## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

## LUÍS BRUNO DA CRUZ E ALVES DE MORAES

# Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890 O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 06/08/2018

## LUÍS BRUNO DA CRUZ E ALVES DE MORAES

# Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis

À memória de meus avós, Leoncio e Maria, Alfredo e Julia.

#### AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas e instituições contribuem para tornar possível a realização de um trabalho como esse. O coração nem sabe como agradecer.

À minha família, por estar ao meu lado para alcançar mais este objetivo. Aos meus pais, por sua constante luta pelo meu crescimento. Obrigado pela imensa paciência e compreensão. Finalmente estou terminando a escola!

Ao Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, pela confiança em mim depositada ao me conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e desenvolver este projeto de pesquisa. Agradeço por sua orientação, incentivo e apoio para a elaboração da tese e revisão final do texto. Serei sempre grato por essa porta aberta!

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela oportunidade oferecida para o meu aprimoramento científico e intelectual.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de doutorado e todo o apoio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de doutorado.

Aos Drs. José Jukemura e Marcel Machado, pela parceria e cooperação no projeto, fornecendo as preciosas amostras para os xenotransplantes.

Ao Dr. Christopher Vakoc, por compartilhar conosco sua biblioteca de shRNAs e nos possibilitar a exploração de um novo caminho na pesquisa científica.

Aos professores Sergio Verjovski, Daniela Bassères e Deborah Schechtman, por compartilhar sua experiência científica durante o período em que estivemos juntos no laboratório, especialmente pelas críticas e sugestões apresentadas em nossas reuniões. Agradeço-os, sobretudo, pela enriquecedora experiência de trabalhar e aprender ao lado de seus alunos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, por compartilhar experiências e conhecimento de alto nível.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, pela colaboração ao longo de todo o período do curso.

Aos funcionários do Biotério de Produção e Experimentação, pelo apoio no fornecimento e cuidado com os animais que utilizamos.

A Ildefonso Júnior, pela imprescindível assistência nas análises de citometria.

A Kenneth Chang, pelo sequenciamento e análise de nossa biblioteca de shRNAs.

À caríssima Bianca Dazzani, sempre tão solícita e pronta a ajudar, tenho muito que agradecer por seu inestimável apoio. Sua presença no laboratório facilita enormemente o trabalho de todos nós. Não existem palavras para expressar minha gratidão!

Aos meus colegas do laboratório, Arthur, Diogo Pellegrina, Diogo Pessoa, Ester, Julio e Vinícius, com os quais tanto tenho aprendido. Vocês estarão sempre em minhas boas recordações, especialmente por tornar os dias no laboratório mais leves e divertidos.

Enfim, sinceramente agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos!

"If you're going to try, go all the way. Otherwise, don't even start. If you're are going to try, go all the way."

Charles Bukowski

#### RESUMO

Moraes, L.B.C.A. **Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico**. 2018. 174 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), o tipo mais prevalente de câncer do pâncreas, é uma neoplasia extremamente agressiva e com elevado índice de letalidade. Há uma necessidade premente de identificação de vulnerabilidades no PDAC que possam ser exploradas como alvos terapêuticos, e a utilização de modelos pré-clínicos que recapitulem a complexidade biológica e heterogeneidade clínica da doença é um aspecto central para a realização dessa tarefa. Os xenotransplantes de tecido tumoral derivado de pacientes (PDX, patient-derived tumor tissue xenografts), realizados em camundongos imunodeficientes, replicam com grande similaridade as principais características do tumor original e, assim, constituem uma ferramenta valiosa para o teste de drogas e estudos funcionais. Neste trabalho, 17 amostras cirúrgicas de PDAC humano foram implantadas subcutaneamente em camundongos nude atímicos. Sete tumores (41%) foram enxertados com sucesso e têm sido mantidos em sucessivas gerações de animais receptores. O exame histológico de seis desses xenoenxertos identificou características morfológicas compatíveis com os padrões reconhecidos no PDAC humano, assim como uma consistente similaridade de seu status de diferenciação histológica em relação aos perfis verificados nos tumores

originais. O cultivo in vitro de células derivadas de um dos xenotumores resultou em uma nova linhagem de câncer de pâncreas, com morfologia e cinética de crescimento comparáveis às de outras linhagens celulares de câncer pancreático. O potencial tumorigênico dessa nova linhagem foi validado in vivo, com uma consistente formação de tumores após inoculação em camundongos nude. A fim de aproveitar esse recurso para a investigação de potenciais alvos terapêuticos no PDAC, um rastreamento de vulnerabilidades moleculares foi realizado por meio de silenciamento gênico em larga-escala com RNA de interferência (RNAi). Uma biblioteca lentiviral de 4492 shRNAs (short hairpin RNAs), alvejando cerca de 350 genes envolvidos na regulação epigenética, foi empregada para a triagem de genes de suscetibilidade nas células derivadas de PDX, e em outras cinco linhagens tumorais pancreáticas (AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2 e PANC-1). Inicialmente, foi realizada uma série de experimentos preliminares, visando à amplificação e controle de qualidade da biblioteca de silenciamento, à produção de vetores lentivirais e à padronização das condições experimentais para a transdução e seleção das células-alvo. Apenas três das linhagens avaliadas (AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1) mostraram-se permissíveis à transdução pelos vetores lentivirais, e foram assim utilizadas no screening de alvos epigenéticos. A análise dos dados obtidos nesse ensaio está em curso e os resultados serão utilizados para a definição de potenciais alvos candidatos. Em conclusão, recursos valiosos para apoiar a pesquisa sobre o câncer de pâncreas foram desenvolvidos. A coleção de PDXs estabelecida, bem como a linhagem celular recém-derivada, constituem uma fonte permanente e estável de células de PDAC para análises moleculares e estudos funcionais que busquem elucidar aspectos da doença ainda pouco compreendidos. Adicionalmente, os reagentes gerados e a expertise adquirida com os ensaios

realizados com a biblioteca de shRNAs contra alvos epigenéticos serão de grande utilidade em futuras investigações para identificar genes com funções importantes na manutenção do fenótipo tumoral, e consequentemente com potencial para serem explorados terapeuticamente.

Palavras-chave: Câncer de pâncreas. Xenoenxerto. Linhagem celular tumoral. Epigenética. RNA de interferência. shRNA

#### ABSTRACT

Moraes L.B.C.A. Establishment of xenografts from human pancreatic tumors for genetic screening of molecular targets with therapeutic potential. 2018. 174 p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most prevalent type of pancreatic cancer, is a highly aggressive and lethal neoplasm. There is a pressing need to identify vulnerabilities in PDAC suited to be exploited as therapeutic targets, and the use of preclinical models recapitulating the biological complexity and clinical heterogeneity of the disease is central to this task. Patient-derived tumor tissue xenografts (PDX), established in immunodeficient mice, replicate with great similarity the main characteristics of the original tumor and thus constitute a valuable tool for drug testing and functional studies. In this work, 17 surgical samples of human PDAC were implanted subcutaneously in athymic nude mice. Seven tumors (41%) were successfully grafted and have been maintained through successive generations of recipient animals. Histological examination of six of these xenografts identified morphological characteristics compatible with the recognized patterns of human PDAC, as well as a consistent similarity of their histological differentiation status in relation to the profiles verified in the original tumors. In vitro culture of cells derived from one of these xenografts resulted in a new pancreatic cancer cell line, with morphology and growth kinetics comparable to those of other pancreatic tumor cells. The tumorigenic potential of this freshly derived cell line was validated in vivo, with a consistent tumor formation following inoculation into nude mice. To take advantage of this resource to investigate potential therapeutic targets in PDAC, a screening of molecular vulnerabilities was performed through large-scale gene silencing with RNA interference (RNAi). A lentiviral library containing 4492 short hairpin RNAs (shRNAs), targeting about 350 genes involved in epigenetic regulation, was employed for the search of susceptibility genes in the PDX-derived cells and in other five pancreatic tumor cell lines (AsPC-1, BxPC -3, Capan-1, MIA PaCa-2 and PANC-1). Initially, a series of preliminary experiments were carried out aiming at the amplification and quality control of the silencing library, production of lentiviral vectors and adjustment of the experimental conditions for transduction and selection of the target cells. Only three of the cell lines evaluated (AsPC-1, MIA PaCa-2 and PANC-1) were permissible for transduction by the lentiviral vectors, and were accordingly used in the screening of epigenetic targets. The analysis of data obtained in this trial is ongoing and the results will be used for definition of potential candidate targets. In conclusion, valuable resources to support research on pancreatic cancer have been developed. The established collection of PDXs as well as the newly derived cell line constitutes a permanent and stable source of PDAC cells for molecular analyzes and functional studies seeking to elucidate aspects of this disease that are still poorly understood. Additionally, both the reagents generated and the expertise gained from the RNAi assay against epigenetic targets will have inordinate usefulness in future investigations to identify genes with major functions in maintaining the malignant phenotype, and consequently with the potential to be exploited therapeutically.

**Keywords:** Pancreatic cancer. Xenograft. Cancer cell line. Epigenetics. RNA interference. shRNA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia do pâncreas29
Figura 2 – Estatística global do câncer pancreático
Figura 3 – Alterações histológicas e moleculares no PDAC
Figura 4 – Estabelecimento e aplicações dos PDXs43
Figura 5 – Mecanismos de regulação epigenética49
Figura 6 – Vias moleculares dos mecanismos de RNA de interferência54
Figura 7 – Cassete de expressão do vetor pLMN68
Figura 8 – Etapas experimentais para a pesquisa de alvos moleculares com RNAi.69
Figura 9 – Estratégia experimental para a triagem de alvos epigenéticos com a
biblioteca lentiviral de shRNAs81
Figura 10 – Sequência temporal das etapas do ensaio de silenciamento85
Figura 11 – Perfil clínico e demográfico das amostras de PDAC90
Figura 12 – Caracterização histológica dos PDXs92
Figura 13 – Culturas celulares derivadas dos PDXs94
Figura 14 – Linhagem celular de câncer pancreático estabelecida a partir de um PDX
Figura 15 – Teste de contaminação cruzada95
Figura 16 – Teste de contaminação por micoplasma96
Figura 17 – Cinética de crescimento da linhagem celular derivada de PDX97
Figura 18 – Teste de tumorigênese98
Figura 19 – Histologia de tumor gerado pelas células derivadas de PDX99
Figura 20 – Digestão endonucleolítica dos plasmídeos da biblioteca de shRNAs 100

Figura 21 - Geração de biblioteca de amplicons de shRNAs para análise por
sequenciamento101
Figura 22 – Abundância dos shRNAs nas bibliotecas original e amplificada103
Figura 23 – Distribuição dos genes-alvo em função do número de shRNAs/gene em
diferentes faixas de detecção na biblioteca amplificada106
Figura 24 – Eficiência de transdução da biblioteca lentiviral de shRNAs109
Figura 25 – Purificação das sequências de shRNAs recuperadas do genoma das
células submetidas à triagem de alvos epigenéticos112

### LISTA DE TABELAS

Quadro 1 – Iniciadores para sequenciamento na plataforma Illumina73
Tabela 1 – Probabilidades para diferentes números de eventos de integração
(distribuição de Poisson)77
Quadro 2 – Linhagens celulares de PDAC77
Tabela 2 – Diluição viral para o teste de eficiência de transdução78
Tabela 3 – Diluição do meio de infecção para as linhagens tumorais pancreáticas82
Quadro 3 – Iniciadores para sequenciamento na plataforma Illumina
Quadro 4 – Amostras de PDAC coletadas para a geração de PDXs90
Tabela 4 – Taxas de sucesso (%) para cada PDX nas sucessivas gerações de
animais receptores91
Tabela 5 – Comparação entre a histologia dos PDXs e a dos tumores originais92
Tabela 6 – Distribuição dos shRNAs em função do número de <i>reads</i> detectados103
Tabela 7 – Sobreposição e exclusividade dos shRNAs em diferentes faixas de
detecção103
Tabela 8 – Número de <i>reads</i> para shRNAs controle104
Tabela 9 – Número de shRNAs e genes correspondentes alvejados pela biblioteca
amplificada105
Tabela 10 – Parâmetros para a infecção das células de PDAC com a biblioteca
lentiviral110
Tabela 11 – Dosagem de Geneticina para a seleção das células transduzidas111

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA	16S ribosomal RNA
3' LTR	3' long terminal repeat
3'-UTR	3'-untranslated region
5' LTR	5' long terminal repeat
5'-UTR	5'-untranslated region
Ac	acetil
AGO2	Argonaute 2
Amp <sup>R</sup>	ampicillin resistance gene
AsPC-1	linhagem celular de câncer pancreático
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosine triphosphate
BALB/c	Bagg albino/color locus c/c
Bg/II	Bacillus globigii II
BRCA2	breast cancer 2
Brd4	bromodomain-containing protein 4
BRG1	brahma-related gene 1
BRM	brahma
BxPC-3	linhagem celular de câncer pancreático
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CA	California
CA9	carbonic anhydrase 9
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Capan-1	linhagem celular de câncer pancreático

CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDX	cell line-derived tumor xenograft
CEA	carcinoembryonic antigen
CEPesq	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CHK1	checkpoint kinase 1
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CpG	cytosine-phosphate-guanine
CSHL	Cold Spring Harbor Laboratory
DE	Delaware
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
dNTP	deoxyribose nucleoside triphosphate
DPC4	deleted in pancreatic carcinoma locus 4
DS	densidade de saturação
dsRNA	double-stranded RNA
E. coli	Escherichia coli
ECT2	epithelial cell-transforming 2
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	epidermal growth factor
EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements

env	envelope
F1	primeira geração de PDX (seguida por F2, F3, F4, etc.)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOLFIRINOX	ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatina
G418	Geneticin
gag	group-specific antigen
gDNA	genomic DNA
GEMM	genetically engineered mouse model
GENCODE	catálogo de genes do projeto ENCODE
H&E	hematoxilina e eosina
HAT	histone acetyltransferase
HCI	ácido clorídrico
HDAC	histone deacetylase
HDM	histone methyltransferase
HEK 293T	human embryonic kidney 293 cell line with SV40 large T antigen
Hmbs	hydroxymethylbilane synthase
HMT	histone demethylase
HPDE	human pancreatic duct epithelial cell line
IARC	International Agency for Research on Cancer
ll2rg	interleukin 2 receptor subunit gamma
INK4	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4
IPMN	intraductal papillary mucinous neoplasm
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
IRES	internal ribosomal entry site
К	lisina

KLF5	Kruppel-like transcription factor 5	
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	
LB	lysogeny broth (Luria-Bertani medium)	
MA	Massachusetts	
MBD	methyl-CpG-binding domain protein	
MCN	mucinous cystic neoplasm	
Ме	metil	
Me-CpG	5-methylcytosine at CpG site	
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio	
MIA PaCa-2	linhagem celular de câncer pancreático	
miR-30	microRNA-30	
МО	Missouri	
MOI	multiplicity of infection	
mRNA	messenger RNA	
MSCV	murine stem cell virus	
mut	mutated	
ND	não disponível	
Ndel	Neisseria denitrificans I	
Neo <sup>R</sup>	neomycin resistance gene	
NGS	next generation sequencing	
NH <sub>4</sub>	amônio	
NHP2L1	non-histone chromosome protein 2-like 1	
NJ	New Jersey	
NOD	non-obese diabetic	
NOG	NOD/SCID gamma mouse	

NSG	NOD/SCID gamma mouse
NTC	no template control
N-terminal	extermidade amino-terminal de cadeia polipeptídica
NUP153	nucleoporin 153
NY	New York
P16	protein p16 <sup>INK4a</sup>
P5	adaptador para sequenciamento na plataforma Illumina
P7	adaptador para sequenciamento na plataforma Illumina
PA	Pennsylvania
PANC-1	linhagem celular de câncer pancreático
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PanNET	pancreatic neuroendocrine tumor
P-body	processing body
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDX	patient-derived tumor tissue xenograft
PEI	polietilenimina
PF	população final
PGKpro	phosphoglycerate kinase promoter
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
PI	população inicial
pLMN	shRNAmir expressing- MSCV-based retroviral vector
Pol II	RNA polymerase II
pol	polymerase

PP	pancreatic polypeptide
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
Q30	Phred quality score para acurácia de 99,9% em sequenciamento
RAD17	RAD17 checkpoint clamp loader component
Rag1	recombination activating gene 1
Rag2	recombination activating gene 2
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	ribonuclease
RPL7	60S ribosomal protein L7
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium 1640
RPS3A	40S ribosomal protein S3A
rRNA	ribosomal RNA
SC	soro de cavalo
SCID	severe combined immunodeficiency
SFB	soro fetal bovino
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SNP	single nucleotide polymorphism
SOC	super optimal broth (SOB) with catabolite repression
SP	São Paulo
sp.	espécie

SPF	specific pathogen-free
STC	small trabecular complex
STK11	serine/threonine kinase 11
STR	short tandem repeat
SV40	simian vacuolating virus 40
SWI/SNF	switch/sucrose non-fermentable
Т0	tempo 0
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TD	tempo de dobramento
TE	tampão Tris-EDTA
TP53	tumor protein p53
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSS	transcription start site
TUBA1C	tubulin alpha 1c
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
UK	United Kingdom
USA	United States of America
VA	Virginia
VSV-G	vesicular stomatitis virus G glycoprotein
WDR5	WD repeat-containing protein 5
WI	Wisconsin
ZsGreen	Zoanthus sp. green fluorescent protein

### LISTA DE SÍMBOLOS

μF	microfarad
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
°C	grau Celsius
cm	centímetro
g	força da gravidade
g	grama
kb	quilobase
kg	quilograma
kV	quilovolt
М	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
pb	par de bases
pg	picograma
рН	potencial hidrogeniônico
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinação

rpm	rotações por	minuto

- s segundo
- S svedberg
- U unidade de atividade enzimática
- W watt
- Ω ohm

## SUMÁRIO

1.	INTR	ODUÇÃO	27
	1.1.	Câncer pancreático: aspectos clínicos e epidemiológicos	27
	1.2.	PDAC: histopatologia e biologia molecular	34
	1.3.	Modelos pré-clínicos no estudo do câncer: a importância dos	
		xenotransplantes	38
	1.4.	Epigenética: conceitos básicos e implicações na oncogênese	47
	1.5.	RNA de interferência: ferramenta na pesquisa do câncer	52
2.	OBJE	ETIVOS	58
3.	MATE	ERIAIS E MÉTODOS	59
	3.1.	Amostras de PDAC	59
	3.2.	Animais	59
	3.3.	Xenotransplantes	60
	3.4.	Manutenção dos xenotransplantes	61
	3.5.	Análise histológica	62
	3.6.	Cultura de células de PDX	62
	3.7.	Teste de contaminação cruzada	63
	3.8.	Teste de contaminação por micoplasma	64
	3.9.	Cinética de crescimento	65
	3.10.	Tumorigênese <i>in vivo</i>	.66
	3.11.	Biblioteca de shRNAs	67
	3.12.	Amplificação da biblioteca de shRNAs	.69
	3.13.	Digestão endonucleolítica da biblioteca de shRNAs	71
	3.14.	Análise de representação da biblioteca de shRNAs	71

	3.15.	Produção de vetores lentivirais	74				
	3.16.	Eficiência de transdução	76				
	3.17.	Teste de sobrevivência à Geneticina	79				
	3.18.	Triagem de alvos epigenéticos em células de PDAC	80				
	3.19.	Sequenciamento dos shRNAs	85				
4.	RESU	JLTADOS	89				
	4.1.	Estabelecimento de modelos de PDAC in vivo e in vitro	89				
		4.1.1. Geração de xenotransplantes	89				
		4.1.2. Características histológicas dos PDXs	91				
		4.1.3. Culturas celulares derivadas dos PDXs	93				
		4.1.4. Validação in vitro da linhagem celular derivada de PDX	95				
		4.1.5. Validação in vivo da linhagem celular derivada de PDX	98				
	4.2.	Padronização da metodologia e rastreamento de alvos epigenéticos	1				
		no PDAC	99				
		4.2.1. Amplificação e validação da biblioteca de shRNAs	99				
		4.2.2. Produção de vetores lentivirais e determinação das condições de					
		transdução1	07				
		4.2.3. Triagem de alvos epigenéticos1	11				
5.	DISC	<b>USSÃO</b> 1	13				
	5.1.	Geração de xenotransplantes e linhagem celular de PDAC1	13				
	5.2.	Estabelecimento de metodologia para rastreamento de alvos					
		epigenéticos no PDAC1	24				
6.	CON	CLUSÕES1	29				
REFERÊNCIAS1							
APÊNDICE A – Certificado CEPesq (Hospital Sírio-Libanês)							

APÊNDICE B – Certificado CEUA (IQ-USP)1	17	'4	ŀ
---	----	----	---

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Câncer pancreático: aspectos clínicos e epidemiológicos

O pâncreas é um órgão glandular presente, em diferentes formas e arranjos, em todos os vertebrados. Na espécie humana, com aproximadamente 15 cm de comprimento e 100 g de peso, situa-se na porção superior esquerda da cavidade abdominal, em posição posterior ao estômago, e divide-se em três principais regiões anatômicas: cabeça, corpo e cauda (Drake et al., 2014) (Figura 1A). Em sua fisiologia, caracteriza-se como uma estrutura secretória mista, com funções independentes. Atua como glândula endócrina, participando ativamente do controle metabólico por meio da liberação de diferentes hormônios, produzidos no interior das chamadas ilhotas pancreáticas (Tan, 2008; Hall, 2015; Jennings et al., 2015) (Figura 1B). Essas estruturas abrigam múltiplos tipos celulares, cujas secreções têm como principal função regular os níveis de açúcar no sangue: células-a, secretam o glucagon, para o aumento da glicemia; células-β, produzem a insulina, e assim reduzem os níveis glicêmicos; células-δ, liberam somatostatina, com ação inibitória sobre as células- $\alpha$  e - $\beta$ ; células- $\epsilon$ , produzem grelina, com efeito ativador sobre as células-δ e também um estimulante do apetite; e as células-γ, ou PP, secretam o polipeptídeo pancreático, cujo papel é regular a liberação de enzimas digestivas (Tan, 2008; Hall, 2015; Jennings et al., 2015; DiGruccio et al., 2016; Muraro et al., 2016). O pâncreas é também um órgão digestivo, responsável pela secreção do suco pancreático, um fluido constituído de água, sais, bicarbonato e enzimas digestivas, que auxilia a degradação e absorção de nutrientes no intestino delgado (Tan, 2008; Hall, 2015). Essa atividade exócrina é desempenhada pela maior parte

das células pancreáticas, arranjadas em ácinos, cujas secreções são drenadas por uma rede de ductos e lançadas no duodeno (Figura 1B), onde atuam na digestão de carboidratos (amilase), proteínas (tripsinogênio, quimotripsinogênio e procarboxipolipeptidase), lipídeos (lipase, fosfolipase e colesterol esterase) e ácidos nucleicos (ribonuclease e desoxirribonuclease) presentes no quimo (Tan, 2008; Hall, 2015).

Assim como outros tecidos do corpo humano, o pâncreas pode ser acometido por diferentes disfunções e condições patológicas, entre as quais o câncer. O câncer pancreático constitui-se como um conjunto heterogêneo de neoplasias, que podem afetar tanto a porção endócrina como as estruturas exócrinas do órgão (Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016). Os diferentes tipos de tumores endócrinos, denominados em conjunto PanNETs (pancreatic neuroendocrine tumors), apresentam-se em variadas figuras clínicas, com destaque para a produção aberrante de hormônios no caso dos chamados tumores funcionais (gastrinoma, glucagonoma, insulinoma e somatostatinoma) (Bond-Smith et al., 2012; Burns e Edil, 2012; Wolfgang et al., 2013; Reid et al., 2014). Entretanto, essas neoplasias são raras, correspondendo a 1 a 2% de todos os tumores pancreáticos, e a maior parte dos casos atinge o tecido exócrino do órgão (Wolfgang et al., 2013; IARC, 2014). Há também diversidade entre os tumores exócrinos, sendo o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma) a forma mais comum, com 85% de todos os casos de crescimento neoplásico no pâncreas (Ryan et al., 2014). Por ser tão predominante, este tipo é frequentemente designado na literatura como sinônimo de câncer pancreático. Exemplos menos frequentes de tumores exócrinos incluem o carcinoma de células acinares, pancreatoblastoma, cistadenoma seroso e

neoplasma sólido pseudopapilar, entre outros (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013).



Figura 1 – Anatomia do pâncreas

(A) Localização do pâncreas na cavidade abdominal. A área em destaque mostra as subdivisões anatômicas do órgão. (B) Estrutura tissular do pâncreas, composta por unidades funcionais que atuam no processo de digestão e no metabolismo energético. A porção exócrina é formada por ácinos produtores de enzimas digestivas e pela rede de ductos que conduzem essas substâncias ao duodeno. A atividade endócrina é promovida pelas ilhotas pancreáticas embutidas no tecido exócrino, organizadas a partir de quatro tipos celulares principais (células- $\alpha$ , - $\beta$ , PP e - $\delta$ ), que secretam hormônios na corrente circulatória para regular o uso da glicose. Fonte: (A) Terese Winslow LLC; (B) Bardeesy e DePinho (2002).

Embora não se inclua entre as neoplasias mais prevalentes, o câncer pancreático representa uma das principais causas de morte por câncer, com taxas de incidência e mortalidade relativamente equivalentes (Hariharan et al., 2008; Bray et al., 2018). No mundo, é o 12º em incidência, porém representa a sétima causa mais frequente de morte associada ao câncer, produzindo, em valores estimados, cerca de 430.000 óbitos em 2018 (Bray et al., 2018) (Figura 2). A maior parte dos casos é registrada nos países desenvolvidos (68% em 2012), onde já é a quarta causa mais comum de morte por câncer (IARC, 2014; Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2015) e com projeções de que se torne a segunda nos próximos anos (Rahib et al., 2014; Ferlay et al., 2016).



Figura 2 – Estatística global do câncer pancreático

Distribuição de incidência e mortalidade para os 10 tipos de câncer mais comuns, agregando os dados de ambos os sexos. O tumor de pele do tipo não-melanoma está incluído na categoria "outros". Fonte: adaptado de Bray et al., 2018.

A idade avançada é o mais importante fator de risco para o PDAC, sendo a maior parte dos casos diagnosticada em pessoas acima de 65 anos, e raramente em indivíduos com menos de 40 (IARC, 2014; Ryan et al., 2014). Na comparação entre os gêneros, a doença se apresenta ligeiramente mais frequente em homens (Maisonneuve e Lowenfels, 2010; IARC, 2014). O tabagismo é o fator de risco evitável mais claramente associado ao PDAC, estando relacionado a cerca de 25% dos casos (Maisonneuve e Lowenfels, 2010; Bosetti et al., 2012). Outras condições que aumentam o risco relativo incluem obesidade, diabetes, pancreatite crônica e o consumo abusivo de álcool (Maisonneuve e Lowenfels, 2010; Ben et al., 2011; Aune et al., 2012; Duell et al., 2012). A predisposição genética também figura como possível fator desencadeador, com 5 a 10% dos casos sendo relacionados a genes herdados em indivíduos com histórico familiar de câncer pancreático (Ryan et al., 2014). Um aumento do risco também é observado em indivíduos com pancreatite hereditária e em portadores de algumas síndromes genéticas raras, que envolvem mutações em genes supressores de tumor como TP53, P16/CDKN2A, BRCA2 e STK11 (Wolfgang et al., 2013; Reznik et al., 2014; Ryan et al., 2014; Peters et al., 2016).

A apresentação clínica do PDAC varia de acordo com a localização do tumor no órgão, sendo sintomas comuns a perda de peso, icterícia, dor persistente no abdome ou nas costas, fezes claras, urina escura, falta de apetite, náusea e indigestão (Hidalgo et al., 2010; Vincent et al., 2011a; Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kamisawa et al., 2016). Pancreatite e diabetes, se por um lado fatores de risco, podem também ser causados pelo próprio PDAC, sendo seu surgimento recente um possível sinal da doença (Pannala et al., 2009; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014). O diagnóstico precoce é raro, especialmente devido à ausência de marcadores sorológicos confiáveis. Os marcadores tumorais CEA (*carcinoembryonic antigen*) e CA 19-9 (*carbohydrate antigen 19-9*), embora se apresentem frequentemente aumentados na doença, não atingem níveis seguros de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico preciso, sendo por isso mais utilizados para o acompanhamento de pacientes já em tratamento (Ryan et al., 2014). O diagnóstico conclusivo é obtido pela combinação de histórico clínico, testes sanguíneos e, principalmente, técnicas de imagem como ultrassonografia e tomografia computadorizada, além do exame anatomopatológico de biópsias (Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016). Além da confirmação do diagnóstico, as técnicas de imagem são importantes para o estadiamento e definição da possibilidade de cirurgia para a ressecção do tumor (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kamisawa et al., 2016; Kleeff et al., 2016).

A remoção cirúrgica ainda em estágios iniciais é o único tratamento curativo para o PDAC. A realização do procedimento depende da localização e do grau de disseminação do tumor, que deve ser extirpado sem risco de trauma vascular e dano a estruturas adjacentes. É tecnicamente viável apenas para tumores pequenos (<3 cm) e restritos à glândula, sem o envolvimento de vasos importantes que cursam junto ao pâncreas, como o eixo celíaco e a artéria e veia mesentéricas superiores, e sem metástases em outros tecidos (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016). Menos de 20% dos pacientes são elegíveis, uma vez que a doença evolui assintomaticamente e quando diagnosticada já se encontra em estágio avançado, em que a cirurgia não é mais benéfica (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016). Para casos considerados limítrofes, a terapia neoadjuvante tem sido oferecida a fim de reduzir o

tumor a dimensões em que a remoção possa ser efetuada (Heinemann et al., 2013). Nos casos sem potencial de cura, o tratamento cirúrgico pode eventualmente ser aplicado para atenuar sintomas e complicações, com o intuito de melhorar a qualidade de vida do paciente (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016).

A quimioterapia, associada ou não à radioterapia, é oferecida como tratamento adjuvante após a cirurgia curativa, e também a pacientes com tumores irressecáveis, para estender e melhorar sua qualidade de vida (Bond-Smith et al., 2012; Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016). O análogo de nucleosídeo gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina), frequentemente combinado a outros agentes citotóxicos, tem sido nas últimas décadas a droga padrão na terapêutica do PDAC (Burris et al., 1997; Ducreux et al., 2015; Kleeff et al., 2016; Chiaravalli et al., 2017). Mais recentemente, o regime denominado FOLFIRINOX, uma combinação de ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecan e oxaliplatina, tem mostrado resultados superiores à gemcitabina no aumento da sobrevida dos pacientes, embora seja oferecido apenas àqueles em condições clínicas favoráveis, capazes de tolerar a severidade de seus efeitos adversos (Conroy et al., 2011; Ducreux et al., 2015; Kleeff et al., 2016; Chiaravalli et al., 2017). Entretanto, em qualquer de suas variações, a ação dos regimes quimioterápicos atuais é limitada pela emergência de subpopulações celulares que adquirem resistência (Shah et al., 2007; Arumugam et al., 2009; Wang et al., 2011; Binenbaum et al., 2015), e o efeito no prolongamento da sobrevivência de pacientes diagnosticados com tumores avançados ou metastáticos é apenas marginal, oferecendo não mais que alguns meses (Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Kleeff et al., 2016; Chiaravalli et al., 2017).

Apesar de décadas de esforços de pesquisa e desenvolvimento terapêutico, o PDAC inequivocamente permanece sendo uma das neoplasias com pior prognóstico. Mesmo para os pacientes submetidos à completa ressecção cirúrgica, a taxa de sobrevida em cinco anos é bastante reduzida, em torno de 20% (Wolfgang et al., 2013). Para os casos inoperáveis, menos de 5% sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (Wolfgang et al., 2013). Esses números ilustram a gravidade do cenário atual do câncer de pâncreas e expõem o tamanho do desafio para a pesquisa científica no caminho para o desenvolvimento de estratégias médicas que possam contribuir com melhores resultados para os pacientes afetados pela doença.

### 1.2. PDAC: histopatologia e biologia molecular

O PDAC se origina no tecido epitelial dos ductos pancreáticos, o sistema de estruturas que transporta as secreções que vão atuar no processo de digestão dos alimentos no intestino. Entre 60 e 70% dos adenocarcinomas afetam a região da cabeça do pâncreas, enquanto 20 a 25% se localizam no corpo e na cauda, sendo a localização um fator relacionado às manifestações clínicas da doença (Ryan et al., 2014). A baixa celularidade neoplásica, geralmente entre 5 e 20%, e a acentuada reação desmoplástica, com a formação de um denso tecido estrutural composto por miofibroblastos, células imunes (linfócitos e macrófagos) e material depositado (colágeno e ácido hialurônico), são caraterísticas típicas do PDAC e estão relacionadas a sua natureza altamente agressiva e quimiorresistente (lacobuzio-Donahue et al., 2002; Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012; Wood e Hruban, 2012; Ryan et al., 2014; Schober et al., 2014; Binenbaum et al., 2015; Adiseshaiah

et al., 2016; Gharibi et al., 2016; Ireland et al., 2016; Dauer et al., 2017; Melstrom et al., 2017).

Diferentes tipos de lesões precursoras podem dar origem ao PDAC. O neoplasma mucinoso papilar intraductal (IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasm) e o neoplasma cístico mucinoso (MCN, mucinous cystic neoplasm) são exemplos bem reconhecidos de lesões ductais macroscópicas que podem eventualmente progredir para o carcinoma invasivo (Wolfgang et al., 2013; Ryan et al., 2014; Gharibi et al., 2016). Entretanto, o modelo clássico da carcinogênese pancreática descreve a transição gradual das células do epitélio ductal por uma série de anormalidades microscópicas, em conjunto denominadas neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasia), até a formação do tumor maligno (Hruban et al., 2000). Essas lesões recebem uma classificação crescente (PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2, PanIN-3), de acordo com o grau de displasia do epitélio ductal em relação à organização do núcleo, polaridade epitelial e aspecto das figuras mitóticas (Hruban et al., 2000) (Figura 3A). As principais alterações genéticas que gradualmente se acumulam ao longo desse processo de transformação estão bem caracterizadas (Figura 3B). Quatro genes específicos têm forte associação com a doença, apresentando-se alterados na maioria dos casos: KRAS (>90%), P16/CDKN2A (>90%), TP53 (~75%) e SMAD4/DPC4 (~55%) (Wood e Hruban, 2012).


#### Figura 3 – Alterações histológicas e moleculares no PDAC

(A) Representação esquemática do modelo da carcinogênese pancreática, com as alterações do epitélio ductal características das lesões pré-neoplásicas (PanIN, *pancreatic intraepithelial neoplasia*) que precedem a formação do PDAC. As alterações citológicas progressivamente observadas incluem hiperplasia, atipia, aumento nuclear, perda da polaridade, invaginação do epitélio e displasia acentuada. (B) Seções histológicas exemplificando um ducto pancreático normal e os diferentes estágios de PanIN, até o surgimento do tumor invasivo, pouco diferenciado e com abundante desmoplasia. São indicadas também as alterações genéticas gradualmente acumuladas ao longo do processo carcinogênico, incluindo o encurtamento telomérico e as mutações no oncogene *KRAS2* e nos supressores tumorais *CDKN2A*, *TP53* e *SMAD4*. Fonte: (A) Guerra e Barbacid (2013); (B) lacobuzio-Donahue (2012).

A aplicação de técnicas avançadas de análise molecular, entretanto, tem revelado um cenário bem mais complexo para a biologia do PDAC (Aguirre et al., 2004; lacobuzio-Donahue, 2012; lacobuzio-Donahue et al., 2012; Samuel e Hudson, 2012; Cowley et al., 2013; Reznik et al., 2014; Knudsen et al., 2016; Makohon-Moore e lacobuzio-Donahue, 2016; Notta et al., 2016; Ying et al., 2016; Notta et al., 2017). Em um trabalho pioneiro, Jones et al. (2008) analisaram o exoma de um conjunto de 24 tumores e identificaram 1562 mutações somáticas distintas, estimando uma

média de 63 anormalidades genéticas por tumor. As alterações identificadas apontaram um conjunto principal de 12 vias regulatórias ou processos biológicos que estavam alterados na maioria dos tumores analisados, incluindo o controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA, adesão celular, migração e diferentes vias de sinalização. Estudos mais recentes, além de confirmarem a alta prevalência das mutações nos genes previamente associados ao PDAC (KRAS, P16/CDKN2A, TP53 e SMAD4/DPC4), também têm identificado um numeroso conjunto de alterações menos frequentes em potenciais driver genes, revelando a grande heterogeneidade intertumoral associada à carcinogênese pancreática (Biankin et al., 2012; Mann et al., 2012; Di Marco et al., 2015; Waddell et al., 2015; Witkiewicz et al., 2015b; Bailey et al., 2016; Murphy et al., 2016; Roberts et al., 2016; Hardie et al., 2017; Humphris et al., 2017; TCGA Research Network, 2017; Gong et al., 2018; Hopkins et al., 2018). Em outra frente de pesquisa, um número crescente de trabalhos tem investigado o papel de RNAs não codificadores na patofisiologia do PDAC, identificando um número relevante de RNA longos e, principalmente, microRNAs envolvidos na regulação de vias importantes para o crescimento, invasão e metástase (Frampton et al., 2014, 2015; Halkova et al., 2015; Müller et al., 2015; Sun et al., 2015; TCGA Research Network, 2017; Yonemori et al., 2017).

Diante da diversidade de mecanismos moleculares que subjazem o comportamento maligno do PDAC, compreende-se o fracasso das abordagens terapêuticas atuais, pouco seletivas, em aumentar as taxas de reabilitação e expectativa de vida dos pacientes. A integração de dados obtidos em diferentes plataformas de análise aponta a existência de subtipos moleculares distintos no PDAC (Collisson et al., 2011; Daemen et al., 2015; Moffitt et al., 2015; Waddell et al., 2015; Bailey et al., 2016; Connor et al., 2016; Humphrey et al., 2016; Knudsen et al.,

2017; Nicolle et al., 2017), e deixa evidente a necessidade de utilização dessas assinaturas moleculares no direcionamento das decisões clínicas, definindo alvos para a intervenção terapêutica, bem como na estratificação dos pacientes envolvidos em testes clínicos de novos medicamentos (Aguirre et al., 2018; Aung et al., 2018).

# 1.3. Modelos pré-clínicos no estudo do câncer: a importância dos xenotransplantes

No âmbito da pesquisa oncológica, a utilização de modelos pré-clínicos é um aspecto fundamental tanto para a investigação das características biológicas básicas dos tumores como para o desenvolvimento e teste de novas abordagens terapêuticas. Ao longo das últimas décadas, tanto a pesquisa básica como os estudos pré-clínicos têm se apoiado principalmente no uso de linhagens celulares tumorais, tanto em análises in vitro como em modelos in vivo, em que são fonte de material para xenoenxertos (Shoemaker et al., 1988; Sausville e Burger, 2006; Shoemaker, 2006; McDermott et al., 2007; Greshock et al., 2010; Liu e Hicklin, 2011; Barretina et al., 2012; Garnett et al., 2012; Kong e Yamori, 2012; Basu et al., 2013; Kim et al., 2014; Niu e Wang, 2015; Reinhold et al., 2015; Seashore-Ludlow et al., 2015; Iorio et al., 2016; Williams e McDermott, 2017; Ling et al., 2018). Apesar de sua ampla utilização, várias limitações restringem a possibilidade de aplicação translacional de abordagens desenvolvidas nestes modelos (Radiloff et al., 2008; Cree et al., 2010; Choi et al., 2014). Primeiramente, a maioria das linhagens celulares atualmente disponíveis tem sido submetida a um longo processo de seleção in vitro, e assim ineficientemente representam a heterogeneidade clonal intratumoral e o amplo espectro mutacional existente na doença (Radiloff et al.,

38

2008; Cree et al., 2010; Choi et al., 2014), parâmetros com influência decisiva sobre propriedades tumorais como capacidade de invasão, migração, recidiva e quimiorresistência (Junttila e de Sauvage, 2013; Lawrence et al., 2013; Quail e Joyce, 2013; Hiley et al., 2014; Tabassum e Polyak, 2015). Outra desvantagem, uma vez que essas células têm sido manipuladas em laboratório durante décadas, o longo tempo de cultura tende a se refletir em maior instabilidade genética e importantes alterações fenotípicas, convertendo-as em entidades distintas do tumor original e destituídas de significância clínica (Hiorns et al., 2004; Radiloff et al., 2008; Cree et al., 2010; Kang et al., 2015). Além disso, como somente uma pequena parte das tentativas de cultivo de tecido tumoral resulta na geração de linhagens permanentes, a variabilidade da doença na esfera populacional também se mostra subrepresentada (Morton e Houghton, 2007). Portanto, o desenvolvimento de modelos de pesquisa que melhor representem a substancial heterogeneidade e complexidade biológica dos tumores humanos se coloca como um passo essencial para a realização de objetivos na linha de frente do combate ao câncer, como a identificação de biomarcadores e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras.

Como alternativa para superar as limitações e complementar o tradicional uso de linhagens celulares tumorais, o emprego de modelos pré-clínicos mais avançados tem sido objeto de atenção crescente (de Jong et al., 2014; Ruggeri et al., 2014; Day et al., 2015; Hwang et al., 2016; Morgan et al., 2016; Thomas et al., 2016; Gengenbacher et al., 2017; Klinghammer et al., 2017). Sistemas emergentes incluem camundongos geneticamente modificados (GEMM, *genetically engineered mouse models*), modelos animais em que mutações somáticas dirigidas induzem a formação espontânea de neoplasias que mimetizam as características genéticas e

patológicas fundamentais da doença humana (Hingorani et al., 2003, 2005; Olive e Tuveson, 2006; Sharpless e DePinho, 2006; Singh e Johnson, 2006; Singh et al., 2010; Hezel e Bardeesy, 2011; Herreros-Villanueva et al., 2012; Guerra e Barbacid, 2013; Kersten et al., 2017), e a cultura de organoides tridimensionais, estabelecidos a partir de amostras de biópsia com o objetivo de esboçar in vitro os perfis moleculares de tumores humanos e auxiliar na elaboração de terapias individualizadas (Boj et al., 2015; Huang et al., 2015; Baker et al., 2016; Pauli et al., 2017; Aberle et al., 2018; Drost e Clevers, 2018; Hou et al., 2018; Tiriac et al., 2018ab). Dentro desse campo, o estabelecimento de xenotransplantes a partir de amostras tumorais humanas implantadas em camundongos imunodeficientes (PDX, patient-derived tumor tissue xenografts), embora não seja uma novidade, tem também despertado interesse crescente tanto na indústria quanto na academia como uma ferramenta para melhorar o desempenho de estudos funcionais e aperfeiçoar o processo de desenvolvimento de novos agentes contra o câncer (Kelland, 2004; Peterson e Houghton, 2004; Rubio-Viqueira e Hidalgo, 2009; Jin et al., 2010a; Kopetz et al., 2012; Tentler et al., 2012; Williams et al., 2013; Siolas e Hannon, 2013; Choi et al., 2014; Hidalgo et al., 2014; Rosfjord et al., 2014; Lodhia et al., 2015; Sia et al., 2015; Byrne et al., 2017; Lai et al., 2017; Lin et al., 2017b; Jung et al., 2018; Williams, 2018). Como principal qualidade, os PDXs mimetizam a biologia dos tumores parentais, preservando a heterogeneidade intratumoral e características histológicas e moleculares, que permanecem relativamente estáveis mesmo após sucessivas passagens (Rubio-Viqueira et al., 2006; Whiteford et al., 2007; Kim et al., 2012; Monsma et al., 2012; Mattie et al., 2013; Walters et al., 2013a; Martinez-Garcia et al., 2014; Tignanelli et al., 2014; Cassidy et al., 2015; Delitto et al., 2015; Jung et al., 2016; Brait et al., 2017; Izumchenko et al., 2017; Li,

2017; Wen et al., 2017; Knudsen et al., 2018). Também recapitulam com considerável concordância o microambiente do tumor primário (Kim et al., 2009; Choi et al., 2014; Li, 2017) e demonstram alto valor preditivo para os resultados clínicos de agentes anticâncer, com uma elevada correlação de resposta entre pacientes e PDXs gerados a partir de seus tumores (Giovanella et al., 1983; Kerbel, 2003; Voskoglou-Nomikos et al., 2003; Fiebig et al., 2004; Fiebig e Burger, 2011; Garrido-Laguna et al., 2011; Hidalgo et al., 2011; Roife et al., 2016; Golan et al., 2017; Izumchenko et al., 2017; Li, 2017; Pergolini et al., 2017). Outra vantagem, a geração desses modelos requer apenas pequena quantidade de material biológico e pode proporcionar fontes ilimitadas de células tumorais humanas para estudos funcionais e testes de novos compostos, *in vitro* e *in vivo* (Sereti et al., 2018).

Os PDXs são, portanto, excelentes modelos para a identificação de vulnerabilidades na célula tumoral que possam ser exploradas farmacologicamente, fato que tem dado ensejo a um amplo esforço por parte de diversas instituições acadêmicas e companhias farmacêuticas e biotecnológicas para o estabelecimento e manutenção de grandes coleções, contando com centenas ou milhares desses modelos, com o intuito de constituir painéis representativos da heterogeneidade tumoral, em diversos tipos de câncer (Fiebig e Burger, 2011; Morton e Houghton, 2011; Hidalgo et al., 2014; Malaney et al., 2014; Shultz et al., 2014a; Gao et al., 2015; Stewart et al., 2016; Townsend et al., 2016; Byrne et al., 2017; Lin et al., 2017a; Stewart et al., 2017). Redes colaborativas, formadas por meio de consórcios multi-institucionais, vêm sendo também estruturadas para o desenvolvimento e compartilhamento desses recursos, com o objetivo de constituir uma plataforma para estudos em escala populacional, bem como aumentar a reprodutibilidade dos estudos pré-clínicos por meio da padronização das práticas de trabalho e

harmonização da anotação dos modelos disponíveis (Morton e Houghton, 2011; Hidalgo et al., 2014; Townsend et al., 2016; Byrne et al., 2017; Lin et al., 2017a). Para dar maior visibilidade a essa plataforma de pesquisa e torná-la mais acessível e informativa, bases de dados estão sendo implantadas para catalogar PDXs provenientes de diferentes repositórios, armazenando, integrando e disseminando de modo sistematizado as informações clínicas, perfil molecular e demais atributos associados a esses modelos, de modo a facilitar o compartilhamento e o acesso às coleções já constituídas (Townsend et al., 2016; Meehan et al., 2017; Conte et al., 2019).

Embora a metodologia varie entre os diferentes grupos de pesquisa, o procedimento básico para a geração de xenotransplantes consiste no implante de tecido tumoral, na forma de pequenos fragmentos ou suspensões celulares, em camundongos imunodeficientes, a fim de que haja a eficiente propagação e não ocorra rejeição do enxerto humano. Após o desenvolvimento, os xenotumores podem ser mantidos e propagados por meio de passagens em sucessivas gerações de animais receptores (Morton e Houghton, 2007; Kim et al., 2009; Calles et al., 2013; Risbridger e Lawrence, 2017) (Figura 4). O material transplantado pode ser derivado de amostra cirúrgica ou biópsia, de lesão primária ou metástase. O local de implantação pode ser o espaço subcutâneo (transplante heteretópico) ou o mesmo órgão do tumor original (transplante ortotópico) (Kim et al., 2009). Por ser mais simples e rápido, o implante subcutâneo é o procedimento mais utilizado, sendo capaz de recapitular as características do tumor original com razoável similaridade (Kim et al., 2009). O modelo ortotópico, entretanto, embora tecnicamente mais complexo, costuma apresentar taxas de sucesso superiores e é mais consistente na manutenção de aspectos fundamentais do tumor original, como o estroma e o

42

potencial de disseminação metastática (Kubota, 1994; Capellá et al., 1999; Hoffman, 1999; Cui et al., 1998, 2001; Kim et al., 2009; Liu e Hicklin, 2011; Hoffman et al., 2015; Hiroshima et al., 2016; Go et al., 2017; Hoover et al., 2017). Para a geração dos PDXs, diferentes linhagens de camundongos, com variados níveis de imunosupressão, têm sido empregadas. Entre as linhagens comumente utilizadas estão os camundongos atímicos nude, os camundongos knockout Rag1/2 (recombination activating gene 1/2) e os animais severamente imunodeficientes SCID (severe combined immunodeficiency), NOD (non-obese diabetic)/SCID e NOD/SCID/Il2rg<sup>mut</sup> (NSG e NOG) (Morton e Houghton, 2007; Shultz et al., 2007; Belizário, 2009; Kim et al., 2009; Shultz et al., 2012; Tentler et al., 2012; Hidalgo et al., 2014; Shultz et al., 2014a; Lai et al., 2017; Byrne et al., 2017; Noto e Yeshi, 2017; Williams, 2018). A escolha da linhagem receptora é uma questão central para o estabelecimento de PDXs, uma vez que o background imunológico dos animais pode afetar aspectos fundamentais dos xenotumores, como a taxa de proliferação celular, heterogeneidade clonal e sensibilidade a quimioterápicos (Yoshimura et al., 1997; Kim et al., 2009).



Figura 4 – Estabelecimento e aplicações dos PDXs

Fragmentos de tecido tumoral obtido de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico são implantados em camundongos imunodeficientes para o estabelecimento dos PDXs (F1). Os tumores enxertados com êxito são subsequentemente expandidos em sucessivas geraçãos de animais receptores (F2, F3, etc.), tanto para a sua manutenção como para a realização de ensaios biológicos, incluindo o teste de novas terapias e a pesquisa de biomarcadores. Fonte: Tentler et al. (2012).

O uso dos PDXs tem sido largamente descrito em diferentes tipos de câncer, aplicados principalmente na avaliação de terapias experimentais para indicar os parâmetros básicos de toxicidade, eficácia e dosagem (Rubio-Viqueira e Hidalgo, 2009; Tentler et al., 2012; Williams, 2017). Todavia, o real valor desse modelo de estudo é refletido por sua inerente versatilidade, sendo empregado também na investigação de diversos aspectos da biologia do câncer, como o papel do microambiente, angiogênese, metástase, marcadores tumorais, mecanismos de resistência e suscetibilidade, e na identificação e enriquecimento de subpopulações celulares específicas, como as células-tronco tumorais (Li et al., 2007; Kim et al., 2009; Williams et al., 2013; Gore et al., 2015; Hoffman et al., 2015; Lohse et al., 2015; Davies et al., 2017; Navone e Labanca, 2017; Stewart e Tsao, 2017; Struss e Black, 2017). Para além da pesquisa básica e pré-clínica, existe também a perspectiva de aplicação clínica dos PDXs na elaboração de estratégias terapêuticas personalizadas, nas quais atuariam como avatares dos pacientes para o teste e seleção do melhor regime de tratamento (Jin et al., 2010b; Hidalgo et al., 2011; Villarroel et al., 2011; Kamiyama et al., 2013; Malaney et al., 2014; Witkiewicz et al., 2016; Cheng et al., 2017; Dong et al., 2017; Perales-Patón et al., 2017; Williams, 2017). Por outro lado, embora representem um novo e valioso instrumento no arsenal dos pesquisadores na guerra contra o câncer, os PDXs não são modelos perfeitos e também apresentam as suas limitações (Kelland, 2004; Kopetz et al., 2012; Choi et al., 2014; Hidalgo et al., 2014; Byrne et al., 2017; Cheng et al., 2017; Dong et al., 2017; Lin et al., 2017a; Wen et al., 2017; Williams, 2018). Por exemplo, o estabelecimento dos xenotransplantes nem sempre é bem sucedido, havendo taxas de sucesso significativamente baixas para determinados tipos de câncer, o que se configura como um obstáculo importante à sua eventual aplicação em

medicina personalizada (Hidalgo et al., 2014; Dong et al., 2017). Da mesma maneira, o tempo necessário para o desenvolvimento dos xenotumores nos animais receptores, normalmente superior a quatro meses, pode ser demasiadamente longo para muitos pacientes, constituindo assim mais um fator limitante para a elaboração de esquemas terapêuticos customizados (Hidalgo et al., 2014; Byrne et al., 2017; Cheng et al., 2017; Dong et al., 2017). Além disso, determinadas características do modelo limitam o espectro de terapias que podem ser testadas. Como exemplo, a gradual substituição do estroma humano pelo estroma murino ao longo das passagens pode afetar o efeito de drogas dirigidas contra esse componente do tumor, como é o caso dos agentes antiangiogênicos (Kelland, 2004; Kopetz et al., 2012; Hidalgo et al., 2014; Cassidy et al., 2015; Byrne et al., 2017; Wen et al., 2017; Williams, 2018). De modo semelhante, o comprometimento do sistema imunológico nos camundongos receptores torna os PDXs incapazes de recapitular com precisão as complexas interações entre as células neoplásicas e as células imunes, restringindo assim a avaliação de terapias com agentes imunomoduladores (Choi et al., 2014; Hidalgo et al., 2014; Cassidy et al., 2015; Byrne et al., 2017; Cheng et al., 2017; Wen et al., 2017; Williams, 2018). Outro inconveniente que pode causar equívocos nas conclusões acerca do efeito de medicamentos é o fato de que PDXs gerados a partir de tumores resistentes à terapia podem eventualmente perder essa característica, e se tornar novamente suscetíveis (Sereti et al., 2018). Além disso, a pequena quantidade de material biológico utilizada para gerar os xenotumores, embora a priori uma vantagem técnica, pode ao final resultar em PDXs que não representam a heterogeneidade do tumor primário em sua totalidade de subclones, um inconveniente que pode ter reflexos no modo de progressão do tumor no animal e, consequentemente, na sua resposta terapêutica (Sereti et al., 2018). Por fim, a

grande variabilidade metodológica, sobretudo em relação às linhagens animais utilizadas, com seus diferentes níveis de imunossupressão, e às técnicas de implante (subcutâneo ou ortotópico), afeta significativamente a consistência dos dados obtidos para um mesmo tipo de tumor, e dificulta a comparação entre os estudos (Hidalgo et al., 2014).

Apesar dessas limitações, o uso dos PDXs emerge como um instrumento com grande potencial para avançar o conhecimento sobre a patogênese do câncer e permitir o exame de abordagens inovadoras para o cuidado dos pacientes. Na oncologia pancreática, em específico, um número crescente de publicações tem mostrado a expansão das aplicações desse modelo (Sereti et al., 2018), sobretudo para a identificação de biomarcadores prognósticos (Jimeno et al., 2008, 2010; Garrido-Laguna et al., 2011; Torphy et al., 2014; Duconseil et al., 2015; Thomas et al., 2015; Bian et al., 2017), investigação de mecanismos de resistência (Kim et al., 2012; Noll et al., 2016; Zhang et al., 2017; Golan et al., 2018) e na avaliação de novos regimes terapêuticos, frequentemente baseados no reposicionamento de drogas (Laheru et al., 2012; Walters et al., 2013b; Gayet et al., 2015; Hiroshima et al., 2015; Witkiewicz et al., 2015a; Nicolle et al., 2017; Rajeshkumar et al., 2017; Chou et al., 2018; Kawaguchi et al., 2018ab). Considerando essas oportunidades, o presente trabalho teve como um de seus objetivos a geração de uma coleção de PDXs, derivados de amostras de adenocarcinoma ductal pancreático. Também é descrito aqui o estabelecimento bem-sucedido de uma nova linhagem celular, derivada de um desses xenotransplantes. Apesar das inerentes limitações dos modelos in vitro, essas células recém-isoladas detêm relevância experimental em razão de sua associação a um tumor ainda existente, crescendo em camundongos, o que favorece sua utilização em ensaios comparativos com foco na ausência da

multivariada comunicação entre células neoplásicas e células estromais no microambiente tumoral. Com essas iniciativas, busca-se contribuir com os atuais esforços para a geração de modelos de câncer pancreático mais consistentes e reprodutíveis, fomentando análises exploratórias para a identificação de biomarcadores e o teste de agentes anticâncer, tanto *in vitro* como *in vivo*.

# 1.4. Epigenética: conceitos básicos e implicações na oncogênese

A epigenética é classicamente definida como o conjunto das mudanças reversíveis e herdáveis na função gênica que não estão associadas a alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (Jones e Baylin, 2007). É um fenômeno fundamental em organismos eucarióticos, controlando processos biológicos importantes como o padrão de expressão espacial-temporal dos genes durante o desenvolvimento, a diferenciação celular, o *imprinting* genômico e o silenciamento de grandes segmentos cromossômicos, como ocorre na inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos (Watson et al., 2013; Alberts et al., 2014). Por permitirem alterações estáveis nos padrões de expressão gênica, os mecanismos epigenéticos ampliam significativamente o potencial funcional do genoma, e assim são diretamente responsáveis pela plasticidade fenotípica e o aumento da variabilidade entre os indivíduos (Watson et al., 2013; Alberts et al., 2014).

Os mecanismos centrais da regulação epigenética são a metilação do DNA e a modificação covalente de histonas. A metilação do DNA, o mais bem caracterizado deles, consiste na substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo metil no carbono número 5 do anel pirimidínico de uma base citosina, situada prévia e contiguamente a uma guanina (sítio CpG, citosina-fosfato-guanina) na sequência do

DNA, resultando na sua conversão à 5-metilcitosina (Me-CpG). Essa modificação é catalisada enzimaticamente por DNA metiltransferases (DNMTs) (Watson et al., 2013; Alberts et al., 2014) (Figura 5). O efeito da metilação do DNA sobre a expressão gênica decorre de sua localização no genoma. As regiões promotoras dos genes estão comumente associadas a segmentos genômicos com um elevado conteúdo de dinucleotídeos CpG, e há uma relação inversa entre a metilação das chamadas ilhas CpG e a atividade transcricional dos genes a elas relacionados (Watson et al., 2013; Alberts et al., 2014). Por sua vez, a modificação covalente de histonas pode ter efeito tanto repressivo como ativador, a depender do tipo de histona, do tipo de modificação e de sua localização na cadeia proteica (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007). Diversas classes de modificações já foram catalogadas, incluindo metilação, acetilação, fosforilação e ubiquinação, sendo as duas primeiras as mais relevantes para a regulação da atividade gênica (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007). Essas modificações são inseridas nas caudas N-terminais das histonas, que se projetam externamente à partícula nucleossomal, e têm o duplo papel de alterar a estrutura da cromatina, modulando a acessibilidade do DNA à maquinaria de transcrição, e de recrutar complexos proteicos que atuam sobre o DNA para ativar ou reprimir a transcrição (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007). A metilação ocorre tipicamente em resíduos de arginina ou lisina, em reações promovidas por metiltransferases de histonas (HMTs) e eventualmente revertidas por desmetilases de histonas (HDMs) (Figura 5). A depender do tipo e da posição do resíduo modificado, a metilação pode reprimir ou ativar a expressão (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007). A acetilação, por sua vez, ocorre em resíduos de lisina e está tipicamente associada ao reforço da atividade transcricional, ao passo que o processo inverso, a desacetilação, alia-se a padrões repressivos de expressão. Essas modificações são efetuadas por acetiltransferases de histonas (HATs) e desacetilases de histonas (HDACs), respectivamente (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007) (Figura 5).



Figura 5 – Mecanismos de regulação epigenética

Um grande e diverso conjunto de proteínas atua na regulação do epigenoma. Esses reguladores podem exercer função deposição (writers), leitura (readers) ou remoção (erasers) de marcas epigenéticas, modulando a compactação do DNA e a atividade transcricional da célula. Os writers são representados pelas metilases do DNA (DNMTs), que estabelecem a metilação de CpGs, particularmente em regiões promotoras, e pelas acetilases (HATs) e metilases (HMTs) de histonas, enzimas que adicionam radicais acetil (Ac) e metil (Me) a essas proteínas, frequentemente em resíduos de lisina (K), e definem determinados padrões de expressão gênica. Os readers, por sua vez, consistem em proteínas com domínios especializados que permitem a sua ligação a marcas específicas, como é o caso das proteínas de ligação à metil-citosina (MBDs), que reconhecem CpGs metiladas. Finalmente, os erasers, que incluem as desacetilases (HDACs) e as desmetilases (HDMs) de histonas, removem as marcas inseridas na cromatina e assim também induzem alterações na atividade de expressão dos genes. O estado transcricional ativo, mostrado na parte superior da figura, caracteriza-se pela ausência de metilação das ilhas CpG associadas ao promotor, níveis elevados de histonas acetiladas e disposição dos nucleossomos em uma conformação aberta na região do sítio de início da transcrição (TSS). Por sua vez, a transição para o estado inativo (parte inferior) envolve a hipermetilação do DNA, remoção das marcas de acetilação, alteração no padrão de metilação das histonas, com a troca de marcas de ativação por marcas repressivas, e um menor espaçamento entre os nucleossomos. Fonte: Ahuja et al. (2016).

A desregulação desses mecanismos de controle da função gênica pode resultar no desenvolvimento de estados patológicos. Por exemplo, padrões aberrantes de expressão gênica são hoje amplamente reconhecidos como um componente fundamental dos processos neoplásicos (Feinberg et al., 2006; Jones e Baylin, 2007; Sandoval e Esteller, 2012). Nesse contexto, os estudos sobre epigenética vêm ampliando o panorama da pesquisa oncológica, movendo o foco do paradigma genético para uma perspectiva mais abrangente, que considera também a contribuição de mediadores epigenéticos e da organização da cromatina no processo de transformação e progressão tumoral (Feinberg et al., 2006; Jones e Baylin, 2007; Sandoval e Esteller, 2012). Por serem transmitidas mitoticamente, anomalias epigenéticas podem colaborar com as mutações somáticas e sofrer os mesmos processos seletivos, em todos os estágios da evolução do câncer (Jones e Baylin, 2007; You e Jones, 2012; Shen e Laird, 2013). Em certos tumores, a aquisição dessas alterações pode até mesmo preceder o surgimento de mutações nas lesões precursoras, estabelecendo assim as condições iniciais para a transformação maligna (Feinberg et al., 2006; Jones e Baylin, 2007).

O espectro de anormalidades epigenéticas no câncer compreende uma ampla variedade de aberrações, afetando virtualmente todos os processos epigenéticos. A primeira e mais bem estabelecida associação entre epigenética e câncer foi a constatação de que o genoma das células tumorais é hipometilado, quando comparado ao genoma das células de tecidos normais (Feinberg e Vogelstein, 1983; Gama-Sosa et al., 1983). Essa redução da metilação genômica é um evento comum e precoce no câncer, afetando principalmente regiões repetitivas e levando a um aumento da instabilidade genômica, um traço característico das células tumorais (Sandoval e Esteller, 2012; Mair et al., 2014). Padrões aberrantes de metilação

afetando especificamente as regiões de ilhas CpG são também recorrentes nos processos carcinogênicos, alterando a atividade transcricional de oncogenes e genes de supressão tumoral pela hipo ou hipermetilação de seus promotores (Jones e Baylin, 2007; Sandoval e Esteller, 2012). Além da ruptura do padrão normal de metilação do DNA, a reprogramação extensiva de outros componentes da maquinaria epigenética, incluindo as modificações de histonas, o reposicionamento de nucleossomos e o remodelamento da cromatina, também tem sido frequentemente reconhecida como fator causal para o silenciamento ou ativação patológicos de genes regulatórios cruciais, envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA, transcrição e sinalização (Jones e Baylin, 2007; Esteller, 2008; Chi et al., 2010; Sharma et al., 2010; Rodríguez-Paredes e Esteller, 2011; Sandoval e Esteller, 2012; You e Jones, 2012; Shen e Laird, 2013).

No câncer de pâncreas, o papel das alterações no epigenoma também tem recebido crescente atenção (Sato e Goggins, 2006; Lomberk et al., 2008; Omura e Goggins, 2009; Delpu et al., 2011; Grzenda et al., 2011; McCleary-Wheeler et al., 2013; Fukushige e Horii, 2014; Nicolle et al., 2017; Träger e Dhayat, 2017; Lomberk et al., 2018; Paradise et al., 2018). Diversos estudos identificaram perfis anormais de metilação do DNA, particularmente associados à inativação de genes supressores de tumor, e sugerem que essas alterações seriam eventos precoces na oncogênese pancreática, se intensificando ao longo da progressão da doença (Ueki et al., 2000, 2001; Fukushima et al., 2002; Sato et al., 2003ab; Hagihara et al., 2009; Shimizu et al., 2006; Omura et al., 2008; Sato et al., 2008; Tan et al., 2009; Shimizu et al., 2011; Vincent et al., 2011b; Nones et al., 2014). Mudanças nos padrões de acetilação de histonas (Miyake et al., 2008; Ouaïssi et al., 2008; Fritsche et al., 2009; Lehmann et al., 2009; von Burstin et al., 2009; Wang et al., 2009;

Schneider et al., 2010; Schüler et al., 2010; Schneider et al., 2011; Aghdassi et al., 2012; Gong et al., 2013; Stenzinger et al., 2013; Deng et al., 2014; Feng et al., 2014), bem como a atividade anômala de proteínas do grupo Polycomb, que reprime a atividade gênica por meio da metilação de histonas (Ougolkov et al., 2008; Martínez-Romero et al., 2009; Chen et al., 2010; Karamitopoulou et al., 2010; Song et al., 2010; Toll et al., 2010; Grzenda et al., 2011; Yin et al., 2011; Avan et al., 2012; Fujii et al., 2012; Lasfargues e Pyronnet, 2012; Mallen-St. Clair et al., 2012; Batchu et al., 2013; Li et al., 2013; Proctor et al., 2013; van Vlerken et al., 2013; Li et al., 2017; Li et al., 2018), são outros eventos de desregulação epigenética que parecem ter importância para a formação neoplásica no pâncreas, promovendo tanto a expansão inicial da população tumoral como sua progressão para o fenótipo invasivo e metastático.

## 1.5. RNA de interferência: ferramenta na pesquisa do câncer

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo natural de regulação da expressão gênica, presente na maioria dos organismos eucariotos (Watson et al., 2013; Alberts et al., 2014). O fenômeno foi descoberto na década de 1990, a partir de observações em plantas e em estudos com o nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Napoli et al., 1990; Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998), e postula-se que tenha evoluído como um mecanismo de defesa da célula contra vírus e transposons que utilizam RNA de fita dupla como meio de propagação (Cerutti e Casas-Mollano, 2006; Stram e Kuzntzova, 2006; Malone e Hannon, 2009). Os pequenos RNAs de interferência (siRNAs, *small interfering RNAs*) são as moléculas efetoras da maguinaria de RNAi. São originados a partir de diferentes RNAs precursores, os

quais são clivados pela enzima Dicer, uma RNase do tipo III que atua no citoplasma, gerando pequenos dúplexes de RNA com 20 a 30 pares de bases. Cada uma dessas novas moléculas é então incorporada pelo complexo multiproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*), que selecionará uma das fitas para guiar sua ligação a um RNA mensageiro (mRNA, *messenger RNA*) de sequência complementar. A depender do grau de homologia entre as sequências, o complexo RISC pode clivar o mRNA alvejado, resultando no silenciamento completo de sua expressão, ou reprimir sua tradução (Carthew e Sontheimer, 2009) (Figura 6).

Essa característica de silenciamento específico atraiu a atenção dos pesquisadores e fez com que o RNAi rapidamente se desenvolvesse como uma poderosa ferramenta experimental para a investigação da função gênica (Dorsett e Tuschl, 2004; lorns et al., 2007). Empresas de biotecnologia e instituições acadêmicas desenvolveram bibliotecas de RNAi cobrindo todo o genoma codificador, tornando possível a realização de análises em larga-escala para interrogar, sistemática e simultaneamente, fenótipos associados à perda de função em um grande número de genes (Cleary et al., 2004; Dorsett e Tuschl, 2004; Paddison et al., 2004; Silva et al., 2005; Bernards et al., 2006; Chang et al., 2006; Moffat et al., 2006; Root et al., 2006; Iorns et al., 2007; Hu e Luo, 2012; Pan et al., 2012). Vários desses ensaios já foram conduzidos, identificando genes envolvidos em apoptose, reparo do DNA, estabilidade proteica e sinalização celular (Brummelkamp et al., 2003; Berns et al., 2004; Zheng et al., 2004).

53



Figura 6 – Vias moleculares dos mecanismos de RNA de interferência

A via de RNAi pode ser guiada tanto por siRNAs (small interfering RNAs) como por miRNAs (microRNAs). A via dos siRNAs (esquerda) se inicia no citoplasma, com a clivagem de uma molécula longa de RNA dupla-fita (dsRNA, double-stranded RNA) pela RNase Dicer. Cada siRNA gerado é a seguir incorporado ao complexo RISC (RNAi-induced silencing complex), onde uma das fitas do dúplex (fita passageira ou senso) é descartada. A fita remanescente (fita guia ou antissenso) liga, por homologia de sequência, o complexo RISC ativado ao mRNA alvo, que é então clivado pela subunidade catalítica Argonauta 2 (AGO2). A via dos miRNAs (direita), por sua vez, é iniciada no núcleo celular, com a geração de transcritos primários (pri-miRNAs, primary microRNAs) pela RNA polimerase II (Pol II). Essas moléculas são processadas pela RNAse Drosha e convertidas em miRNAs precursores (pre-miRNAs, precursor microRNAs), que a seguir são encaminhados ao citoplasma pela Exportina 5. A enzima Dicer processa os pre-miRNAs, permitindo o seu carregamento no complexo RISC. A fita passageira do dúplex de RNA é então removida, deixando o miRNA maduro ligado ao RISC ativado. Mesmo com complementaridade imperfeita, o miRNA reconhece o sítio-alvo no mRNA, localizado tipicamente na região 3'-UTR (3'-untranslated region), ocasionando a inibição da tradução ou levando a sua degradação nos chamados corpos de processamento (P-bodies, processing-bodies). Fonte: de Fougerolles et al. (2007).

Na pesquisa do câncer, as análises empregando a tecnologia de RNAi tiveram papel fundamental na caracterização de novos oncogenes (Pan et al., 2005; Horvath et al., 2006; Ngo et al., 2006; Zhang et al., 2006) e na identificação de genes críticos para o controle de fenótipos associados à doença, como quimiorresistência e migração celular (MacKeigan al., 2005; Collins et al., 2006; Whittaker et al., 2013). Além de permitir uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese, o uso de screenings com RNAi também tem se destacado na elaboração de novas estratégias para o tratamento da doença (lorns et al., 2007). Ao suprimir a expressão gênica e, consequentemente, a função proteica, essa ferramenta simula o efeito da inibição farmacológica e, portanto, é um meio efetivo para identificar e validar alvos terapêuticos (Ngo et al., 2006; lorns et al., 2007; Fennell et al., 2014). Tal abordagem já foi utilizada com sucesso para identificar genes essenciais em diversas linhagens celulares tumorais provenientes de diferentes tecidos, incluindo o pâncreas (Luo et al., 2008; Schlabach et al., 2008; Cheung et al., 2011; Marcotte et al., 2012; Cowley et al., 2014; Marcotte et al., 2016; McDonald et al., 2017; Tsherniak et al., 2017).

No contexto da prospecção de alvos, o rastreamento direcionado a subconjuntos gênicos específicos, reconhecidamente importantes para o desenvolvimento tumoral, tem sido uma estratégia comumente utilizada para simplificar o trabalho experimental e diminuir os custos associados às investigações englobando todo o genoma. Como exemplo, a triagem de um conjunto de genes envolvidos no metabolismo revelou que determinados tumores de mama são dependentes de um aumento no fluxo da via de síntese da serina, causado pela superexpressão da fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH), e sugere a supressão desse alvo como uma potencial estratégia antitumoral (Possemato et al., 2011). Em

um ensaio análogo com um modelo murino de leucemia mielóide aguda, utilizando uma biblioteca de RNAi contra genes reguladores epigenéticos, foi identificada uma proteína ligante de histonas acetiladas (Brd4) que exerce funções essenciais na manutenção da célula leucêmica (Zuber et al., 2011). Em um teste de validação, a inibição farmacológica desse alvo resultou na morte das células malignas e remissão da doença nos camundongos avaliados (Zuber et al., 2011). Em uma investigação também dirigida a alvos do epigenoma, interrogando um amplo e diverso painel de linhagens celulares tumorais, Hoffman et al. (2014) constataram que o *knockdown* do gene *BRM*, codificador de uma ATPase dependente de DNA que integra o complexo de remodelamento da cromatina SWI/SNF, resulta em um efeito de letalidade sintética em células mutadas com perda de função de *BRG1*, outra ATPase atuante no mesmo complexo, mas de modo mutuamente exclusivo com *BRM*.

Considerando, portanto, as possibilidades de investigação oferecidas por essa ferramenta biotecnológica, o presente trabalho teve como um de seus objetivos a padronização de um ensaio para o rastreamento em larga-escala de vulnerabilidades moleculares em células de câncer pancreático. Em função da importância dos mecanismos de regulação epigenética para o estabelecimento e progressão de fenótipos tumorais, essa varredura foi direcionada para a identificação de componentes da maquinaria epigenética que exerçam funções críticas para a sobrevivência e manutenção das células de PDAC. Para isto, foi empregada uma biblioteca de RNAi constituída por shRNAs (short hairpin RNAs) contra genes codificadores de proteínas de regulação epigenética, para interrogar um painel de linhagens celulares tumorais pancreáticas, incluindo linhagens convencionais e também células derivadas da coleção de xenotransplantes de PDAC gerada neste trabalho.

# 2. OBJETIVOS

**Objetivo 1:** Estabelecer modelos *in vivo* e *in vitro* de adenocarcinoma ductal pancreático para a pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos.

Objetivos específicos:

- Gerar uma coleção de PDXs em camundongos imunodeficientes a partir de tumores pancreáticos humanos.
- Estabelecer novas linhagens celulares tumorais a partir dos xenotumores gerados com as amostras de PDAC humano.

**Objetivo 2:** Identificar componentes da maquinaria epigenética cujo silenciamento afete a sobrevivência e a proliferação do PDAC, expondo potenciais alvos para o tratamento da doença.

# Objetivos específicos:

- Padronizar a metolodogia para o rastreamento de vulnerabilidades moleculares no câncer de pâncreas por meio de silenciamento gênico com RNA de interferência.
- Realizar uma triagem de alvos epigenéticos com RNAi, utilizando células derivadas de PDX e linhagens pancreáticas convencionais.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras de PDAC

Amostras de adenocarcinona ductal pancreático foram obtidas de pacientes submetidos à pancreatectomia, duodenopancreatectomia ou extirpação de metástases pelos cirurgiões Dr. Marcel Cerqueira César Machado e Dr. José Jukemura, professores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e colaboradores do estudo. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Sírio-Libanês, Hospital Alemão Oswaldo Cruz e Hospital 9 de Julho (São Paulo, SP). A coleta e utilização deste material foi realizada com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq) do Hospital Sírio-Libanês (Parecer nº 834.279) (Apêndice A), e o processo está devidamente registrado na Plataforma Brasil do Ministério da Saúde (<u>www.saude.gov.br/plataformabrasil</u>). Todas as amostras foram obtidas com consentimento esclarecido dos pacientes, e a quantidade de tecido coletada estava em excesso à necessária para a avaliação anatomopatológica.

#### 3.2. Animais

Foram utilizadas fêmeas BALB/c *nude*, com idade entre 4 e 8 semanas e peso entre 12 e 15 g no início dos experimentos. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob condições SPF (*specific pathogen-free*) e submetidos a condições ambientais padrão, com temperatura a 21°C ± 1°C, 12 horas de ciclo claro/escuro (luminárias acesas às 07:00 e apagadas às 19:00 horas) e água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas éticas de pesquisa com animais adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob protocolos aprovados (Certificados nº 03/2014 e 71/2017) (Apêndice B) pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

## 3.3. Xenotransplantes

Imediatamente após a ressecção de cada amostra de câncer pancreático, um fragmento do tecido tumoral, estéril e não necrótico, foi transferido para um tubo contendo 20 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), sem soro e com antibióticos (penicilina/estreptomicina; Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), mantido resfriado em gelo (~4°C). Para cada amostra, um fragmento adicional foi coletado em RNAlater (Ambion, Carlsbad, CA, USA) e posteriormente congelado para futuras análises moleculares. Após a coleta, cada peça cirúrgica foi imediatamente transportada até o Biotério de Produção e Experimentação do IQ-USP, onde foi processada e enxertada no espaço subcutâneo de camundongos nude, de acordo com procedimentos descritos na literatura (Morton e Houghton, 2007; Kim et al., 2009; Calles et al., 2013). As cirurgias foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com instrumentos cirúrgicos autoclavados. Para aumentar as chances de sucesso, cada tumor foi implantado em múltiplos receptores (três animais, na maioria dos casos). Para a implantação do tumor, cada camundongo foi pesado e anestesiado com um coquetel de cetamina/xilazina (Ceva, Paulínia, SP, Brasil) na dose de 100 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. Já sob o efeito da anestesia, o animal foi colocado em decúbito lateral e o lado direito do

corpo, da base do pescoço até a cauda, foi limpo com uma gaze embebida em etanol a 70%. Com uma tesoura pequena, foi feita na pele do flanco uma incisão de cerca de 1 cm. Utilizando as pontas da tesoura, introduzida no espaço subcutâneo, a pele foi gentilmente divulsionada até a formação de um pequeno "bolso", sendo então depositados nesse espaço, sobre o tecido muscular subjacente, 5 a 10 fragmentos de tumor (quantidade variável em função do tamanho da peça recebida), com 1 a 3 mm<sup>3</sup> cada um. Por fim, a pele foi suturada (seda, 3-0; Techsuture, Bauru, SP, Brasil) e desinfectada com uma solução antisséptica de iodopolividona a 10%, e o animal colocado sob uma lâmpada de aquecimento (luz infra-vermelha, 150 W; Philips, Pila, Polônia), para impedir a hipotermia durante o período de recuperação da anestesia. Ao longo das semanas subsequentes aos implantes, os camundongos foram monitorados para a verificação do crescimento dos tumores, assim como de suas condições gerais de saúde. O crescimento dos tumores foi acompanhado por meio de medições com paquímetro, utilizando a fórmula elipsoidal modificada (Euhus et al., 1986; Tomayko e Reynolds, 1989):

$$volume = \frac{1}{2}$$
 (comprimento  $\times$  largura<sup>2</sup>)

#### 3.4. Manutenção dos xenotransplantes

Para as amostras de PDAC em que o xenotransplante foi bem-sucedido, os tumores expandidos foram removidos e reimplantados em sucessivas gerações de camundongos receptores (F1, F2, F3, etc.), de modo a permitir sua manutenção e expansão. Para o reimplante, quando o nódulo subcutâneo atingiu um diâmetro máximo de 2 cm, o animal portador foi eutanasiado em câmara de CO<sub>2</sub> e transferido

para uma cabine de fluxo laminar, onde o xenotumor foi dissecado, lavado em RPMI-1640 sem soro e, com o auxílio de um bisturi, dividido em pequenos fragmentos (1 a 3 mm<sup>3</sup>). Utilizando o mesmo procedimento cirúrgico descrito acima, os fragmentos foram então reimplantados em novos camundongos *nude* (três animais, na maioria dos casos). O tecido tumoral excedente, não utilizado no transplante, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em *freezer* a  $-80^{\circ}$ C.

#### 3.5. Análise histológica

Para o exame da histologia dos PDX, fragmentos dos xenotumores foram lavados em tampão fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*, 0,1 M, pH 7,2) e fixados em formalina tamponada em PBS, durante 24 horas, à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram colocadas em etanol a 70%, desidratadas e incluídas em parafina. Seções do tecido, com 3 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo, montadas em lâminas de vidro, desparafinizadas, reidratadas, e então coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e cobertas com lamínula. As lâminas foram encaminhadas a um patologista, para avaliação do *status* de diferenciação, conteúdo desmoplásico e demais aspectos da arquitetura tumoral.

#### 3.6. Cultura de células de PDX

Parte dos xenotumores expandidos nos camundongos *nude* foi utilizada para o estabelecimento de culturas celulares. Para esse procedimento, cada xenotumor foi dissecado, lavado em RPMI-1640 sem soro e transferido para uma placa de cultura

de 60 mm. Coágulos sanguíneos e tecido conectivo provenientes do animal carreador foram removidos com um bisturi, e a amostra lavada novamente, em PBS. Porções do tumor com cerca de 100 mg foram transferidas para novas placas de 60 mm, contendo meio completo [RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%; Vitrocell), fator de crescimento epidérmico (EGF, 20 ng/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e toxina colérica (100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)], e dissociadas com bisturi até a formação de uma suspensão constituída por células livres e pequenos fragmentos de tecido tumoral. As suspensões celulares foram então semeadas em placas de 60 mm ou frascos de 25 cm<sup>2</sup>, e mantidas em incubadora com atmosfera umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. O meio de cultivo substituído a cada dois ou três dias.

# 3.7. Teste de contaminação cruzada

A presença de células de camundongo na cultura de células de PDX foi verificada por PCR (polymerase chain reaction), utilizando iniciadores (primers) para o homólogo murino do gene Hmbs (hidroximetilbilano sintase, forward: 5'-GCTCGCATACAGACCGACA-3', reverse: 5'-GAATCTTGTCTCCCGTGGTG-3'; Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) e para a sequência humana do gene TUBA1C (atubulina 1C, forward: 5'-TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG-3', reverse: 5'-AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'; Exxtend). Para efetuar as reações, o DNA genômico (gDNA) foi extraído das células em cultura com um kit de purificação de DNA em minicoluna (Wizard SV Genomic DNA Purification System; Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências investigadas foram amplificadas em reações de 50 µL, com 31,75 µL de água livre de nucleases (Ambion), 10  $\mu$ L de 5x GoTaq Reaction Buffer (Promega), 1  $\mu$ L de dNTP mix 10 mM (Promega), 1  $\mu$ L do forward primer 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ L do reverse primer 10  $\mu$ M, 1,25 U (0,25  $\mu$ L) de GoTaq DNA Polymerase (Promega) e 50 ng (5  $\mu$ L) de gDNA. As condições de reação em termociclador (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram: 95°C por 5 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 40 s; 72°C por 7 min. Ao final, os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1,5%.

#### 3.8. Teste de contaminação por micoplasma

A eventual contaminação por micoplasma das células derivadas de PDX foi checada por PCR, utilizando o mesmo DNA extraído para o teste de contaminação cruzada, e iniciadores para o gene do RNA ribossomal 16S de Mycoplasma sp. (16S rRNA. forward: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACAC-3', 5'reverse: CGGATAACGCTTGCGACCTA-3'; Exxtend). Para confirmar a presença de DNA humano nas amostras testadas, foram incluídas reações com iniciadores para o gene da tubulina (TUBA1C, forward: 5'-TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG-3', reverse: 5'-AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'; Exxtend). Para cada reação de amplificação, em volume de 50 µL, foram utilizados 34,7 µL de água isenta de nucleases (Ambion), 5 µL de 10× NH4 Reaction Buffer (Bioline, London, UK), 1,3 µL de solução de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Bioline), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Promega), 1 µL do forward primer 10 µM, 1 µL do reverse primer 10 µM, 5 U (1 µL) de BIOLASE DNA Polymerase (Bioline) e 30 ng (5 µL) de gDNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 40 s;

72°C por 7 min. Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1,5%.

#### 3.9. Cinética de crescimento

O padrão de crescimento in vitro das células derivadas de PDX foi examinado para a determinação de parâmetros cinéticos como o tempo de dobramento populacional (TD) e a densidade de saturação (DS). Para essa avaliação, as células foram plaqueadas em baixa densidade em três placas de seis poços (300.000 células/poço) contendo RPMI-1640 (Gibco) com 10% de SFB (Vitrocell), sem antibióticos, e mantidas em condições de cultura padrão (37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar), com substituição do meio a cada três dias. A cada dois dias, ao longo de um período total de 18 dias, as células foram coletadas por tripsinização (tripsina/EDTA 0,25%; Vitrocell) de poços em duplicata e contadas em hemocitômetro. Os valores registrados em cada um dos nove pontos de contagem foram utilizados para gerar uma curva de crescimento. Por meio da análise gráfica dos dados, o TD foi estimado fazendo-se a seleção de um valor ao longo da fase de crescimento exponencial, traçando-se uma reta até o dobro desse valor, e determinando o tempo aproximado (horas), entre os dois. O valor de DS (células/cm<sup>2</sup>) foi obtido pela razão entre o número máximo de células verificado na curva e a área de superfície de um poço da placa de cultivo (nesse caso, ~9,5 cm<sup>2</sup>). Para uma comparação com os padrões de proliferação de outras linhagens celulares de câncer pancreático, foram também produzidas curvas de crescimento para AsPC-1 (ATCC CRL-1682, Manassas, VA, USA), MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420) e PANC-1 (ATCC CRL-1469). AsPC-1 foi plaqueada com 100.000 células/poço em três placas de seis poços, e cultivada durante 18 dias, com nove contagens. MIA PaCa-2 e PANC-1 foram ambas semeadas com 50.000 células/poço em quatro placas, e mantidas em cultura por 12 dias, com contagens diárias. Os meios de cultura utilizados para essas linhagens foram RPMI-1640 com 10% de SFB (AsPC-1), DMEM (Vitrocell) com 10% de SFB e 2,5% de soro de cavalo (Gibco) (MIA PaCa-2), e DMEM com 10% de SFB (PANC-1), renovados a cada dois ou três dias.

#### 3.10. Tumorigênese in vivo

O potencial tumorigênico das células cultivadas, derivadas de PDX, foi avaliado por inoculação em camundongos *nude*. Para a preparação do inóculo, as células foram tripsinizadas (tripsina/EDTA 0,25%; Vitrocell), contadas em hemocitômetro, centrifugadas (300 × *g*, 5 minutos), lavadas em RPMI-1640 (Gibco) sem soro e centrifugadas novamente (300 × *g*, 5 minutos). A seguir, as células foram ressuspensas em RPMI-1640 sem soro, com a concentração ajustada para 20 ×  $10^6$  células/mL, e aspiradas em uma seringa estéril de 1 mL. Para a inoculação, três camundongos *nude* foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (Ceva), recebendo em seguida, cada um, a injeção subcutânea (flanco dorsal) de 2 ×  $10^6$  células, suspensas em 100 µL do veículo. O desenvolvimento dos tumores foi monitorado ao longo das semanas subsequentes, do mesmo modo praticado para os xenotransplantes de PDAC. Para avaliação da histologia, fragmentos do tecido tumoral foram processados e encaminhados para exame histopatológico, conforme procedimento descrito anteriormente (seção 3.5).

#### 3.11. Biblioteca de shRNAs

O ensaio para a identificação de vulnerabilidades moleculares em células de PDAC foi realizado com uma biblioteca de shRNAs, construída para o silenciamento de genes reguladores epigenéticos, e gentilmente cedida pelo Dr. Christopher Vakoc do Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL, Cold Spring Harbor, NY, USA). A versão da biblioteca utilizada neste trabalho (Human Epi-V4) é constituída por 4492 shRNAs, contra cerca de 350 alvos (média de ~13 shRNAs/alvo), que incluem genes codificadores de proteínas componentes de complexos com função de adição, leitura e remoção de marcas epigenéticas (DNMTs, HMTs, HATs, HDMs, HDACs), proteínas ligantes de CpG metilada (MBDs), variantes de histona e fatores remodeladores de cromatina dependentes de ATP. Os shRNAs foram clonados em vetores pLMN (8065 pb), que expressam o shRNA de interesse fusionado a regiões do transcrito primário do microRNA-30 (miR-30), otimizado para o processamento pela RNase do tipo III Drosha, e que confere alta eficiência de silenciamento (Figura 7). A sequência de cada shRNA é flanqueada por uma outra sequência específica (barcode), que permite sua rápida identificação e quantificação por sequenciamento NGS (next generation sequencing). O plasmídeo pLMN emprega como repórter o gene da proteína fluorescente ZsGreen (Zoanthus sp. green fluorescent protein), e como marcador de seleção o gene de resistência à neomicina (Neo<sup>R</sup>) (Figura 7). Como controles positivos, a biblioteca possui shRNAs contra os genes RPL7, U2AF1, EIF5B, NHP2L1 e RPS3A, envolvidos em processos essenciais para qualquer tipo celular. O controle negativo é proporcionado por shRNAs contra o gene da luciferase do coral Renilla, portanto um alvo inexistente nas células analisadas.





5' LTR: 5' long terminal repeat, shRNA: microRNA-adapted short hairpin RNA (baseado no miR-30), PGK: phosphoglycerate kinase promoter, Neo<sup>R</sup>: neomycin resistance gene, IRES: internal ribosomal entry site, ZsGreen: Zoanthus sp. green fluorescent protein, 3' LTR: 3' long terminal repeat.

Um screening em larga-escala com RNAi é sempre precedido por uma complexa fase preparatória, visando à padronização e otimização das condições de manutenção e transdução da biblioteca de silenciamento. Essa preparação consiste na amplificação da biblioteca para uso e armazenamento, no controle de qualidade e de representação da biblioteca amplificada, no empacotamento dos plasmídeos da biblioteca em vetores virais, na titulação dos vírus para a determinação dos valores de multiplicidade de infecção apropriados para cada linhagem alvo, e na titulação do agente de seleção para a exclusão das células não infectadas pelas partículas virais. Cumpridas essas etapas, pode-se enfim iniciar o *screening* propriamente dito, para a triagem de eventuais genes de vulnerabilidade. O fluxograma apresentado a seguir (Figura 8) sumariza todo o esquema experimental.

Figura 8 – Etapas experimentais para a pesquisa de alvos moleculares com RNAi



Nas seções a seguir são descritas em detalhe todas essas etapas de padronização da metodologia do ensaio, assim como os procedimentos para o rastreamento de alvos moleculares em linhagens tumorais pancreáticas.

#### 3.12. Amplificação da biblioteca de shRNAs

A amplificação da biblioteca de shRNAs, para experimentação e armazenamento, foi realizada por meio da introdução e multiplicação dos plasmídeos vetores em bactérias transformantes. Para a transformação, 200 ng do DNA plasmidial da biblioteca, diluídos em 4 µL de tampão Tris-EDTA (TE; Tris HCI 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM), foram adicionados a 96 µL de bactérias Escherichia coli eletrocompetentes (ElectroMAX Stbl4 cells, Invitrogen), seguido por incubação em gelo. A mistura DNA/bactérias foi homogeneizada e dividida em 4 cubetas de eletroporação (24 µL/cubeta) com fenda de 0,1 cm entre os eletrodos (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A eletroporação (Gene Pulser II, Bio-Rad) foi efetuada nas seguintes condições: voltagem de 1,2 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200  $\Omega$ . Imediatamente após a aplicação do pulso elétrico, 1 mL de meio SOC (Invitrogen) foi adicionado a cada cubeta, e as bactérias reunidas em um tubo de 15 mL e colocadas em agitação por 1 hora, a 37°C e 225 rpm, para se recuperarem da eletroporação. Na sequência, as bactérias foram inoculadas em 200 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich), para o crescimento das células transformantes (o vetor pLMN possui o gene Amp<sup>R</sup>, que confere resistência à ampicilina). As bactérias, divididas em dois volumes de 100 mL, foram mantidas sob agitação constante, a 37°C e 225 rpm, até a saturação (~24 horas). Após o cultivo, as bactérias transformadas foram transferidas para 4 tubos de 50 mL e recuperadas por centrifugação a 6000  $\times$  g durante 15 minutos, a 4°C. O DNA plasmidial foi isolado com kit de extração em coluna de sílica (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

#### 3.13. Digestão endonucleolítica da biblioteca de shRNAs

A integridade dos plasmídeos da biblioteca de shRNAs, após o procedimento de transformação e amplificação em bactérias, foi examinada por digestão endonucleolítica com enzimas selecionadas a partir do mapa de restrição do plasmídeo pLMN. Foram utilizadas as enzimas Bg/II e Ndel, com sítios de restrição únicos nesse vetor. Três reações de 20 µL foram preparadas: uma digestão simples para cada enzima e uma digestão dupla, utilizando ambas. Para a primeira reação foram utilizados 14 µL de água livre de nucleases (Ambion), 2 µL de 10× NEBuffer 3.1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 10 U (1 µL) da enzima Bg/II (New England Biolabs) e 150 ng (3 µL) de DNA plasmidial. A segunda reação foi composta por 14,5 µL de água, 2 µL de 10× NEBuffer 3.1, 10 U (0,5 µL) da enzima Ndel (New England Biolabs) e 150 ng (3 µL) de DNA plasmidial. Para a dupla digestão foram utilizados 13,5 µL de água, 2 µL de 10× NEBuffer 3.1, 10 U (1 µL) da enzima Bg/II, 10 U (0,5 µL) da enzima Ndel e 150 ng (3 µL) de DNA plasmidial. Todas as reações foram incubadas a 37°C por duas horas, e os fragmentos gerados pela digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1%. A linearização do plasmídeo pLMN, por Bg/II ou Ndel, gera um fragmento de 8 kb, enquanto a digestão dupla (Bg/II + Ndel) produz fragmentos de 6,1 e 1,9 kb.

# 3.14. Análise de representação da biblioteca de shRNAs

Após o procedimento de amplificação, a representação de cada shRNA na nova biblioteca plasmidial foi examinada para checar sua equivalência em relação à biblioteca original. Essa análise foi realizada por meio do sequenciamento de
amplicons das sequências dos shRNAs nas duas bibliotecas. Para a obtenção dessas sequências, foi inicialmente realizada uma PCR com iniciadores para as regiões que flanqueiam os shRNAs no vetor pLMN (Mir5-F: 5'-CAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAAC-3'; PGKpro-R: 5'-

CTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC-3'), resultando em um produto de 366 pb. Para a reação de amplificação, em um volume final 50 µL, foram utilizados 24,5 µL de água livre de nucleases (Ambion), 10 µL de 5× SuperFi Buffer (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Promega), 4 µL de DMSO (Sigma-Aldrich), 2,5 µL do primer Mir5-F 10 µM (Exxtend), 2,5 µL do primer PGKpro-R 10 µM (Exxtend), 1 U (0,5 µL) de Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) e 100 ng (em 5 µL) do DNA plasmidial da biblioteca de shRNAs. As condições de reação foram: 98°C por 5 min; 20 ciclos de 94°C por 35 s, 55°C por 35 s, 72°C por 35 s; 72°C por 5 min. Os produtos da reação foram purificados em minicoluna de sílica (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, eluídos em 30 µL de água e quantificados por fluorimetria (Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen; Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen). Esses amplicons foram em seguida utilizados em uma segunda PCR, com iniciadores que introduzem os adaptadores (P5 e P7) e índices para sequenciamento na plataforma Illumina (Quadro 1), e que geram fragmentos de 375 pb. Para essa reação, em volume de 50 µL, foram utilizados 24,5 µL de água (Ambion), 10 µL de 5× SuperFi Buffer (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Promega), 4 µL de DMSO (Sigma-Aldrich), 2,5 µL do primer P5+mir30Loop-F 10 µM (Exxtend), 2,5 µL do primer P7+Index+PGKpro-R 10 µM (Exxtend), 1 U (0,5 µL) de Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) e 100 ng (em 5 µL) do produto purificado da primeira PCR. As condições de termociclagem foram: 98°C por 5 min; 20 ciclos de 94°C por 35 s, 52°C por 35 s, 72°C por 35 s;

72°C por 5 min. Os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 2%, com as bandas correspondentes ao tamanho esperado para os fragmentos (375 pb) sendo excisadas. O DNA foi recuperado por meio de um kit de extração de DNA em gel (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega), de acordo com as instruções do fornecedor, eluído em 30 µL de tampão TE e quantificado em fluorímetro (*Qubit 2.0 Fluorometer*, Invitrogen; *Qubit dsDNA HS Assay Kit*, Invitrogen).

Iniciador	Sequência (5'–3')
P5_Ext3_N6_mir30Loop-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACTCTTTC CCTACACGACGCTCTTCCGATCNNNNNN <u>TAGTGAAGCC</u> <u>ACAGATGTA</u>
P7_Index1_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>CGTGAT</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index2_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>ACATCG</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>

Quadro 1 – Iniciadores para sequenciamento na plataforma Illumina

Os produtos resultantes desse processamento foram então encaminhados para sequenciamento no equipamento *MiSeq* (Illumina, San Diego, CA, USA), instalado na *facility* de NGS do CSHL. O envio das amostras a esse laboratório se deve a características particulares aos *amplicons* gerados a partir de bibliotecas de shRNAs, e cujo sequenciamento exige adaptações no protocolo padrão de NGS da Illumina. Como esses fragmentos não possuem diversidade de sequência nas extremidades do inserto, tendo como única região variável o trecho correspondente à fita-guia do shRNA, é necessária a introdução de alguns "ciclos escuros", sem captação do sinal de fluorescência, no início da corrida – fase determinante para a

definição e ajuste da linha de base da intensidade do sinal luminoso, que será utilizada para a leitura das bases subsequentes –, permitindo assim melhorar a qualidade e o rendimento do sequenciamento. Uma vez que a *facility* de NGS do CSHL tem acesso a uma adaptação no *software* controlador do sequenciador, que permite a introdução dessa modificação, e como a Illumina não autoriza a distribuição do *software* adaptado, optou-se, assim, pelo sequenciamento no exterior.

# 3.15. Produção de vetores lentivirais

Para a integração e expressão estável dos shRNAs no genoma das células de interesse é necessária a utilização de vetores lentivirais para o transporte da biblioteca plasmidial de shRNAs (Manjunath et al., 2009). Para a produção dos lentivírus foram utilizadas as células *Platinum-E* (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), uma potente linhagem de empacotamento retroviral baseada nas células HEK 293T (Morita et al., 2000). Essas células foram transfectadas com o *pool* de plasmídeos da biblioteca de shRNAs, o material a ser encapsulado nas partículas virais, juntamente com dois plasmídeos adicionais: psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA), o plasmídeo de empacotamento que carrega os genes *gag, pol e env,* responsáveis pelas proteínas da maquinaria de replicação e componentes estruturais do vírion; e pMD2.G (Addgene), o vetor do envelope, responsável pela pseudotipagem do envelope viral com a glicoproteína VSV-G (*vesicular stomatitis virus G glycoprotein*), que confere tropismo para uma ampla variedade de espécies e tipos celulares (Cronin et al., 2005; Manjunath et al., 2009). A partir das sequências introduzidas, as células de empacotamento geram as partículas virais, que são

então recolhidas com o meio de cultivo e utilizadas para transduzir as células de interesse.

O procedimento para a transfecção das células de empacotamento e coleta das partículas virais foi conduzido do seguinte modo: as células Platinum-E foram semeadas em 10 placas de 100 mm (5 × 10<sup>6</sup> células/placa), com 10 mL de DMEM (10% de SFB, sem antibióticos) por placa, e incubadas overnight a 37°C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO2. Aproximadamente 16 horas após o plaqueamento, com as células em confluência de ~80%, foi realizada a transfecção. Em um tubo de 15 mL foram misturados 100 µg da biblioteca de shRNAs, 16,6 µg do plasmídeo psPAX2 e 13,3 µg do plasmídeo pMD2.G. Em outro tubo de 15 mL, foram adicionados 10 mL de meio Opti-MEM (Gibco) e 350 µL de polietilenimina linear (PEI, 1 mg/mL; Polysciences, Warrington, PA, USA). A seguir, a solução de PEI foi adicionada ao tubo contendo a mistura de DNA plasmidial. A nova solução foi então homogeneizada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. A solução de transfecção (PEI/DNA) foi gotejada sobre o meio de cultura de cada uma das 10 placas com as células de empacotamento (~1 mL/placa). As placas foram gentilmente agitadas para a homogeneização do meio e retornadas à incubadora. Aproximadamente oito horas após a transfecção, o meio de transfecção foi substituído por 10 mL do meio regular (DMEM com 10% de SFB, sem antibióticos). Transcorrido um período de ~12 horas, o meio de cultura foi novamente substituído, agora por volume menor (6 mL). Após mais um período de ~12 horas, foram então iniciadas as coletas dos lentivírus. O sobrenadante, contendo as partículas lentivirais, foi aspirado das placas com uma seringa de 10 mL e filtrado (em poro de 0,45 µm) para a remoção de células residuais. O filtrado das 10 placas (60 mL no total) foi coletado em dois tubos de 50 mL e armazenado a 4°C. Após a coleta, o meio de cultura nas placas foi reposto com o mesmo volume (6 mL) de meio fresco. O procedimento de remoção e filtragem do sobrenadante foi repetido para uma quantidade total de cinco coletas, realizadas em intervalos de ~12 horas. Após a última coleta todos os sobrenadantes armazenados foram reunidos em um único volume, que foi então aliquotado em tubos criogênicos de 2 mL (1,5 mL/tubo) e armazenado a ~80°C. As placas com as células de empacotamento dos lentivírus foram descontaminadas com hipoclorito de sódio a 10% e descartadas de acordo com as normas de biossegurança.

# 3.16. Eficiência de transdução

Para o sucesso de um ensaio de rastreamento de vulnerabilidades por silenciamento gênico, é fundamental que cada célula seja infectada por uma única partícula viral, de modo que o efeito fenotípico observado seja decorrente da expressão de um único shRNA. Para que isto ocorra é necessário que a transdução seja realizada em uma condição de baixa multiplicidade de infecção (MOI, *multiplicity of infection*), uma medida que representa a relação entre o número de partículas virais e o número de células-alvo (nº de vírus/nº de células). Tendo como referência a distribuição de Poisson (Tabela 1), deve ser utilizada uma faixa de MOI entre 0,1 e 0,3, ajustando os parâmetros de densidade celular e diluição viral de modo a estabelecer uma eficiência de infecção entre 10 e 30%. Para a definição desses parâmetros, foram realizados experimentos com cada uma das linhagens celulares a serem utilizadas no ensaio de silenciamento com a biblioteca de shRNAs, testando diferentes diluições dos lentivírus para uma determinada densidade de plaqueamento. Foram avaliadas as células derivadas do PDX do Paciente 08, e as linhagens tumorais pancreáticas AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2 e PANC-1 (Quadro 2).

MO	Número de Integrações								
WO	0	1	2	3	4				
0,1	0,90	0,09	0,00	0,00	0,00				
0,2	0,82	0,16	0,02	0,00	0,00				
0,3	0,74	0,22	0,03	0,00	0,00				
0,4	0,67	0,27	0,05	0,01	0,00				
0,5	0,61	0,30	0,08	0,01	0,00				
0,6	0,55	0,33	0,10	0,02	0,00				
0,7	0,50	0,35	0,12	0,03	0,00				
0,8	0,45	0,36	0,14	0,04	0,01				
0,9	0,41	0,37	0,16	0,05	0,01				
1,0	0,37	0,37	0,18	0,06	0,02				

Tabela 1 – Probabilidades para diferentes números de eventos de integração (distribuição de Poisson)

Os valores destacados em azul representam o intervalo apropriado para a multiplicidade de infecção, permitindo a integração de não mais do que uma sequência de shRNA no genoma de cada célula alvejada. Fonte: Rodriguez-Barrueco et al. (2013).

Quadro 2 – Linhagens celulares de PDA
---------------------------------------

Linhagem	Origem	Meio de Cultura	Código ATCC
AsPC-1	metástase (fluido ascítico)	RPMI-1640 (10% SFB)	ATCC CRL-1682
BxPC-3	tumor primário	RPMI-1640 (10% SFB)	ATCC CRL-1687
Capan-1	metástase (fígado)	DMEM (20% SFB)	ATCC HTB-79
MIA PaCa-2	tumor primário	DMEM (10% SFB; 2,5% SC)	ATCC CRL-1420
PANC-1	tumor primário	DMEM (10% SFB)	ATCC CRL-1469

ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA); RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium 1640; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; SFB: soro fetal bovino; SC: soro de cavalo.

Para a determinação das condições ótimas de infecção, cada linhagem foi semeada em duas placas de seis poços, com 700.000 células e 2 mL de meio de cultura em cada poço (densidade de 50-60%, assumindo uma área de ~10 cm²/poço e ~125.000 células/cm² quando em 100% de confluência). A seguir, as células foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e após ~24 horas, tempo suficiente para aderirem às placas, foram infectadas com os vetores lentivirais em seis diluições diferentes: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6. Para o preparo do meio de infecção, foram misturados, em seis tubos de 15 mL, os volumes do estoque lentiviral e de meio de cultura indicados na Tabela 2, para um volume final de 4 mL.

Diluição	Estoque lentiviral (mL)	Meio de cultura (mL)
1:1	2,00	2,00
1:2	1,33	2,67
1:3	1,00	3,00
1:4	0,80	3,20
1:5	0,67	3,33
1:6	0,57	3,43

Tabela 2 – Diluição viral para o teste de eficiência de transdução

Para auxiliar a interação da partícula viral com a membrana celular, a cada um dos tubos de diluição foram adicionados 40  $\mu$ L do polímero catiônico *Polybrene* (brometo de hexadimetrino, 1 mg/mL, Sigma-Aldrich), para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL. O meio de cultura nas placas com as células foi então removido e o conteúdo de cada tubo com o meio de infecção foi adicionado a dois poços (2 mL/poço), perfazendo duas réplicas para cada diluição testada. Na sequência, as placas foram centrifugadas a 200 × *g* por 1 hora, à temperatura ambiente, e então retornadas à incubadora. Cerca de 24 horas após a infecção, o meio de infecção foi substituído por meio fresco. Após mais um período de ~24 horas, as células em cada poço foram tripsinizadas, transferidas para tubos de 1,5 mL, centrifugadas (300 × *g*, 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de PBS com 2% de SFB e centrifugadas novamente. A seguir, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS com 2% de SFB e encaminhadas para análise por citometria de fluxo (*BD FACSCanto II e BD FACSAria II*, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Para cada amostra foram analisados 10.000 eventos, e a eficiência de transdução proporcionada por cada diluição viral foi determinada pela porcentagem de células com expressão positiva da proteína ZsGreen.

# 3.17. Teste de sobrevivência à Geneticina

Para determinar a concentração de Geneticina (Gibco) apropriada para a seleção de células com expressão positiva dos shRNAs, e eliminação daquelas não transduzidas pelos vetores lentivirais, foi avaliada a faixa de concentração de 200-2200 µg/mL (0,4 a 4,4 mM), incluindo um controle não tratado. A concentração de seleção foi definida para cada linhagem celular a ser utilizada no ensaio de silenciamento com a biblioteca de shRNAs, usando como diluente da droga o meio de cultura próprio a cada uma delas. Para esse teste, as células foram semeadas em uma placa de 12 poços (100.000 células/poço), em meio de cultura sem antibióticos, e mantidas em condições padrão de crescimento (37°C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>) até atingirem a confluência de 60-80%. Neste ponto, o meio de cultura foi substituído por meio fresco, contendo concentrações (µg/mL) crescentes do antibiótico, conforme o esquema a seguir:

79



As células foram assim cultivadas por seis dias, sendo o meio cultura renovado a cada dois ou três dias, adicionado do antibiótico na concentração testada. Ao fim do período de cultivo, por meio da análise visual da viabilidade celular, foi determinada a concentração de trabalho para cada linhagem celular, selecionando a menor dose de Geneticina capaz de eliminar a totalidade das células.

#### 3.18. Triagem de alvos epigenéticos em células de PDAC

O ensaio de silenciamento gênico para a identificação de vulnerabilidades moleculares no PDAC foi realizado com as linhagens tumorais pancreáticas AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1 (Quadro 2), utilizando como referência protocolos de análise em larga-escala com RNAi (Sims et al., 2011; Zuber et al., 2011; Rodriguez-Barrueco et al., 2013; Shain et al., 2013; Yu et al., 2013). O diagrama a seguir (Figura 9) sumariza a estratégia utilizada neste trabalho.



# Figura 9 – Estratégia experimental para a triagem de alvos epigenéticos com a biblioteca lentiviral de shRNAs

A biblioteca lentiviral de shRNAs é utilizada para infectar a linhagens alvo com uma baixa multiplicidade de infecção (~0,3 integração/célula), de modo que cada célula contenha um único shRNA, portanto inibindo a expressão de um único gene. Após a infecção, um agente de seleção é adicionado ao meio de cultura para eliminar as células não transduzidas pelas partículas virais. Ao término da seleção, uma fração das células sobreviventes é coletada, estabelecendo o ponto inicial (dia 0) do screening. As células remanescentes são então cultivadas por um período cuja extensão varia para cada linhagem testada, mas que deve ser suficiente para no mínimo 10 duplicações populacionais. Ao final desta etapa de crescimento competitivo (dia N), as células são coletadas, estabelecindo o segundo ponto de comparação do *screening*. O DNA genômico é isolado das células coletadas nois dois pontos e usado como *template* para a amplificação por PCR dos shRNAs da biblioteca. Para a deconvolução da representação dos shRNAs nos dois *pools* (dia N *vs.* dia 0), os produtos dessa reação são sequenciados (NGS), e as sequências dos shRNAs são contadas para identificar aqueles que sofreram depleção ou enriquecimento. Fonte: adaptado de Shain et al. (2013).

Para cada linhagem celular foram avaliadas duas réplicas, geradas e processadas de modo independente em todas as etapas do experimento. Para a

constituição de cada réplica foram semeadas quatro placas de seis poços. Assumindo uma eficiência de infecção em torno de 30% e um pool de cerca de 5000 shRNAs, foram plaqueadas nos 24 poços de cada réplica um total de 16,8 × 10<sup>6</sup> células (700.000 células/poço), de modo a obter ao menos 5  $\times$  10<sup>6</sup> células transduzidas, número suficiente para garantir uma representação consistente da biblioteca, com pelo menos 1000 células expressando cada um dos shRNAs, bem como para mitigar potenciais artefatos provenientes de sítios de integração específicos ou de integrações múltiplas. A seguir, as células foram colocadas em incubação (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e, ~24 horas após o plaqueamento, foram infectadas com os lentivírus vetores da biblioteca. Como mencionado anteriormente, a infecção de uma única partícula viral por célula é crítica para a deconvolução do fenótipo resultante. Assim, para evitar múltiplos eventos de integração em cada célula-alvo, as culturas foram infectadas com baixa eficiência (~30%), de modo que cada célula fosse transduzida por apenas uma partícula viral e expressasse, portanto, a seguência de um único shRNA. Para o preparo da solução de infecção aplicada a cada réplica, em um tubo de 50 mL, o estoque lentiviral foi diluído com o meio de cultura padrão da linhagem-alvo, utilizando proporções previamente definidas nos testes de eficiência de transdução, para um volume final de 48 mL (Tabela 3).

Linhagem	Diluição	Estoque lentiviral (mL)	Meio de cultura (mL)
AsPC-1	1:5	8	40
MIA Paca-2	1:2	16	32
PANC-1	1:2	16	32

Tabela 3 – Diluição do meio de infecção para as linhagens tumorais pancreáticas

À mistura no tubo foram acrescentados 480 µL de Polybrene (brometo de hexadimetrino, 1 mg/mL, Sigma-Aldrich), para uma concentração final de 10 µg/mL. O meio de cultura das placas com as células aderentes foi então removido e 2 mL do meio de infecção foram adicionados a cada um dos 24 poços. A seguir, as placas foram centrifugadas a 200  $\times$  g por 1 hora, à temperatura ambiente, e então retornadas à incubadora. Após ~24 horas, as células nas quatro placas de cada réplica foram tripsinizadas (tripsina/EDTA 0,25%; Vitrocell), reunidas em uma única suspensão e replaqueadas em múltiplas placas de 100 mm (6 placas/réplica para AsPC-1 e 12 placas/réplica para MIA PaCa-2 e PANC-1), com 10 mL de meio por placa e em densidade de ~40%. Após mais um período de ~24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio suplementado com Geneticina (Gibco), em concentrações previamente determinadas (1000 µg/mL para AsPC-1 e PANC-1, e 600 µg/mL para MIA PaCa-2) para a seleção positiva das células eficientemente transduzidas, isto é, das células que integraram o cassete de expressão do vetor pLMN, contendo a sequência de resistência à neomicina (Neo<sup>R</sup>). As culturas foram mantidas sob pressão seletiva durante seis dias (com renovação do meio de seleção no terceiro dia), até que todas as células não infectadas fossem eliminadas. Para cada linhagem, uma placa com células não infectadas foi tratada com o antibiótico, na concentração de seleção, e utilizada como referência para avaliar a mortalidade celular. Após o período de seleção, as células sobreviventes foram tripsinizadas, reagrupadas e quantificadas em hemocitômetro. Uma parcela da suspensão, contendo ~50 × 10<sup>6</sup> células, foi centrifugada a 300 × g por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 10 mL de PBS, aliquotadas em 10 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (1 mL com ~5 × 106 células por tubo, número mínimo para manter a representação dos shRNAs da biblioteca) e novamente centrifugadas (300  $\times$  g, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e os pellets armazenados a -80°C para a posterior extração do DNA genômico. Essas células representam a população inicial (PI) ou tempo zero (T0) do screening, referência para a análise de representação (enriquecimento/depleção) dos shRNAs ao final do ensaio. O restante das células selecionadas por Geneticina (~20 × 10<sup>6</sup> células), em número superior ao mínimo necessário para manter a representação da biblioteca (5 × 10<sup>6</sup> células, 1000 células/shRNA), foi centrifugado a 300  $\times$  g por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio de cultura. Essas células foram então semeadas em cinco placas de 100 mm, com 10 mL de meio por placa e em densidade de ~40%, e mantidas em cultura para um período de crescimento competitivo, definido para o tempo de 12 duplicações populacionais. Esse período foi de 24 dias para AsPC-1 e 12 dias para MIA PaCa-2 e PANC-1 (Figura 10). Para evitar o ressurgimento de células não transduzidas, as culturas foram mantidas sob pressão seletiva com Geneticina, em dose equivalente a 50% da concentração utilizada para a seleção inicial, e o meio de cultura renovado a cada três dias. Ao longo do período de cultivo, as células foram mantidas sempre subconfluentes, sendo subcultivadas a cada três (MIA PaCa-2 e PANC-1) ou seis dias (AsPC-1), quando em confluência de 70-80%. Em cada passagem, parte das células foi peletizada e congelada, e o restante replaqueado, seguindo os mesmos procedimentos utilizados em T0 e mantendo a representação mínima da biblioteca (1000 células/shRNA) tanto nos pellets quanto nas células mantidas em cultura. Ao final do período de crescimento, todas as células em cada réplica foram coletadas e congeladas, conforme o procedimento descrito acima.



# Figura 10 – Sequência temporal das etapas do ensaio de silenciamento

P: plaqueamento (placa de seis poços), I: infecção, R: replaqueamento (placa de 100 mm), G418: Geneticina, TD: tempo de dobramento, DP: duplicação populacional, PI: população inicial (T0), PF: população final.

#### 3.19. Sequenciamento dos shRNAs

A identificação de shRNAs com efeito negativo sobre as células de PDAC foi realizada pela análise da variação da representação de cada shRNA na população celular ao final do período de cultura (PF), em relação ao ponto inicial (PI), a fim de detectar desvios de proporção significativa (shRNAs que silenciam genes essenciais têm sua representação diminuída ao longo do período de cultura, devido à perda de viabilidade da célula alvejada). representação relativa (depleção А ou enriquecimento) das sequências dos diferentes shRNAs integradas ao genoma das células-alvo foi determinada por sequenciamento de alta capacidade. Para essa análise, o DNA genômico foi extraído dos *pellets* celulares congelados, utilizando um kit de purificação de DNA em minicoluna (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen), de acordo

com as instruções do fabricante, e quantificado por fluorimetria (Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen; Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen). As sequências dos shRNAs integradas ao DNA genômico foram recuperadas por PCR, utilizando iniciadores para as regiões flanqueadoras dos shRNAs no cassete de expressão do vetor pLMN (Mir5-F: 5'-CAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAAC-3'; PGKpro-R: 5'-CTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC-3'; Exxtend). Esses iniciadores geram produtos de 366 pb e são específicos para as sequências do miR-30 transduzidas, não atuando sobre o miR-30 endógeno das células-alvo. Para manter a representação inicial de cada shRNA da biblioteca, foram realizadas 13 reações em paralelo para cada réplica do screening, utilizando um total de ~30 µg de DNA, equivalente ao conteúdo genômico de 5 x 10<sup>6</sup> células (~6 pg de DNA/célula). Para cada reação de amplificação, em um volume final 50 µL, foram utilizados 10 µL de 5x SuperFi Buffer (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Promega), 4 µL de DMSO (Sigma-Aldrich), 2,5 µL do primer Mir5-F 10 µM, 2,5 µL do primer PGKpro-R 10 µM, 1 U (0,5 μL) de Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) e ~2 μg (em 29,5 μL de água) de gDNA. As condições de reação foram: 98°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 35 s, 55°C por 35 s, 72°C por 35 s; 72°C por 5 min. O produto das reações paralelas foi combinado e uma alíquota de 100 µL foi purificada em minicoluna (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, sendo ao final o DNA eluído em 30 µL de água. Após quantificação fluorimétrica, esses amplicons foram utilizados em uma segunda PCR, com iniciadores que introduzem as sequências dos adaptadores (P5 e P7) e índices (1 a 12) para sequenciamento na plataforma Illumina (Quadro 3), e que geram fragmentos de 375 pb. Foram realizadas três repetições para cada amostra, com um total de 300 ng de DNA. Para cada reação, em volume de 50 µL, foram utilizados

24,5 µL de água livre de nucleases (Ambion), 10 µL de 5× SuperFi Buffer (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Promega), 4 µL de DMSO (Sigma-Aldrich), 2,5 µL do primer P5+mir30Loop-F 10 µM (Exxtend), 2,5 µL do primer P7+Index+PGKpro-R 10 µM (Exxtend), 1 U (0,5 µL) de Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) e 100 ng (em 5 µL) do produto purificado da primeira PCR. As condições de termociclagem foram: 98°C por 5 min; 20 ciclos de 94°C por 35 s, 52°C por 35 s, 72°C por 35 s; 72°C por 5 min. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 2%, com as bandas correspondentes ao tamanho esperado para os fragmentos (375 pb) sendo excisadas. O DNA em cada banda foi recuperado por meio de um kit de extração de DNA em gel (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), de acordo com as instruções do fornecedor, e eluído em 30 µL de água. Os volumes correspondentes às três repetições de cada amostra foram combinados e o DNA quantificado em fluorímetro. Por fim, as 12 bibliotecas de amplicons das sequências dos shRNAs (3 linhagens celulares x 2 réplicas x 2 pontos de tempo) foram encaminhadas para sequenciamento no equipamento NextSeq (Illumina), instalado na facility de NGS do CSHL. Conforme detalhado na seção 3.14, o envio das amostras ao CSHL deve-se à necessidade de adaptações no protocolo da corrida de sequenciamento, às quais somente esse laboratório está habilitado a proceder.

Iniciador	Sequência (5'–3')
P5_Ext3_N6_mir30Loop-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACTCTTTC CCTACACGACGCTCTTCCGATCNNNNNN <u>TAGTGAAGCC</u> <u>ACAGATGTA</u>
P7_Index1_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC
P7_Index2_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>ACATCG</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index3_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>GCCTAA</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index4_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC
P7_Index5_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>CACTGT</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index6_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC
P7_Index7_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>GATCTG</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index8_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAGTGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC
P7_Index9_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>CTGATC</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index10_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCTAGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC
P7_Index11_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <mark>GTAGCC</mark> GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> <u>CATGCTCCAGACTGC</u>
P7_Index12_Truseq_N2_PGKpro-R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN <u>CTGCTAAAGCG</u> CATGCTCCAGACTGC

Quadro 3 - Iniciadores para sequenciamento na plataforma Illumina

# 4. RESULTADOS

# 4.1. Estabelecimento de modelos de PDAC in vivo e in vitro

# 4.1.1. Geração de xenotransplantes

De fevereiro de 2015 a outubro de 2017, foram coletadas amostras de 18 pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático, 16 provenientes de tumores primários e duas de metástases hepáticas. A maior parte das amostras (dois terços) foi obtida de pacientes do sexo feminino. A idade dos doadores variou de 44 a 83 anos, com a maioria (89%) acima de 60 (Figura 11 e Quadro 4).





Paciente	Sexo	Idade	Tipo de Tumor
P01	М	83	metástase hepática
P02	F	62	tumor primário
P03	F	44	metástase hepática
P04	F	67	tumor primário
P05	F	69	tumor primário
P06*	F	71	tumor primário
P07	Μ	73	tumor primário
P08	F	74	tumor primário
P09	Μ	61	tumor primário
P10	F	64	tumor primário
P11	F	74	tumor primário
P12	Μ	45	tumor primário
P13	F	69	tumor primário
P14	Μ	68	tumor primário
P15	F	78	tumor primário
P16	F	67	tumor primário
P17	Μ	67	tumor primário
P18	F	80	tumor primário

Quadro 4 – Amostras de PDAC coletadas para a geração de PDXs

\*Amostra não transplantada

Dezessete das 18 amostras coletadas foram implantadas subcutaneamente em camundongos *nude*. Para aumentar as chances de sucesso dos enxertos, foram transplantados múltiplos receptores (três animais, em geral) para cada amostra. Sete dos tumores transplantados cresceram nos camundongos receptores, representando uma taxa de sucesso de 41% (7/17). Todas as amostras expandidas foram derivadas de tumores primários. O tempo decorrido para a formação de nódulos palpáveis variou de dois a quatro meses, aproximadamente, entre as amostras

avaliadas. Os PDXs estabelecidos estão sendo mantidos por passagens sucessivas em novos camundongos receptores, já alcançando a geração F11 para duas das amostras expandidas. Houve um substancial aumento na eficiência dos enxertos após a geração F1, com taxas de sucesso de 100% sendo frequentemente observadas (Tabela 4), ao passo que o tempo para a formação dos nódulos foi reduzido.

Tabela 4 – Taxas de sucesso (%) para cada PDX nas sucessivas gerações de animais receptores

Paciente	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
P02	50	67	67	83	40	100	80	100			
P04	100	67	44	89	93	100	100	100			
P07	67	33	100	100	83	89	100	100	100	100	100
P08	33	67	100	63	100	100	100	100	100	100	100
P09	67	100	83	80	43	83	100				
P12	67	100	100	88	100	100	100	75			
P17	50	100									

#### 4.1.2. Características histológicas dos PDXs

O grau de diferenciação histológica e as características estromais foram examinados em seis dos sete PDXs estabelecidos. O *status* histopatológico dos xenotumores variou de pouco diferenciado a bem diferenciado, sendo a maioria classificada como carcinoma moderadamente diferenciado (Figura 12). Em números, um PDX foi classificado como pouco diferenciado (Paciente 12), quatro como moderadamente diferenciados (Pacientes 02, 04, 07 e 08), e um como bem diferenciado (Paciente 09). De modo geral, os xenotumores exibiram elevado conteúdo desmoplásico (Figura 12), uma característica semelhante ao padrão

observado em humanos. Nos casos em que a comparação foi possível, houve razoável concordância do perfil histológico dos tumores originais com o de seus PDXs correspondentes (Tabela 5).



# Figura 12 – Caracterização histológica dos PDXs

O exame de cortes histológicos (H&E) obtidos a partir de amostras dos xenotumores indicou que estes retêm o perfil histológico característico de tumores humanos, com a formação de ductos e a presença de abundante estroma peritumoral. O *status* de diferenciação dos PDXs foi classificado como moderamente diferenciado para os Pacientes 02, 04, 07 e 08, bem diferenciado para o Paciente 09 e pouco diferenciado para o Paciente 12. A identificação de cada paciente e o número da passagem dos PDXs analisados estão indicados. Aumento: 200x.

Paciente	Tumor original	PDX
P02	ND	moderadamente diferenciado
P04	ND	moderadamente diferenciado
P07	moderadamente diferenciado	moderadamente diferenciado
P08	moderadamente diferenciado	moderadamente diferenciado
P09	moderadamente diferenciado	bem diferenciado
P12	pouco diferenciado	pouco diferenciado
P17	moderadamente diferenciado	ND

Tabela 5 - Comparação entre a histologia dos PDXs e a dos tumores originais

ND: não disponível

#### 4.1.3. Culturas celulares derivadas dos PDXs

Foram efetuadas tentativas de cultivo celular em monocamada com tecido oriundo de seis dos sete xenotransplantes estabelecidos nos camundongos *nude*. Não houve sucesso no cultivo de espécimes derivados dos Pacientes 02 e 04, uma vez que as células foram incapazes de aderir com eficiência ao substrato plástico. Por sua vez, as células dissociadas dos PDXs dos pacientes 07, 08, 09 e 12 se adaptaram bem ao ambiente *in vitro*, nas condições de crescimento utilizadas, e colônias aderentes formaram-se pouco tempo após o plaqueamento (Figura 13). No entanto, ao longo das semanas subsequentes, o crescimento de fibroblastos contaminantes superou progressivamente o desenvolvimento das células tumorais, ao final tomando toda a área das placas de cultura (Figura 13).

Após numerosas tentativas, uma linhagem celular foi gerada com sucesso a partir de um xenotumor do Paciente 08, na geração F6. As células derivadas exibiam a morfologia característica de células epiteliais, com a formação de colônias compactas (Figura 14), e foram subcultivadas somente após o desaparecimento completo dos fibroblastos. Essa linhagem celular foi mantida inicialmente em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro e fatores de crescimento (EGF e toxina colérica) e, após cinco passagens, passou a receber meio de cultura padrão (RPMI-1640 com 10% de soro). As células foram cultivadas por nove passagens sem qualquer sinal de senescência.



# Figura 13 – Culturas celulares derivadas dos PDXs

Tentantivas de cultivo em monocamada foram realizadas com tecido dissecado dos xenotumores. As células dos PDXs dos Pacientes 02 e 04 se mostraram refratárias à cultura *in vitro*, com baixa capacidade de adesão à superfície de crescimento. As células dos xenotumores dos Pacientes 07, 08, 09 e 12 aderiram eficientemente ao plástico, porém, contaminações microbiológicas e, principalmente, o crescimento acelerado de fibroblastos prejudicaram o desenvolvimento das células tumorais. Os PDXs do Paciente 17 ainda não foram testados em cultura. Aumento: 100x.

Figura 14 – Linhagem celular de câncer pancreático estabelecida a partir de um PDX



Uma linhagem celular pura e estável foi gerada a partir de um xenotumor F6 derivado da amostra do Paciente 08. As células aderentes exibiram a morfologia epitelióide típica das células de carcinoma e gradualmente suplantaram o crescimento dos fibroblastos contaminantes ao longo do período de cultura. Essas células foram periodicamente subcultivadas, mantendo suas características básicas inalteradas. As fotomicrografias mostram as células antes do subcultivo (P0), ainda na presença de fibroblastos, e na quarta passagem (P4), já livres da contaminação. Aumento: 100x.

#### 4.1.4. Validação in vitro da linhagem celular derivada de PDX

A linhagem celular derivada do PDX do Paciente 08 foi validada quanto a sua origem humana e ausência de contaminação cruzada com células de camundongo. O DNA isolado de células cultivadas nas passagens 2 e 5 foi testado por PCR com iniciadores para o gene humano da tubulina (*TUBA1C*) e para o homólogo murino da enzima hidroximetilbilano sintase (*Hmbs*). Nas duas amostras analisadas, a presença de DNA humano foi confirmada, não sendo, por outro lado, detectado nenhum vestígio de material genético de camundongo. Esse resultado demonstra a obtenção de uma linhagem pura de células de PDAC, desde as primeiras passagens em cultura (Figura 15).



Figura 15 – Teste de contaminação cruzada

As células derivadas do xenotumor do Paciente 08 foram testadas para contaminação cruzada com células murinas. A análise por PCR para o gene da tubulina humana (241 pb) e para o gene da hidroximetilbilano sintase de camundongo (461 pb), usando DNA isolado das células nas passagens 2 (P2) e 5 (P5), confirmou sua origem humana assim como a ausência de células do animal receptor na cultura testada, em ambas as passagens. O DNA para o controle positivo, murino e humano, foi obtido das linhagens tumorais UN-KC-6141 e MIA PaCa-2, respectivamente. NTC (*no template control*): reação controle sem DNA.

O mesmo material genético isolado para o teste de contaminação cruzada foi examinado para a presença de contaminação por micoplasma na linhagem celular recém-gerada. A análise por PCR, utilizando como alvo o gene do rRNA 16S de *Mycoplasma* sp., mostrou que a nova linhagem está livre da infecção por esse microrganismo (Figura 16).



Figura 16 – Teste de contaminação por micoplasma

As células derivadas do xenotumor do Paciente 08 foram testadas por PCR para infecção por micoplasma, utilizando como marcador o gene do RNA ribossomal 16S (462 pb). Somente material genético humano foi detectado nas células, tanto na passagem 2 como na passagem 5. Os controles foram proporcionados pelo DNA de células livres de contaminação (PANC-1) ou contaminadas (HeLa) com micoplasma. Reações tendo como alvo a tubulina foram realizadas para atestar a origem humana do DNA examinado, tanto nas amostras testadas como nos controles positivo e negativo. NTC (*no template control*): reação controle sem DNA.

A cinética de crescimento das células derivadas do PDX do Paciente 08 foi avaliada por meio de uma curva de crescimento e comparada à de outras linhagens celulares de câncer pancreático (AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1). O tempo para a duplicação populacional (TD) das células do Paciente 08 na fase de crescimento exponencial foi de aproximadamente 48 horas, um padrão de proliferação semelhante ao registrado para a linhagem AsPC-1, porém notadamente mais lento quando comparado ao de outras duas linhagens, MIA PaCa-2 e PANC-1, ambas com TD em torno de 24 horas (Figura 17). Por outro lado, quando avaliados os números para a densidade de saturação (DS), os resultados aferidos para a linhagem derivada do Paciente 08 (4 × 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>) e para AsPC-1 (5,9 × 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>) apresentaram menor similaridade, com valores de DS mais próximos sendo verificados na comparação com MIA PaCa-2 (3 × 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>) e PANC-1 (4,8 × 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>).



Figura 17 – Cinética de crescimento da linhagem celular derivada de PDX

A proliferação das células derivadas do xenotumor do Paciente 08 foi avaliada durante 18 dias e uma curva de crescimento foi gerada. Os parâmetros de crescimento estimados foram comparados àqueles das linhagens tumorais pancreáticas AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1. O tempo de dobramento (TD) populacional das células do Paciente 08 foi estimado no valor aproximado de 48 horas, análogo ao de AsPC-1 e maior que o das células MIA PaCa-2 e PANC-1 (para ambas em torno de 24 horas), conforme determinado por suas respectivas curvas de crescimento. Os valores aproximados para a densidade de saturação (DS) foram (em células/cm<sup>2</sup>): 4 × 10<sup>5</sup> para as células do Paciente 08, 5,9 × 10<sup>5</sup> para AsPC-1, 3 × 10<sup>5</sup> para MIA PaCa-2, e 4,8 × 10<sup>5</sup> para PANC-1. Os valores indicados nas curvas, em cada ponto de contagem, representam a média de duas réplicas.

#### 4.1.5. Validação in vivo da linhagem celular derivada de PDX

O potencial tumorigênico da linhagem celular recém-gerada foi avaliado por meio de sua inoculação no espaço subcutâneo de três camundongos *nude*. A eficiência de tumorigênese verificada foi de 100%, com o inóculo inicial (2 × 10<sup>6</sup> células) induzindo o desenvolvimento de nódulos palpáveis em todos os animais receptores, em um intervalo de aproximadamente duas semanas. As medidas de progressão do crescimento tumoral, realizadas 30 e 60 dias após a inoculação, registaram volumes tumorais médios de 76,2 mm<sup>3</sup> e 388,5 mm<sup>3</sup>, respectivamente, indicando um aumento aproximado de cinco vezes no intervalo entre as avaliações (Figura 18).



Figura 18 – Teste de tumorigênese

O potencial tumorigênico das células derivadas do xenotumor do Paciente 08 foi confirmado após injeção subcutânea ( $2 \times 10^6$  células) em camundongos *nude* (n = 3). As células induziram a formação de tumores em todos os animais, com volume médio crescente, avaliado 30 (76,2 mm<sup>3</sup>) e 60 dias (388,5 mm<sup>3</sup>, aumento de 5x) após a inoculação.

A análise histológica de um desses tumores revelou um grau de diferenciação moderado, evidenciando assim a manutenção do perfil observado tanto no PDX como no tumor original do Paciente 08 (Figura 19).

Figura 19 – Histologia de tumor gerado pelas células derivadas de PDX



A inoculação das células derivadas do PDX do Paciente 08 em camundongos imunodeficientes produziu tumores (CDXs, *cell line-derived tumor xenografts*) com perfil histológico moderamente diferenciado, o mesmo apresentado pelo PDX e pelo tumor original (não mostrado) do Paciente 08. Coloração: H&E. Aumento: 200×.

# 4.2. Padronização da metodologia e rastreamento de alvos epigenéticos no PDAC

# 4.2.1. Amplificação e validação da biblioteca de shRNAs

Para a geração de material suficiente para os experimentos planejados e para um estoque permanente da biblioteca de shRNAs contra reguladores epigenéticos, foi realizada a amplificação dos plasmídeos vetores. Nesse procedimento, 200 ng de DNA plasmidial, retirados da alíquota original, foram introduzidos e multiplicados em bactérias *E. coli*, gerando ao final um rendimento aproximado de 1,1 mg de DNA. Esse material foi dividido em alíquotas e armazenado. Após o procedimento de amplificação, foi realizada a checagem da integridade dos plasmídeos da biblioteca, de modo a identificar eventual perda de sequências ou eventos de recombinação. Alíquotas das duas bibliotecas (original e amplificada) foram submetidas à digestão com endonucleases de restrição (*BgI*II e *Nde*I) e os fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Na comparação do padrão de bandas gerado após a separação eletroforética, foi constatado um perfil idêntico para as duas bibliotecas, e igualmente em conformidade com o mapa de restrição do vetor pLMN (Figura 20). Esse resultado demonstra que o processo de amplificação não resultou em qualquer alteração na estrutura dos plasmídeos vetores na nova biblioteca.



Figura 20 – Digestão endonucleolítica dos plasmídeos da biblioteca de shRNAs

A integridade dos plasmídeos vetores da biblioteca de shRNAs após o procedimento de amplificação foi checada por digestão com as enzimas de restrição *Bg/*II e *Nde*I. (A) Posição dos sítios de restrição das enzimas *Bg/*II e *Nde*I no vetor pLMN. (B) Padrão de bandas de alíquotas digeridas da biblioteca original e da biblioteca amplificada. O tamanho dos fragmentos gerados após a digestão foi idêntico para as duas bibliotecas, indicando que o procedimento de amplificação não resultou em qualquer alteração na estrutura dos plasmídeos. *Uncut*: reação controle sem enzima (plasmídeo superenrolado).

Para verificar se a representação de cada shRNA na nova biblioteca é equivalente àquela encontrada na biblioteca original, e identificar eventuais desvios surgidos após o processo de amplificação, foi efetuada uma análise por sequenciamento de alta capacidade de ambas as bibliotecas. Inicialmente, as sequências dos shRNAs inseridas no vetor pLMN foram amplificadas por 20 ciclos de PCR, utilizando uma polimerase de alta fidelidade e iniciadores complementares às sequências que flanqueiam os shRNAs (Figura 21). Os *amplicons* gerados foram em seguida utilizados em uma segunda rodada de amplificação por 20 ciclos de PCR, com iniciadores que introduzem os adaptadores (P5 e P7) e índices para sequenciamento na plataforma Illumina (Figura 21).

Figura 21 – Geração de biblioteca de *amplicons* de shRNAs para análise por sequenciamento



As bibliotecas de *amplicons* para a análise de sequenciamento foram geradas por duas reações consecutivas de PCR. Na parte superior da figura estão representados os sítios de anelamento dos iniciadores para as duas amplificações. No gel à direita, os retângulos amarelos indicam as bandas purificadas para a recuperação dos fragmentos para o sequenciamento. NTC: *no template control*.

Os produtos dessa reação foram então sequenciados em duas corridas no equipamento *MiSeq* (Illumina), gerando 17,6 milhões de *reads* para a biblioteca amplificada e 11,7 milhões para a biblioteca original, com excelente qualidade técnica (qualidade média ≥Q30 (i.e., acurácia ≥99,9%) apresentada por mais de 96 e 98% das bases sequenciadas em cada corrida, respectivamente). Por meio de ferramentas de análise bioinformática, os *reads* obtidos foram alinhados com a sequência da fita-guia de cada um dos 4492 shRNAs listados na biblioteca, sendo então determinado o número de *reads* para cada shRNA, tanto na amostra original como na amplificada. Em média, 67% dos *reads* gerados (8 milhões da biblioteca original e 11 milhões da biblioteca amplificada) apresentaram alinhamento perfeito (sem *mismatches*) com as sequências de referência.

Na análise da representação dos shRNAs na biblioteca original e na biblioteca amplificada, foi observada uma alta correlação ( $R^2 = 0,9969$ ) entre a abundância relativa dos shRNAs em ambas as bibliotecas (Figura 22). A maior parte dos shRNAs esperados para compor a biblioteca foi detectada por ao menos um *read*, tanto na amostra original (3928/4492, 87%) como na amplificada (4095/4492, 91%), com uma proporção semelhante de shRNAs identificados em diferentes faixas de detecção (Tabela 6). Em ambas as bibliotecas, aproximadamente 70% dos shRNAs foram detectados por mais de 500 *reads* (Tabela 6). Além de uma distribuição numérica semelhante, foi observada também uma alta sobreposição entre os shRNAs detectados em ambas as bibliotecas, em diferentes faixas de detecção (Tabela 7).



Figura 22 – Abundância dos shRNAs nas bibliotecas original e amplificada

As sequências (*reads*) obtidas em cada biblioteca foram alinhadas com a lista de referência dos shRNAs para a determinação de sua quantidade, e os valores obtidos foram utilizados para a construção de um gráfico de dispersão mostrando a abundância de cada um dos 4492 shRNAs nas bibliotecas original e amplificada. Uma alta correlação ( $R^2 \approx 1$ ) da representação relativa dos shRNAs foi verificada entre as duas bibliotecas.

Número de reade	Origi	inal	Amplificada		
Numero de reads	n⁰ de shRNAs	% do total	n⁰ de shRNAs	% do total	
0	564	13	397	9	
1–10	509	11	649	14	
11–50	80	2	88	2	
51–100	21	0	32	1	
101–500	389	9	168	4	
501-1000	1212	27	678	15	
>1000	1717	38	2480	55	
Total	4492	100	4492	100	
Detectados (≥1)	3928	87	4095	91	

Tabela 6 – Distribuição dos shRNAs em função do número de reads detectados

Tabela 7 – Sobreposição e exclusividade dos shRNAs em diferentes f	aixas	de
detecção		

Número de <i>reads</i>	shRNAs detectados nas duas bibliotecas	shRNAs detectados apenas na original	shRNAs detectados apenas na amplificada
0	255	309	142
≥10	1045	28	1
≥100	3319	0	9
≥500	2931	0	228
≥1000	1718	0	763

A análise da representação dos shRNAs com função de controle positivo (*RPL7*, *U2AF1*, *EIF5B*, *NHP2L1* e *RPS3A*) ou negativo (*Renilla* luciferase) mostrou uma distribuição bastante similar nas duas bibliotecas, com a maioria destes shRNAs (14/20) sendo detectada, em ambas, por mais de 700 *reads* (Tabela 8).

shRNA	Controle	Original	Amplificada
RPL7.207	Positivo	1088	1076
RPL7.28	Positivo	1	1
RPL7.380	Positivo	725	735
RPL7.620	Positivo	1328	1470
RPL7.670	Positivo	1427	1721
RPL7.746	Positivo	1139	1358
U2AF1.118	Positivo	1	0
U2AF1.130	Positivo	1420	1685
U2AF1.252	Positivo	0	0
U2AF1.597	Positivo	1200	1157
U2AF1.860	Positivo	1057	1244
EIF5B.1551	Positivo	1457	1551
EIF5B.2167	Positivo	1	0
EIF5B.2432	Positivo	0	2
EIF5B.3090	Positivo	1	1
EIF5B.3643	Positivo	936	1057
EIF5B.521	Positivo	1530	1548
NHP2L1.432	Positivo	2006	3101
RPS3A.827	Positivo	1476	1516
Rluc.713	Negativo	5019	7447

Tabela 8 – Número de reads para shRNAs controle

Para verificar o número de genes interrogado pelos 4492 shRNAs da biblioteca, foi realizada uma reanotação com as sequências de 22 nucleotídeos correspondentes a esses shRNAs, por meio de seu alinhamento com uma das anotações mais recentes do catálogo de genes humanos (GENCODE, versão 22). Os resultados mostraram que transcritos provenientes de um total de 398 loci gênicos são alvejados pela biblioteca, número superior ao descrito na anotação original (~350 genes). Essa discrepância reflete o fato de que alguns shRNAs são atribuídos, nesta nova anotação, a genes parálogos, incluindo pseudogenes. Cabe destacar que a quase totalidade (97,7%) dos 398 genes interrogados possuem shRNAs detectados por 500 ou mais *reads* na biblioteca amplificada (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de shRNAs e genes correspondentes alvejados pela biblioteca amplificada

Número de <i>reads</i>	Número de shRNAs	Número de genes	% do total de 398 alvos
≥100	3319	393	98,7
≥500	3150	389	97,7
≥1000	2474	378	95,0

Na aferição do número de shRNAs para cada gene-alvo na biblioteca amplificada, bem como de sua distribuição em diferentes faixas de detecção, foi observado que cerca de 85% dos genes de interesse são alvejados por ao menos três shRNAs, detectados por 1000 ou mais *reads* (Figura 23).



Figura 23 – Distribuição dos genes-alvo em função do número de shRNAs/gene em diferentes faixas de detecção na biblioteca amplificada

O eixo y principal (à esquerda) e as barras indicam o número de genes alvejados por 1 até 17 shRNAs distintos. O eixo y secundário (à direita) e as curvas indicam a porcentagem cumulativa de genes-alvo em função do número de shRNAs/gene.

Em resumo, os resultados obtidos a partir da análise de sequenciamento mostraram que a biblioteca amplificada (1) manteve a representação de shRNAs semelhante à existente na biblioteca original, (2) é capaz de alvejar a quase totalidade dos genes interrogados e (3) que a maior parte dos genes alvejados possui ao menos três shRNAs presentes em quantidade suficiente para permitir a detecção de alterações de representação com significância estatística em um ensaio de silenciamento. Estes resultados permitem concluir que a biblioteca produzida apresenta-se em condições adequadas para a realização de experimentos para a maquinaria epigenética triagem de genes da que possam representar vulnerabilidades na célula tumoral.

# 4.2.2. Produção de vetores lentivirais e determinação das condições de transdução

Previamente à realização da triagem com a biblioteca de shRNAs para a identificação de vulnerabilidades moleculares em células de PDAC, foi efetuada uma série de experimentos para a produção de vetores virais e a definição de parâmetros essenciais para o sucesso do ensaio de silenciamento. Essa preparação consistiu (1) no empacotamento dos plasmídeos da biblioteca em partículas lentivirais, (2) na realização de testes de eficiência de transdução com esses vetores, a fim de definir valores de multiplicidade de infecção que favorecessem eventos de integração únicos em cada célula hospedeira e (3) na titulação do agente de seleção (Geneticina) para a determinação das doses mínimas necessárias para a eliminação de células não transduzidas.

Para a produção dos vetores lentivirais, células de empacotamento retroviral (*Platinum-E*) foram transfectadas com a biblioteca plasmidial de shRNAs, juntamente com um plasmídeo de empacotamento (psPAX2), que expressa as proteínas estruturais dos lentivírus (*gag, pol e env*), e um plasmídeo de pseudotipagem do envelope viral (pMD2.G), que expressa a glicoproteína VSV-G, necessária para potencializar a capacidade de infecção desses vírus. Após a transfecção, as células de empacotamento foram incubadas e o meio sobrenadante periodicamente recolhido para a recuperação dos vírus produzidos. Foram realizadas cinco coletas, gerando um volume total aproximado de 300 mL de partículas lentivirais, suspensas em meio de cultura. Esse material foi aliquotado e armazenado para a sequência dos experimentos.
O passo seguinte, nessa série de procedimentos de padronização, foi a definição das condições de transdução da biblioteca lentiviral de shRNAs, estabelecendo valores apropriados de MOI, um parâmetro crucial para o sucesso do ensaio de silenciamento. É fundamental que as transduções sejam realizadas com baixa eficiência (<30%), para garantir que cada célula seja infectada por uma única partícula viral e, consequentemente, que o efeito observado seja decorrente da expressão de um único shRNA. Para a obtenção da eficiência desejada, os parâmetros de densidade celular e diluição viral devem ser previamente definidos e ajustados, para cada linhagem celular avaliada. A análise desses parâmetros foi realizada com as células derivadas do PDX do Paciente 08, e mais as linhagens tumorais pancreáticas AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2 e PANC-1. Utilizando uma densidade de plaqueamento de 50-60% (700.000 células semeadas em cada um dos poços de uma placa de seis poços), essas células foram infectadas com o estoque lentiviral, diluído em meio de cultura em seis proporções diferentes (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6), e a eficiência de infecção foi avaliada por citometria de fluxo, a partir da quantificação das células com expressão da proteína ZsGreen. Os resultados mostraram que três das linhagens analisadas (Paciente 08, BxPC-3 e Capan-1) foram resistentes à infecção, apresentando percentuais de células ZsGreen<sup>+</sup> próximas a zero, mesmo com a menor diluição testada (Figura 24). Por essa razão, essas linhagens foram excluídas das análises. As outras três linhagens examinadas, AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1, mostraram-se permissivas à infecção viral, exibindo níveis decrescentes de eficiência de transdução conforme o aumento da diluição dos lentivírus. Para a realização do screening, foram selecionados os valores de diluição que proporcionaram eficiência de transdução dentro da faixa desejada, ou seja, próxima a 30%: 1:5 para AsPC-1 e 1:2 para MIA PaCa-2 e PANC-1 (Figura 24 e Tabela 10).



Figura 24 – Eficiência de transdução da biblioteca lentiviral de shRNAs

Análise por citometria de fluxo para a eficiência de transdução da biblioteca de shRNAs em linhagens tumorais pancreáticas. As células foram plaqueadas em densidade de 50-60% e infectadas com os vetores lentivirais em seis diluições diferentes (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6). Os valores sob cada histograma indicam a razão de diluição dos vírus em meio de cultura e, entre parênteses, o percentual de células eficientemente transduzidas, com expressão positiva da proteína fluorescente ZsGreen. Os experimentos foram realizados em duplicata (apenas uma réplica de cada linhagem é mostrada). As células derivadas do PDX do Paciente 08 e as linhagens BxPC-3 e Capan-1 (painéis superiores) foram resistentes à infecção pelos lentivírus (porcentagens de células ZsGreen<sup>+</sup> próximas a zero mesmo com a menor diluição, de 1:1), e por isso excluídas da sequência dos experimentos. AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1 (painéis inferiores) foram eficientemente transduzidas pelos vírus, e os valores de diluição que proporcionaram eficiência próxima a 30% (1:5 para AsPC-1 e 1:2 para MIA PaCa-2 e PANC-1), nível apropriado para garantir a infecção de cada célula-alvo por uma única partícula viral, foram selecionados para o ensaio de silenciamento para a identificação de vulnerabilidades epigenéticas nas células de PDAC.

Linhagem	Densidade de plaqueamento	Diluição viral (vírus : meio)	Eficiência de transdução*
AsPC-1	50-60%	1:5	27,6%
MIA PaCa-2	50-60%	1:2	28,8%
PANC-1	50-60%	1:2	26,1%

Tabela 10 – Parâmetros para a infecção das células de PDAC com a biblioteca lentiviral

\*Média de duas réplicas

Uma vez que a infecção da população de células-alvo deve ser limitada, para a sequência do ensaio de silenciamento faz-se necessária a seleção das células eficientemente transduzidas, eliminando da cultura aquelas que não foram infectadas pelos vetores lentivirais e que, portanto, não expressam nenhum shRNA. O vetor de expressão da biblioteca de shRNAs possui como marcador de seleção o gene que confere resistência ao antibiótico neomicina (Neo<sup>R</sup>), permitindo a seleção positiva das células de interesse por meio da adição dessa droga ao meio de cultivo. A concentração de trabalho deve ser previamente determinada por titulação em células não transduzidas, sendo escolhida a dose mínima capaz de abolir a viabilidade celular. Para este ensaio foi utilizado o agente de seleção Geneticina (G418), um análogo da neomicina, e uma vez que a sensibilidade ao antibiótico difere para cada tipo celular, a concentração de seleção foi determinada para cada uma das linhagens a serem utilizadas na triagem de alvos epigenéticos (AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1). Foi avaliada a faixa de concentração de 200 a 2200 µg de Geneticina por mL de meio de cultura (0,4 a 4,4 mM), com as células sendo expostas à droga durante seis dias, o período previsto para a etapa de seleção no ensaio de silenciamento. Ao final do cultivo, por meio da análise visual da toxicidade do antibiótico sobre as células, foram selecionadas as doses indicadas na Tabela

11.

Linhagem	μg/mL	mM
AsPC-1	1000	2,0
MIA PaCa-2	600	1,2
PANC-1	1000	2,0

Tabela 11 – Dosagem de Geneticina para a seleção das células transduzidas

#### 4.2.3. Triagem de alvos epigenéticos

Concluídas as etapas preparatórias, com a amplificação e análises de controle de qualidade da biblioteca de shRNAs, seu empacotamento em vetores lentivirais, e a definição dos parâmetros de eficiência de transdução e seleção positiva das células transduzidas, foram enfim realizados os ensaios de silenciamento para a identificação de vulnerabilidades epigenéticas nas células de PDAC. Para isso, as células AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1 foram plaqueadas e infectadas de acordo com os parâmetros previamente estabelecidos, em duplicata, seguindo-se a seleção das células transduzidas pela exposição à Geneticina por seis dias. Ao término do período de seleção, quando somente células com expressão estável dos shRNAs estavam presentes na cultura, foi definido o início do período de crescimento competitivo (T0). A extensão desse período para cada linhagem celular foi estabelecida com base em seu tempo de dobramento, utilizando um intervalo que permitisse um mínimo de 12 duplicações populacionais, assumindo que esse período seria suficiente para que o silenciamento induzido por cada shRNA pudesse manifestar seu efeito sobre a viabilidade da célula-alvo, e alterações significativas na representação dos shRNAs pudessem ser detectadas. Assim, a linhagem AsPC-1 (TD de ~48 horas) permaneceu em cultura por 24 dias, enquanto MIA PaCa-2 e PANC-1 (ambas com TD de ~24 horas) foram cultivadas por 12 dias. O DNA genômico foi isolado da população celular no início (PI) e ao final (PF) desse período de crescimento, e as sequências dos shRNAs integradas ao genoma das célulasalvo foram recuperadas por PCR e preparadas para sequenciamento (Figura 25). O material foi enviado para sequenciamento no CSHL, de onde se aguarda o envio dos resultados. Esses dados, assim que disponíveis, serão utilizados na análise de representação diferencial da biblioteca de silenciamento, comparando-se os dois extremos da fase de crescimento competitivo (PI *vs.* PF) para a identificação de shRNAs depletados e definição de possíveis alvos candidados.

Figura 25 – Purificação das sequências de shRNAs recuperadas do genoma das células submetidas à triagem de alvos epigenéticos

AsPC-1



MIA PaCa-2



#### PANC-1



As sequências dos shRNAs integradas ao genoma das células submetidas à triagem de alvos epigenéticos foram recuperadas por PCR, utilizando como *template* o DNA isolado das populações inicial (PI) e final (PF) da fase de crescimento competitivo, em cada réplica das três linhagens analisadas. Os produtos dessa reação foram submetidos a uma segunda PCR, para a introdução de adaptadores e índices para o sequenciamento na plataforma Illumina, e os *amplicons* gerados (375 pb) foram purificados em gel de agarose. Os retângulos amarelos indicam as bandas excisadas para a recuperação dos fragmentos, posteriormente encaminhados para sequenciamento.

### 5. DISCUSSÃO

#### 5.1. Geração de xenotranplantes e linhagem celular de PDAC

Ao longo das últimas décadas houve um progresso substancial na compreensão das bases moleculares do câncer de pâncreas, um conhecimento que, lamentavelmente, ainda não se traduziu em melhores resultados no cuidado dos pacientes, com o prognóstico sombrio da doença permanecendo inalterado. A descoberta de marcadores para a detecção precoce e o desenvolvimento de terapias mais eficazes são ainda desafios a serem superados, e cujo enfrentamento exige modelos de pesquisa dotados de características reprodutíveis e clinicamente relevantes, tanto para análises moleculares dos tumores como para o desenvolvimento de fármacos e avaliações pré-clínicas.

O estabelecimento de coleções de modelos animais, desenvolvidos a partir do enxerto de tecido tumoral humano em camundongos imunodeficientes, é atualmente uma proeminente plataforma in vivo a fomentar diferentes aplicações na pesquisa básica e em estudos translacionais. No presente trabalho, amostras de tecido tumoral obtidas de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático submetidos à ressecção cirúrgica foram utilizadas para gerar um desses painéis de modelos PDX. De 17 amostras de tumor implantadas em camundongos nude, sete xenotransplantes foram estabelecidos, representando uma taxa de sucesso de 41%, análoga a índices previamente reportados (Bocsi e Zalatnai, 1999; Fiebig e Burger, 2011; Garrido-Laguna et al., 2011; Monsma et al., 2012; Mattie et al., 2013; Damhofer et al., 2015; Delitto et al., 2015; Jun et al., 2016; Izumchenko et al., 2017; Pergolini et al., 2017). As taxas de enxerto na primeira geração de receptores (F1) costumam de fato não ser altas, todavia, a eficiência na formação dos tumores tende a aumentar substancialmente nas gerações subsequentes (F2, F3, F4, etc.), nas quais se observa frequentemente níveis superiores a 90%, além de redução no tempo para o crescimento do tumor (Rubio-Viqueira et al., 2006; Kim et al., 2009, 2012). Os resultados deste trabalho também estão de acordo com esse cenário, com os animais receptores pós-F1 mostrando altos índices de sucesso para os tumores reimplantados. Curiosamente, neste estudo, os espécimes derivados de metástases não cresceram nos camundongos *nude*, e todas as amostras enxertadas com êxito foram provenientes de tumores primários. Sendo originário de lesões com características mais agressivas, seria esperada uma aptidão maior do tecido metastático para crescer no novo organismo, conforme observado anteriormente para células tumorais pancreáticas derivadas de fluido ascítico (Golan et al., 2017).

A ineficácia de parte das amostras (59%) em formar tumores nos camundongos receptores é, como referido acima, um resultado esperado e pode ser causada por vários fatores. Entre as condições críticas que afetam a eficácia do xenoenxerto estão a agressividade intrínseca do tumor e a administração de tratamento neoadjuvante (Kim et al., 2009, 2012). A tumorigenicidade pode ser prejudicada pela ablação de células-tronco tumorais na população inicial utilizada para produzir o xenoenxerto, bem como por células não tumorigênicas residentes no tumor, dotadas da capacidade de regular negativamente as propriedades suportivas de crescimento associadas às células iniciadoras de tumor (Kern e Shibata, 2007). Alguns autores também correlacionam o sucesso do implante às dimensões do tumor no paciente, com um tamanho mínimo de 3,5 cm sendo um fator contribuinte significativo (Jun et al., 2016). Além do tamanho original do tumor e de seus níveis intrínsecos de *stemness*, a viabilidade das células tumorais também pode ser

114

afetada pelo processo de manipulação da amostra. Por exemplo, o tempo decorrido entre a ressecção do tumor no paciente e o implante do tecido nos camundongos receptores é um determinante crucial da manutenção de seu potencial tumorigênico, e deve ser o mais breve possível, idealmente inferior a uma hora (Kim et al., 2009). Neste aspecto, devido a dificuldades logísticas, as condições do trabalho para o processamento das amostras dos pacientes não foram ótimas. Outra variável metodológica importante refere-se ao local de implantação do tumor. Em diferentes estudos, a realização de enxertos em localização ortotópica (Fu et al., 1992; Reyes et al., 1996; Loukopoulos et al., 2004; Kim et al., 2009; Walters et al., 2013a) ou sob a cápsula subrenal (Fingert et al., 1987; Lee et al., 2005; Cutz et al., 2006; Shultz et al., 2014b; Wang et al., 2016) tem produzido resultados superiores ao do implante sob a pele. Quando a opção é pela usual via subcutânea, o recobrimento da peça tumoral com Matrigel antes da implantação tem sido uma estratégia empregada por alguns autores para auxiliar o crescimento do tumor e melhorar as taxas de enxerto (Hahn et al., 1995; Sorio et al., 2001; Rubio-Viqueira et al., 2006; Garrido-Laguna et al., 2011; Nicolle et al., 2017).

O resultado do xenotransplante é também fortemente influenciado pelo *background* imunológico dos animais receptores. O uso de camundongos imunossuprimidos é um aspecto chave nesse contexto, pois somente com tais modelos é possível expandir as células tumorais em seu microambiente nativo e preservar as amostras indefinidamente, por meio da passagem dos tumores em gerações sucessivas de animais hospedeiros (Morton e Houghton, 2007; Kim et al., 2009, Calles et al., 2013). No presente estudo, as amostras de PDAC foram transplantadas em camundongos *nude* que, em razão da atimia, são deficientes em células T funcionais e, portanto, incompetentes em rejeitar enxertos de tecidos de

outras espécies (Flanagan, 1966; Pantelouris, 1968). Entretanto, mesmo com a imunidade comprometida, a eficiência de formação de tumores nesses animais pode ser prejudicada, pois estes ainda retêm a capacidade de desenvolver uma resposta imune inata mediada por monócitos/macrófagos, células natural killer (NK), células apresentadoras de antígeno e o sistema complemento, assim como preservam a imunidade humoral intacta, mediada por linfócitos B (Shultz et al., 2007; Belizário, 2009; Liu e Hicklin, 2011; Walters et al., 2013a; de Jong et al., 2014; Shultz et al., 2014a; Jung et al., 2018). Além disso, mesmo em um enxerto eficaz, esses mecanismos imunes remanescentes podem interferir nos resultados, promovendo uma seleção clonal de subconjuntos mais agressivos de células tumorais, reduzindo assim a heterogeneidade e complexidade da amostra original (Kim et al., 2009). Para uma maior eficiência na expansão de tumores xenogênicos, os camundongos com imunodeficiência severa combinada (SCID), deficientes em células T e B, e consequentemente ineptos para o desenvolvimento de respostas imunes tanto celulares como humorais, são considerados a melhor opção, especialmente no caso de material inicial escasso (Bosma et al., 1983; Bosma e Carroll, 1991; Shultz et al., 1995; Ito et al., 2002; Fujji et al., 2008). Além de taxas de sucesso superiores, os camundongos SCID seriam um modelo mais adequado para os xenotransplantes por exercerem menor pressão seletiva sobre os tumores implantados e, portanto, recapitulariam com maior confiabilidade a estrutura tumoral originada nos pacientes (Kim et al., 2009).

Apesar de suas conhecidas limitações, os PDXs gerados em camundongos *nude* permanecem como modelos pré-clínicos válidos, replicando satisfatoriamente as características biológicas primárias dos tumores originais e, assim, fornecendo um meio coerente e reprodutível para análises experimentais (Martinez-Garcia et al., 2014). Menor custo, facilidade de manutenção e menor incidência de complicações cirúrgicas e infecciosas, quando comparados ao modelo SCID, são vantagens práticas essenciais que também ajudam a explicar o amplo emprego de camundongos nude ainda verificado em investigações oncológicas (Kim et al., 2009). Um esquema híbrido, tirando proveito de ambas as linhagens, pode ser aplicado ao se utilizar camundongos SCID para estabelecer e potencializar o enxerto dos tumores humanos nas primeiras gerações de receptores (F1 e F2) e, subsequentemente, empregar a linhagem nude para a manutenção dos xenotransplantes bem-sucedidos (Walters et al., 2013a). Em qualquer caso, um aspecto técnico importante a observar quando se trabalha com animais nude é a sua idade no momento da implantação do tumor. Devem ser utilizados sempre indivíduos jovens, idealmente com menos de oito semanas (Marincola et al., 1989; Kim et al., 2009), uma vez que a funcionalidade das células T aumenta com a idade (Jung et al., 2018) e, com isso, a permissividade ao desenvolvimento do xenotumor é significativamente reduzida. Para evitar tal inconveniente, foram utilizados neste trabalho animais em idade adequada, a fim de que as preciosas amostras de PDAC humano e pudessem manter um crescimento prolongado em seu novo ambiente, sofrendo níveis mínimos de pressão seletiva.

No diagnóstico anatomopatológico do PDAC, o grau de diferenciação do epitélio ductal é o parâmetro utilizado para a classificação histológica do tumor. Os tumores bem diferenciados são compostos por mais de 95% de ductos, enquanto em tumores moderadamente diferenciados essa extensão é de 50 a 95% e, em amostras pouco diferenciadas, inferior a 50% (Torres et al., 2013). A classificação histopatológica dos PDXs gerados neste trabalho evidenciou sua diversidade fenotípica. Embora a maioria dos tumores tenha sido classificada como

moderadamente diferenciada, por não apresentarem formação completa de ductos, espécimes com características morfológicas de adenocarcinoma pouco diferenciado e bem diferenciado também foram obtidos. Quando avaliada comparativamente a morfologia do material original de pacientes e dos xenotumores derivados, vários trabalhos têm mostrado uma notável correspondência entre tumores primários humanos e seus PDXs com relação ao grau de diferenciação do epitélio maligno e características gerais do estroma desmoplásico, e que tal histoarquitetura é conservada ao longo das passagens em camundongos (Mattie et al., 2013; Walters et al., 2013a; Damhofer et al., 2015; Jung et al., 2016; Pergolini et al., 2017; Knudsen et al., 2018). Os resultados deste trabalho se alinham a essas observações, ao demonstrarem que os xenotransplantes gerados apresentam características histológicas e microambientais representativas do PDAC humano, e que replicam consistentemente o perfil de diferenção histológica presente no tecido de origem.

Sem embargo, ao lado dessa revisão estrutural, é também imprescindível uma caracterização mais abrangente desse grupo de PDXs, combinando dados clínicos e biológicos para compor uma plataforma bem anotada e informativa para aplicações futuras. Nessa perspectiva, o próximo passo deve ser uma anotação molecular quanto ao *status* mutacional desse xenotumores, com foco nos genes prevalentemente mutados (*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* e *SMAD4*) no câncer de pâncreas, bem como uma avaliação abrangente de seus perfis de expressão gênica, conforme trabalhos congêneres têm realizado regularmente (Loukopoulos et al., 2004; Rubio-Viqueira et al., 2006; Mattie et al., 2013; Jung et al., 2016; Knudsen et al., 2018).

Paralelamente à geração e manutenção da coleção de xenotransplantes de PDAC, outro objetivo proposto neste trabalho foi o estabelecimento de culturas celulares a partir desses PDXs. Embora as linhagens celulares contínuas não sejam modelos ideais para todas as aplicações de pesquisa, estas são ainda amplamente empregadas na rotina laboratorial devido a sua conveniência e facilidade de uso para screenings farmacológicos e uma diversidade de ensaios genéticos e bioquímicos. A inadequação dos modelos in vitro para fins translacionais deve-se em grande medida ao fato de que as linhagens celulares tumorais atualmente disponíveis têm sido adaptadas para crescer indefinidamente em condições artificiais, um processo que resulta em alterações irreversíveis em propriedades biológicas fundamentais, incluindo ganho e perda de informação genética, alteração nas habilidades de crescimento e invasão, e o desaparecimento de subpopulações celulares específicas (Gillet et al., 2011). Consequentemente, essas células não são representantes fidedignos da complexidade e heterogeneidade do tumor original, uma desvantagem refletida em seu limitado poder preditivo para a atividade de agentes citotóxicos em pacientes com câncer (Johnson et al., 2001). Como inconveniente adicional, existem evidências de que um número significativo de linhagens celulares, mesmo as adquiridas de bancos de células, está incorretamente identificado ou apresenta contaminação cruzada, o que torna seu uso ainda mais problemático (Cabrera et al., 2006). Por todas essas razões, derivar novas linhagens celulares internamente, embora uma tarefa complexa e trabalhosa, representa um expediente válido para contornar as limitações das linhagens convencionais e obter uma ferramenta experimental dotada de maior semelhança com o tecido original (Rückert et al., 2012a).

Na experiência deste estudo, o estabelecimento de culturas em monocamada a partir de células de xenotumor revelou-se, de fato, uma tarefa desafiadora. Diferentes técnicas têm sido descritas para gerar culturas de células tumorais, e a opção por qualquer uma delas deve levar em consideração diversos fatores, desde a origem do material biológico até o nível de complexidade e o tempo consumido em cada estratégia de processamento. Rückert e colaboradores (2012a) elaboraram uma extensa revisão dos estudos em que linhagens celulares permanentes de tumores pancreáticos foram estabelecidas, enfocando os métodos de cultura empregados. As abordagens básicas foram categorizadas nos seguintes tipos: cultura de explantes, digestão enzimática, xenoenxerto e cultura de células metastáticas derivadas de fluidos corporais malignos, como efusão pleural e ascite. Com exceção do último, todos os demais foram experimentados neste trabalho, especialmente a cultura de explantes com dissociação mecânica do tecido tumoral. o protocolo mais simples e frequentemente utilizado. Neste método, o tumor é cortado com bisturi até que se reduza aos menores fragmentos possíveis, os quais, juntamente com as células dissociadas, são plaqueados e mantidos em condições padrões de cultura celular. Grupos de células tumorais denominados complexos trabeculares pequenos (STC, small trabecular complexes) são formados, e pela ação de fatores proteolíticos e aumento da motilidade, as células se espalham ativamente a partir dos fragmentos iniciais e crescem em colônias (Rückert et al., 2012a). Em uma variação desse procedimento, também testada neste trabalho, minúsculos fragmentos do tumor são dispersos sobre uma placa, sem meio de cultura, e incubados por um breve período atém aderirem à superfície plástica, quando então é adicionado o meio de cultivo e as células passam a crescer como descrito acima (Rückert et al., 2012b). Alternativamente, a digestão de espécimes tumorais com enzimas como tripsina, colagenase e hialuronidase, tem sido utilizada por alguns pesquisadores para remover o tecido conectivo e produzir uma suspensão de células livres, prontas a serem cultivadas (Kaku et al., 1980; Chifenti et al., 2009; Kalinina et al., 2010; Kim et al., 2017). Entretanto, além de mais trabalhoso, esse método carece de evidências de que produza maiores taxas de sucesso, como se pôde verificar no presente trabalho, em tentativas com colagenase do tipo IV. A abordagem da xenoenxertia, por sua vez, baseia-se na ideia de que a passagem repetida das células tumorais em camundongos imunodeficientes pode aumentar sua agressividade (Rückert et al., 2012a). Deste modo, em lugar do cultivo direto da amostra primária, o tecido maligno é xenotransplantado e os tumores formados são posteriormente processados, por cultura de explante ou digestão enzimática, para o estabelecimento de linhagens celulares contínuas (Dexter et al., 1982; Yachida et al., 2011; Kang et al., 2015). Todas as culturas celulares realizadas neste trabalho utilizaram tecido de PDAC xenotransplantado, e como o cultivo direto a partir dos tumores originais não foi um procedimento efetuado aqui, não é possível examinar os resultados sob a perspectiva de um hipotético aumento no potencial de crescimento das células tumorais pancreáticas.

Sobre o tema das dificuldades enfrentadas no processo de estabelecimento das culturas de PDX, células recalcitrantes ao substrato plástico e contaminações bacterianas ou fúngicas, favorecidas pelo longo tempo de cultivo, foram eventos associados à parte das tentativas fracassadas. No entanto, o crescimento excessivo de fibroblastos foi certamente o maior obstáculo durante todo o período de cultura, anulando progressivamente a expansão das células do epitélio tumoral. Isto não surpreende, uma vez que, de fato, o principal empecilho para o cultivo de qualquer tecido primário é a proliferação massiva de fibroblastos contaminantes. Esse inconveniente, porém, é particularmente agravado em culturas de células derivadas de PDAC, por se tratar de um tipo tumoral com um compartimento estromal abundante e fibroso (Rückert et al., 2012ab). Para lidar com o problema, foram introduzidos no protocolo de cultivo alguns artifícios para favorecer as condições de crescimento das células de interesse. Primeiramente, foi feita a suplementação do meio de cultura com a toxina colérica, um ingrediente que, por meio do aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP), postula-se exercer influência mitogênica sobre células epiteliais (Green, 1978; Taylor-Papadimitriou et al., 1980; Okada et al., 1982; Stampfer, 1982). A tripsinização seletiva, um método bastante utilizado para reduzir a contaminação, baseado nas propriedades adesivas diferenciadas de fibroblastos e células epiteliais (fibroblastos aderem menos firmemente às superfícies de cultura), e no qual as culturas são periodicamente incubadas por breves instantes (2 a 3 minutos) com solução de tripsina, seguindo-se o descarte das células sobrenadantes (Rückert et al., 2012a; Damhofer et al., 2015), foi outro expediente testado aqui para promover um enriquecimento gradual das células tumorais, porém com resultados decepcionantes para a eliminação seletiva dos fibroblastos. Por fim, a remoção mecânica com o auxílio de raspadores ou ponteiras estéreis, embora também considerado um método efetivo para proteger as culturas da expansão exacerbada de fibroblastos (Rückert et al., 2012a), proporcionou aos cultivos de PDX uma purificação apenas parcial e transitória, com as células contaminantes remanescentes retomando seu crescimento rapidamente.

Apesar das recorrentes tentativas abortadas, foi possível estabelecer com sucesso uma linhagem celular, pura e estável, a partir de um dos xenotransplantes de PDAC (Paciente 08). No entanto, para qualquer nova linhagem celular tumoral, a

derivação é apenas o primeiro passo, e uma série de testes in vitro e in vivo deve ser subsequentemente realizada para validá-la e caracterizá-la (Geraghty et al., 2014; Kim et al., 2017). Nesse aspecto, a checagem inicial das células derivadas do PDX do Paciente 08 comprovou sua origem humana e excluiu a contaminação cruzada com células de camundongo. A presença de micoplasma, um microrganismo parasita intracelular causador de frequentes transtornos em procedimentos envolvendo a cultura de células, também foi descartada. Quando examinado seu padrão de crescimento in vitro, características em comum com outras células de câncer pancreático foram reconhecidas. E, finalmente, essas células passaram pela prova decisiva para a demonstração de sua capacidade intrínseca de originar um tumor quando introduzidas em um organismo vivo, o qual, inclusive, desenvolve-se com padrão histológico semelhante ao exibido pelo PDX do Paciente 08. Contudo, o processo de validação dessa nova linhagem celular pancreática ainda carece da prova fundamental de autenticação de origem, demonstrando inequivocamente que é derivada do respectivo paciente doador. A análise de impressão digital de DNA (DNA fingerprint), por meio do perfil de STRs (short tandem repeats) ou de SNPs (single nucleotide polymorphisms), é uma técnica adequada para essa finalidade (Cabrera et al., 2006; Geraghty et al., 2014; El-Hoss et al., 2016) e será aplicada em momento oportuno. Exames adicionais para agregar informações sobre cariótipo, perfil mutacional e expressão de marcadores tumorais, na comparação com o tumor parental, também estão previstos.

Em conclusão, instrumentos valiosos para apoiar investigações sobre o câncer de pâncreas foram desenvolvidos neste trabalho. O PDAC representa hoje um problema crescente de saúde pública, agravado pela ausência de métodos efetivos para diagnóstico e tratamento. Nesse cenário, o conjunto de modelos PDX aqui estabelecido, após sistemática anotação com dados clínicos e moleculares, constituirá uma relevante ferramenta de pesquisa, fornecendo de modo duradouro material com características biológicas estáveis e diversificadas para pesquisas básicas e estudos pré-clínicos, elaborados para identificar biomarcadores e lançar luz sobre novos alvos farmacológicos. Por sua vez, a derivação de uma nova linhagem de células tumorais pancreáticas representa um avanço adicional, oferecendo um instrumento alternativo para ensaios *in vitro*, isento das limitações atribuídas às linhagens celulares atualmente disponíveis, impostas por seu longo período em cultura. Em conjunto, esses novos recursos podem contribuir para revelar aspectos da biologia do câncer de pâncreas ainda desconhecidos, e assim definir novos direcionamentos para a pesquisa no emergente cenário da medicina de precisão.

# 5.2. Estabelecimento de metodologia para rastreamento de alvos epigenéticos no PDAC

No âmbito do segundo objetivo deste trabalho, a triagem de genes da maquinaria epigenética com papel essencial para a sobrevivência e proliferação das células de PDAC, foram concluídos com êxito todos os procedimentos de preparação e padronização do ensaio de silenciamento. A biblioteca de shRNAs contra reguladores epigenéticos, cedida pelo grupo do Dr. Christopher Vakoc (CSHL), foi inicialmente amplificada para a geração de um recurso permanente de pesquisa, utilizado nesta e em futuras análises exploratórias. Uma criteriosa análise de sua qualidade, realizada por meio de sequenciamento NGS, mostrou que a representação dos shRNAs existente na biblioteca original foi mantida na biblioteca

amplificada, sendo esta então capaz de alvejar de forma eficiente, com ao menos três shRNAs, a maior parte (~85%) dos 398 genes interrogados pela biblioteca original. A quase totalidade (~98%) dos alvos pesquisados, que incluem todos os genes com funções conhecidas em processos relacionados à deposição, remoção ou leitura de marcas na cromatina, possui ao menos um shRNA presente em quantidade suficiente (500 *reads* ou mais) para permitir a detecção de alterações de representação (depleção ou enriquecimento) com significância estatística, após o período de silenciamento.

Confirmada a qualidade adequada da biblioteca amplificada, o trabalho prosseguiu com o encapsulamento dos shRNAs em partículas lentivirais, e com a realização de ensaios para a padronização das condições de infecção e seleção das células transduzidas, utilizando um painel de linhagens tumorais pancreáticas. As células do PDX do Paciente 08, e de outras duas linhagens (BxPC-3 e Capan-1), mostraram-se refratárias à infecção pelos lentivírus e foram por isso excluídas da análise. Três linhagens (AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1) foram permissivas à transdução viral, e então submetidas ao *screening* com a biblioteca de shRNAs, para a identificação de vulnerabilidades entre os genes da maquinaria epigenética. O ensaio, para cada linhagem avaliada, teve duração suficiente para 12 duplicações populacionais, e as sequências dos shRNAs integradas ao DNA genômico das células, obtidas no início e ao término do período de crescimento competitivo, foram recuperadas por PCR e encaminhadas para sequenciamento NGS.

Não foi possível, todavia, concluir a etapa final de análise da representação diferencial dos shRNAs, a tempo de apresentar os resultados nesta tese. Assim que estiverem disponíveis, os resultados do sequenciamento serão utilizados em uma análise computacional para quantificar as sequências geradas, verificando uma

possível depleção de shRNAs ocorrida durante o período de seleção negativa, e realizar o mapeamento dos genes candidatos. Serão considerados candidatos os genes alvejados por shRNAs cujas sequências apresentarem depleção significativa na população celular coletada ao final do período de crescimento competitivo (na comparação com a condição controle T0), nas duas réplicas independentes de cada linhagem, significando assim que afetaram a expressão de genes essenciais e que isto resultou na redução ou desaparecimento das células em cujo genoma se integraram.

Por fim, a validade dos candidatos identificados será determinada individualmente em novos ensaios de silenciamento *in vitro*, com as linhagens tumorais pancreáticas sendo transduzidas com shRNAs específicos contra os genes selecionados. Serão realizados ensaios funcionais para avaliar o efeito do seu silenciamento sobre a viabilidade e fenótipos malignos da célula tumoral. Nessa análise, será incluída como controle uma linhagem pancreática não tumoral (HPDE), para verificar se um eventual efeito de redução da viabilidade celular é específico para células neoplásicas, e não devido ao silenciamento de um gene essencial também para células normais.

A julgar pelo conjunto de trabalhos registrados na literatura, há dados que justificam uma expectativa otimista em relação aos resultados desta varredura de essencialidades moleculares no câncer de pâncreas. Estratégias de rastreamento análogas à utilizada neste trabalho, porém com foco em outros conjuntos gênicos, têm identificado potenciais *driver genes* dos processos neoplásicos do pâncreas. Por exemplo, *screenings* com shRNAs alvejando genes situados em *loci* genômicos afetados por alteração do número de cópias no PDAC, e interrogando dezenas de linhagens celulares, apontam um possível papel oncogênico para o regulador do

126

ciclo celular *ECT*2 (Samuel et al., 2013), assim como para a nucleoporina *NUP153* e o fator de transcrição *KLF*5 (Shain et al., 2013).

A triagem de genes codificadores de proteínas quinases associadas à manutenção e quimiorresistência no PDAC também tem sido objeto de interesse na busca por novos alvos para terapia. Em um estudo com siRNAs alvejando todo o quinoma humano em células tumorais pancreáticas, foi estabelecido um painel com dezenas de quinases cuja inibição aumenta a apoptose espontânea assim como a apoptose induzida por gemcitabina (Giroux et al., 2006). Azorsa e colaboradores (2009), em um ensaio com um pool de siRNAs contra 572 guinases, identificaram vários alvos cuja inativação potencializa o efeito inibitório da gemcitabina sobre o crescimento das células de PDAC, com destaque para o gene CHK1, que atua no controle do ciclo celular. Em uma análise de validação, a exposição a compostos que inibem essa proteína promoveu a sensibilização das células tumorais à gemcitabina (Azorsa et al., 2009). Todavia, embora estabelecida como um alvo promissor para uma abordagem de letalidade sintética com a gemcitabina, a inibição dessa quinase é potencialmente tóxica também para células não tumorais, em razão de seu papel central em diversas vias de resposta a dano no DNA. Uma alternativa para a terapia combinada com gemcitabina, possivelmente com ação mais específica do que a supressão de CHK1, pode ser a inibição do gene RAD17, outro regulador do ciclo celular que atua na mesma via dessa quinase, porém em etapa anterior (Fredebohm et al., 2013). Esse novo alvo foi identificado em uma varredura com shRNAs para cerca de 10.000 genes, e sua depleção também demonstrou efeito sinérgico com a gemcitabina, intensificando a citotoxicidade da droga nas células de PDAC (Fredebohm et al., 2013).

Uma nova abordagem de investigação, observada em trabalhos mais recentes, é a pesquisa de vulnerabilidades genéticas por meio de *screenings* realizados *in vivo*, com modelos PDXs derivados de PDAC. Como exemplo, em uma análise de genes envolvidos no metabolismo tumoral, com um *pool* de shRNAs contra transportadores de superfície celular, a anidrase carbônica 9 (CA9) mostrou-se essencial para a iniciação e o crescimento tumoral nos animais (Pore et al., 2015). Em outro trabalho nessa mesma linha, mas com enfoque nos reguladores epigenéticos, a supressão do gene *WDR5*, membro de um complexo de metilação de histonas, afetou a capacidade das células de PDAC em manter o crescimento dos xenotumores, apontando assim mais uma possível via de ataque contra a doença (Carugo et al., 2016).

Em conclusão, todos os exemplos mencionados corroboram o imenso potencial das análises com RNAi para a identificação de alvos terapêuticos no PDAC. Nesse contexto, o controle da atividade de reguladores epigenéticos apresenta-se como uma abordagem especialmente atraente, uma vez que, por natureza, as anomalias no epigenoma são potencialmente reversíveis e já há um considerável arsenal de inibidores farmacológicos à disposição para serem testados contra esses alvos. Com base nessas considerações, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam efetivamente revelar potenciais vulnerabilidades no câncer de pâncreas, e assim apontar novas direções para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para os pacientes acometidos por tão devastadora enfermidade.

128

## 6. CONCLUSÕES

Foi estabelecida uma coleção de sete PDXs derivados de amostras de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático. Os xenotumores apresentam características histológicas típicas do PDAC, com perfis de diferenciação compatíveis com os tumores originais.

Uma linhagem celular pura de câncer pancreático humano foi derivada a partir de um dos xenotumores. As células apresentam a morfologia epitelial e padrão de proliferação semelhante ao de outras linhagens pancreáticas. Seu potencial tumorigênico foi confirmado, pela capacidade de indução de tumores *in vivo*.

Empregando uma biblioteca de 4492 shRNAs contra componentes da maquinaria epigenética, foram gerados reagentes e padronizadas as condições experimentais para o rastreamento de genes que possam representar vulnerabilidades no câncer pancreático. A biblioteca de shRNAs foi amplificada e manteve constituição equivalente à existente na biblioteca original, apresentando-se em condições adequadas para o silenciamento de 398 reguladores epigenéticos.

Três linhagens tumorais pancreáticas (AsPC-1, MIA PaCa-2 e PANC-1) mostraram-se suscetíveis à infecção por vetores lentivirais contendo a biblioteca de shRNAs, e foram assim utilizadas no *screening* de alvos epigenéticos no PDAC. O sequenciamento e análise de representação diferencial dos shRNAs em cada linhagem após o silenciamento dos genes-alvo está em andamento, para a identificação de possíveis alvos candidatos. A validade dos candidatos que venham a ser identificados será determinada posteriormente de modo individual, em ensaios funcionais para verificar o efeito do seu silenciamento sobre o fenótipo e viabilidade das células tumorais pancreáticas.

# REFERÊNCIAS

Aberle MR, Burkhart RA, Tiriac H, Olde Damink SWM, Dejong CHC, Tuveson DA, van Dam RM. Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer. Br J Surg. 2018 Jan;105(2):e48-e60.

Adiseshaiah PP, Crist RM, Hook SS, McNeil SE. Nanomedicine strategies to overcome the pathophysiological barriers of pancreatic cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2016 Dec;13(12):750-765.

Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn CO, Heidecke CD, Friess H, Büchler M, Evert M, Lerch MM, Weiss FU. Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. Gut. 2012 Mar;61(3):439-48.

Aguirre AJ, Brennan C, Bailey G, Sinha R, Feng B, Leo C, Zhang Y, Zhang J, Gans JD, Bardeesy N, Cauwels C, Cordon-Cardo C, Redston MS, DePinho RA, Chin L. High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):9067-72.

Aguirre AJ, Nowak JA, Camarda ND, Moffitt RA, Ghazani AA, Hazar-Rethinam M, Raghavan S, Kim J, Brais LK, Ragon D, Welch MW, Reilly E, McCabe D, Marini L, Anderka K, Helvie K, Oliver N, Babic A, Da Silva A, Nadres B, Van Seventer EE, Shahzade HA, St Pierre JP, Burke KP, Clancy T, Cleary JM, Doyle LA, Jajoo K, McCleary NJ, Meyerhardt JA, Murphy JE, Ng K, Patel AK, Perez K, Rosenthal MH, Rubinson DA, Ryou M, Shapiro GI, Sicinska E, Silverman SG, Nagy RJ, Lanman RB, Knoerzer D, Welsch DJ, Yurgelun MB, Fuchs CS, Garraway LA, Getz G, Hornick JL, Johnson BE, Kulke MH, Mayer RJ, Miller JW, Shyn PB, Tuveson DA, Wagle N, Yeh JJ, Hahn WC, Corcoran RB, Carter SL, Wolpin BM. Real-time Genomic Characterization of Advanced Pancreatic Cancer to Enable Precision Medicine. Cancer Discov. 2018 Sep;8(9):1096-1111.

Ahuja N, Sharma AR, Baylin SB. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. Annu Rev Med. 2016;67:73-89.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 6th ed. New York: Garland Science; 2014.

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5820-8.

Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Cade JE, Burley VJ, Norat T. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. Ann Oncol. 2012 Apr;23(4):843-52.

Aung KL, Fischer SE, Denroche RE, Jang GH, Dodd A, Creighton S, Southwood B, Liang SB, Chadwick D, Zhang A, O'Kane GM, Albaba H, Moura S, Grant RC, Miller JK, Mbabaali F, Pasternack D, Lungu IM, Bartlett JMS, Ghai S, Lemire M, Holter S, Connor AA, Moffitt RA, Yeh JJ, Timms L, Krzyzanowski PM, Dhani N, Hedley D, Notta F, Wilson JM, Moore MJ, Gallinger S, Knox JJ. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. Clin Cancer Res. 2018 Mar 15;24(6):1344-1354.

Avan A, Crea F, Paolicchi E, Funel N, Galvani E, Marquez VE, Honeywell RJ, Danesi R, Peters GJ, Giovannetti E. Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. Mol Cancer Ther. 2012 Aug;11(8):1735-46.

Azorsa DO, Gonzales IM, Basu GD, Choudhary A, Arora S, Bisanz KM, Kiefer JA, Henderson MC, Trent JM, Von Hoff DD, Mousses S. Synthetic lethal RNAi screening identifies sensitizing targets for gemcitabine therapy in pancreatic cancer. J Transl Med. 2009 Jun 11;7:43.

Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, Miller DK, Christ AN, Bruxner TJ, Quinn MC, Nourse C, Murtaugh LC, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourbakhsh E, Wani S, Fink L, Holmes O, Chin V, Anderson MJ, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wilson PJ, Cloonan N, Kassahn KS, Taylor D, Quek K, Robertson A, Pantano L, Mincarelli L, Sanchez LN, Evers L, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Jones MD, Colvin EK, Nagrial AM, Humphrey ES, Chantrill LA, Mawson A, Humphris J, Chou A, Pajic M, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Merrett ND, Toon CW, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Moran-Jones K, Jamieson NB, Graham JS, Duthie F, Oien K, Hair J, Grützmann R, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Rusev B, Capelli P, Salvia R, Tortora G, Mukhopadhyay D, Petersen GM; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Munzy DM, Fisher WE, Karim SA, Eshleman JR, Hruban RH, Pilarsky C, Morton JP, Sansom OJ, Scarpa A, Musgrove EA, Bailey UM, Hofmann O, Sutherland RL, Wheeler DA, Gill AJ, Gibbs RA, Pearson JV, Waddell N, Biankin AV, Grimmond SM. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature. 2016 Mar 3;531(7592):47-52.

Baker LA, Tiriac H, Clevers H, Tuveson DA. Modeling pancreatic cancer with organoids. Trends Cancer. 2016 Apr;2(4):176-190.

Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. Nat Rev Cancer. 2002 Dec;2(12):897-909.

Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P Jr, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature. 2012 Mar 28;483(7391):603-7. Erratum in: Nature. 2012 Dec 13;492(7428):290.

Basu A, Bodycombe NE, Cheah JH, Price EV, Liu K, Schaefer GI, Ebright RY, Stewart ML, Ito D, Wang S, Bracha AL, Liefeld T, Wawer M, Gilbert JC, Wilson AJ, Stransky N, Kryukov GV, Dancik V, Barretina J, Garraway LA, Hon CS, Munoz B, Bittker JA, Stockwell BR, Khabele D, Stern AM, Clemons PA, Shamji AF, Schreiber SL. An interactive resource to identify cancer genetic and lineage dependencies targeted by small molecules. Cell. 2013 Aug 29;154(5):1151-1161.

Batchu RB, Qazi AM, Gruzdyn OV, Semaan A, Seward SM, Chamala S, Dhulipala VB, Bouwman DL, Weaver DW, Gruber SA. EZH2-shRNA-mediated upregulation of p21waf1/cip1 and its transcriptional enhancers with concomitant downmodulation of mutant p53 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Surgery. 2013 Oct;154(4):739-46; discussion 746-7.

Belizário JE. Immunodeficient mouse models: an overview. The Open Immunol J. 2009;2:79-85.

Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. Eur J Cancer. 2011 Sep;47(13):1928-37.

Bernards R, Brummelkamp TR, Beijersbergen RL. shRNA libraries and their use in cancer genetics. Nat Methods. 2006 Sep;3(9):701-6.

Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature. 2004 Mar 25;428(6981):431-7.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. Cell. 2007 Feb 23;128(4):669-81.

Bian B, Bigonnet M, Gayet O, Loncle C, Maignan A, Gilabert M, Moutardier V, Garcia S, Turrini O, Delpero JR, Giovannini M, Grandval P, Gasmi M, Ouaissi M, Secq V, Poizat F, Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Rubis M, Raoul JL, Bradner JE, Qi J, Lomberk G, Urrutia R, Saul A, Dusetti N, Iovanna J. Gene expression profiling of patientderived pancreatic cancer xenografts predicts sensitivity to the BET bromodomain inhibitor JQ1: implications for individualized medicine efforts. EMBO Mol Med. 2017 Apr;9(4):482-497.

Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, Song S, Harliwong I, Idrisoglu S, Nourse C, Nourbakhsh E, Manning S, Wani S, Gongora M, Pajic M, Scarlett CJ, Gill AJ, Pinho AV, Rooman I, Anderson M, Holmes O, Leonard C, Taylor D, Wood S, Xu Q, Nones K, Fink JL, Christ A, Bruxner T, Cloonan N, Kolle G, Newell F, Pinese M, Mead RS, Humphris JL, Kaplan W, Jones MD, Colvin EK,

Nagrial AM, Humphrey ES, Chou A, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Daly RJ, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Kakkar N, Zhao F, Wu YQ, Wang M, Muzny DM, Fisher WE, Brunicardi FC, Hodges SE, Reid JG, Drummond J, Chang K, Han Y, Lewis LR, Dinh H, Buhay CJ, Beck T, Timms L, Sam M, Begley K, Brown A, Pai D, Panchal A, Buchner N, De Borja R, Denroche RE, Yung CK, Serra S, Onetto N, Mukhopadhyay D, Tsao MS, Shaw PA, Petersen GM, Gallinger S, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Capelli P, Corbo V, Scardoni M, Tortora G, Tempero MA, Mann KM, Jenkins NA, Perez-Mancera PA, Adams DJ, Largaespada DA, Wessels LF, Rust AG, Stein LD, Tuveson DA, Copeland NG, Musgrove EA, Scarpa A, Eshleman JR, Hudson TJ, Sutherland RL, Wheeler DA, Pearson JV, McPherson JD, Gibbs RA, Grimmond SM. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. Nature. 2012 Nov 15;491(7424):399-405.

Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. Drug Resist Updat. 2015 Nov;23:55-68.

Bocsi J, Zalatnai A. Establishment and long-term xenografting of human pancreatic carcinomas in immunosuppressed mice: changes and stability in morphology, DNA ploidy and proliferation activity. J Cancer Res Clin Oncol. 1999;125(1):9-19.

Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriac H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. Cell. 2015 Jan 15;160(1-2):324-38.

Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. BMJ. 2012 May 16;344:e2476.

Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, Negri E, Li D, Risch HA, Olson SH, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Bertuccio P, Gao YT, Hassan M, Yu H, Kurtz RC, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Duell EJ, Boffetta P, La Vecchia C. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). Ann Oncol. 2012 Jul;23(7):1880-8. Erratum in: Ann Oncol. 2012 Oct;23(10):2773.

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature. 1983 Feb 10;301(5900):527-30.

Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. Annu Rev Immunol. 1991;9:323-50.

Brait M, Izumchenko E, Kagohara LT, Long S, Wysocki PT, Faherty B, Fertig EJ, Khor TO, Bruckheimer E, Baia G, Ciznadija D, Sloma I, Ben-Zvi I, Paz K, Sidransky D. Comparative mutational landscape analysis of patient-derived tumour xenografts. Br J Cancer. 2017 Feb 14;116(4):515-523.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.

Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. Nature. 2003 Aug 14;424(6950):797-801.

Burns WR, Edil BH. Neuroendocrine pancreatic tumors: guidelines for management and update. Curr Treat Options Oncol. 2012 Mar;13(1):24-34.

Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol. 1997 Jun;15(6):2403-13.

Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV, Bruna A, Budinská E, Caldas C, Chang DK, Clarke RB, Clevers H, Coukos G, Dangles-Marie V, Eckhardt SG, Gonzalez-Suarez E, Hermans E, Hidalgo M, Jarzabek MA, de Jong S, Jonkers J, Kemper K, Lanfrancone L, Mælandsmo GM, Marangoni E, Marine JC, Medico E, Norum JH, Palmer HG, Peeper DS, Pelicci PG, Piris-Gimenez A, Roman-Roman S, Rueda OM, Seoane J, Serra V, Soucek L, Vanhecke D, Villanueva A, Vinolo E, Bertotti A, Trusolino L. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. Nat Rev Cancer. 2017 Apr;17(4):254-268. Nat Rev Cancer. 2017 Sep 15;17(10):632.

Cabrera CM, Cobo F, Nieto A, Cortés JL, Montes RM, Catalina P, Concha A. Identity tests: determination of cell line cross-contamination. Cytotechnology. 2006 Jun;51(2):45-50.

Calles A, Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Primary human non-small cell lung and pancreatic tumorgraft models--utility and applications in drug discovery and tumor biology. Curr Protoc Pharmacol. 2013 Jun;Chapter 14:Unit 14.26.

Capellá G, Farré L, Villanueva A, Reyes G, García C, Tarafa G, Lluís F. Orthotopic models of human pancreatic cancer. Ann N Y Acad Sci. 1999 Jun 30;880:103-9.

Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 Feb 20;136(4):642-55.

Carugo A, Genovese G, Seth S, Nezi L, Rose JL, Bossi D, Cicalese A, Shah PK, Viale A, Pettazzoni PF, Akdemir KC, Bristow CA, Robinson FS, Tepper J, Sanchez N, Gupta S, Estecio MR, Giuliani V, Dellino GI, Riva L, Yao W, Di Francesco ME,

Green T, D'Alesio C, Corti D, Kang Y, Jones P, Wang H, Fleming JB, Maitra A, Pelicci PG, Chin L, DePinho RA, Lanfrancone L, Heffernan TP, Draetta GF. In Vivo Functional Platform Targeting Patient-Derived Xenografts Identifies WDR5-Myc Association as a Critical Determinant of Pancreatic Cancer. Cell Rep. 2016 Jun 28;16(1):133-147.

Cassidy JW, Caldas C, Bruna A. Maintaining Tumor Heterogeneity in Patient-Derived Tumor Xenografts. Cancer Res. 2015 Aug 1;75(15):2963-8.

Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. Curr Genet. 2006 Aug;50(2):81-99.

Chen Y, Xie D, Yin Li W, Man Cheung C, Yao H, Chan CY, Chan CY, Xu FP, Liu YH, Sung JJ, Kung HF. RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. Cancer Lett. 2010 Nov 1;297(1):109-16.

Chang K, Elledge SJ, Hannon GJ. Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. Nat Methods. 2006 Sep;3(9):707-14.

Cheng H, Liu Z, Xue H, Gout PW, Shan H. Application of PDX cancer models in coclinical trials and personalized/precision medicine. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 177-92.

Cheung HW, Cowley GS, Weir BA, Boehm JS, Rusin S, Scott JA, East A, Ali LD, Lizotte PH, Wong TC, Jiang G, Hsiao J, Mermel CH, Getz G, Barretina J, Gopal S, Tamayo P, Gould J, Tsherniak A, Stransky N, Luo B, Ren Y, Drapkin R, Bhatia SN, Mesirov JP, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Root DE, Hahn WC. Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 26;108(30):12372-7.

Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. Nat Rev Cancer. 2010 Jul;10(7):457-69.

Chiaravalli M, Reni M, O'Reilly EM. Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-theart 2017 and new therapeutic strategies. Cancer Treat Rev. 2017 Nov;60:32-43.

Chifenti B, Morelli M, Zavaglia M, Coviello DA, Guerneri S, Santucci A, Paffetti A, Masetti M, Locci MT, Bertacca G, Capodanno A, Collecchi P, Campani D, Mosca F, Bevilacqua G, Cavazzana AO. Establishment and characterization of 4 new human pancreatic cancer cell lines: evidences of different tumor phenotypes. Pancreas. 2009 Mar;38(2):184-96.

Choi SY, Lin D, Gout PW, Collins CC, Xu Y, Wang Y. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Dec 15;79-80:222-37.

Chou A, Froio D, Nagrial AM, Parkin A, Murphy KJ, Chin VT, Wohl D, Steinmann A, Stark R, Drury A, Walters SN, Vennin C, Burgess A, Pinese M, Chantrill LA, Cowley

MJ, Molloy TJ; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative (APGI), Waddell N, Johns A, Grimmond SM, Chang DK, Biankin AV, Sansom OJ, Morton JP, Grey ST, Cox TR, Turchini J, Samra J, Clarke SJ, Timpson P, Gill AJ, Pajic M. Tailored firstline and second-line CDK4-targeting treatment combinations in mouse models of pancreatic cancer. Gut. 2018 Dec;67(12):2142-2155.

Cleary MA, Kilian K, Wang Y, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, Leproust E, Coffey EM, Burchard J, McCombie WR, Linsley P, Hannon GJ. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nat Methods. 2004 Dec;1(3):241-8.

Collins CS, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K, Schultz PG, Hampton GM. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 7;103(10):3775-80.

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L, Feiler HS, Ko AH, Olshen AB, Danenberg KL, Tempero MA, Spellman PT, Hanahan D, Gray JW. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. Nat Med. 2011 Apr;17(4):500-3.

Connor AA, Denroche RE, Jang GH, Timms L, Kalimuthu SN, Selander I, McPherson T, Wilson GW, Chan-Seng-Yue MA, Borozan I, Ferretti V, Grant RC, Lungu IM, Costello E, Greenhalf W, Palmer D, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Buchler M, Petersen G, Thayer S, Hollingsworth MA, Sherker A, Durocher D, Dhani N, Hedley D, Serra S, Pollett A, Roehrl MHA, Bavi P, Bartlett JMS, Cleary S, Wilson JM, Alexandrov LB, Moore M, Wouters BG, McPherson JD, Notta F, Stein LD, Gallinger S. Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. JAMA Oncol. 2017 Jun 1;3(6):774-783.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med. 2011 May 12;364(19):1817-25.

Conte N, Mason JC, Halmagyi C, Neuhauser S, Mosaku A, Yordanova G, Chatzipli A, Begley DA, Krupke DM, Parkinson H, Meehan TF, Bult CC. PDX Finder: A portal for patient-derived tumor xenograft model discovery. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D1073-D1079.

Cowley GS, Weir BA, Vazquez F, Tamayo P, Scott JA, Rusin S, East-Seletsky A, Ali LD, Gerath WF, Pantel SE, Lizotte PH, Jiang G, Hsiao J, Tsherniak A, Dwinell E, Aoyama S, Okamoto M, Harrington W, Gelfand E, Green TM, Tomko MJ, Gopal S, Wong TC, Li H, Howell S, Stransky N, Liefeld T, Jang D, Bistline J, Hill Meyers B, Armstrong SA, Anderson KC, Stegmaier K, Reich M, Pellman D, Boehm JS, Mesirov JP, Golub TR, Root DE, Hahn WC. Parallel genome-scale loss of function screens in

216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. Sci Data. 2014 Sep 30;1:140035. Erratum in: Sci Data. 2014;1:140044.

Cowley MJ, Chang DK, Pajic M, Johns AL, Waddell N, Grimmond SM, Biankin AV. Understanding pancreatic cancer genomes. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013 Aug;20(6):549-56.

Cree IA, Glaysher S, Harvey AL. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. Curr Opin Pharmacol. 2010 Aug;10(4):375-9.

Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. Curr Gene Ther. 2005 Aug;5(4):387-98. Erratum in: Curr Gene Ther. 2005 Oct;5(5):531.

Cui JH, Krüger U, Vogel I, Lüttges J, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Intact tissue of gastrointestinal cancer specimen orthotopically transplanted into nude mice. Hepatogastroenterology. 1998 Nov-Dec;45(24):2087-96.

Cui JH, Krueger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Orthotopic transplantation model of human gastrointestinal cancer and detection of micrometastases. World J Gastroenterol. 2001 Jun;7(3):381-6.

Cutz JC, Guan J, Bayani J, Yoshimoto M, Xue H, Sutcliffe M, English J, Flint J, LeRiche J, Yee J, Squire JA, Gout PW, Lam S, Wang YZ. Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression-related changes. Clin Cancer Res. 2006 Jul 1;12(13):4043-54.

Daemen A, Peterson D, Sahu N, McCord R, Du X, Liu B, Kowanetz K, Hong R, Moffat J, Gao M, Boudreau A, Mroue R, Corson L, O'Brien T, Qing J, Sampath D, Merchant M, Yauch R, Manning G, Settleman J, Hatzivassiliou G, Evangelista M. Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Aug 11;112(32):E4410-7.

Damhofer H, Ebbing EA, Steins A, Welling L, Tol JA, Krishnadath KK, van Leusden T, van de Vijver MJ, Besselink MG, Busch OR, van Berge Henegouwen MI, van Delden O, Meijer SL, Dijk F, Medema JP, van Laarhoven HW, Bijlsma MF. Establishment of patient-derived xenograft models and cell lines for malignancies of the upper gastrointestinal tract. J Transl Med. 2015 Apr 11;13:115.

Dauer P, Nomura A, Saluja A, Banerjee S. Microenvironment in determining chemoresistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. Pancreatology. 2017 Jan -Feb;17(1):7-12.

Davies AH, Johnson F, Ketola K, Zoubeidi A. The plasticity of stem-like states in patient-derived tumor xenografts. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 71-91.

Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. Cell. 2015 Sep 24;163(1):39-53.

de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2007 Jun;6(6):443-53.

de Jong M, Essers J, van Weerden WM. Imaging preclinical tumour models: improving translational power. Nat Rev Cancer. 2014 Jul;14(7):481-93.

Delitto D, Pham K, Vlada AC, Sarosi GA, Thomas RM, Behrns KE, Liu C, Hughes SJ, Wallet SM, Trevino JG. Patient-derived xenograft models for pancreatic adenocarcinoma demonstrate retention of tumor morphology through incorporation of murine stromal elements. Am J Pathol. 2015 May;185(5):1297-303.

Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. Curr Genomics. 2011 Mar;12(1):15-24.

Deng S, Zhu S, Wang B, Li X, Liu Y, Qin Q, Gong Q, Niu Y, Xiang C, Chen J, Yan J, Deng S, Yin T, Yang M, Wu H, Wang C, Zhao G. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer demonstrate active epithelial-mesenchymal transition profile, regulated by miR-217-SIRT1 pathway. Cancer Lett. 2014 Dec 28;355(2):184-91.

Dexter DL, Matook GM, Meitner PA, Bogaars HA, Jolly GA, Turner MD, Calabresi P. Establishment and characterization of two human pancreatic cancer cell lines tumorigenic in athymic mice. Cancer Res. 1982 Jul;42(7):2705-14.

Di Marco M, Astolfi A, Grassi E, Vecchiarelli S, Macchini M, Indio V, Casadei R, Ricci C, D'Ambra M, Taffurelli G, Serra C, Ercolani G, Santini D, D'Errico A, Pinna AD, Minni F, Durante S, Martella LR, Biasco G. Characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma using whole transcriptome sequencing and copy number analysis by single-nucleotide polymorphism array. Mol Med Rep. 2015 Nov;12(5):7479-84.

DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, van der Meulen T, Huising MO. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. Mol Metab. 2016 May 3;5(7):449-458.

Dong X, Gout PW, Yi L, Wang Y, Xu Y, Yang K. First-generation tumor xenografts: a link between patient-derived xenograft models and clinical disease. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 155-76.

Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2004 Apr;3(4):318-29.

Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. Gray's anatomy for students. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2014.

Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. Nat Rev Cancer. 2018 Jul;18(7):407-418.

Duconseil P, Gilabert M, Gayet O, Loncle C, Moutardier V, Turrini O, Calvo E, Ewald J, Giovannini M, Gasmi M, Bories E, Barthet M, Ouaissi M, Goncalves A, Poizat F, Raoul JL, Secq V, Garcia S, Viens P, Iovanna J, Dusetti N. Transcriptomic analysis predicts survival and sensitivity to anticancer drugs of patients with a pancreatic adenocarcinoma. Am J Pathol. 2015 Apr;185(4):1022-32.

Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015 Sep;26 Suppl 5:v56-68. Erratum in: Ann Oncol. 2017 Jul 1;28(suppl\_4):iv167-iv168.

Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, Silverman DT, Ji BT, Gallinger S, Holly EA, Fontham EH, Maisonneuve P, Bueno-de-Mesquita HB, Ghadirian P, Kurtz RC, Ludwig E, Yu H, Lowenfels AB, Seminara D, Petersen GM, La Vecchia C, Boffetta P. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). Ann Oncol. 2012 Nov;23(11):2964-70.

EI-Hoss J, Jing D, Evans K, Toscan C, Xie J, Lee H, Taylor RA, Lawrence MG, Risbridger GP, MacKenzie KL, Sutton R, Lock RB. A single nucleotide polymorphism genotyping platform for the authentication of patient derived xenografts. Oncotarget. 2016 Sep 13;7(37):60475-60490.

Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1148-59.

Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. J Surg Oncol. 1986 Apr;31(4):229-34.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet. 2006 Jan;7(1):21-33.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983 Jan 6;301(5895):89-92.

Feng W, Zhang B, Cai D, Zou X. Therapeutic potential of histone deacetylase inhibitors in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2014 Jun 1;347(2):183-90.

Fennell M, Xiang Q, Hwang A, Chen C, Huang CH, Chen CC, Pelossof R, Garippa RJ. Impact of RNA-guided technologies for target identification and deconvolution. J Biomol Screen. 2014 Dec;19(10):1327-37.

Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. Acta Oncol. 2016 Sep - Oct;55(9-10):1158-1160.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

Fiebig HH, Burger AM. Patient-derived tumor models and explants. In: Teicher BA, editor. Tumor models in cancer research. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2011. p. 167-93.

Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. Eur J Cancer. 2004 Apr;40(6):802-20.

Fingert HJ, Chen Z, Mizrahi N, Gajewski WH, Bamberg MP, Kradin RL. Rapid growth of human cancer cells in a mouse model with fibrin clot subrenal capsule assay. Cancer Res. 1987 Jul 15;47(14):3824-9.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res. 1966 Dec;8(3):295-309.

Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N, Mato Prado M, Krell D, Habib NA, Castellano L, Jiao LR, Stebbing J. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. Eur J Cancer. 2015 Jul;51(11):1389-404.

Frampton AE, Castellano L, Colombo T, Giovannetti E, Krell J, Jacob J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Funel N, Gall TM, De Giorgio A, Pinho FG, Fulci V, Britton DJ, Ahmad R, Habib NA, Coombes RC, Harding V, Knösel T, Stebbing J, Jiao LR. MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. Gastroenterology. 2014 Jan;146(1):268-77.e18.

Fredebohm J, Wolf J, Hoheisel JD, Boettcher M. Depletion of RAD17 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. J Cell Sci. 2013 Aug 1;126(Pt 15):3380-9.

Fritsche P, Seidler B, Schüler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. Gut. 2009 Oct;58(10):1399-409.

Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5645-9.

Fujii E, Suzuki M, Matsubara K, Watanabe M, Chen YJ, Adachi K, Ohnishi Y, Tanigawa M, Tsuchiya M, Tamaoki N. Establishment and characterization of in vivo human tumor models in the NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse. Pathol Int. 2008 Sep;58(9):559-67.

Fujii S, Fukamachi K, Tsuda H, Ito K, Ito Y, Ochiai A. RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 20;417(3):1074-9.

Fukushige S, Horii A. Road to early detection of pancreatic cancer: Attempts to utilize epigenetic biomarkers. Cancer Lett. 2014 Jan 28;342(2):231-7.

Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. Am J Pathol. 2002 May;160(5):1573-81.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. Nucleic Acids Res. 1983 Oct 11;11(19):6883-94.

Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, Zhang C, Schnell C, Yang G, Zhang Y, Balbin OA, Barbe S, Cai H, Casey F, Chatterjee S, Chiang DY, Chuai S, Cogan SM, Collins SD, Dammassa E, Ebel N, Embry M, Green J, Kauffmann A, Kowal C, Leary RJ, Lehar J, Liang Y, Loo A, Lorenzana E, Robert McDonald E 3rd, McLaughlin ME, Merkin J, Meyer R, Naylor TL, Patawaran M, Reddy A, Röelli C, Ruddy DA, Salangsang F, Santacroce F, Singh AP, Tang Y, Tinetto W, Tobler S, Velazquez R, Venkatesan K, Von Arx F, Wang HQ, Wang Z, Wiesmann M, Wyss D, Xu F, Bitter H, Atadja P, Lees E, Hofmann F, Li E, Keen N, Cozens R, Jensen MR, Pryer NK, Williams JA, Sellers WR. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. Nat Med. 2015 Nov;21(11):1318-25.

Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, Greenman CD, Dastur A, Lau KW, Greninger P, Thompson IR, Luo X, Soares J, Liu Q, Iorio F, Surdez D, Chen L, Milano RJ, Bignell GR, Tam AT, Davies H, Stevenson JA, Barthorpe S, Lutz SR, Kogera F, Lawrence K, McLaren-Douglas A, Mitropoulos X, Mironenko T, Thi H, Richardson L, Zhou W, Jewitt F, Zhang T, O'Brien P, Boisvert JL, Price S, Hur W, Yang W, Deng X, Butler A, Choi HG, Chang JW, Baselga J, Stamenkovic I, Engelman JA, Sharma SV, Delattre O, Saez-Rodriguez J, Gray NS, Settleman J, Futreal PA, Haber DA, Stratton MR, Ramaswamy S, McDermott U, Benes CH. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. Nature. 2012 Mar 28;483(7391):570-5.

Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, de Oliveira E, Karikari C, Villaroel MC, Salomon A, Taylor G, Sharma R, Hruban RH, Maitra A, Laheru D, Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Hidalgo M. Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma- related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2011 Sep 1;17(17):5793-800.

Gayet O, Loncle C, Duconseil P, Gilabert M, Lopez MB, Moutardier V, Turrini O, Calvo E, Ewald J, Giovannini M, Gasmi M, Bories E, Barthet M, Ouaissi M, Goncalves A, Poizat F, Raoul JL, Secq V, Garcia S, Viens P, Dusetti N, Iovanna J. A

subgroup of pancreatic adenocarcinoma is sensitive to the 5-aza-dC DNA methyltransferase inhibitor. Oncotarget. 2015 Jan 20;6(2):746-54.

Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG. Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. Nat Rev Cancer. 2017 Dec;17(12):751-765.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JR, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M; Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. Br J Cancer. 2014 Sep 9;111(6):1021-46.

Gharibi A, Adamian Y, Kelber JA. Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer. Acta Histochem. 2016 Apr;118(3):305-16.

Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 15;108(46):18708-13.

Giovanella BC, Stehlin JS Jr, Shepard RC, Williams LJ Jr. Correlation between response to chemotherapy of human tumors in patients and in nude mice. Cancer. 1983 Oct 1;52(7):1146-52.

Giroux V, Iovanna J, Dagorn JC. Probing the human kinome for kinases involved in pancreatic cancer cell survival and gemcitabine resistance. FASEB J. 2006 Oct;20(12):1982-91.

Go KL, Delitto D, Judge SM, Gerber MH, George TJ Jr, Behrns KE, Hughes SJ, Judge AR, Trevino JG. Orthotopic Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts Engraft Into the Pancreatic Parenchyma, Metastasize, and Induce Muscle Wasting to Recapitulate the Human Disease. Pancreas. 2017 Jul;46(6):813-819.

Golan T, Stossel C, Atias D, Buzhor E, Halperin S, Cohen K, Raitses-Gurevich M, Glick Y, Raskin S, Yehuda D, Feldman A, Schvimer M, Friedman E, Karni R, Wilson JM, Denroche RE, Lungu I, Bartlett JMS, Mbabaali F, Gallinger S, Berger R. Recapitulating the clinical scenario of BRCA-associated pancreatic cancer in preclinical models. Int J Cancer. 2018 Jul 1;143(1):179-183.

Golan T, Stossel C, Schvimer M, Atias D, Halperin S, Buzhor E, Raitses-Gurevich M, Cohen K, Pri-Chen S, Wilson J, Denroche RE, Lungu I, Bartlett JMS, Mbabaali F, Yarden Y, Nataraj NB, Gallinger S, Berger R. Pancreatic cancer ascites xenograft-an expeditious model mirroring advanced therapeutic resistant disease. Oncotarget. 2017 Jun 20;8(25):40778-40790.

Gong DJ, Zhang JM, Yu M, Zhuang B, Guo QQ. Inhibition of SIRT1 combined with gemcitabine therapy for pancreatic carcinoma. Clin Interv Aging. 2013;8:889-97.

Gong L, Zhang D, Lei Y, Qian Y, Tan X, Han S. Transcriptome-wide association study identifies multiple genes and pathways associated with pancreatic cancer. Cancer Med. 2018 Nov;7(11):5727-5732.

Gore J, Craven KE, Wilson JL, Cote GA, Cheng M, Nguyen HV, Cramer HM, Sherman S, Korc M. TCGA data and patient-derived orthotopic xenografts highlight pancreatic cancer-associated angiogenesis. Oncotarget. 2015 Apr 10;6(10):7504-21.

Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. Cell. 1978 Nov;15(3):801-11.

Greshock J, Bachman KE, Degenhardt YY, Jing J, Wen YH, Eastman S, McNeil E, Moy C, Wegrzyn R, Auger K, Hardwicke MA, Wooster R. Molecular target class is predictive of in vitro response profile. Cancer Res. 2010 May 1;70(9):3677-86.

Grzenda A, Ordog T, Urrutia R. Polycomb and the emerging epigenetics of pancreatic cancer. J Gastrointest Cancer. 2011 Jun;42(2):100-11.

Guerra C, Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. Mol Oncol. 2013 Apr;7(2):232-47.

Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. Oncogene. 2004 Nov 11;23(53):8705-10.

Hahn SA, Seymour AB, Hoque AT, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. Cancer Res. 1995 Oct 15;55(20):4670-5.

Halkova T, Cuperkova R, Minarik M, Benesova L. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Involvement in Carcinogenesis and Potential Use for Diagnosis and Prognosis. Gastroenterol Res Pract. 2015;2015:892903.

Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2015.

Hardie RA, van Dam E, Cowley M, Han TL, Balaban S, Pajic M, Pinese M, Iconomou M, Shearer RF, McKenna J, Miller D, Waddell N, Pearson JV, Grimmond SM; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Sazanov L, Biankin AV, Villas-Boas S, Hoy AJ, Turner N, Saunders DN. Mitochondrial mutations and metabolic adaptation in pancreatic cancer. Cancer Metab. 2017 Jan 30;5:2.

Hariharan D, Saied A, Kocher HM. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. HPB (Oxford). 2008;10(1):58-62.

Heinemann V, Haas M, Boeck S. Neoadjuvant treatment of borderline resectable and non-resectable pancreatic cancer. Ann Oncol. 2013 Oct;24(10):2484-92.
Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Mouse models of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2012 Mar 28;18(12):1286-94.

Hezel AF, Bardeesy N. Genetically engineered mouse models of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: Teicher BA, editor. Tumor models in cancer research. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2011. p. 377-95.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Mælandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. Cancer Discov. 2014 Sep;4(9):998-1013.

Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Oliveira E, Rubio-Viqueira B, Strawn S, Wick MJ, Martell J, Sidransky D. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. Mol Cancer Ther. 2011 Aug;10(8):1311-6.

Hidalgo M. Pancreatic cancer. N Engl J Med. 2010 Apr 29;362(17):1605-17. Erratum in: N Engl J Med. 2010 Jul 15;363(3):298.

Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. Genome Biol. 2014 Aug 27;15(8):453.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell. 2003 Dec;4(6):437-50.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Cancer Cell. 2005 May;7(5):469-83.

Hiorns LR, Bradshaw TD, Skelton LA, Yu Q, Kelland LR, Leyland-Jones B. Variation in RNA expression and genomic DNA content acquired during cell culture. Br J Cancer. 2004 Jan 26;90(2):476-82.

Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, Zhang N, Murakami T, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, BouvetM, Endo I, Hoffman RM. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy. Oncotarget. 2016 Nov 1;7(44):71696-71702.

Hiroshima Y, Maawy AA, Katz MH, Fleming JB, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Selective efficacy of zoledronic acid on metastasis in a patient-derived orthotopic xenograph (PDOX) nude-mouse model of human pancreatic cancer. J Surg Oncol. 2015 Mar;111(3):311-5.

Hoffman GR, Rahal R, Buxton F, Xiang K, McAllister G, Frias E, Bagdasarian L, Huber J, LindemanA, Chen D, Romero R, Ramadan N, Phadke T, Haas K, Jaskelioff M, Wilson BG, Meyer MJ, Saenz-Vash V, Zhai H, Myer VE, Porter JA, Keen N, McLaughlin ME, Mickanin C, Roberts CW, Stegmeier F, Jagani Z. Functional epigenetics approach identifies BRM/SMARCA2 as a critical synthetic lethal target in BRG1-deficient cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 25;111(8):3128-33.

Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. Invest New Drugs. 1999;17(4):343-59.

Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. Nat Rev Cancer. 2015 Aug;15(8):451-2.

Hoover M, Adamian Y, Brown M, Maawy A, Chang A, Lee J, Gharibi A, Katz MH, Fleming J, Hoffman RM, Bouvet M, Doebler R, Kelber JA. A novel method for RNA extraction from FFPE samples reveals significant differences in biomarker expression between orthotopic and subcutaneous pancreatic cancer patient-derived xenografts. Oncotarget. 2017 Jan 24;8(4):5885-5894.

Hopkins JF, Denroche RE, Aguiar JA, Notta F, Connor AA, Wilson JM, Stein LD, Gallinger S, Boutros PC. Mutations in Mitochondrial DNA From Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Associate With Survival Times of Patients and Accumulate as Tumors Progress. Gastroenterology. 2018 May;154(6):1620-1624.e5.

Horvath S, Zhang B, Carlson M, Lu KV, Zhu S, Felciano RM, Laurance MF, Zhao W, Qi S, Chen Z, Lee Y, Scheck AC, Liau LM, Wu H, Geschwind DH, Febbo PG, Kornblum HI, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 14;103(46):17402-7.

Hou S, Tiriac H, Sridharan BP, Scampavia L, Madoux F, Seldin J, Souza GR, Watson D, Tuveson D, Spicer TP. Advanced Development of Primary Pancreatic Organoid Tumor Models for High-Throughput Phenotypic Drug Screening. SLAS Discov. 2018 Jul;23(6):574-584.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2000 Aug;6(8):2969-72.

Hu G, Luo J. A primer on using pooled shRNA libraries for functional genomic screens. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2012 Feb;44(2):103-12.

Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, Nostro C, Wang R, Muthuswamy LB, Crawford HC, Arrowsmith C, Kalloger SE, Renouf DJ, Connor AA, Cleary S, Schaeffer DF, Roehrl M, Tsao MS, Gallinger S, Keller G, Muthuswamy SK. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. Nat Med. 2015 Nov;21(11):1364-71.

Humphrey ES, Su SP, Nagrial AM, Hochgräfe F, Pajic M, Lehrbach GM, Parton RG, Yap AS, Horvath LG, Chang DK, Biankin AV, Wu J, Daly RJ. Resolution of Novel

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Subtypes by Global Phosphotyrosine Profiling. Mol Cell Proteomics. 2016 Aug;15(8):2671-85.

Humphris JL, Patch AM, Nones K, Bailey PJ, Johns AL, McKay S, Chang DK, Miller DK, Pajic M, Kassahn KS, Quinn MC, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Stone A, Wilson PJ, Anderson M, Fink JL, Holmes O, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Mead RS, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Jones MD, Nagrial AM, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Rooman I, Giry-Laterriere M, Samra JS, Kench JG, Merrett ND, Toon CW, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, McKay CJ, Carter CR, Dickson EJ, Graham JS, Duthie F, Oien K, Hair J, Morton JP, Sansom OJ, Grützmann R, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Rusev B, Corbo V, Salvia R, Cataldo I, Tortora G, Tempero MA; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Hofmann O, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Gill AJ, Pearson JV, Grimmond SM, Waddell N, Biankin AV. Hypermutation In Pancreatic Cancer. Gastroenterology. 2017 Jan;152(1):68-74.e2.

Hwang CI, Boj SF, Clevers H, Tuveson DA. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. J Pathol. 2016 Jan;238(2):197-204.

lacobuzio-Donahue CA, Ryu B, Hruban RH, Kern SE. Exploring the host desmoplastic response to pancreatic carcinoma: gene expression of stromal and neoplastic cells at the site of primary invasion. Am J Pathol. 2002 Jan;160(1):91-9.

lacobuzio-Donahue CA, Velculescu VE, Wolfgang CL, Hruban RH. Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. Clin Cancer Res. 2012 Aug 15;18(16):4257-65.

lacobuzio-Donahue CA. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. Gut. 2012 Jul;61(7):1085-94.

International Agency for Research on Cancer (IARC). World Cancer Report 2014. Geneva: WHO Press; 2014. Chapter 5.7, Pancreatic Cancer; p. 413-21.

lorio F, Knijnenburg TA, Vis DJ, Bignell GR, Menden MP, Schubert M, Aben N, Gonçalves E, Barthorpe S, Lightfoot H, Cokelaer T, Greninger P, van Dyk E, Chang H, de Silva H, Heyn H, Deng X, Egan RK, Liu Q, Mironenko T, Mitropoulos X, Richardson L, Wang J, Zhang T, Moran S, Sayols S, Soleimani M, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Ross-Macdonald P, Esteller M, Gray NS, Haber DA, Stratton MR, Benes CH, Wessels LFA, Saez-Rodriguez J, McDermott U, Garnett MJ. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. Cell. 2016 Jul 28;166(3):740-754.

lorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2007 Jul;6(7):556-68.

Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, Weyer-Czernilofsky U, Engle DD, Perez-Mancera PA, Coupland SE, Taktak A, Bogenrieder T, Tuveson DA, Campbell F, Schmid MC, Mielgo A. Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. Cancer Res. 2016 Dec 1;76(23):6851-6863.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002 Nov 1;100(9):3175-82.

Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, Sloma I, Katz A, Vasquez-Dunddel D, Ben-Zvi I, Stebbing J, McGuire W, Harris W, Maki R, Gaya A, Bedi A, Zacharoulis S, Ravi R, Wexler LH, Hoque MO, Rodriguez-Galindo C, Pass H, Peled N, Davies A, Morris R, Hidalgo M, Sidransky D. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. Ann Oncol. 2017 Oct 1;28(10):2595-2605.

Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. Development. 2015 Sep 15;142(18):3126-37.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.

Jimeno A, Tan AC, Coffa J, Rajeshkumar NV, Kulesza P, Rubio-Viqueira B, Wheelhouse J, Diosdado B, Messersmith WA, Iacobuzio-Donahue C, Maitra A, Varella-Garcia M, Hirsch FR, Meijer GA, Hidalgo M. Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer. Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2841-9.

Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Rajeshkumar NV, Chan A, Solomon A, Hidalgo M. A fine-needle aspirate-based vulnerability assay identifies polo-like kinase 1 as a mediator of gemcitabine resistance in pancreatic cancer. Mol Cancer Ther. 2010 Feb;9(2):311-8.

Jin K, Teng L, Shen Y, He K, Xu Z, Li G. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. Clin Transl Oncol. 2010 Jul;12(7):473-80. (a)

Jin K, He K, Li G, Teng L. Personalized cancer therapy using a patient-derived tumor tissue xenograft model: a translational field worthy of exploring further? Per Med. 2010 Sep;7(5):597-606. (b)

Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. Br J Cancer. 2001 May 18;84(10):1424-31.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR,

Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science. 2008 Sep 26;321(5897):1801-6.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007 Feb 23;128(4):683-92.

Jun E, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Kim MB, Lee JS, Hong SM, Seol HS, Hwang C, Hoffman RM, Shim IK, Chang S, Kim SC. Surgical and Oncological Factors Affecting the Successful Engraftment of Patient-derived Xenografts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Anticancer Res. 2016 Feb;36(2):517-21.

Jung J, Lee CH, Seol HS, Choi YS, Kim E, Lee EJ, Rhee JK, Singh SR, Jun ES, Han B, Hong SM, Kim SC, Chang S. Generation and molecular characterization of pancreatic cancer patient-derived xenografts reveals their heterologous nature. Oncotarget. 2016 Sep 20;7(38):62533-62546.

Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. Cancer Res Treat. 2018 Jan;50(1):1-10.

Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature. 2013 Sep 19;501(7467):346-54.

Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K, Abe M. Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. Gan. 1980 Oct;71(5):596-601.

Kalinina T, Güngör C, Thieltges S, Möller-Krull M, Penas EM, Wicklein D, Streichert T, Schumacher U, Kalinin V, Simon R, Otto B, Dierlamm J, Schwarzenbach H, Effenberger KE, Bockhorn M, Izbicki JR, Yekebas EF. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. BMC Cancer. 2010 Jun 16;10:295.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. Lancet. 2016 Jul 2;388(10039):73-85.

Kamiyama H, Rauenzahn S, Shim JS, Karikari CA, Feldmann G, Hua L, Kamiyama M, Schuler FW, Lin MT, Beaty RM, Karanam B, Liang H, Mullendore ME, Mo G, Hidalgo M, Jaffee E, Hruban RH, Jinnah HA, Roden RB, Jimeno A, Liu JO, Maitra A, Eshleman JR. Personalized chemotherapy profiling using cancer cell lines from selectable mice. Clin Cancer Res. 2013 Mar 1;19(5):1139-46.

Kang Y, Zhang R, Suzuki R, Li SQ, Roife D, Truty MJ, Chatterjee D, Thomas RM, Cardwell J, Wang Y, Wang H, Katz MH, Fleming JB. Two-dimensional culture of human pancreatic adenocarcinoma cells results in an irreversible transition from epithelial to mesenchymal phenotype. Lab Invest. 2015 Feb;95(2):207-22.

Karamitopoulou E, Pallante P, Zlobec I, Tornillo L, Carafa V, Schaffner T, Borner M, Diamantis I, Esposito F, Brunner T, Zimmermann A, Federico A, Terracciano L, Fusco A. Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer. Eur J Cancer. 2010 May;46(8):1438-44.

Kawaguchi K, Igarashi K, Miyake K, Lwin TM, Miyake M, Kiyuna T, Hwang HK, Murakami T, Delong JC, Singh SR, Clary B, Bouvet M, Unno M, Hoffman RM. MEK inhibitor trametinib in combination with gemcitabine regresses a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) pancreatic cancer nude mouse model. Tissue Cell. 2018 Jun;52:124-128. (a)

Kawaguchi K, Miyake K, Han Q, Li S, Tan Y, Igarashi K, Lwin TM, Higuchi T, Kiyuna T, Miyake M, Oshiro H, Bouvet M, Unno M, Hoffman RM. Targeting altered cancer methionine metabolism with recombinant methioninase (rMETase) overcomes partial gemcitabine-resistance and regresses a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model of pancreatic cancer. Cell Cycle. 2018;17(7):868-873. (b)

Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. Eur J Cancer. 2004 Apr;40(6):827-36.

Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. Cancer Biol Ther. 2003 Jul-Aug;2(4 Suppl 1):S134-9.

Kern SE, Shibata D. The fuzzy math of solid tumor stem cells: a perspective. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):8985-8.

Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. EMBO Mol Med. 2017 Feb;9(2):137-153.

Kim MJ, Kim MS, Kim SJ, An S, Park J, Park H, Lee JH, Song KB, Hwang DW, Chang S, Kim KP, Jeong SY, Kim SC, Hong SM. Establishment and characterization of 6 novel patient-derived primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines from Korean pancreatic cancer patients. Cancer Cell Int. 2017 Apr 20;17:47.

Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. Nat Protoc. 2009;4(11):1670-80.

Kim N, He N, Yoon S. Cell line modeling for systems medicine in cancers (review). Int J Oncol. 2014 Feb;44(2):371-6.

Kim MP, Truty MJ, Choi W, Kang Y, Chopin-Lally X, Gallick GE, Wang H, McConkey DJ, Hwang R, Logsdon C, Abbruzzesse J, Fleming JB. Molecular profiling of direct xenograft tumors established from human pancreatic adenocarcinoma after neoadjuvant therapy. Ann Surg Oncol. 2012 Jul;19 Suppl 3:S395-403.

Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. Nat Rev Dis Primers. 2016 Apr 21;2:16022.

Klinghammer K, Walther W, Hoffmann J. Choosing wisely - Preclinical test models in the era of precision medicine. Cancer Treat Rev. 2017 Apr;55:36-45.

Knudsen ES, Balaji U, Mannakee B, Vail P, Eslinger C, Moxom C, Mansour J, Witkiewicz AK. Pancreatic cancer cell lines as patient-derived avatars: genetic characterisation and functional utility. Gut. 2018 Mar;67(3):508-520.

Knudsen ES, O'Reilly EM, Brody JR, Witkiewicz AK. Genetic Diversity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Opportunities for Precision Medicine. Gastroenterology. 2016 Jan;150(1):48-63.

Knudsen ES, Vail P, Balaji U, Ngo H, Botros IW, Makarov V, Riaz N, Balachandran V, Leach S, Thompson DM, Chan TA, Witkiewicz AK. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Combinatorial Genetic, Stromal, and Immunologic Markers. Clin Cancer Res. 2017 Aug 1;23(15):4429-4440.

Kong D, Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. Bioorg Med Chem. 2012 Mar 15;20(6):1947-51.

Kopetz S, Lemos R, Powis G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. Clin Cancer Res. 2012 Oct 1;18(19):5160-2.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705.

Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. J Cell Biochem. 1994 Sep;56(1):4-8.

Laheru D, Shah P, Rajeshkumar NV, McAllister F, Taylor G, Goldsweig H, Le DT, Donehower R, Jimeno A, Linden S, Zhao M, Song D, Rudek MA, Hidalgo M. Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-Farnesylthiosalicylic Acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer. Invest New Drugs. 2012 Dec;30(6):2391-9.

Lai Y, Wei X, Lin S, Qin L, Cheng L, Li P. Current status and perspectives of patientderived xenograft models in cancer research. J Hematol Oncol. 2017 May 12;10(1):106.

Lasfargues C, Pyronnet S. EZH2 links pancreatitis to tissue regeneration and pancreatic cancer. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2012 Aug;36(4):323-4.

Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortés ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G.

Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature. 2013 Jul 11;499(7457):214-218.

Lee CH, Xue H, Sutcliffe M, Gout PW, Huntsman DG, Miller DM, Gilks CB, Wang YZ. Establishment of subrenal capsule xenografts of primary human ovarian tumors in SCID mice: potential models. Gynecol Oncol. 2005 Jan;96(1):48-55.

Lehmann A, Denkert C, Budczies J, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Noske A, Müller BM, Bahra M, Neuhaus P, Dietel M, Kristiansen G, Weichert W. High class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer in vitro and in vivo. BMC Cancer. 2009 Nov 13;9:395.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

Li CH, To KF, Tong JH, Xiao Z, Xia T, Lai PB, Chow SC, Zhu YX, Chan SL, Marquez VE, Chen Y. Enhancer of zeste homolog 2 silences microRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells by inducing formation of heterochromatin. Gastroenterology. 2013 May;144(5):1086-1097.e9.

Li CH, Xiao Z, Tong JH, To KF, Fang X, Cheng AS, Chen Y. EZH2 coupled with HOTAIR to silence MicroRNA-34a by the induction of heterochromatin formation in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Int J Cancer. 2017 Jan 1;140(1):120-129.

Li G. Fidelity and stability of PDX models. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 29-42.

Li J, Wang Y, Ge J, Li W, Yin L, Zhao Z, Liu S, Qin H, Yang J, Wang L, Ni B, Liu Y, Wang H. Doublecortin-Like Kinase 1 (DCLK1) Regulates B Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Insertion Site 1 (Bmi-1) and is Associated with Metastasis and Prognosis in Pancreatic Cancer. Cell Physiol Biochem. 2018;51(1):262-277.

Lin D, Wang X, Gout PW, Wang Y. Patient-derived tumor xenografts: historical background. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 1-9. (a)

Lin D, Wang Y, Gout PW. Prospectives. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 193-200. (b)

Ling A, Gruener RF, Fessler J, Huang RS. More than fishing for a cure: The promises and pitfalls of high throughput cancer cell line screens. Pharmacol Ther. 2018 Nov;191:178-189.

Liu M, Hicklin D. Human tumor xenograft efficacy models. In: Teicher BA, editor. Tumor models in cancer research. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2011. p. 99-124.

Lodhia KA, Hadley AM, Haluska P, Scott CL. Prioritizing therapeutic targets using patient-derived xenograft models. Biochim Biophys Acta. 2015 Apr;1855(2):223-34.

Lohse I, Borgida A, Cao P, Cheung M, Pintilie M, Bianco T, Holter S, Ibrahimov E, Kumareswaran R, Bristow RG, Tsao MS, Gallinger S, Hedley DW. BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patient-derived pancreatic cancer xenografts. Br J Cancer. 2015 Jul 28;113(3):425-32.

Lomberk G, Blum Y, Nicolle R, Nair A, Gaonkar KS, Marisa L, Mathison A, Sun Z, Yan H, Elarouci N, Armenoult L, Ayadi M, Ordog T, Lee JH, Oliver G, Klee E, Moutardier V, Gayet O, Bian B, Duconseil P, Gilabert M, Bigonnet M, Garcia S, Turrini O, Delpero JR, Giovannini M, Grandval P, Gasmi M, Secq V, De Reyniès A, Dusetti N, Iovanna J, Urrutia R. Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes. Nat Commun. 2018 May 17;9(1):1978.

Lomberk G, Mathison AJ, Grzenda A, Urrutia R. The sunset of somatic genetics and the dawn of epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research. Curr Opin Gastroenterol. 2008 Sep;24(5):597-602.

Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. Pancreas. 2004 Oct;29(3):193-203.

Luo B, Cheung HW, Subramanian A, Sharifnia T, Okamoto M, Yang X, Hinkle G, Boehm JS, Beroukhim R, Weir BA, Mermel C, Barbie DA, Awad T, Zhou X, Nguyen T, Piqani B, Li C, Golub TR, Meyerson M, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM, Root DE. Highly parallel identification of essential genes in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23;105(51):20380-5.

MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. Nat Cell Biol. 2005 Jun;7(6):591-600.

Mair B, Kubicek S, Nijman SM. Exploiting epigenetic vulnerabilities for cancer therapeutics. Trends Pharmacol Sci. 2014 Mar;35(3):136-45.

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

Makohon-Moore A, lacobuzio-Donahue CA. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. Nat Rev Cancer. 2016 Sep;16(9):553-65.

Malaney P, Nicosia SV, Davé V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. Cancer Lett. 2014 Mar 1;344(1):1-12.

Mallen-St Clair J, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, Taylor L, Livanos A, Pylayeva-Gupta Y, Miller G, Margueron R, Reinberg D, Bar-Sagi D. EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. Genes Dev. 2012 Mar 1;26(5):439-44.

Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. Cell. 2009 Feb 20;136(4):656-68.

Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jul 25;61(9):732-45.

Mann KM, Ward JM, Yew CC, Kovochich A, Dawson DW, Black MA, Brett BT, Sheetz TE, Dupuy AJ; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Chang DK, Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Grimmond SM, Rust AG, Adams DJ, Jenkins NA, Copeland NG. Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 17;109(16):5934-41.

Marcotte R, Brown KR, Suarez F, Sayad A, Karamboulas K, Krzyzanowski PM, Sircoulomb F, Medrano M, Fedyshyn Y, Koh JLY, van Dyk D, Fedyshyn B, Luhova M, Brito GC, Vizeacoumar FJ, Vizeacoumar FS, Datti A, Kasimer D, Buzina A, Mero P, Misquitta C, Normand J, Haider M, Ketela T, Wrana JL, Rottapel R, Neel BG, Moffat J. Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells. Cancer Discov. 2012 Feb;2(2):172-189.

Marcotte R, Sayad A, Brown KR, Sanchez-Garcia F, Reimand J, Haider M, Virtanen C, Bradner JE, Bader GD, Mills GB, Pe'er D, Moffat J, Neel BG. Functional Genomic Landscape of Human Breast Cancer Drivers, Vulnerabilities, and Resistance. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):293-309.

Marincola FM, Drucker BJ, Siao DY, Hough KL, Holder WD Jr. The nude mouse as a model for the study of human pancreatic cancer. J Surg Res. 1989 Dec;47(6):520-9.

Martinez-Garcia R, Juan D, Rausell A, Muñoz M, Baños N, Menéndez C, Lopez-Casas PP, Rico D, Valencia A, Hidalgo M. Transcriptional dissection of pancreatic tumors engrafted in mice. Genome Med. 2014 Apr 16;6(4):27.

Martínez-Romero C, Rooman I, Skoudy A, Guerra C, Molero X, González A, Iglesias M, Lobato T, Bosch A, Barbacid M, Real FX, Hernández-Muñoz I. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. J Pathol. 2009 Oct;219(2):205-13.

Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo A, Hruban R, Goggins M. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):1208-17.

Mattie M, Christensen A, Chang MS, Yeh W, Said S, Shostak Y, Capo L, Verlinsky A, An Z, Joseph I, Zhang Y, Kumar-Ganesan S, Morrison K, Stover D, Challita-Eid P. Molecular characterization of patient-derived human pancreatic tumor xenograft models for preclinical and translational development of cancer therapeutics. Neoplasia. 2013 Oct;15(10):1138-50.

McCleary-Wheeler AL, Lomberk GA, Weiss FU, Schneider G, Fabbri M, Poshusta TL, Dusetti NJ, Baumgart S, Iovanna JL, Ellenrieder V, Urrutia R, Fernandez-Zapico ME. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis.

Cancer Lett. 2013 Jan 28;328(2):212-21. Erratum in: Cancer Lett. 2013 Aug 28;337(1):143-4.

McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J, Archibald H, Raudales R, Tam A, Lee D, Rothenberg SM, Supko JG, Sordella R, Ulkus LE, lafrate AJ, Maheswaran S, Njauw CN, Tsao H, Drew L, Hanke JH, Ma XJ, Erlander MG, Gray NS, Haber DA, Settleman J. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 11;104(50):19936-41.

McDonald ER 3rd, de Weck A, Schlabach MR, Billy E, Mavrakis KJ, Hoffman GR, Belur D, Castelletti D, Frias E, Gampa K, Golji J, Kao I, Li L, Megel P, Perkins TA. Ramadan N, Ruddy DA, Silver SJ, Sovath S, Stump M, Weber O, Widmer R, Yu J, Yu K, Yue Y, Abramowski D, Ackley E, Barrett R, Berger J, Bernard JL, Billig R, Brachmann SM, Buxton F, Caothien R, Caushi JX, Chung FS, Cortés-Cros M, deBeaumont RS, Delaunay C, Desplat A, Duong W, Dwoske DA, Eldridge RS, Farsidiani A, Feng F, Feng J, Flemming D, Forrester W, Galli GG, Gao Z, Gauter F, Gibaja V, Haas K, Hattenberger M, Hood T, Hurov KE, Jagani Z, Jenal M, Johnson JA, Jones MD, Kapoor A, Korn J, Liu J, Liu Q, Liu S, Liu Y, Loo AT, Macchi KJ, Martin T, McAllister G, Meyer A, Mollé S, Pagliarini RA, Phadke T, Repko B, Schouwey T, Shanahan F, Shen Q, Stamm C, Stephan C, Stucke VM, Tiedt R, Varadarajan M, Venkatesan K, Vitari AC, Wallroth M, Weiler J, Zhang J, Mickanin C, Myer VE, Porter JA, Lai A, Bitter H, Lees E, Keen N, Kauffmann A, Stegmeier F, Hofmann F, Schmelzle T, Sellers WR. Project DRIVE: A Compendium of Cancer Dependencies and Synthetic Lethal Relationships Uncovered by Large-Scale, Deep RNAi Screening. Cell. 2017 Jul 27;170(3):577-592.e10.

Meehan TF, Conte N, Goldstein T, Inghirami G, Murakami MA, Brabetz S, Gu Z, Wiser JA, Dunn P, Begley DA, Krupke DM, Bertotti A, Bruna A, Brush MH, Byrne AT, Caldas C, Christie AL, Clark DA, Dowst H, Dry JR, Doroshow JH, Duchamp O, Evrard YA, Ferretti S, Frese KK, Goodwin NC, Greenawalt D, Haendel MA, Hermans E, Houghton PJ, Jonkers J, Kemper K, Khor TO, Lewis MT, Lloyd KCK, Mason J, Medico E, Neuhauser SB, Olson JM, Peeper DS, Rueda OM, Seong JK, Trusolino L, Vinolo E, Wechsler-Reya RJ, Weinstock DM, Welm A, Weroha SJ, Amant F, Pfister SM, Kool M, Parkinson H, Butte AJ, Bult CJ. PDX-MI: Minimal Information for Patient-Derived Tumor Xenograft Models. Cancer Res. 2017 Nov 1;77(21):e62-e66.

Melstrom LG, Salazar MD, Diamond DJ. The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. J Surg Oncol. 2017 Jul;116(1):7-15.

Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, Sugimoto K, Batmunkh E, Kanemura H, Morine Y, Shimada M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. Pancreas. 2008 Apr;36(3):e1-9.

Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK, Carpenter AE, Foo SY, Stewart SA, Stockwell BR, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM, Root DE. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. Cell. 2006 Mar 24;124(6):1283-98.

Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, Rashid NU, Williams LA, Eaton SC, Chung AH, Smyla JK, Anderson JM, Kim HJ, Bentrem DJ, Talamonti MS, Iacobuzio-Donahue CA, Hollingsworth MA, Yeh JJ. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Genet. 2015 Oct;47(10):1168-78.

Monsma DJ, Monks NR, Cherba DM, Dylewski D, Eugster E, Jahn H, Srikanth S, Scott SB, Richardson PJ, Everts RE, Ishkin A, Nikolsky Y, Resau JH, Sigler R, Nickoloff BJ, Webb CP. Genomic characterization of explant tumorgraft models derived from fresh patient tumor tissue. J Transl Med. 2012 Jun 18;10:125.

Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15502-7.

Morgan MM, Johnson BP, Livingston MK, Schuler LA, Alarid ET, Sung KE, Beebe DJ. Personalized in vitro cancer models to predict therapeutic response: Challenges and a framework for improvement. Pharmacol Ther. 2016 Sep;165:79-92.

Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. Gene Ther. 2000 Jun;7(12):1063-6.

Morton CL, Houghton PJ. The Pediatric Preclinical Testing Program. In: Teicher BA, editor. Tumor models in cancer research. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2011. p. 195-213.

Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. Nat Protoc. 2007;2(2):247-50.

Müller S, Raulefs S, Bruns P, Afonso-Grunz F, Plötner A, Thermann R, Jäger C, Schlitter AM, Kong B, Regel I, Roth WK, Rotter B, Hoffmeier K, Kahl G, Koch I, Theis FJ, Kleeff J, Winter P, Michalski CW. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, IncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. Mol Cancer. 2015 Apr 25;14:94. Erratum in: Mol Cancer. 2015 Jul 31;14:144.

Muraro MJ, Dharmadhikari G, Grün D, Groen N, Dielen T, Jansen E, van Gurp L, Engelse MA, Carlotti F, de Koning EJ, van Oudenaarden A. A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas. Cell Syst. 2016 Oct 26;3(4):385-394.e3.

Murphy SJ, Hart SN, Halling GC, Johnson SH, Smadbeck JB, Drucker T, Lima JF, Rohakhtar FR, Harris FR, Kosari F, Subramanian S, Petersen GM, Wiltshire TD, Kipp BR, Truty MJ, McWilliams RR, Couch FJ, Vasmatzis G. Integrated Genomic Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Reveals Genomic Rearrangement Events as Significant Drivers of Disease. Cancer Res. 2016 Feb 1;76(3):749-61. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 1990 Apr;2(4):279-289.

Navone NM, Labanca E. Modeling cancer metastasis. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 93-114.

Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. Nature. 2006 May 4;441(7089):106-10.

Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Loncle C, Gayet O, Moutardier V, Turrini O, Giovannini M, Bian B, Bigonnet M, Rubis M, Elarouci N, Armenoult L, Ayadi M, Duconseil P, Gasmi M, Ouaissi M, Maignan A, Lomberk G, Boher JM, Ewald J, Bories E, Garnier J, Goncalves A, Poizat F, Raoul JL, Secq V, Garcia S, Grandval P, Barraud-Blanc M, Norguet E, Gilabert M, Delpero JR, Roques J, Calvo E, Guillaumond F, Vasseur S, Urrutia R, de Reyniès A, Dusetti N, Iovanna J. Pancreatic Adenocarcinoma Therapeutic Targets Revealed by Tumor-Stroma Cross-Talk Analyses in Patient-Derived Xenografts. Cell Rep. 2017 Nov 28;21(9):2458-2470.

Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. Pharmacogenomics. 2015;16(3):273-85.

Noll EM, Eisen C, Stenzinger A, Espinet E, Muckenhuber A, Klein C, Vogel V, Klaus B, Nadler W, Rösli C, Lutz C, Kulke M, Engelhardt J, Zickgraf FM, Espinosa O, Schlesner M, Jiang X, Kopp-Schneider A, Neuhaus P, Bahra M, Sinn BV, Eils R, Giese NA, Hackert T, Strobel O, Werner J, Büchler MW, Weichert W, Trumpp A, Sprick MR. CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Med. 2016 Mar;22(3):278-87.

Nones K, Waddell N, Song S, Patch AM, Miller D, Johns A, Wu J, Kassahn KS, Wood D, Bailey P, Fink L, Manning S, Christ AN, Nourse C, Kazakoff S, Taylor D, Leonard C, Chang DK, Jones MD, Thomas M, Watson C, Pinese M, Cowley M, Rooman I, Pajic M; APGI, Butturini G, Malpaga A, Corbo V, Crippa S, Falconi M, Zamboni G, Castelli P, Lawlor RT, Gill AJ, Scarpa A, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. Int J Cancer. 2014 Sep 1;135(5):1110-8.

Noto FK, Yeshi T. Humanized mouse and rat PDX cancer models. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 43-57.

Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, Denroche RE, Liang SB, Brown AM, Kim JC, Wang T, Simpson JT, Beck T, Borgida A, Buchner N, Chadwick D, Hafezi-Bakhtiari S, Dick JE, Heisler L, Hollingsworth MA, Ibrahimov E, Jang GH, Johns J, Jorgensen LG, Law C, Ludkovski O, Lungu I, Ng K, Pasternack D, Petersen GM, Shlush LI, Timms L, Tsao MS, Wilson JM, Yung CK, Zogopoulos G, Bartlett JM, Alexandrov LB, Real FX, Cleary SP, Roehrl MH, McPherson JD, Stein

LD, Hudson TJ, Campbell PJ, Gallinger S. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. Nature. 2016 Oct 20;538(7625):378-382. Erratum in: Nature. 2017 Feb 2;542(7639):124.

Notta F, Hahn SA, Real FX. A genetic roadmap of pancreatic cancer: still evolving. Gut. 2017 Dec;66(12):2170-2178.

Okada N, Kitano Y, Ichihara K. Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. J Invest Dermatol. 1982 Jul;79(1):42-7.

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science. 2009 Jun 12;324(5933):1457-61.

Olive KP, Tuveson DA. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. Clin Cancer Res. 2006 Sep 15;12(18):5277-87.

Omura N, Li CP, Li A, Hong SM, Walter K, Jimeno A, Hidalgo M, Goggins M. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Biol Ther. 2008 Jul;7(7):1146-56.

Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2009;2(4):310-26.

Ouaïssi M, Sielezneff I, Silvestre R, Sastre B, Bernard JP, Lafontaine JS, Payan MJ, Dahan L, Pirrò N, Seitz JF, Mas E, Lombardo D, Ouaissi A. High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. Ann Surg Oncol. 2008 Aug;15(8):2318-28.

Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. Clin Cancer Res. 2008 Nov 1;14(21):6790-6.

Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S, Balija V, O'Shaughnessy A, Gnoj L, Scobie K, Chang K, Westbrook T, Cleary M, Sachidanandam R, McCombie WR, Elledge SJ, Hannon GJ. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. Nature. 2004 Mar 25;428(6981):427-31.

Pan Q, Bao LW, Kleer CG, Sabel MS, Griffith KA, Teknos TN, Merajver SD. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. Cancer Res. 2005 Sep 15;65(18):8366-71.

Pan Q, van der Laan LJ, Janssen HL, Peppelenbosch MP. A dynamic perspective of RNAi library development. Trends Biotechnol. 2012 Apr;30(4):206-15.

Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. Lancet Oncol. 2009 Jan;10(1):88-95.

Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature. 1968 Jan 27;217(5126):370-1.

Paradise BD, Barham W, Fernandez-Zapico ME. Targeting Epigenetic Aberrations in Pancreatic Cancer, a New Path to Improve Patient Outcomes? Cancers (Basel). 2018 Apr 28;10(5). pii: E128.

Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, Sailer V, Augello M, Puca L, Rosati R, McNary TJ, Churakova Y, Cheung C, Triscott J, Pisapia D, Rao R, Mosquera JM, Robinson B, Faltas BM, Emerling BE, Gadi VK, Bernard B, Elemento O, Beltran H, Demichelis F, Kemp CJ, Grandori C, Cantley LC, Rubin MA. Personalized *In Vitro* and *In Vivo* Cancer Models to Guide Precision Medicine. Cancer Discov. 2017 May;7(5):462-477.

Perales-Patón J, Piñeiro-Yañez E, Tejero H, López-Casas PP, Hidalgo M, Gómez-López G, Al-Shahrour F. Pancreas Cancer Precision Treatment Using Avatar Mice from a Bioinformatics Perspective. Public Health Genomics. 2017;20(2):81-91.

Pergolini I, Morales-Oyarvide V, Mino-Kenudson M, Honselmann KC, Rosenbaum MW, Nahar S, Kem M, Ferrone CR, Lillemoe KD, Bardeesy N, Ryan DP, Thayer SP, Warshaw AL, Fernández-Del Castillo C, Liss AS. Tumor engraftment in patientderived xenografts of pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with adverse clinicopathological features and poor survival. PLoS One. 2017 Aug 30;12(8):e0182855.

JF, Miksad RA. Genetic Testing Pancreatic Peters ML, Tseng in Ductal Adenocarcinoma: Implications Prevention Treatment. for and Clin Ther. 2016 Jul;38(7):1622-35.

Peterson JK, Houghton PJ. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. Eur J Cancer. 2004 Apr;40(6):837-44.

Pore N, Jalla S, Liu Z, Higgs B, Sorio C, Scarpa A, Hollingsworth R, Tice DA, Michelotti E. In Vivo Loss of Function Screening Reveals Carbonic Anhydrase IX as a Key Modulator of Tumor Initiating Potential in Primary Pancreatic Tumors. Neoplasia. 2015 Jun;17(6):473-80.

Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. Nature. 2011 Aug 18;476(7360):346-50.

Proctor E, Waghray M, Lee CJ, Heidt DG, Yalamanchili M, Li C, Bednar F, Simeone DM. Bmi1 enhances tumorigenicity and cancer stem cell function in pancreatic adenocarcinoma. PLoS One. 2013;8(2):e55820.

Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell. 2012 Mar 20;21(3):418-29.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1423-37.

Radiloff DR, Rinella ES, Threadgill DW. Modeling cancer patient populations in mice: complex genetic and environmental factors. Drug Discov Today Dis Models. 2008;4(2):83-88.

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. 2014 Jun 1;74(11):2913-21. Erratum in: Cancer Res. 2014 Jul 15;74(14):4006.

Rajeshkumar NV, Yabuuchi S, Pai SG, De Oliveira E, Kamphorst JJ, Rabinowitz JD, Tejero H, Al-Shahrour F, Hidalgo M, Maitra A, Dang CV. Treatment of Pancreatic Cancer Patient-Derived Xenograft Panel with Metabolic Inhibitors Reveals Efficacy of Phenformin. Clin Cancer Res. 2017 Sep 15;23(18):5639-5647.

Reid MD, Balci S, Saka B, Adsay NV. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. Endocr Pathol. 2014 Mar;25(1):65-79.

Reinhold WC, Varma S, Rajapakse VN, Luna A, Sousa FG, Kohn KW, Pommier YG. Using drug response data to identify molecular effectors, and molecular "omic" data to identify candidate drugs in cancer. Hum Genet. 2015 Jan;134(1):3-11. Erratum in: Hum Genet. 2015 May;134(5):509.

Reyes G, Villanueva A, García C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capellá G. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. Cancer Res. 1996 Dec 15;56(24):5713-9.

Reznik R, Hendifar AE, Tuli R. Genetic determinants and potential therapeutic targets for pancreatic adenocarcinoma. Front Physiol. 2014 Mar 3;5:87.

Risbridger GP, Lawrence MG. Towards best practice in establishing patient-derived xenografts. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 11-28.

Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, Kurtz RC, Olson SH, Rustgi AK, Schwartz AG, Stoffel E, Syngal S, Zogopoulos G, Ali SZ, Axilbund J, Chaffee KG, Chen YC, Cote ML, Childs EJ, Douville C, Goes FS, Herman JM, Iacobuzio-Donahue C, Kramer M, Makohon-Moore A, McCombie RW, McMahon KW, Niknafs N, Parla J, Pirooznia M, Potash JB, Rhim AD, Smith AL, Wang Y, Wolfgang CL, Wood LD, Zandi PP, Goggins M, Karchin R, Eshleman JR,

Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Klein AP. Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. Cancer Discov. 2016 Feb;6(2):166-75.

Rodriguez-Barrueco R, Marshall N, Silva JM. Pooled shRNA screenings: experimental approach. In: Su GH, editor. Pancreatic cancer: methods and protocols. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2013. p. 353-70.

Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nat Med. 2011 Mar;17(3):330-9.

Roife D, Dai B, Kang Y, Perez MVR, Pratt M, Li X, Fleming JB. Ex Vivo Testing of Patient-Derived Xenografts Mirrors the Clinical Outcome of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2016 Dec 15;22(24):6021-6030.

Root DE, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. Nat Methods. 2006 Sep;3(9):715-9.

Rosfjord E, Lucas J, Li G, Gerber HP. Advances in patient-derived tumor xenografts: from target identification to predicting clinical response rates in oncology. Biochem Pharmacol. 2014 Sep 15;91(2):135-43.

Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, Zhang X, Iacobuzio-Donahue C, Karikari C, Shi C, Danenberg K, Danenberg PV, Kuramochi H, Tanaka K, Singh S, Salimi-Moosavi H, Bouraoud N, Amador ML, Altiok S, Kulesza P, Yeo C, Messersmith W, Eshleman J, Hruban RH, Maitra A, Hidalgo M. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2006 Aug 1;12(15):4652-61.

Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. Clin Pharmacol Ther. 2009 Feb;85(2):217-21.

Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Establishment of primary cell lines in pancreatic cancer. In: Srivastava SK, editor. Pancreatic cancer: molecular mechanism and targets. Rijeka: InTech; 2012. p. 259-74. (a)

Rückert F, Aust D, Böhme I, Werner K, Brandt A, Diamandis EP, Krautz C, Hering S, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C. Five primary human pancreatic adenocarcinoma cell lines established by the outgrowth method. J Surg Res. 2012 Jan;172(1):29-39. (b)

Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. Biochem Pharmacol. 2014 Jan 1;87(1):150-61.

Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. N Engl J Med. 2014 Sep 11;371(11):1039-49.

Samuel N, Sayad A, Wilson G, Lemire M, Brown KR, Muthuswamy L, Hudson TJ, Moffat J. Integrated genomic, transcriptomic, and RNA-interference analysis of genes in somatic copy number gains in pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreas. 2013 Aug;42(6):1016-26.

Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;9(2):77-87. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. Curr Opin Genet Dev. 2012 Feb;22(1):50-5.

Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. Mod Pathol. 2008 Mar;21(3):238-44.

Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3735-42. (a)

Sato N, Maitra A, Fukushima N, van Heek NT, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Rosty C, Goggins M. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Res. 2003 Jul 15;63(14):4158-66. (b)

Sato N, Goggins M. The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2006;13(4):286-95.

Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. Cancer Res. 2006 Apr 1;66(7):3351-4, discussion 3354.

Schlabach MR, Luo J, Solimini NL, Hu G, Xu Q, Li MZ, Zhao Z, Smogorzewska A, Sowa ME, Ang XL, Westbrook TF, Liang AC, Chang K, Hackett JA, Harper JW, Hannon GJ, Elledge SJ. Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. Science. 2008 Feb 1;319(5863):620-4. Erratum in: Science.2008 Apr 18;320(5874):316.

Schneider G, Krämer OH, Schmid RM, Saur D. Acetylation as a transcriptional control mechanism-HDACs and HATs in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Gastrointest Cancer. 2011 Jun;42(2):85-92.

Schneider G, Krämer OH, Fritsche P, Schüler S, Schmid RM, Saur D. Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Cell Mol Med. 2010 Jun;14(6A):1255-63.

Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, Weidenauer C, Hagmann W, Michl P, Heuchel RL, Haas SL, Löhr JM. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. Cancers (Basel). 2014 Oct 21;6(4):2137-54.

Schüler S, Fritsche P, Diersch S, Arlt A, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. Mol Cancer. 2010 Apr 16;9:80.

Seashore-Ludlow B, Rees MG, Cheah JH, Cokol M, Price EV, Coletti ME, Jones V, Bodycombe NE, Soule CK, Gould J, Alexander B, Li A, Montgomery P, Wawer MJ, Kuru N, Kotz JD, Hon CS, Munoz B, Liefeld T, Dančík V, Bittker JA, Palmer M, Bradner JE, Shamji AF, Clemons PA, Schreiber SL. Harnessing Connectivity in a Large-Scale Small-Molecule Sensitivity Dataset. Cancer Discov. 2015 Nov;5(11):1210-23.

Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, Magouliotis D, Kamposioras K, Ulukaya E, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? J Proteomics. 2018 Sep 30;188:107-118.

Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. Ann Surg Oncol. 2007 Dec;14(12):3629-37.

Shain AH, Salari K, Giacomini CP, Pollack JR. Integrative genomic and functional profiling of the pancreatic cancer genome. BMC Genomics. 2013 Sep 16;14:624.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010 Jan;31(1):27-36.

Sharpless NE, Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. Nat Rev Drug Discov. 2006 Sep;5(9):741-54.

Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. Cell. 2013 Mar 28;153(1):38-55.

Shimizu H, Horii A, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Fukushige S. Identification of epigenetically silenced genes in human pancreatic cancer by a novel method "microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation" (MeTA-array). Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jul 22;411(1):162-7.

Shoemaker RH, Monks A, Alley MC, Scudiero DA, Fine DL, McLemore TL, Abbott BJ, Paull KD, Mayo JG, Boyd MR. Development of human tumor cell line panels for use in disease-oriented drug screening. Prog Clin Biol Res. 1988;276:265-86.

Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nat Rev Cancer. 2006 Oct;6(10):813-23.

Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol. 2007 Feb;7(2):118-30.

Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. Nat Rev mmunol. 2012 Nov;12(11):786-98.

Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. Cold Spring Harb Protoc. 2014 Jul 1;2014(7):694-708. (a)

Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Subcapsular transplantation of tissue in the kidney. Cold Spring Harb Protoc. 2014 Jul 1;2014(7):737-40. (b)

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, Leiter EH. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. J Immunol. 1995 Jan 1;154(1):180-91.

Sia D, Moeini A, Labgaa I, Villanueva A. The future of patient-derived tumor xenografts in cancer treatment. Pharmacogenomics. 2015;16(14):1671-83.

Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. Nat Genet. 2005 Nov;37(11):1281-8.

Sims D, Mendes-Pereira AM, Frankum J, Burgess D, Cerone MA, Lombardelli C, Mitsopoulos C, Hakas J, Murugaesu N, Isacke CM, Fenwick K, Assiotis I, Kozarewa I, Zvelebil M, Ashworth A, Lord CJ. High-throughput RNA interference screening using pooled shRNA libraries and next generation sequencing. Genome Biol. 2011 Oct 21;12(10):R104.

Singh M, Johnson L. Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective. Clin Cancer Res. 2006 Sep 15;12(18):5312-28.

Singh M, Lima A, Molina R, Hamilton P, Clermont AC, Devasthali V, Thompson JD, Cheng JH, Bou Reslan H, Ho CC, Cao TC, Lee CV, Nannini MA, Fuh G, Carano RA, Koeppen H, Yu RX, Forrest WF, Plowman GD, Johnson L. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. Nat Biotechnol. 2010 Jun;28(6):585-93.

Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. Cancer Res. 2013 Sep 1;73(17):5315-9.

Song W, Tao K, Li H, Jin C, Song Z, Li J, Shi H, Li X, Dang Z, Dou K. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. Cancer Sci. 2010 Jul;101(7):1754-60.

Sorio C, Bonora A, Orlandini S, Moore PS, Capelli P, Cristofori P, Dal Negro G, Marchiori P, Gaviraghi G, Falconi M, Pederzoli P, Zamboni G, Scarpa A. Successful xenografting of cryopreserved primary pancreatic cancers. Virchows Arch. 2001 Feb;438(2):154-8.

Stampfer MR. Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. In Vitro. 1982 Jun;18(6):531-7.

Stenzinger A, Endris V, Klauschen F, Sinn B, Lorenz K, Warth A, Goeppert B, Ehemann V, Muckenhuber A, Kamphues C, Bahra M, Neuhaus P, Weichert W. High SIRT1 expression is a negative prognosticator in pancreatic ductal adenocarcinoma. BMC Cancer. 2013 Oct 2;13:450.

Stewart EL, Tsao MS. Modeling drug resistance in PDX models. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 115-26.

Stewart E, Federico S, Karlstrom A, Shelat A, Sablauer A, Pappo A, Dyer MA. The Childhood Solid Tumor Network: A new resource for the developmental biology and oncology research communities. Dev Biol. 2016 Mar 15;411(2):287-293.

Stewart E, Federico SM, Chen X, Shelat AA, Bradley C, Gordon B, Karlstrom A, Twarog NR, Clay MR, Bahrami A, Freeman BB 3rd, Xu B, Zhou X, Wu J, Honnell V, Ocarz M, Blankenship K, Dapper J, Mardis ER, Wilson RK, Downing J, Zhang J, Easton J, Pappo A, Dyer MA. Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. Nature. 2017 Sep 7;549(7670):96-100.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

Stram Y, Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference. Virus Genes. 2006 Jun;32(3):299-306.

Struss WJ, Black PC. Using PDX for biomarker development. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 127-40.

Sun L, Chua CYX, Tian W, Zhang Z, Chiao PJ, Zhang W. MicroRNA Signaling Pathway Network in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. J Genet Genomics. 2015 Oct 20;42(10):563-577.

Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. Nat Rev Cancer. 2015 Aug;15(8):473-83.

Tan GD. The pancreas. Anaesth Intens Care Med. 2008 Oct;9(10):424-7.

Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, Solomon A, Rajeshkumar NV, Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. Mol Oncol. 2009 Dec;3(5-6):425-38.

Taylor-Papadimitriou J, Purkis P, Fentiman IS. Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary epithelial cells. J Cell Physiol. 1980 Mar;102(3):317-21.

Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nat Rev Clin Oncol. 2012 Apr 17;9(6):338-50.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancer Cell. 2017 Aug 14;32(2):185-203.e13.

Thomas RM, Van Dyke T, Merlino G, Day CP. Concepts in Cancer Modeling: A Brief History. Cancer Res. 2016 Oct 15;76(20):5921-5925.

Thomas RM, Truty MJ, Kim M, Kang Y, Zhang R, Chatterjee D, Katz MH, Fleming JB. The canary in the coal mine: the growth of patient-derived tumorgrafts in mice predicts clinical recurrence after surgical resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. Ann Surg Oncol. 2015;22(6):1884-92.

Tignanelli CJ, Herrera Loeza SG, Yeh JJ. KRAS and PIK3CA mutation frequencies in patient-derived xenograft models of pancreatic and colorectal cancer are reflective of patient tumors and stable across passages. Am Surg. 2014 Sep;80(9):873-7.

Tiriac H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, Froeling FEM, Burkhart RA, Denroche RE, Jang GH, Miyabayashi K, Young CM, Patel H, Ma M, LaComb JF, Palmaira RLD, Javed AA, Huynh JC, Johnson M, Arora K, Robine N, Shah M, Sanghvi R, Goetz AB, Lowder CY, Martello L, Driehuis E, LeComte N, Askan G, Iacobuzio-Donahue CA, Clevers H, Wood LD, Hruban RH, Thompson E, Aguirre AJ, Wolpin BM, Sasson A, Kim J, Wu M, Bucobo JC, Allen P, Sejpal DV, Nealon W, Sullivan JD, Winter JM, Gimotty PA, Grem JL, DiMaio DJ, Buscaglia JM, Grandgenett PM, Brody JR, Hollingsworth MA, O'Kane GM, Notta F, Kim E, Crawford JM, Devoe C, Ocean A, Wolfgang CL, Yu KH, Li E, Vakoc CR, Hubert B, Fischer SE, Wilson JM, Moffitt R, Knox J, Krasnitz A, Gallinger S, Tuveson DA. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. Cancer Discov. 2018 Sep;8(9):1112-1129. (a)

Tiriac H, Bucobo JC, Tzimas D, Grewel S, Lacomb JF, Rowehl LM, Nagula S, Wu M, Kim J, Sasson A, Vignesh S, Martello L, Munoz-Sagastibelza M, Somma J, Tuveson DA, Li E, Buscaglia JM. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. Gastrointest Endosc. 2018 Jun;87(6):1474-1480. (b)

Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, Yeo CJ, Kleer CG, Brody JR, Witkiewicz AK. Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Hum Pathol. 2010 Sep;41(9):1205-9.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother Pharmacol. 1989;24(3):148-54.

Torphy RJ, Tignanelli CJ, Kamande JW, Moffitt RA, Herrera Loeza SG, Soper SA, Yeh JJ. Circulating tumor cells as a biomarker of response to treatment in patientderived xenograft mouse models of pancreatic adenocarcinoma. PLoS One. 2014 Feb 19;9(2):e89474.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015 Mar;65(2):87-108.

Torres MP, Rachagani S, Souchek JJ, Mallya K, Johansson SL, Batra SK. Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. PLoS One. 2013 Nov 20;8(11):e80580.

Townsend EC, Murakami MA, Christodoulou A, Christie AL, Köster J, DeSouza TA, Morgan EA, Kallgren SP, Liu H, Wu SC, Plana O, Montero J, Stevenson KE, Rao P, Vadhi R, Andreeff M, Armand P, Ballen KK, Barzaghi-Rinaudo P, Cahill S, Clark RA, Cooke VG, Davids MS, DeAngelo DJ, Dorfman DM, Eaton H, Ebert BL, Etchin J, Firestone B, Fisher DC, Freedman AS, Galinsky IA, Gao H, Garcia JS, Garnache-Ottou F, Graubert TA, Gutierrez A, Halilovic E, Harris MH, Herbert ZT, Horwitz SM, Inghirami G, Intlekofer AM, Ito M, Izraeli S, Jacobsen ED, Jacobson CA, Jeay S, Jeremias I, Kelliher MA, Koch R, Konopleva M, Kopp N, Kornblau SM, Kung AL, Kupper TS, LeBoeuf NR, LaCasce AS, Lees E, Li LS, Look AT, Murakami M, Muschen M, Neuberg D, Ng SY, Odejide OO, Orkin SH, Paquette RR, Place AE, Roderick JE, Ryan JA, Sallan SE, Shoji B, Silverman LB, Soiffer RJ, Steensma DP, Stegmaier K, Stone RM, Tamburini J, Thorner AR, van Hummelen P, Wadleigh M, Wiesmann M, Weng AP, Wuerthner JU, Williams DA, Wollison BM, Lane AA, Letai A, Bertagnolli MM, Ritz J, Brown M, Long H, Aster JC, Shipp MA, Griffin JD, Weinstock DM. The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. Cancer Cell. 2016 Apr 11;29(4):574-586. Erratum in: Cancer Cell. 2016 Jul 11;30(1):183.

Träger MM, Dhayat SA. Epigenetics of epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. Int J Cancer. 2017 Jul 1;141(1):24-32.

Tsherniak A, Vazquez F, Montgomery PG, Weir BA, Kryukov G, Cowley GS, Gill S, Harrington WF, Pantel S, Krill-Burger JM, Meyers RM, Ali L, Goodale A, Lee Y, Jiang G, Hsiao J, Gerath WFJ, Howell S, Merkel E, Ghandi M, Garraway LA, Root DE, Golub TR, Boehm JS, Hahn WC. Defining a Cancer Dependency Map. Cell. 2017 Jul 27;170(3):564-576.e16.

Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. Cancer Res. 2001 Dec 1;61(23):8540-6.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. 2000 Apr 1;60(7):1835-9.

van Vlerken LE, Kiefer CM, Morehouse C, Li Y, Groves C, Wilson SD, Yao Y, Hollingsworth RE, Hurt EM. EZH2 is required for breast and pancreatic cancer stem cell maintenance and can be used as a functional cancer stem cell reporter. Stem Cells Transl Med. 2013 Jan;2(1):43-52.

Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S, Maitra A, Hruban RH, Eshleman JR, Klein A, Laheru D, Donehower R, Hidalgo M. Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. Mol Cancer Ther. 2011 Jan;10(1):3-8.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. Lancet. 2011 Aug 13;378(9791):607-20. (a)

Vincent A, Omura N, Hong SM, Jaffe A, Eshleman J, Goggins M. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2011 Jul 1;17(13):4341-54. (b)

von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D. E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. Gastroenterology. 2009 Jul;137(1):361-71, 371.e1-5.

Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. Clin Cancer Res. 2003 Sep 15;9(11):4227-39.

Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, Quinn MC, Robertson AJ, Fadlullah MZ, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wani S, Wilson PJ, Markham E, Cloonan N, Anderson MJ, Fink JL, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Newell F, Poudel B, Song S, Taylor D, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Lee HC, Jones MD, Nagrial AM, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Steinmann AM, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Pettitt JA, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, Graham JS, Niclou SP, Bjerkvig R, Grützmann R, Aust D, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Falconi M, Zamboni G, Tortora G, Tempero MA; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Gill AJ, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature. 2015 Feb 26;518(7540):495-501.

Walters DM, Stokes JB, Adair SJ, Stelow EB, Borgman CA, Lowrey BT, Xin W, Blais EM, Lee JK, Papin JA, Parsons JT, Bauer TW. Clinical, molecular and genetic validation of a murine orthotopic xenograft model of pancreatic adenocarcinoma using fresh human specimens. PLoS One. 2013 Oct 18;8(10):e77065. (a)

Walters DM, Lindberg JM, Adair SJ, Newhook TE, Cowan CR, Stokes JB, Borgman CA, Stelow EB, Lowrey BT, Chopivsky ME, Gilmer TM, Parsons JT, Bauer TW. Inhibition of the growth of patient-derived pancreatic cancer xenografts with the MEK inhibitor trametinib is augmented by combined treatment with the epidermal growth factor receptor/HER2 inhibitor lapatinib. Neoplasia. 2013 Feb;15(2):143-55. (b)

Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Sarkar FH. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 Jan;8(1):27-33.

Wang W, Gao J, Man XH, Li ZS, Gong YF. Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. Oncol Rep. 2009 Jun;21(6):1439-47.

Wang Y, Wang JX, Xue H, Lin D, Dong X, Gout PW, Gao X, Pang J. Subrenal capsule grafting technology in human cancer modeling and translational cancer research. Differentiation. 2016 Apr-Jun;91(4-5):15-9.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular biology of the gene. 7th ed. New York: Pearson/Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013.

Wen D, Zhang F, Long Y. Studies of cancer heterogeneity using PDX models. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 59-69.

Whiteford CC, Bilke S, Greer BT, Chen Q, Braunschweig TA, Cenacchi N, Wei JS, Smith MA, Houghton P, Morton C, Reynolds CP, Lock R, Gorlick R, Khanna C, Thiele CJ, Takikita M, Catchpoole D, Hewitt SM, Khan J. Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. Cancer Res. 2007 Jan 1;67(1):32-40.

Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowley GS, Schadendorf D, Root DE, Garraway LA. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. Cancer Discov. 2013 Mar;3(3):350-62.

Williams JA. Patient-derived xenografts as cancer models for preclinical drug screening. In: Wang Y, Lin D, Gout PW, editors. Patient-derived xenograft models of human cancer. Cham: Humana Press (Springer); 2017. p. 141-54.

Williams JA. Using PDX for Preclinical Cancer Drug Discovery: The Evolving Field. J Clin Med. 2018 Mar 2;7(3). pii: E41.

Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. Lab Invest. 2013 Sep;93(9):970-82.

Williams SP, McDermott U. The Pursuit of Therapeutic Biomarkers with High-Throughput Cancer Cell Drug Screens. Cell Chem Biol. 2017 Sep 21;24(9):1066-1074.

Witkiewicz AK, Balaji U, Eslinger C, McMillan E, Conway W, Posner B, Mills GB, O'Reilly EM, Knudsen ES. Integrated Patient-Derived Models Delineate Individualized Therapeutic Vulnerabilities of Pancreatic Cancer. Cell Rep. 2016 Aug 16;16(7):2017-31.

Witkiewicz AK, Borja NA, Franco J, Brody JR, Yeo CJ, Mansour J, Choti MA, McCue P, Knudsen ES. Selective impact of CDK4/6 suppression on patient-derived models of pancreatic cancer. Oncotarget. 2015 Jun 30;6(18):15788-801. (a)

Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, Mollaee M, Wagner KU, Koduru P, Yopp A, Choti MA, Yeo CJ, McCue P, White MA, Knudsen ES. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. Nat Commun. 2015 Apr 9;6:6744. (b)

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin. 2013 Sep;63(5):318-48.

Wood LD, Hruban RH. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. Cancer J. 2012 Nov-Dec;18(6):492-501.

Yachida S, Zhong Y, Patrascu R, Davis MB, Morsberger LA, Griffin CA, Hruban RH, Laheru D, Iacobuzio-Donahue CA. Establishment and characterization of a new cell line, A99, from a primary small cell carcinoma of the pancreas. Pancreas. 2011 Aug;40(6):905-10.

Yin T, Wei H, Leng Z, Yang Z, Gou S, Wu H, Zhao G, Hu X, Wang C. Bmi-1 promotes the chemoresistance, invasion and tumorigenesis of pancreatic cancer cells. Chemotherapy. 2011;57(6):488-96.

Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman AC, Draetta GF, Maitra A, DePinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes Dev. 2016 Feb 15;30(4):355-85.

Yonemori K, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. MicroRNA in pancreatic cancer. J Hum Genet. 2017 Jan;62(1):33-40.

Yoshimura M, Endo S, Hioki K, Ueyama Y, Ohnishi Y. Chemotherapeutic profiles of human tumors implanted in SCID mice showing appreciable inconsistencies with those in nude mice. Exp Anim. 1997 Apr;46(2):153-6.

You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? Cancer Cell. 2012 Jul 10;22(1):9-20.

Yu J, Putcha P, Califano A, Silva JM. Pooled shRNA screenings: computational analysis. In: Su GH, editor. Pancreatic cancer: methods and protocols. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer); 2013. p. 371-84.

Zhang YJ, Wen CL, Qin YX, Tang XM, Shi MM, Shen BY, Fang Y. Establishment of a human primary pancreatic cancer mouse model to examine and investigate gemcitabine resistance. Oncol Rep. 2017 Dec;38(6):3335-3346.

Zhang Z, Jiang G, Yang F, Wang J. Knockdown of mutant K-ras expression by adenovirus-mediated siRNA inhibits the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells. Cancer Biol Ther. 2006 Nov;5(11):1481-6.

Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S, Schultz PG. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 6;101(1):135-40.

Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, Mulloy JC, Kogan SC, Brown P, Valent P, Bradner JE, Lowe SW, Vakoc CR. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature. 2011 Aug 3;478(7370):524-8.

# **APÊNDICE A – Certificado CEPesq (Hospital Sírio-Libanês)**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Busca de novos alvos terapêuticos no câncer de pâncreas Pesquisador: Eduardo Moraes Rego Reis Área Temática: Versão: 1 CAAE: 36005314.1.0000.5461 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO Patrocinador Principal: Financiamento Próprio FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 834.279 Data da Relatoria: 09/10/2014

#### Apresentação do Projeto:

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), o tipo mais prevalente de câncer pancreático, é uma neoplasia extremamente agressiva e em geral letal. A ausência de opções terapêuticas eficientes motiva a busca de vulnerabilidades moleculares nestes tumores que possam ser exploradas no desenvolvimento de novas terapias para o PDAC. Neste trabalho, vamos rastrear genes essenciais para a

sobrevivência do PDAC empregando uma estratégia de silenciamento gênico com short hairpin RNAs (shRNAs), uma classe de RNA de interferência (RNAi). Células tumorais obtidas de pacientes com PDAC serão expandidas in vivo por meio de xenotransplantes em camundongos severamente imunodeficientes. Culturas primárias derivadas desses xenotransplantes serão utilizadas para o rastreamento de vulnerabilidades genéticas utilizando bibliotecas de shRNAs que alvejam centenas de genes simultaneamente. Inicialmente, serão testados shRNAs que alvejam 243 genes envolvidos na regulação da cromatina. Com essa abordagem esperamos identificar proteínas participantes da maquinaria epigenética cujo silenciamento afete significativamente a sobrevivência do PDAC, expondo assim potenciais candidatos a alvos farmacológicos para o tratamento da doença.

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar			
Bairro: Jardim Paulista	CEP: 01.4	09-000	
UF: SP Município: SAO PAULO			
Telefone: (11)3394-5701		E-mail: cepesq@hsl.org.br	

# HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS / SOCIEDADE BENEFICENTE DE SENHORAS

Continuação do Parecer: 834.279

Projeto envolvendo o uso de participantes com câncer de pancreas que serão submetidos a cirurgia. Após obtenção de TCLE, o tumor extraído será transportado para o biotério do IQ/USP e enxertados em roedores. O pesquisador possui apoio financeiro da FAPESP e o HSL será a instituição co-participante.

### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se o silenciamento do conjunto conhecido de genes codificadores de proteínas com função de "escrita", "leitura" ou "limpeza" de marcas epigenéticas em células derivadas de tumores de pâncreas poderá revelar genes essenciais para a sobrevivência do tumor.

Esta informação será relevante para o desenvolvimento de novas terapias para a doença, por exemplo através da identificação de fármacos que interfiram com a função destas proteínas.

Objetivo Primário:

Identificar alvos terapêuticos no PDAC através do rastreamento por RNA de interferência em xenotransplantes de tumores utilizando bibliotecas de short hairpin RNAs.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador considera o risco mínimo para o participante, embora todos os estudos tenham um risco, ainda que considerado como risco mínimo associado a qualquer estudo.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância científica e poderá gerar dados que auxiliem, no futuro, novas pesquisas para o desenvolvimento de produtos destinados ao tratamento de pacientes com cancer.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada conforme legislação vigente e normas da instituição.

#### Recomendações:

não se aplica

## Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo cadastrado no CEPesq como HSL 2014-68 aprovado em 09-10-2014 conforme as versões listadas abaixo:

- Projeto de Pesquisa versão 1 - 20-05-2014

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de 1 de novembro de 2013.

Lembramos que o pesquisador deverá manter o CEPesq informado sobre o andamento de sua pesquisa através do envio de relatórios parciais (semestrais) e final. De acordo com o cronograma

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar				
Bairro: Jardim Paulista	CEP: 01.409-000			
UF: SP Município: SAO PAULO				
Telefone: (11)3394-5701	E-mail: cepesq@hsl.org.br			

Página 02 de 03

# HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS / SOCIEDADE BENEFICENTE DE SENHORAS

Continuação do Parecer: 834.279

apresentado, o primeiro relatório parcial está previsto para ser entregue em 09-04-2015. Caso haja alterações no protocolo, cronograma do estudo, ou em qualquer outro documento do estudo por favor, submeter atualização.

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 16 de Outubro de 2014

Assinado por: Bernardo Garicochea (Coordenador)

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar Bairro: Jardim Paulista UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)3394-5701

CEP: 01.409-000 E-mail: cepesq@hsl.org.br

Página 03 de 03

## APÊNDICE B – Certificado CEUA (IQ-USP)

Universidade de São Paulo Instituto de Química

# CERTIFICADO Nº 03/2014

Certifico que o Projeto "Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico", desenvolvido sob responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 27/02/2014.

We attest that the project entitled "Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico", developed under the responsibility of **Dr. Eduardo Moraes Rego Reis**, is in agreement with the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 02/27/2014.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2014

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto Coordenadora CEUA