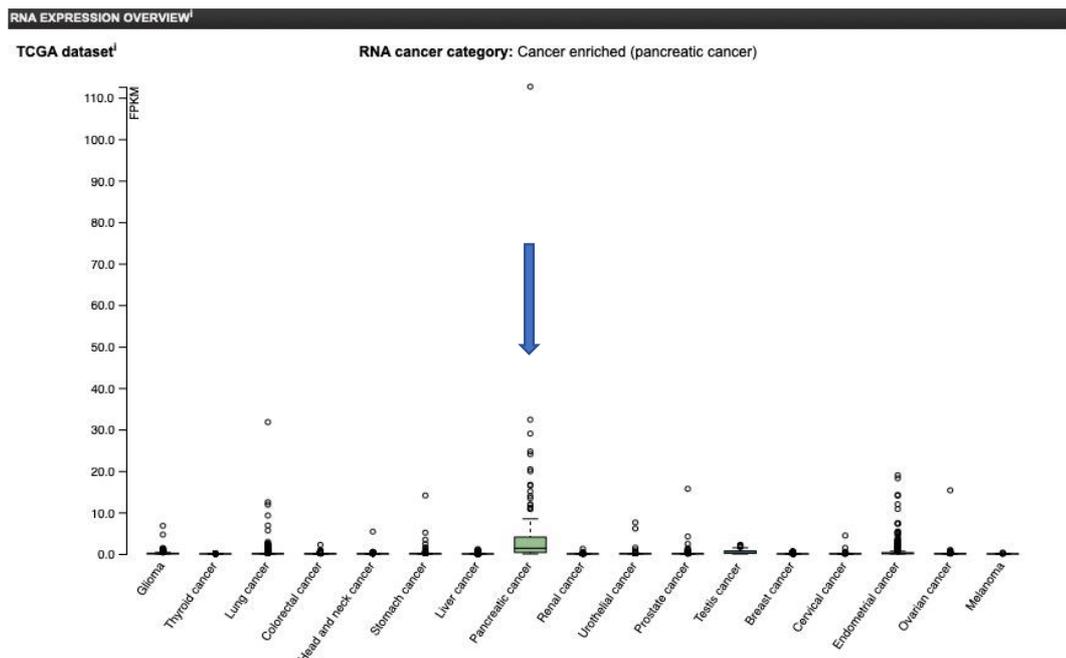


Figura 14. Expressão do gene *SHISAL2B* disponível no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em diferentes neoplasias.

O gene *ULK4* foi mais expresso no Grupo CP em relação aos Grupos DM2 e C. Ele codifica a *Unc-51 like kinase 4*, uma proteína da família *unc-51-like serine/threonine kinase* envolvida em crescimento neuronal e endocitose (54). O *ULK4* é considerado um dos genes centrais da autofagia, um processo que tem o objetivo de coletar energia e nutrientes a partir dos componentes celulares, direcionando proteínas de meia-vida longa e organelas danificadas para serem degradadas nos lisossomos, reciclando, desta forma, nutrientes que servirão de base para a síntese de novas macromoléculas. Mutações somáticas no *ULK4* foram detectadas em carcinoma de endométrio (55) e maior expressão deste gene associou-se a uma menor chance de sobrevida em indivíduos com glioblastoma multiforme (56). Os mecanismos pelos quais o *ULK4* está envolvido na tumorigênese não estão elucidados, mas há evidências de que exista uma desregulação da autofagia no câncer (57).

O gene *GIGYF2* foi mais expresso no Grupo CP em relação aos Grupos DM2 e C. Ele codifica a proteína *GRB10 interacting GYF protein 2*, envolvida na regulação da sinalização de receptores tirosina-cinase (58). Esta proteína interage com a proteína RQCD1 (*Required for cell differentiation 1 homolog*) e está envolvida na regulação da atividade da proteína cinase B (AKT) na via de sinalização do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), no câncer de mama. Uma deleção em um fragmento do gene *GIGYF2* já foi identificada em um paciente com CP, juntamente com diversas outras mutações (59). Em gliomas, a expressão desse gene se associou com um menor grau de malignidade e uma melhor sobrevida do paciente e, *in vitro*, o aumento de sua expressão reduziu a migração celular mediada pela metaloproteinase 9 (MMP9) e a sinalização da via AKT/Bax/Caspase-2 (60). A participação do gene *GIGYF2* na tumorigênese do CP nunca foi investigada.

O gene *YWHAB* foi mais expresso no Grupo CP em relação ao Grupo DM2. Ele codifica a *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein beta*, uma proteína que regula múltiplas vias de sinalização, tanto em células normais quanto em células neoplásicas. Ela suprime a expressão da Ciclina D1, reprime a atividade apoptótica e está envolvida em inúmeros processos fisiológicos. Uma maior expressão dessa proteína já foi descrita em carcinoma hepatocelular e também no soro de indivíduos com câncer de pulmão, nos quais sua maior expressão se associou com uma pior sobrevida global (61). Uma maior expressão do *YWHAB* também já foi descrita em células de câncer cervical e sua inibição inibiu a proliferação a invasão e promoveu apoptose celular (62). A participação desse gene na tumorigênese do CP nunca foi investigada.

Os genes *MTND5* e *MTND1* foram menos expressos no Grupo CP em relação aos Grupos DM2 e C. Eles codificam, respectivamente, as enzimas NADH desidrogenase subunidades 1 e 5, que fazem parte do Complexo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductase). O Complexo I é a primeira enzima da cadeia respiratória, que oxida NADH gerado no ciclo de Krebs e usa dois elétrons para reduzir ubiquinona a ubiquinol. A transferência de elétrons ao longo dos complexos mitocondriais constitui a fosforilação oxidativa, que gera adenosina trifosfato (ATP) na presença de oxigênio (63).

As células neoplásicas produzem energia a partir da glicólise aeróbica ao invés da oxidação fosforilativa, mesmo na presença de oxigênio. Esta mudança metabólica é típica de células neoplásicas, e foi chamada de Efeito Warburg em homenagem ao seu descobridor, que, na época, deduziu que esse fenômeno aconteceria em decorrência de uma disfunção mitocondrial (64). Estudos recentes descobriram que mutações em genes localizados no DNA mitocondrial, dentre os quais os genes

MTND5 e *MTND1*, estão associadas ao câncer, inclusive ao CP (65). Estudos *in vitro* suportam a hipótese de que mutações somáticas que diminuem a atividade da enzima *MTND5* cursam com aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e aumento da expressão de genes anti-apoptóticos (64). Em câncer renal, uma menor expressão do *MTND5* foi associada com uma menor probabilidade de sobrevida (66). Da mesma forma, uma menor expressão do *MTND1* foi associada a uma menor probabilidade de sobrevida em CP (67) (Figura 15).

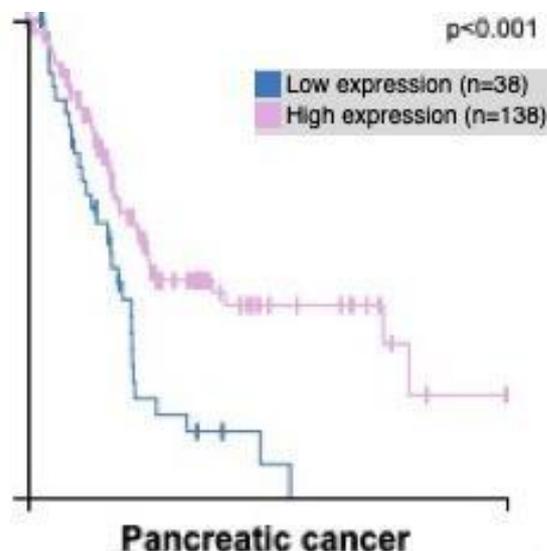


Figura 15. Curvas de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a expressão do gene *MTND1* (67)

O gene *HBB* foi menos expresso no Grupo CP em relação ao Grupo DM2 e ao Grupo C (sem alcançar significância estatística nesta comparação). Ele codifica a subunidade beta da hemoglobina, uma das cadeias de globina que compõe a hemoglobina A. Uma perda de heterozigosidade no *locus* do gene *HBB* já foi descrito em câncer de ovário, glioma, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer anaplásico de tireoide. Estudos *in vitro* mostraram que a proteína HBB exerce uma atividade supressora de tumor (68).

Maman e cols. demonstraram, em camundongos, que substâncias solúveis presentes no pulmão normal eram capazes de inibir a viabilidade de células de neuroblastoma e identificaram ser um desses fatores a HBB2 produzida pelas células epiteliais alveolares. A partir desse achado, eles testaram se a HBB humana seria capaz de inibir a viabilidade de linhagens de células neoplásicas, o que aconteceu para células de neuroblastoma, de câncer de mama, colon, pulmão e próstata, entre outras. Os efeitos observados de indução de apoptose e de parada do crescimento foram mediados por uma região na extremidade carboxiterminal da HBB humana composta por 11 aminoácidos. Esses achados evidenciaram que, além de transportar oxigênio, a HBB também exerce atividade supressora tumoral (69).

Deutsch e cols. realizaram um trabalho com o objetivo de procurar biomarcadores de CP no fluido oral. Mais de 100 candidatos a biomarcadores foram identificados na comparação entre indivíduos com CP e controles saudáveis e a HBB foi uma das proteínas diferencialmente expressas, com uma razão CP/controles saudáveis de 0,33, ou seja, estava mais expressa nos indivíduos saudáveis. Os autores observaram que várias das proteínas encontradas eram proteínas exossomais (70) e mencionaram um estudo prévio, conduzido em camundongos, que evidenciou que exossomas transportam moléculas mensageiras do pâncreas para as glândulas salivares. Esse achado explicaria por que biomarcadores de CP podem ser encontrados no fluido oral (71). A menor expressão do mRNA de *HBB* em exossomas séricos de indivíduos do Grupo CP no presente estudo, está de acordo com o achado de menor expressão de HBB no fluido oral de pacientes com CP.

Um trabalho recentemente publicado avaliou a proteômica de exossomas de indivíduos com diferentes doenças pancreáticas, inclusive CP em diferentes estágios e encontrou a HBB como uma das proteínas com diferentes graus de abundância

entre CP e outras doenças pancreáticas. A razão CP/outras doenças pancreáticas foi de 0,655, evidenciando a menor expressão da HBB no CP em relação à pancreatite crônica, tumores neuroendócrinos pancreáticos e lesões císticas pancreáticas (Figura 16) (72).

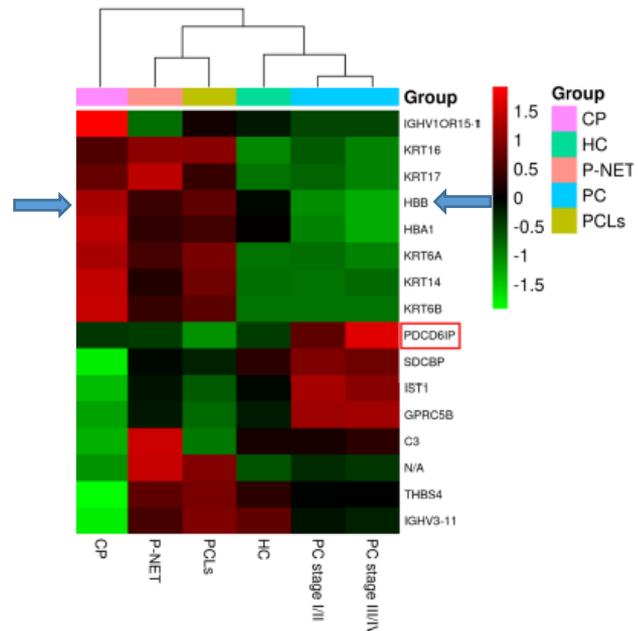


Figura 16. Expressão da subunidade beta da hemoglobina (HBB, seta azul) no exossoma de indivíduos com diferentes doenças pancreáticas e de controles saudáveis. CP: pancreatite crônica, HC: controles saudáveis; P-NET: tumor neuroendócrino pancreático; PC: câncer de pâncreas; PCLs: lesões císticas pancreáticas (72).

O gene *DNASE1* foi menos expresso no Grupo CP em relação ao Grupo DM2. Ele codifica a desoxiribonuclease 1 (DNase), uma proteína que fica estocada em grânulos de zimogênio do envelope nuclear e que cliva o DNA de forma endonucleolítica (73). Desde a década de 1950 já é conhecido que as concentrações de DNase estão reduzidas em indivíduos com câncer em comparação a controles saudáveis, e que elas aumentam durante a remissão e diminuem quando há progressão e metástases (74). Zhou e cols., analisando dados do TCGA, detectaram uma redução da expressão do gene *DNASE1* em câncer de bexiga estágios III e IV

em relação àqueles nos estágios I e II (75). Não foram encontradas publicações sobre a expressão deste gene em CP, mas um estudo *in vitro* mostrou que a hipóxia aumenta a expressão de *DNASE1* em uma linhagem de CP (76).

O presente estudo precisa ser replicado em uma população independente para confirmação dos achados e melhor avaliação de quais genes diferencialmente expressos têm potencial de ser empregado no diagnóstico diferencial entre o DM secundário a um CP e o DM2.

Uma limitação deste estudo é que a população de DM2 avaliada foi selecionada na Atenção primária, onde não haveria condições de realização de tomografia computadorizada para afastar CaP. Portanto, não existe certeza de que os indivíduos do Grupo DM2 (e também do Grupo C) não sejam portadores de CP em fases iniciais. No entanto, a opção por selecionar indivíduos com DM2 com mais de três anos de diagnóstico (mediana de 10 anos de doença) minimiza essa possibilidade. Outra limitação é a ausência de validação por RT-PCR em tempo real de, pelo menos, alguns dos genes diferencialmente expressos. As etapas iniciais desse trabalho, no entanto, mostraram como é difícil conseguir amplificar genes-alvo a partir de RNA extraído de exossomas, dada a exiguidade do material obtido. Apesar disso, alguns dos genes estão sendo selecionados para essa validação.

Como ponto forte do presente estudo destacamos que, mesmo com as baixíssimas concentrações de RNA obtidas de exossomas e com a grande variabilidade na expressão gênica intra-Grupos, foi possível identificar genes diferencialmente expressos entre as três condições avaliadas, com plausibilidade biológica encontrada para alguns dos genes até o momento pesquisados na literatura.

6. CONCLUSÕES

O perfil de expressão de mRNA de exossomas isolados do soro de indivíduos com CP e DM de início recente diferiu do perfil de expressão de indivíduos com DM2 de longa duração e de indivíduos sem CP e sem DM2. Alguns dos genes diferencialmente expressos apresentam potencial para discriminar DM secundário ao CP de DM2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klimstra DS. Noductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* [Internet]. 2007;20(1):S94–112. Available from: <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800686>
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7–33.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019;69(1):7–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30620402>
4. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Jun 1;74(11):2913–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840647>
5. Statistical Epidemiology and End Results (SEER): Cancer Statistics Review 1975-2013 [Internet]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/results_merged/sect_22_pancreas.pdf
6. Klimstra DS, Adsay N V. Pancreas Cancer: Pathology. In: Kelsen D, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, editors. *Gastrointestinal oncology: Principles and practices*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
7. Available from: <https://www.inca.gov.br>
8. Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>
9. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>
10. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1999;10 Suppl 4:82–4.
11. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2005 Jun;7(5):189–97.
12. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS. National failure to operate on early stage pancreatic cancer. *Ann Surg*. 2007 Aug;246(2):173–80.

13. Willett CG, Czito BG, Bendell JC, Ryan DP. Locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Jul;23(20):4538–44.
14. Available from: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>
15. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes statistics report 2020: Estimates of diabetes and its burden in the United States. US Department of Health and Human Services. [Internet]. [cited 2020 Sep 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/statistics/national-diabetes-statistics-report>.
16. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th ed, 2019.
17. Yoon BH, Ang SM, Alabd A, Furlong K, Yeo CJ, Lavu H, et al. Pancreatic Cancer–Associated Diabetes is Clinically Distinguishable From Conventional Diabetes. *J Surg Res* [Internet]. 2021 May;261:215–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480420308763>
18. Wiskemann J, Clauss D, Tjaden C, Hackert T, Schneider L, Ulrich CM, et al. Progressive Resistance Training to Impact Physical Fitness and Body Weight in Pancreatic Cancer Patients. *Pancreas* [Internet]. 2019 Feb;48(2):257–66. Available from: <https://journals.lww.com/00006676-201902000-00018>
19. Sun Y, He W, Luo M, Zhou Y, Chang G, Ren W, et al. Role of transgelin-2 in diabetes-associated pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jul 25;8(30):49592–604. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.17519>
20. Li D. Diabetes and pancreatic cancer. *Mol Carcinog*. 2012 Jan;51(1):64–74.
21. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, et al. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* [Internet]. 2011 Sep;47(13):1928–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458985>
22. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Aug;129(2):504–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083707>
23. Imperiale TF, Glowinski EA, Lin-Cooper C, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Five-Year Risk of Colorectal Neoplasia after Negative Screening Colonoscopy. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Sep 18;359(12):1218–24. Available from:

- <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0803597>
24. Hendrick RE, Helvie MA. Mammography Screening: A New Estimate of Number Needed to Screen to Prevent One Breast Cancer Death. *Am J Roentgenol* [Internet]. 2012 Mar;198(3):723–8. Available from: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.11.7146>
 25. Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, Arumugam T, Dutta S, Klee GG, et al. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Dec;143(6):1510-1517.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960655>
 26. Souza JJS, Machado MCC, Fortes MAHZ, Giorgi RR, Cunha JEM, Jukemura J, et al. Cytokine-like fam3d gene is associated to diabetes mellitus in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* [Internet]. 2006;33(4). Available from: https://journals.lww.com/pancreasjournal/Fulltext/2006/11000/CYTOKINE_LIKE_FAM3D_GENE_IS_ASSOCIATED_TO_DIABETES.208.aspx
 27. Magruder JT, Elahi D, Andersen DK. Diabetes and pancreatic cancer: chicken or egg? *Pancreas* [Internet]. 2011 Apr;40(3):339–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412116>
 28. Hart PA, Law RJ, Frank RD, Bamlet WR, Burch PA, Petersen GM, et al. Impact of diabetes mellitus on clinical outcomes in patients undergoing surgical resection for pancreatic cancer: a retrospective, cohort study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Sep;109(9):1484–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070053>
 29. Gao W, Zhou Y, Li Q, Zhou Q, Tan L, Song Y, et al. Analysis of global gene expression profiles suggests a role of acute inflammation in type 3C diabetes mellitus caused by pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diabetologia* [Internet]. 2015 Apr;58(4):835–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-014-3481-8>
 30. Parajuli P, Nguyen TL, Prunier C, Razzaque MS, Xu K, Atfi A. Pancreatic cancer triggers diabetes through TGF- β -mediated selective depletion of islet β -cells. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2020 Jun 5;3(6):e201900573. Available from: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.201900573>
 31. Kang M, Qin W, Buya M, Dong X, Zheng W, Lu W, et al. VNN1, a potential biomarker for pancreatic cancer-associated new-onset diabetes, aggravates

- paraneoplastic islet dysfunction by increasing oxidative stress. *Cancer Lett* [Internet]. 2016 Apr;373(2):241–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383516000021>
32. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* [Internet]. 1987 Jul 5;262(19):9412–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417>
 33. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 Dec 16;10(12):1470–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb1800>
 34. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):27066. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.27066>
 35. Natasha G, Gundogan B, Tan A, Farhatnia Y, Wu W, Rajadas J, et al. Exosomes as Immunotheranostic Nanoparticles. *Clin Ther* [Internet]. 2014 Jun;36(6):820–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291814002173>
 36. Mollaei H, Safaralizadeh R, Pouladi N. A brief review of exosomes and their roles in cancer. *Meta Gene* [Internet]. 2017 Feb;11:70–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221454001630086X>
 37. Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018 Aug;51:116–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X17301669>
 38. Zheng J, Hernandez JM, Doussot A, Bojmar L, Zambirinis CP, Costa-Silva B, et al. Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with pancreatic cancer. *HPB* [Internet]. 2018 Jul;20(7):597–604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X17311978>
 39. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015 Jun 18;17(6):816–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb3169>

40. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* [Internet]. 2015 Nov 28;527(7578):329–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature15756>
41. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* [Internet]. 2012 Jun 27;18(6):883–91. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2753>
42. Rodrigues G, Hoshino A, Kenific CM, Matei IR, Steiner L, Freitas D, et al. Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019 Nov 4;21(11):1403–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41556-019-0404-4>
43. Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, Gyan KE, Cioffi M, Hernandez J, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell* [Internet]. 2020;182(4):1044-1061.e18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32795414>
44. Sagar G, Sah RP, Javeed N, Dutta SK, Smyrk TC, Lau JS, et al. Pathogenesis of pancreatic cancer exosome-induced lipolysis in adipose tissue. *Gut* [Internet]. 2016 Jul;65(7):1165–74. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-308350>
45. Jiang Z, Zhou X, Li R, Michal JJ, Zhang S, Dodson M V., et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015 Sep 28;72(18):3425–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1934-y>
46. Qadir F, Aziz MA, Sari CP, Ma H, Dai H, Wang X, et al. Transcriptome reprogramming by cancer exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation. *Mol Cancer* [Internet]. 2018 Dec 16;17(1):97. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0846-5>
47. Sah RP, Nagpal SJS, Mukhopadhyay D, Chari ST. New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Jul 26;10(7):423–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2013.49>
48. Hart PA, Chari ST. Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer. *Pancreas*

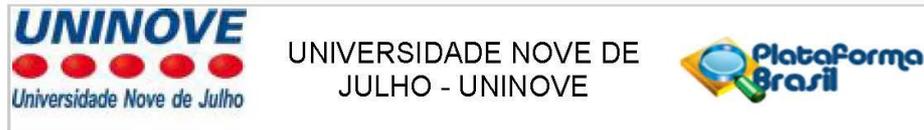
- [Internet]. 2013 Nov;42(8):1207–9. Available from: <https://journals.lww.com/00006676-201311000-00003>
49. San Lucas FA, Allenson K, Bernard V, Castillo J, Kim DU, Ellis K, et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Apr;27(4):635–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092375341935745X>
 50. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2015 Jul 24;523(7559):177–82. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14581>
 51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100132916>
 52. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000145642-SHISAL2B/pathology>
 53. Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. The α -cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018 Dec 11;14(12):694–704. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41574-018-0097-y>
 54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54986>
 55. Lebovitz CB, Robertson AG, Goya R, Jones SJ, Morin RD, Marra MA, et al. Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy* [Internet]. 2015 Sep 2;11(9):1668–87. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2015.1067362>
 56. Varghese RT, Liang Y, Guan T, Franck CT, Kelly DF, Sheng Z. Survival kinase genes present prognostic significance in glioblastoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 12;7(15):20140–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956052>
 57. Liang C, Jung JU. Autophagy genes as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2010 Apr;22(2):226–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067409001963>
 58. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26058>
 59. Liang WS, Craig DW, Carpten J, Borad MJ, Demeure MJ, Weiss GJ, et al. Genome-Wide Characterization of Pancreatic Adenocarcinoma Patients Using Next Generation Sequencing. Sarkar FH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Oct 10;7(10):e43192. Available from:

- <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043192>
60. Yang W, Yuan Q, Zhang S, Zuo M, Li T, Li J, et al. Elevated GIGYF2 expression suppresses tumor migration and enhances sensitivity to temozolomide in malignant glioma. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2021 May 31; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41417-021-00353-1>
 61. Xu C, Du Z, Ren S, Liang X, Li H. MiR-129-5p sensitization of lung cancer cells to etoposide-induced apoptosis by reducing YWHAB. *J Cancer* [Internet]. 2020;11(4):858–66. Available from: <http://www.jcancer.org/v11p0858.htm>
 62. Zhang X, Zhang Q, Zhang K, Wang F, Qiao X, Cui J. Circ SMARCA5 Inhibited Tumor Metastasis by Interacting with SND1 and Downregulating the YWHAB Gene in Cervical Cancer. *Cell Transplant* [Internet]. 30:963689720983786. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33588586>
 63. Sharma L, Lu J, Bai Y. Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Curr Med Chem* [Internet]. 2009 Apr 1;16(10):1266–77. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=10&spage=1266>
 64. Bianchi G, Martella R, Ravera S, Marini C, Capitanio S, Orengo A, et al. Fasting induces anti-Warburg effect that increases respiration but reduces ATP-synthesis to promote apoptosis in colon cancer models. *Oncotarget* [Internet]. 2015 May 20;6(14):11806–19. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3688>
 65. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* [Internet]. 2006 Aug 7;25(34):4663–74. Available from: <http://www.nature.com/articles/1209604>
 66. No Title [Internet]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198786-MT-ND5/pathology/renal+cancer>
 67. No Title [Internet]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198888-MT-ND1/pathology/pancreatic+cancer>
 68. Onda M, Akaishi J, Asaka S, Okamoto J, Miyamoto S, Mizutani K, et al. Decreased expression of haemoglobin beta (HBB) gene in anaplastic thyroid cancer and recovery of its expression inhibits cell growth. *Br J Cancer* [Internet].

- 2005 Jun 14;92(12):2216–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/6602634>
69. Maman S, Sagi-Assif O, Yuan W, Ginat R, Meshel T, Zubrilov I, et al. The Beta Subunit of Hemoglobin (HBB2/HBB) Suppresses Neuroblastoma Growth and Metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 2017 Jan 1;77(1):14–26. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-2929>
 70. Deutsch O, Haviv Y, Krief G, Keshet N, Westreich R, Stemmer SM, et al. Possible proteomic biomarkers for the detection of pancreatic cancer in oral fluids. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 15;10(1):21995. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-78922-x>
 71. Lau C, Kim Y, Chia D, Spielmann N, Eibl G, Elashoff D, et al. Role of Pancreatic Cancer-derived Exosomes in Salivary Biomarker Development. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep;288(37):26888–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820490969>
 72. Yang J, Zhang Y, Gao X, Yuan Y, Zhao J, Zhou S, et al. Plasma-Derived Exosomal ALIX as a Novel Biomarker for Diagnosis and Classification of Pancreatic Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021 May 5;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.628346/full>
 73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1773>
 74. Hawes MC, Wen F, Elquza E. Extracellular DNA: A Bridge to Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2015 Oct 15;75(20):4260–4. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-1546>
 75. Zhou Z, Cheng SH, Ding SC, Heung MMS, Xie T, Cheng THT, et al. Jagged Ends of Urinary Cell-Free DNA: Characterization and Feasibility Assessment in Bladder Cancer Detection. *Clin Chem* [Internet]. 2021 Mar 31;67(4):621–30. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/67/4/621/6144780>
 76. Kominato Y, Iida R, Nakajima T, Tajima Y, Takagi R, Makita C, et al. Hypoxia induces upregulation of the deoxyribonuclease I gene in the human pancreatic cancer cell line QGP-1. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2007 Nov;1770(11):1567–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416507001857>

ANEXOS

Anexo 1



Continuação do Parecer: 2.962.639

aumentadas em pacientes com ACP, em relação ao indivíduo saudável, os objetivos dessa pesquisa são avaliar, em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas e DM de início recente, em indivíduos com DM tipo 2 de longa duração e em indivíduos saudáveis, pareados de acordo com sexo e idade a concentração plasmática da proteína FAM3D e a expressão do mRNA do FAM3D em exossomas de soro. Serão selecionados pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas no ambulatório do Hospital Oswaldo Cruz e dos Hospitais Santa Maggiore. Todos serão submetidos à mensuração das medidas antropométricas: peso (kg) e altura (m) aferidos em balança e estadiômetro da marca Welmy; cálculo do IMC (em kg/m²) e circunferência abdominal aferida com fita métrica flexível e inelástica (cm). Exames Bioquímicos: glicemia de

jejum (mg/dL), hemoglobina glicada (%), insulina (UI/mL), cálculo do HOMA-IR (glicose [mmol/L] x insulina [U/ml] ÷ 22,5), peptídeo C (ng/mL), CA19-9 (U/mL). Serão analisados dados clínicos e patológicos colhidos retrospectivamente dos prontuários de pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas, tais como idade, sexo, estágio da doença (I a IV), sítio do tumor primário (cabeça, corpo ou cauda pancreática), tratamentos já realizados ou em andamento, data do diagnóstico, história de tabagismo, diferenciação do tumor e performance status de acordo com a escala

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). No grupo com DM serão colhidos data do diagnóstico de DM e medicações em uso.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Os objetivos dessa pesquisa são avaliar, em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas e DM de início recente, em indivíduos com DM tipo

2 de longa duração e em indivíduos saudáveis, pareados de acordo com sexo e idade: A concentração plasmática da proteína FAM3D e a expressão do mRNA do FAM3D em exossomas de soro.

Objetivo Secundário: Determinação do perfil de microRNAs no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus e eeterminar a

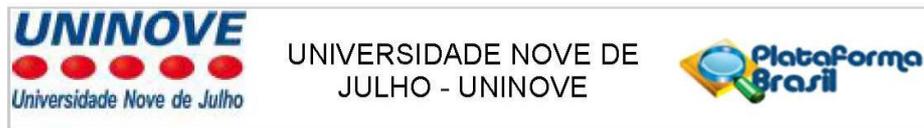
Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Há o risco de ficar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha (punção) para tirar o sangue. Alguns participantes podem sentir mal estar e até mesmo desmaiar no momento da coleta, mas o médico estará no local para qualquer situação de necessidade. Os profissionais que

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249	CEP: 01.504-001
Bairro: LIBERDADE	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3385-9010	E-mail: comitedeetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 2.962.839

farão a coleta de sangue estão preparados para as orientações da coleta, como a maneira correta de posicionar o braço e a pressão que será feita no local da picada da agulha para não ficar mancha roxa. A medida da circunferência abdominal será feita com uma fita métrica, pelo médico, no momento da consulta no ambulatório. Dessa forma, não haverá nenhum constrangimento (vergonha) além do habitual durante uma consulta médica.

Benefícios:

Aumentar o conhecimento, nos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas e diabetes mellitus tipo 2, da concentração plasmática da proteína FAM3D e a expressão do seu mRNA em exossomas de soro, do perfil de microRNAs no soro e a Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é adequada quanto aos preceitos éticos e as solicitações requeridas anteriormente pela análise deste Comitê de Ética foram atendidas (descritas no item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE teve sua linguagem ajustada para o entendimento do público leigo, conforme solicitado no parecer anterior, assim como foram explicitados os termos antes apenas citados.

A seguir, são listadas as solicitações do parecer anterior e relata-se que todas foram atendidas:

- Adequar a linguagem do TCLE para melhor entendimento do leigo - ATENDIDO
- Incluir informações importantes no TCLE como "consentimento pós informação", atualizar endereço do CEP e horário de funcionamento e incluir métodos alternativos existentes (se for o caso), Explicitar todos os riscos da pesquisa como por exemplo desmaio ao coletar sangue e constrangimento ao realizar as medidas da circunferência abdominal e suas respectivas medidas protetivas - ATENDIDO
- Incluir no TCLE, nos procedimentos da fase experimental, que serão coletados dados de prontuário médico - ATENDIDO
- Ajustar o cronograma - ATENDIDO

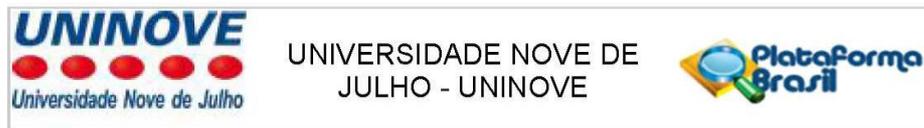
Recomendações:

Foi sugerido e atendido que o TCLE deveria ser escrito como um convite ao participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado.

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249	CEP: 01.504-001
Bairro: LIBERDADE	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3385-9010	E-mail: comitedeetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 2.962.839

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados.

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

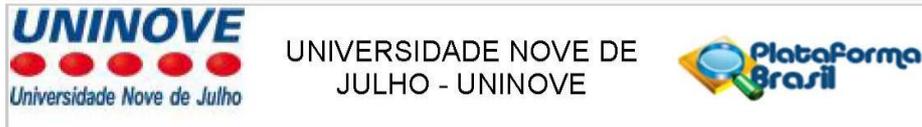
Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f).

De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1145766.pdf	01/10/2018 00:18:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_02.docx	01/10/2018 00:17:15	José Antônio Januário Neves	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Detalhado_02.docx	01/10/2018	José Antônio	Aceito

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249
Bairro: LIBERDADE **CEP:** 01.504-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 2.962.839

/ Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_02.docx	00:16:47	Januário Neves	Aceito
Cronograma	Cronograma_02.docx	01/10/2018 00:15:11	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_PREVENT_SENIO R_Hospitais_Santa_Maggiore.pdf	15/06/2018 17:11:24	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HOSPITAL_ALEM AO_OSWALDO_CRUZ.pdf	15/06/2018 17:07:31	José Antônio Januário Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_CONFIDENCIALID ADE_ASSINADA.pdf	15/06/2018 16:49:57	José Antônio Januário Neves	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_PB_01.docx	15/06/2018 16:19:27	José Antônio Januário Neves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto_Assinada.pdf	15/06/2018 16:18:51	José Antônio Januário Neves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Outubro de 2018

Assinado por:
CHRISTIANE PAVANI
(Coordenador(a))

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249
Bairro: LIBERDADE **CEP:** 01.504-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br

Anexo 2

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da proteína FAM3D no plasma e de seu mRNA em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas, Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus e Determinação do perfil de microRNAs no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus.

Pesquisador: José Antônio Januário Neves

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 93908318.0.3001.0070

Instituição Proponente: HOSPITAL ALEMAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.323.054

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa para o desenvolvimento de Tese de Doutorado: Determinação da proteína FAM3D no plasma e de seu mRNA em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas, Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus e Determinação do perfil de microRNAs no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus.

Serão selecionados 126 pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas nos ambulatórios do Hospital Oswaldo Cruz e dos Hospitais Santa Maggiore.

Todos serão submetidos à mensuração das medidas antropométricas e a exames bioquímicos. Serão analisados dados clínicos e patológicos colhidos retrospectivamente dos prontuários de pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas, tais como idade, sexo, estágio da doença (I a IV), sítio do tumor primário (cabeça, corpo ou cauda pancreática), tratamentos já realizados ou em andamento, data do diagnóstico, história de tabagismo, diferenciação do tumor e performance status de acordo com a escala Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). No grupo com DM serão colhidos data do diagnóstico de DM e medicações em uso. Determinação da proteína FAM3D

Endereço: Rua João Julião, 331

Bairro: Paraíso

CEP: 01.323-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3549-0863

Fax: (11)3549-0862

E-mail: cep@haoc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP



Continuação do Parecer: 3.323.054

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a hipótese de que as concentrações plasmáticas de FAM3D apresentam-se aumentadas em pacientes com Adenocarcinoma de Pâncreas, em relação ao indivíduo saudável.

Os objetivos dessa pesquisa são avaliar, em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas e DM de início recente, em indivíduos com DM tipo 2 de longa duração e em indivíduos saudáveis, pareados de acordo com sexo e idade:

1. A concentração plasmática da proteína FAM3D e
2. A expressão do mRNA do FAM3D em exossomas de soro.
3. Avaliar se os miRNAs miR-483-5p, miR-19a, miR-29a, miR-20a, miR-24 e miR-25 estão mais expressos.
4. A expressão do mRNA do CTLR4, do PD1 e do IDO em exossomas de soro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Há o risco de hematoma (mancha roxa) no local da punção (picada da agulha) para a coleta de sangue.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos para os participantes dessa pesquisa. O único benefício é aumentar o conhecimento sobre o câncer de pâncreas e o diabetes mellitus e, possivelmente, descobrir mais cedo quem tem câncer de Pâncreas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente e de fácil realização, pois consiste apenas em coleta de dados de exames físico, coleta única de exames de sangue e de revisão de prontuários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Enviados orçamento dados da fonte pagadora, onde constam: a. Financiamento próprio: R\$4.000,00. b. FAPESP: R\$6.000,00. Número do Processo 2018/20966-0.

Apresentado como comprovante desse processo, apenas , um Certificado de Recebimento de proposta, datado de 08/10/2018, que se refere à pesquisa: "Fatores Genômicos e Epigenéticos Associados à Resolução do Diabetes após Derivação Gástrica em Y-Roux e à Patogênese do Diabetes Secundário ao Adenocarcinoma Ductal de Pâncreas." em nome da orientadora.

Desta feita, o pesquisador responde com o seguinte texto:

"O Processo de pedido de financiamento FAPESP, número 2018/20966-0, ainda não foi concluído, até a presente data. (...)

Solicito a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) a aprovação deste com base nos seguintes pontos e compromissos:

Endereço: Rua João Julião, 331	CEP: 01.323-903
Bairro: Paraíso	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0863	Fax: (11)3549-0862 E-mail: cep@haoc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP



Continuação do Parecer: 3.323.054

- a) Este projeto não possui nenhum financiamento da indústria farmacêutica e ou laboratórios com interesses comerciais;
- b) A fase de análise do processo de financiamento pela FAPESP não impede a aprovação de projetos pelo CEP;
- c) Para aprovação do financiamento, a FAPESP pode solicitar a aprovação do projeto pelo CEP, como já nos foi informado por outros pesquisadores;
- d) Se, por ventura, o financiamento do projeto pela FAPESP for negado, nossa equipe se compromete em financiar todos os custos, em virtude do mesmo ser o trabalho de pesquisa para o curso de Doutorado de três pós-graduandos. O financiamento próprio não é uma irregularidade para o CEP;
- e) Todas as outras solicitações do CEP foram prontamente atendidas, esta, porém, depende exclusivamente dos trâmites do processo de financiamento pela FAPESP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Segue sem a aprovação do financiamento pela FAPESP, mas o pesquisador se compromete a arcar com todos os custos do projeto caso não venha a ocorrer.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1239525.pdf	11/04/2019 20:09:34		Aceito
Orçamento	Fianciamento_02.pdf	11/04/2019 20:04:16	José Antônio Januário Neves	Aceito
Orçamento	FAPESP_Comprovante_01.pdf	31/01/2019 23:13:27	José Antônio Januário Neves	Aceito
Orçamento	Fianciamento_01.pdf	31/01/2019 23:12:57	José Antônio Januário Neves	Aceito
Orçamento	Fianciamento_01.docx	31/01/2019 23:12:37	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_04.pdf	31/01/2019 23:11:26	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_04.docx	31/01/2019 23:11:01	José Antônio Januário Neves	Aceito

Endereço: Rua João Julião, 331
Bairro: Paraíso **CEP:** 01.323-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0863 **Fax:** (11)3549-0862 **E-mail:** cep@haoc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP



Continuação do Parecer: 3.323.054

Outros	Carta_de_Anuencia_HOSPITAL_ALEM AO_OSWALDO_CRUZ_02.pdf	21/12/2018 00:22:55	José Antônio Januário Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_02.pdf	21/12/2018 00:21:02	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_03.pdf	21/12/2018 00:18:12	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Fianciamento_Pendencias_HAOC_01.p df	21/12/2018 00:16:34	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Fianciamento_Pendencias_HAOC_01.d ocx	14/12/2018 14:53:53	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_PREVENT_SENIO R_02.pdf	14/12/2018 01:08:07	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_03.docx	14/12/2018 01:04:42	José Antônio Januário Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Compromisso.pdf	14/12/2018 01:03:41	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_02.docx	01/10/2018 00:17:15	José Antônio Januário Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_02.docx	01/10/2018 00:16:47	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_PREVENT_SENIO R_Hospitais_Santa_Maggiore.pdf	15/06/2018 17:11:24	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HOSPITAL_ALEM AO_OSWALDO_CRUZ.pdf	15/06/2018 17:07:31	José Antônio Januário Neves	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_PB_01.docx	15/06/2018 16:19:27	José Antônio Januário Neves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua João Julião, 331
Bairro: Paraíso **CEP:** 01.323-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0863 **Fax:** (11)3549-0862 **E-mail:** cep@haoc.com.br

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO
CRUZ - SP



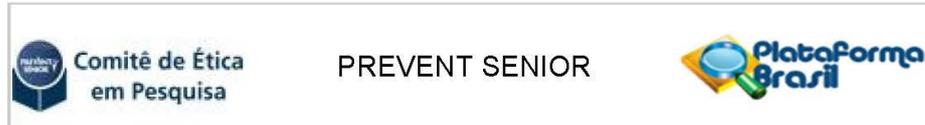
Continuação do Parecer: 3.323.054

SAO PAULO, 13 de Maio de 2019

Assinado por:
Edmir Felix da Silva Junior
(Coordenador(a))

Endereço: Rua João Julião, 331
Bairro: Paraíso **CEP:** 01.323-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3549-0863 **Fax:** (11)3549-0862 **E-mail:** cep@haoc.com.br

Anexo 3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da proteína FAM3D no plasma e de seu mRNA em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas, Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus e Determinação do perfil de microRNAs no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus.

Pesquisador: José Antônio Januário Neves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 93908318.0.3002.8114

Instituição Proponente: PREVENT SENIOR PRIVATE OPERADORA DE SAUDE LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.111.704

Apresentação do Projeto:

Projeto bem detalhado, com boa estruturação teórica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo adequado com metodologia de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos, sendo o benefício na forma de conhecimento do assunto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa usa métodos avançados para conhecimento da doença.

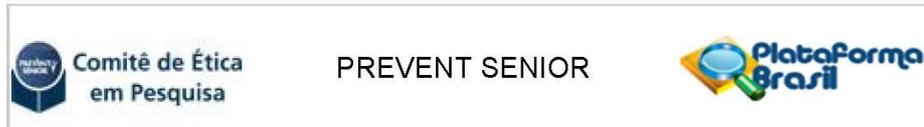
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo adequado, com recomendação de explicitação de quem irá acessar os dados do prontuário caso não seja um médico, e espaço para rubrica de pesquisador e participante em cada página.

Recomendações:

Recomenda-se maior detalhamento do processo de descarte de materiais coletados após uso no estudo, levando em consideração as leis de descarte de material biológico.

Endereço: Rua Alvorada 1355 Térreo
Bairro: VILA OLIMPIA **CEP:** 04.550-004
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)4085-9070 **E-mail:** cepps@preventsenior.com.br



Continuação do Parecer: 3.111.704

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1239526.pdf	14/12/2018 14:47:31		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Compromisso.pdf	14/12/2018 14:37:24	José Antônio Januário Neves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Compromisso_Amostras.pdf	14/12/2018 14:35:48	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_PREVENT_SENIOR_02.pdf	14/12/2018 00:33:44	José Antônio Januário Neves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_Local_Pesquisa.pdf	14/12/2018 00:24:15	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_03.docx	14/12/2018 00:22:34	José Antônio Januário Neves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_02.docx	01/10/2018 00:17:15	José Antônio Januário Neves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_02.docx	01/10/2018 00:16:47	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_PREVENT_SENIOR_Hospitais_Santa_Maggiore.pdf	15/06/2018 17:11:24	José Antônio Januário Neves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HOSPITAL_ALEMAO_OSWALDO_CRUZ.pdf	15/06/2018 17:07:31	José Antônio Januário Neves	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_PB_01.docx	15/06/2018 16:19:27	José Antônio Januário Neves	Aceito

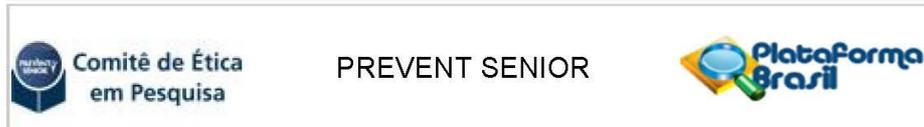
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Alvorada 1355 Térreo
Bairro: VILA OLIMPIA **CEP:** 04.550-004
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)4085-9070 **E-mail:** cepps@preventsenior.com.br



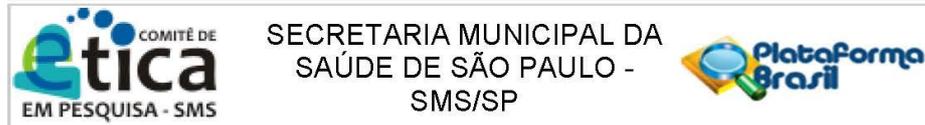
Continuação do Parecer: 3.111.704

SAO PAULO, 14 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Alexandra Paola Zandonai
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Alvorada 1355 Térreo
Bairro: VILA OLIMPIA **CEP:** 04.550-004
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)4085-9070 **E-mail:** cepps@preventsenior.com.br

Anexo 4



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA FERRAMENTA DIGITAL EM CUIDADOS E PREVENÇÃO DO PÉ DE RISCO EM PACIENTES COM DIABETES

Pesquisador: Mozania Reis de Matos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 81249417.1.3001.0086

Instituição Proponente: SECRETARIA MUNICIPAL DA SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.141.417

Apresentação do Projeto:

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto já aprovado por este CEP.

Trata esta relatoria da avaliação ética da seguinte emenda:

“Gostaríamos de acrescentar ao desenho do estudo, a realização da análise diagnóstica para Neuropatia Autonômica Cardiovascular. Os pacientes serão submetidos a realização de eletrocardiograma, teste de respiração profunda, teste de Valsalva e teste ortostático.

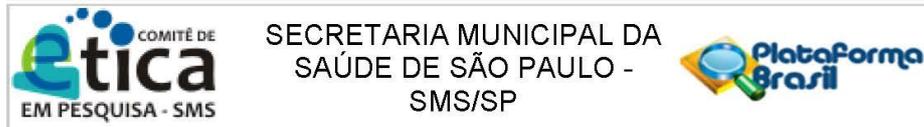
Foi acrescentando ao termo de consentimento, o risco de constrangimento ao ter que retirar a camisa para realização do eletrocardiograma, o risco de tontura após realização do teste de respiração profunda e teste de Valsalva e risco de queda ao realizar o teste ortostático. “

Retificar o texto do TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Folha de Rosto está corretamente preenchida, foram identificadas instituição proponente e

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar	CEP: 01.223-010
Bairro: Vila Buarque	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464	E-mail: smscep@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.141.417

coparticipante, autorização para realização da pesquisa foi adequadamente apresentada. TCLE, Cronograma, fonte financiadora e orçamento detalhado estão adequados.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

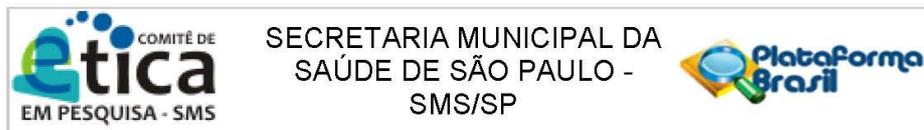
Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

De acordo com a Res. CNS 466/12, o pesquisador deve apresentar os relatórios parciais e final através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1268642.pdf	31/12/2018 10:15:08		Aceito
Outros	apontamentos_correcoes_tcle_cep_sms.docx	31/12/2018 10:14:31	Mozania Reis de Matos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_corriguido_31_dezembro_2018_cep_sms.docx	31/12/2018 09:58:17	Mozania Reis de Matos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	11/09/2018 00:36:58	Mozania Reis de Matos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	tcle.docx	11/09/2018 00:35:32	Mozania Reis de Matos	Aceito

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar
Bairro: Vila Buarque **CEP:** 01.223-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464 **E-mail:** smscep@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.141.417

Justificativa de Ausência	tcle.docx	11/09/2018 00:35:32	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	ciencia.pdf	09/06/2018 12:48:10	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	Ementa.docx	09/06/2018 12:40:38	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	23/11/2017 15:33:43	Mozania Reis de Matos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador(a))

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar
Bairro: Vila Buarque
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464 **CEP:** 01.223-010
E-mail: smscep@gmail.com

Anexo 5

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
UNINOVE
DOUTORADO EM MEDICINA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TCLE - Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do participante: _____
 Endereço: _____
 Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____
 E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental:

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa "Determinação da proteína FAM3D no plasma e de seu mRNA em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas, Expressão de genes relacionados à imunidade em exossomas de soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus e Determinação do perfil de microRNAs no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas com diabetes mellitus".

2. Objetivo:

O objetivo desse projeto será o de medir a quantidade da proteína FAM3D e de seu RNA, do RNA de outros genes relacionados à imunidade e de microRNAs no sangue de participantes com Adenocarcinoma (Câncer) de Pâncreas com diabetes mellitus. RNA e microRNA são tipos de materiais genéticos usados para descobrir ou entender as doenças e outras pesquisas em medicina. Esse resultado, se for confirmado, poderá ser um exame para descobrir o câncer de pâncreas mais cedo, e com mais possibilidades de um tratamento melhor.

3. Justificativa:

Caso se confirme uma quantidade aumentada dessas substâncias no sangue dos participantes com câncer de pâncreas, eles poderão ser usados como exames deste tipo de câncer, permitindo a sua descoberta mais cedo, em uma hora em que ainda há uma possibilidade de cura.

4. Procedimentos da Fase Experimental:

O exame físico dos participantes (pressão arterial, altura, peso, medida da circunferência abdominal, remédios que estão tomando, e outras informações importantes) será anotado uma vez, no momento da primeira consulta, no ambulatório dos Hospitais participantes desta pesquisa. As informações importantes do prontuário médico também serão anotadas.

Exames de laboratório: todos os participantes vão tirar sangue para exames, por um profissional de enfermagem ou de análises clínicas. Uma parte do sangue colhido será usada para os exames de rotina (glicemia de jejum, hemoglobina glicada, peptídeo C e insulina). Outra parte que foi colhida será reservada para as dosagens do FAM3D, dos RNAs e dos microRNAs que serão estudados (estudos de genética). O tempo gasto para a coleta de sangue será entre 5 e 10 minutos, em média.

 Rubrica do Participante

 Rubrica do Pesquisador Responsável

5. Desconforto ou Riscos Esperados:

Há o risco de hematoma (mancha roxa) no local da punção (picada da agulha) para a coleta de sangue. Alguns participantes podem sentir mal-estar e até mesmo desmaiar no momento da coleta, mas o médico estará no local para qualquer situação de necessidade. Os profissionais que farão a coleta de sangue estão preparados para as orientações da coleta, como a maneira correta de posicionar o braço e a pressão que será feita no local da picada da agulha para não ficar mancha roxa. A medida da circunferência abdominal será feita com uma fita métrica, pelo médico, no momento da consulta no ambulatório. Dessa forma, não haverá nenhum constrangimento (vergonha) além do habitual durante uma consulta médica.

6. Benefícios da Pesquisa:

Não haverá benefícios diretos para os participantes dessa pesquisa. O único benefício é aumentar o conhecimento sobre o câncer de pâncreas e o diabetes mellitus e, possivelmente, descobrir mais cedo quem tem câncer de Pâncreas, ajudando os futuros pacientes a terem um tratamento mais cedo e com mais chances de sucesso.

7. Retirada do Consentimento:

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

8. Garantia do Sigilo:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de ninguém. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

9. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa:

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10. Local da Pesquisa:

Será desenvolvida na Universidade Nove de Julho – UNINOVE, unidade Vergueiro.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado Interdisciplinar e Independente, que deve existir nas Instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS no 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da UNINOVE: Rua Vergueiro no 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP.: 01504-001 Fone: (11) 3385-9010 E-mail: comitedeetica@uninove.br

Horários de atendimento do Comitê de Ética: segunda-feira a sexta-feira – das 11h30 às 13h00 e das 15h30 às 19h00

Endereço do Comitê de Ética do Hospital Alemão Oswaldo Cruz: Rua João Julião, 331 - Paraisópolis – Bloco B – 5º andar – São Paulo/SP. Contato: 11 35490862 – E-mail: CEP@haoc.com.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Alunos) para Contato: Orientadora Profa. Dra. Marta Lucia C. C. Giannella e Doutorandos José Antônio Januário Neves, Renata D'Alpino Peixoto e Carlos Del Cistia Donnarumma. A quem os participantes da pesquisa poderão contatar e consultar a qualquer momento que julgar necessário através dos telefones 11 96057-0099, 11 97258-4321 e 11 98119-2747 ou e-mails: joseajneves@gmail.com, renatadalpino@gmail.com e carlos.cistia@preventsenor.com.br.

 Rubrica do Participante

 Rubrica do Pesquisador Responsável

13. Eventuais intercomências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

14. Consentimento Pós-Infomação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de infomação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirio que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo somente no meio científico.

Assinatura do Participante

16. Eu, Profa. Dra. Maria Lucia C. C. Glannella, Pesquisadora responsável desta pesquisa, certifico que:

- a) Considerando que a ética em pesquisa implica o respeito pela dignidade humana e a proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos;
- b) Este estudo tem mérito científico e a equipe de profissionais devidamente citados neste termo é treinada, capacitada e competente para executar os procedimentos descritos neste termo;
- c) A resolução CNS no 466/12 dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais, cujo procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes.

Profa. Dra. Maria Lucia C. C. Glannella
Assinatura do Pesquisador Responsável

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Rubrica do Participante

Rubrica do Pesquisador Responsável

APÊNDICE

ARTIGOS CIENTIFICO

SUBMETIDO NO PERÍODICO: