



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans*  
A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM  
MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO  
CÂNCER DE PÂNCREAS**

**GIOVANA MARTINS ZANETTE**

Foz do Iguaçu  
2022



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans*  
A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM  
MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO  
CÂNCER DE PÂNCREAS**

**GIOVANA MARTINS ZANETTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Priscilla Arantes

Foz do Iguaçu

2022

GIOVANA MARTINS ZANETTE

**SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans* A PARTIR DE  
SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM MICROAMBIENTE TUMORAL NA  
DETECÇÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto Latino Americano de Ciências da  
Vida e da Natureza da Universidade Federal da  
Integração Latino-Americana como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Priscilla Arantes  
UNILA

---

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz  
UNILA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Da Costa Silva Gonçalves  
UNILA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA

Foz do Iguaçu, 9 de dezembro de 2022.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Giovana Martins Zanette

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento

(....) graduação

(....) artigo

(....) especialização

( x ) trabalho de conclusão de curso

(....) mestrado

(....) monografia

(....) doutorado

(....) dissertação

(....) tese

(....) CD/DVD – obras audiovisuais

(....) \_\_\_\_\_

Título do trabalho acadêmico: **SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans* A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS**

Nome do orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Priscilla Arantes

Data da Defesa: 09/12/2022

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 09 de dezembro de 2022.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha equipe de trabalho, que em 90 dias no laboratório comemorou comigo os resultados positivos e negativos de cada experimento. Alba pela parceria nos experimentos, por compartilhar os L1, por cada sincronização. Milena pela organização, e cuidado com os reagentes. Aos meus colegas de curso: Ângelo, por todo o apoio no laboratório e com os equipamentos e o Mateus, pelo auxílio com os materiais de bancada.

Agradeço aos meus amigos veteranos, que foram como Porto Seguro e fonte de inspiração durante toda minha graduação, desde que cheguei na cidade: Ana Letícia por ser minha dupla dinâmica e minha companhia para qualquer coisa, Felipe pela parceria e toda a ajuda acadêmica e pessoal, Natália por sempre acompanhar e compartilhar conquistas em um bom café da cidade, a Ingrid, Amanda, Hellen, Giuliana, Dulce, Samuel e Dylon por sempre toparem compartilhar momentos de felicidade comigo. A Maria Camila pelas oportunidades e todo o auxílio no estágio. Ao Eric e Anabel pelas aulas de salsa e integração. A minha família da biotec: Ana Letícia, Santiago, Marcel, Suasana e Ned que junto comigo formam a melhor linhagem do curso. Aos meus amigos da T4 que passaram por todas as dificuldades e delícias de ser biotec desde 2018. A Ágatha pela aproximação, carinho e admiração principalmente nos últimos anos em que estive aqui. Ao Ned e Bruno por compartilharem as conquistas e derrotas comigo. Ao Andrés por todo cuidado e parceria que tenho dentro e fora da universidade.

Agradeço também aos meus calouros Gustavo por ter chegado trabalhando comigo e sendo uma companhia pessoal muito querida, ao Bernie que me mostrou que a integração pode ser feita a qualquer hora, em qualquer lugar, e se tornou muito especial pra mim. Ao Lucas por todos os trabalhos juntos, por me inspirar a caminhar sonhos e áreas até então desconhecidas da divulgação científica. Ao Marcel pela parceria.

A minha equipe de trabalho na diretoria da atlética, Heloísa, Laura, Sara e Hellen por fazer acontecer todos nossos eventos e se tornarem amigas fiéis. A gestão em que tive o prazer de passar o bastão e se tornaram grandes amigos Matheus, Laura e Giovana. A equipe do centro acadêmico, Lina e Synfronteras em que tive a oportunidade de trabalhar junto. As equipes dos projetos de extensão que participei: biotec no bar, ciclo de palestras, liga de genética e coleção de microrganismos por toda coletividade fazendo acontecer. Aos professores e discentes do colegiado que tanto me ensinaram atuando na gestão.

Agradeço a equipe de handebol da Unila que me acolheu e resgatou a importância do esporte na minha vida, me trazendo muitos amigos e oportunidades dentro e fora de quadra. A minha parceira de vida Rebecca, que transpassou todas as conexões de dentro de quadra e se tornou além de minha pivô, minha companhia para tudo.

As meninas do 101, Isadora e Flora, que sempre me acolheram em momentos de felicidade e companheirismo. Meu vizinho Feroldi por cada momento compartilhado, cada conversa colocada em dia.

As minhas hommies Isadora e Tainá que me mostraram a importância de respeitar a individualidade de cada um, me ensinando muito sobre mim. E em especial a Tainá que foi minha melhor amiga em todo meu percurso por Foz do Iguaçu, sempre me acolheu, obrigada por todas as reflexões, por ser minha inspiração de coragem atrás dos seus sonhos.

A Camila que foi minha base no curso e na vida pessoal em muitos momentos me dando norte e forças para continuar, seja dividindo casa, trabalho, artigos, projetos, um drink, microondas, máquina de lavar. Obrigada por sempre estar por perto e me mostrar tanto sobre mim.

Aos meus amigos que deixei quando vim para cá. A Laís que esteve presente nos últimos anos e fez parte de todas as minhas conquistas acadêmicas e pessoais, sendo a maior apoiadora de todos os meus projetos.

A minha família que sempre apoiou todas as minhas decisões, que apostou em uma educação de qualidade, proporcionou minha vinda e permanência aqui por todos esses anos. A minha mãe que nunca deixou de sonhar meus sonhos comigo. Ao meu pai que mesmo sem vivenciar o mesmo, me apoiou e entendeu a importância do conhecimento. Ao meu irmão que sempre foi o meu presente de vida, quem me ensinou sobre saudade e distância, sobre amadurecimento individual, sobre espaço e missão pessoal. Obrigada por sempre me acolherem e serem meu porto seguro, minha origem. A minha avó Neusa, que me ensina todos os dias sobre intuição, força, ancestralidade e presença. Minha avó Maria que me ensina sobre ocupar espaço e assumir liderança, seguir o caminho que tudo é possível. A minha prima Ana Luisa que foi a primeira graduanda de universidade pública da família. As minhas madrinhas, tias e primas que me mostram todos os dias o quanto mulheres unidas podem chegar juntas ao topo. Aos meus tios e primos que sempre foram suporte e estrutura familiar.

A minha orientadora por toda dedicação e ajuda nessa caminhada, por todo o ensinamento com o *C. elegans* e por ter contribuído e topado de cara o projeto assim como ao meu orientador que abraçou o desafio e me deu todo apoio com as células.

A UNILA pela oportunidade e grande transformação pessoal e internacional garantindo uma educação gratuita e de qualidade em que tenho o orgulho de fazer história.

ZANETTE, Giovana Martins. **SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans* A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS.**

– 33 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

## RESUMO

O câncer é uma das doenças mais prevalentes no mundo e avança em níveis preocupantes. Compreender a doença e suas manifestações é primordial para desenvolver diagnósticos e tratamentos mais eficientes. O câncer de pâncreas, que acomete um dos principais órgãos de funções metabólicas do organismo, apresenta altas taxas de mortalidade e não possui biomarcadores conhecidos. Tem sido demonstrado que células tumorais secretam compostos voláteis que podem ser detectados por cães e camundongos. Porém, na prática clínica, essa metodologia se mostram inviável. *C. elegans* é um nematóide de sistema olfativo aguçado, um organismo explorado como modelo alternativo em diversos ensaios devido a sua alta conservação de genes quando comparados a mamíferos e ao seu fácil cultivo. Esse animal é capaz de detectar uma ampla gama de odores respondendo de maneira comportamental, por atração ou repulsão a odorantes específicos (quimiotaxia positiva ou negativa). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de *C. elegans* ao meio condicionado (meio de cultivo) de células do câncer de pâncreas (MIA PaCa-2), que contém substâncias secretadas no microambiente tumoral, pelo ensaio de quimiotaxia. Foram necessários ensaios para padronização da metodologia, pois geralmente são usadas amostras biológicas de pacientes, como urina, e não celulares. Os resultados foram comparados com as próprias células, além do controle com fibroblastos e controle positivo de acetona. *C. elegans* foram atraídos pelo meio usado para cultivo de células tumorais pancreáticas e repelidos pelo meio condicionado de fibroblastos. Ainda é necessária uma melhor padronização da metodologia para se obter constatações mais significativas e confiáveis. Entretanto, foi possível evidenciar mudanças no microambiente tumoral do câncer de pâncreas rastreadas pelo olfato de *C. elegans*, sugerindo que o metabolismo dessas células produzem compostos voláteis em níveis desordenados quando comparados a amostras do controle, que podem auxiliar na compreensão e na identificação precoce da doença.

**Palavras-chave:** Quimiotaxia; Metabolismo tumoral; Câncer; Modelo animal alternativo; Biomarcador.

ZANETTE, Giovana Martins. **SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans* A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS.** – 33 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

## ABSTRACT

Cancer is one of the most prevalent diseases in the world and is advancing at worrying levels. Understanding the disease and its manifestations is essential to develop more efficient diagnoses and treatments. Pancreatic cancer, which affects one of the main organs of metabolic functions in the body, has high mortality rates and no biomarkers. It has been shown that tumor cells secrete volatile compounds that can be detected by dogs and mice. However, in clinical practice, this methodology is not feasible. *C. elegans* is a nematode with a powerful olfactory system, an organism used as an alternative model in several assays due to its high gene conservation when compared to mammals and its easy cultivation. This animal can detect a wide range of odors responding by attraction or repulsion to specific odors (positive or negative chemotaxis). Thus, the present work aimed to evaluate the response of *C. elegans* to the conditioned medium (culture medium) of pancreatic cancer cells (MIA PaCa-2), which contains substances secreted in the tumor microenvironment, by the chemotaxis assay. Trials were needed to standardize the methodology, once biological samples of patients, such as urine, and not cells are generally used. The results were compared with the tumor cells, in addition to the fibroblast control and acetone-positive control. *C. elegans* were attracted by the medium used for growing pancreatic tumor cells and repelled by the conditioned medium of fibroblasts. Better standardization of the methodology is still necessary to obtain more significant and confident findings. However, it was possible to show changes in the tumor microenvironment of pancreatic cancer tracked by the smell of *C. elegans*, suggesting that the cell metabolism produces volatile compounds at disordered levels when compared to the control sample, which may help in the understanding and early identification of the disease.

**Key-words:** Chemotaxis; Tumor metabolism; Cancer; Alternative animal model; Biomarker.

ZANETTE, Giovana Martins. **SINALIZAÇÃO OLFATIVA DE *Caenorhabditis elegans* A PARTIR DE SUBSTÂNCIAS METABÓLICAS EM MICROAMBIENTE TUMORAL NA DETECÇÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS.** – 33 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

## RESÚMEN

El cáncer es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo y avanza a niveles preocupantes. Comprender la enfermedad y sus manifestaciones es fundamental para desarrollar diagnósticos y tratamientos más eficientes. El cáncer de páncreas, que afecta a uno de los principales órganos de las funciones metabólicas del cuerpo, tiene altas tasas de mortalidad y no tiene biomarcadores conocidos. Se ha demostrado que las células tumorales secretan compuestos volátiles que pueden ser detectados por perros y ratones. Sin embargo, en la práctica clínica, esta metodología no es factible. *C. elegans* es un nematodo con un sistema olfativo poderoso, un organismo explorado como modelo alternativo en varias pruebas debido a su alta conservación de genes en comparación con los mamíferos y su fácil cultivo. Este animal es capaz de detectar una amplia gama de olores respondiendo por atracción o repulsión a olores específicos (quimiotaxis positiva o negativa). Así, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta de *C. elegans* al medio acondicionado (medio de cultivo) de células de cáncer de páncreas (MIA PaCa-2), que contiene sustancias secretadas en el microambiente tumoral, mediante el ensayo de quimiotaxis. Se necesitaban pruebas para estandarizar la metodología, ya que generalmente se utilizan muestras biológicas de pacientes, como orina, y no células. Los resultados se compararon con las propias células, además del control de fibroblastos y el control positivo de acetona. *C. elegans* fue atraída por el medio utilizado para cultivar células tumorales pancreáticas y repelida por el medio acondicionado de fibroblastos. Aún se necesita una mejor estandarización de la metodología para obtener resultados más significativos y confiables. Sin embargo, fue posible mostrar cambios en el microambiente tumoral del cáncer de páncreas rastreados por el olor de *C. elegans*, lo que sugiere que el metabolismo de estas células produce compuestos volátiles en niveles desordenados en comparación con las muestras de control, lo que puede ayudar en la comprensión y identificación temprana de la enfermedad.

**Palabras-clave:** Quimiotaxis; Metabolismo tumoral; Cáncer; Modelo animal alternativo; Biomarcador.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>C. elegans</i> em diferentes estágios 3 dias após o repique, observado por microscópio, aumento de 40x.....	18
<b>Figura 2</b> - Cultivo de células MIA PaCa-2 e MRC-5.....	22
<b>Figura 3</b> - Células MIA PaCa-2 em microscópio invertido, aumento de 40x.....	23
<b>Figura 4</b> - Células MRC-5 em microscópio invertido, aumento 40x.....	24
<b>Figura 5</b> - Placas preparadas para o ensaio de quimiotaxia.....	26
<b>Figura 6</b> - Vermes chegando até o ponto onde foi adicionada a amostra de meio condicionado de células MIA PaCa-2 em um dos ensaios de quimiotaxia.....	27
<b>Figura 7</b> - Índices de quimiotaxia.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Índices de quimiotaxia por diferentes concentrações de acetona como reagente controle de atração.....	28
<b>Tabela 2</b> - Índices de quimiotaxia por diferentes concentrações de meio condicionado de células de câncer de pâncreas (MIA Paca-2) e de fibroblastos (MRC-5).....	29

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

DMEM - do inglês, Dulbecco's Modified EagleMedium

NGM - do inglês, Nematode Growth Medium

PBS - do inglês, Phosphate-buffered saline

SFB - Soro fetal bovino

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 CÂNCER E METABOLISMO CELULAR.....	14
2.2 CÂNCER DE PÂNCREAS E MICROAMBIENTE TUMORAL.....	15
2.3 RASTREAMENTO OLFATIVO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	16
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE RASTREAMENTO.....	17
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
5.1 CULTURA DE CÉLULAS CANCERÍGENAS PANCREÁTICAS E FIBROBLASTOS.....	20
5.2. CULTIVO DE <i>C. elegans</i> .....	23
5.3 ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA.....	24
5.3.1. Preparação das amostras .....	24
5.3.2. Preparação de <i>C. elegans</i> .....	25
5.3.3. Ensaio piloto e de repetições.....	25
5.4 ANÁLISES ESTÁTISCAS.....	27
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todos os países do mundo e a identificação da doença é um processo ainda desafiador. Muitos pacientes são diagnosticados em estágios avançados e com pouca expectativa de vida, principalmente em alguns tipos de câncer como o de pâncreas, que não há um biomarcador específico conhecido (BRAY *et al.*, 2018).

As células dos organismos multicelulares possuem sistemas muito precisos de controle da divisão celular, assim como sistemas de vigilância que induzem morte celular no fim da vida celular ou ante problemas que afetem as capacidades celulares. A partir de mutações e alterações moleculares ocorre a malignização de células e, posteriormente, o desenvolvimento de tumores. Essa aceleração descontínua da produção de células anormais resulta em um microambiente onde todas as funções fisiológicas se encontram desequilibradas (INCA, 2018).

Uma abordagem que vem sendo destaque na pesquisa é a análise do metabolismo cancerígeno, já que está interligado ao sistema de comunicação e controle de funções celulares. Compostos voláteis excretados no microambiente tumoral relacionados com o processo de divisão celular alteram as vias metabólicas e de sinalização, causam absorção de nutrientes em excesso e iniciam o processo metastático (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Assim, esses compostos se tornam substâncias candidatas à detecção precoce do câncer, sendo rastreadas por diferentes metodologias. Uma delas é através de cachorros (MCCULLOCH *et al.*, 2006) ou camundongos (MATSUMURA *et al.*, 2010) que respondem a estímulos do sistema olfativo a partir de amostras biológicas de pacientes. Neurônios detectam e transmitem informações do ambiente para o sistema nervoso e as vias moleculares e neurais definem comportamentos específicos de detecção (TROEMEL; KIMMEL; BARGMANN, 1997). Na prática clínica, entretanto, essas metodologias se mostram inviáveis, tanto pelo uso de animais como pela sensibilidade e padronização dos mesmos (SONODA *et al.*, 2011), fazendo com que métodos alternativos sejam necessários para implementar essa abordagem de rastreio metabólico.

*Caenorhabditis elegans* é um nematoide com alta conservação genética e de vias de sinalização em relação aos mamíferos, apresentando um

grande número de genes que codificam receptores olfativos. Devido a isso e à facilidade de cultivo e manuseio, é usado como organismo modelo em ensaios de quimiotaxia (LANZA *et al.*, 2021), onde são atraídos ou repelidos por substâncias específicas, tornando a metodologia de rastreamento de compostos voláteis acessível e simples. *C. elegans* responde a nível molecular e comportamental a estímulos odorantes e apresenta um sistema nervoso compacto, porém bem compreendido e semelhante ao de organismos superiores (HIROTSU; IINO, 2005). A partir dessa abordagem foram descritos comportamentos de repulsão sobre amostras de controle e de atração a partir de amostras de câncer.

Neste estudo, foram realizadas análises de quimiotaxia com *C. elegans* utilizando o meio de cultivo de células tumorais pancreáticas (MIA PaCa-2) e as próprias células em concentrações diferentes, além do controle com fibroblastos. Foram conduzidos ensaios para padronização da metodologia que até então foi pouco explorada, visto que geralmente são usadas amostras biológicas de pacientes, como urina, e não celulares (HIROTSU *et al.*, 2015). Essa metodologia alternativa pode ajudar a identificar a presença de substâncias específicas no microambiente tumoral como produto direto do metabolismo celular e não aquelas geradas após biotransformação, e futuramente auxiliar na melhor compreensão e controle do câncer de pâncreas, bem como na utilização dessas substâncias como biomarcadores precoces.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CÂNCER E METABOLISMO CELULAR**

O câncer é mundialmente uma importante causa de morbidade e mortalidade, independentemente do nível de desenvolvimento humano, com incidência em um a cada oito homens e uma a cada 10 mulheres. Assim, a doença ocupa a primeira ou segunda posição no ranking de causa de morte em quase 100 países (BRAY *et al.*, 2018).

O histórico da doença vem entrelaçado com o aumento da expectativa de vida, já que na maioria dos casos se manifesta após gradativas mudanças na rotina e inserção da sociedade em novos ambientes, com mais tecnologia e contato com substâncias nocivas. Através de dados históricos é possível associar a incidência de alguns cânceres com atividades comuns de época, por hábitos, regiões e gênero. A prevalência do tabaco, por exemplo, com a incidência do câncer de pulmão em homens no Sul e Sudeste do Brasil e o declínio das curvas de

mortalidade da doença com a constante queda observada no consumo do cigarro atualmente (FILHO; MONCAU, 2002).

No organismo, as células que formam os tecidos se multiplicam ou dividem-se e morrem de maneira ordenada no processo chamado apoptose. Esse processo pode ser afetado por questões ambientais ou genéticas fazendo com que sejam geradas células cancerígenas, caracterizadas pelo crescimento desordenado e agressivo de maneira rápida e descontrolada. A mutação de pré oncogenes que até o momento estavam inativados, fazem com que a divisão celular sofra alterações. A partir disso, ocorre a malignização das células normais que passam a ser denominadas cancerígenas (INCA, 2018).

O desenvolvimento de tumores se dá a partir da aceleração descontínua da produção de células anormais, resultando em um microambiente onde todas as funções fisiológicas se encontram desequilibradas. Independente do órgão afetado, a quantidade exacerbada de células e seus processos metabólicos afeta diretamente o funcionamento do organismo. Marcadores tumorais, como metabólitos celulares e alterações genéticas podem ser analisados em amostras biológicas para identificar o aparecimento de um tumor, porém alguns tipos de câncer se desenvolvem com mais rigurosidade e, pela escassez de conhecimentos e marcadores específicos, apresentam diagnóstico tardio, como é o caso do câncer de pâncreas (VIDEIRA *et al.*, 2002).

Analisar o metabolismo celular através das mudanças no microambiente tumoral pode resultar na descoberta de indicadores sobre o desenvolvimento da doença. Vias de sinalização controladas produzem os nutrientes necessários e previnem a proliferação exacerbada de células no processo de divisão celular, porém, a partir de mutações genéticas, células tumorais alteram suas vias metabólicas e de sinalização, absorvendo nutrientes em excesso e iniciando o processo metastático (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Por isso, identificar as alterações no metabolismo de células normais e tumorais, e na formação de um microambiente tumoral, pode trazer avanços no entendimento da doença e na sua detecção precoce (AMORIM *et al.*, 2018).

## 2.2 CÂNCER DE PÂNCREAS E MICROAMBIENTE TUMORAL

O câncer de pâncreas é responsável por 4 % das mortes causadas por câncer no Brasil, apresenta sobrevida estimada a 23 meses após diagnóstico em estágios iniciais e de apenas seis meses quando diagnosticado em estágio metastático (VINCENT *et al.*, 2011). A alta letalidade da doença é principalmente uma

consequência do diagnóstico tardio, já que atualmente são desconhecidas metodologias eficazes de identificação precoce. Estima-se que apenas 10 % dos casos de câncer pancreático são diagnosticados numa fase ainda possível de realizar a remoção cirúrgica do órgão, enquanto grande parte dos pacientes identifica a doença em um estágio de metástase. Mesmo que novas abordagens terapêuticas estejam ganhando destaque, nenhuma delas atingiu benefícios satisfatórios no caso do câncer de pâncreas (BORGES, 2019).

Um fator de grande relevância é a função do órgão afetado, a íntima associação do pâncreas com vasos sanguíneos e a drenagem para linfonodos, o que favorece a disseminação metastática das células tumorais ao mesmo tempo que dificulta a ressecção cirúrgica de grande parte dos tumores. Assim, o órgão que tem importante papel no metabolismo acaba facilitando o desequilíbrio de células anormais, agravando gradativamente a doença pelo ambiente afetado, desequilibrando vias de sinalização e controle celular (KIERSZENBAUM, 2012).

A origem do tumor se apresenta como multifatorial, pois envolve mutações genéticas e epigenéticas que desencadeiam lesões que precedem o câncer de pâncreas (ALEMAR; GREGÓRIO; ASHTON-PROLLA, 2015). Além disso, essas alterações causam resistência das células tumorais para as drogas anticâncer (AMRUTKAR; GLADHAUG, 2017). Em células cancerígenas, a transformação metabólica também foi tida como necessária para a tumorigênese, isso porque as células de diferentes tipos de tumores podem promover uma autonomia metabólica, alterando concentrações de nutrientes que estão relacionados com o crescimento e proliferação celular (DEBERARDINIS; SAYED; DITSWORTH; THOMPSON, 2008).

Além do pâncreas ter importante função no metabolismo do organismo, os seus principais fatores de risco que incluem idade, dieta, obesidade, status de exercício, status de tabagismo, sexo, diabetes, histórico familiar e geografia (PROENÇA, 2020) também apresentam fortes componentes metabólicos. Portanto, analisar o microambiente tumoral único do câncer de pâncreas e identificar metabólitos alterados podem auxiliar na melhor compreensão dos processos associados ao desenvolvimento acelerado dos tumores (RITCHIE *et al.*, 2013).

### 2.3 RASTREAMENTO OLFATIVO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

As células cancerígenas, entre mutações e interações na formação de tumores, conferem mudanças no metabolismo e estão ligadas à produção de compostos voláteis, que são identificados como substâncias candidatas à detecção precoce do câncer. Estudos envolvendo o câncer de pulmão evidenciaram que

células liberam biomarcadores como compostos orgânicos voláteis (CHEN *et al.*, 2007). A presença desses compostos em diferentes diluições e concentrações de distintas amostras biológicas e em diferentes tipos de câncer, confirma a produção e excreção no microambiente celular, sugerindo que as substâncias não passaram pelo processo de biotransformação.

Atualmente, muitos estudos vêm relacionando compostos voláteis na identificação do câncer, desde estudos analisando esses compostos na respiração expirada ou na urina de pacientes utilizando o olfato canino (MCCULLOCH *et al.*, 2006), até abordagens mais sofisticadas como é o caso do rastreamento do câncer de pulmão por camundongos (MATSUMURA *et al.*, 2010).

Respostas comportamentais podem ser ativadas por estímulos do sistema olfativo de animais a partir da tentativa de reconhecimento de ambiente, assim os neurônios detectam esses compostos e transmitem informações para o sistema nervoso como instinto para se alimentarem, identificam predadores e feromônios. Vias moleculares e neurais definem comportamentos específicos podendo detectar moléculas e induzir o animal a comportamentos de desenvolvimento, acasalamento, atração ou repulsão (TROEMEL; KIMMEL; BARGMANN, 1997).

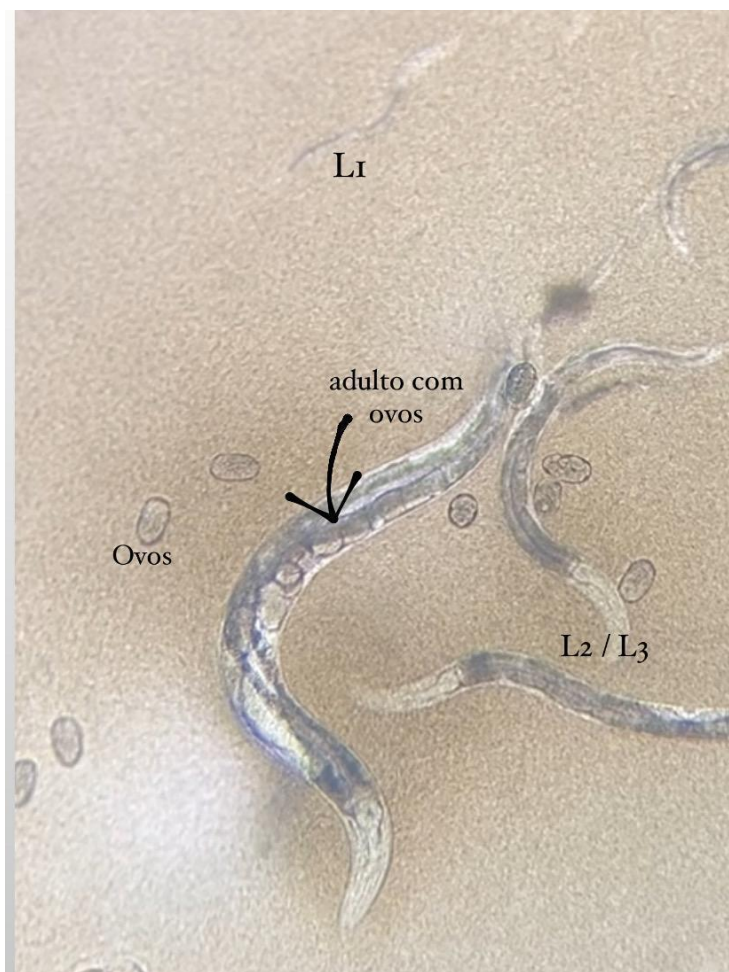
Testes utilizando amostras biológicas como hálito, fezes e urina, sugerem que odores comuns podem existir entre diferentes tipos de câncer e podem ser identificados por cães. Essa abordagem na prática clínica se mostra inviável em grande escala, pois os animais devem possuir treinamento e cuidados específicos desde a sua criação. A capacidade de identificação do aroma e da concentração das amostras variam até mesmo para o mesmo cão dentro de dias, tornando a padronização da metodologia inconsistente (SONODA *et al.*, 2011).

#### 2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE RASTREAMENTO

Os compostos voláteis excretados por células cancerígenas e presentes no microambiente tumoral podem ser rastreados pelo sistema olfativo de *Caenorhabditis elegans*. Esse nematoide é explorado como organismo modelo em diferentes campos devido a sua alta conservação de genes e vias de sinalização se comparados aos mamíferos e garante vantagens em pesquisas devido a suas características como a transparência, formato cilíndrico e seu tamanho, não sendo visto a olho nu, facilitando seu armazenamento e amostragem. Com ciclo de vida de uma semana, passam por estágios: ovos, L1, L2, L3, L4 até que se tornem adultos e gerem mais ovos como mostrado na figura um. A partir do sequenciamento de genes,

foi o primeiro organismo multicelular a ter o genoma completamente sequenciado, sendo utilizados em testes de laboratório como uma alternativa ao uso de animais, a partir da sua reconstrução da linhagem celular e do seu sistema nervoso que apresenta profundas correlações neurológicas e comportamentais (HUNT, 2017).

**Figura 1** *C. elegans* em diferentes estágios observado por microscópio, aumento de 40x.



Fonte: Imagem de autoria própria, 2022

O animal apresenta grande número de genes que codificam receptores olfativos e possui apenas 32 neurônios quimiossensoriais, sendo que três deles são especializados na detecção de moléculas voláteis. Cada neurônio olfativo é capaz de detectar uma ampla gama de odores se comparado aos mamíferos (LANZA *et al.*, 2021). A detecção é mediada por famílias de proteínas que ao se ligarem a seus ligantes produzem cascatas de sinalização intracelular específicas.

Foram descritos comportamentos de repulsão de vermes expostos a amostras de urinas de pacientes controle e de atração a urinas de pacientes com câncer. Essa movimentação pode ser causada por compostos voláteis, o que é definido como quimiotaxia, reação de orientação de um organismo ou de uma célula na direção a favor ou contrária a um determinado estímulo químico. Os neurônios olfativos de *C. elegans*, quando sinapsam em diversos interneurônios, causam movimentação em

direção positiva ou não a uma fonte de estímulo, através de motoneurônios (LANZA *et al.*, 2021).

A adaptação ao odor e, no caso desses vermes, a resposta comportamental a nível molecular, garantem vantagens no uso do modelo por se tratar de um organismo simples e fácil de ser manipulado, com um sistema nervoso compacto composto por 302 neurônios bem documentados, incluindo o seu circuito do sistema olfativo. Em adição, os neurônios olfativos AWC (*amphid wing C cells*), na via de transdução sensorial, são semelhantes à de organismos superiores, favorecendo sua compreensão (HIROTSU; LINO, 2005).

A abordagem de detecção de odores relacionados ao câncer de forma mais precisa permite a identificação de substâncias específicas e seus receptores, assim a identificação de compostos voláteis produzidos por células cancerígenas é promissora na pesquisa de marcadores tumorais precoces. Utilizar a abordagem alternativa de detecção por *C. elegans* permite que um número maior de amostras biológicas sejam avaliadas e mais facilmente compreendidas, já que as análises moleculares e genéticas são difíceis ou indisponíveis em organismos superiores, como cães (HIROTSU *et al.*, 2015).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Estudos têm constatado mudanças no microambiente tumoral de diferentes tipos de câncer, incluindo o de pâncreas, sugerindo que o metabolismo de células cancerígenas produz compostos voláteis em níveis anormais que podem ser detectados em amostras biológicas. A fim de facilitar essa abordagem descrita na literatura utilizando principalmente urina de pacientes e o sistema olfativo canino, que possui desvantagens clínicas, o presente trabalho se propôs a utilizar *C. elegans* como método alternativo para detectar substâncias voláteis produzidas por células de câncer de pâncreas através do ensaio de quimiotaxia. A metodologia amplia as possibilidades a serem exploradas para a compreensão do metabolismo e do desenvolvimento das células cancerígenas e ao sistema neuroquímico de *C. elegans* na identificação de compostos voláteis específicos para detecção precoce do câncer de pâncreas, testando concentrações celulares e diluições até então não descritas na literatura com precisão.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar se há atração de *C. elegans* ao meio condicionado (meio de cultivo) de células do câncer de pâncreas, que contém substâncias secretadas no microambiente tumoral.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia em laboratório de quimiotaxia com *C. elegans* envolvendo cultura celular diretamente na placa de petri;
- Determinar concentrações e diluições das amostras de cultura celular mais adequadas para o teste de quimiotaxia;
- Levantar hipóteses sobre a formação do microambiente tumoral e o desenvolvimento de células do câncer de pâncreas;
- Evidenciar a presença de compostos voláteis em meio condicionado de células tumorais pancreáticas.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CULTURA DE CÉLULAS CANCERÍGENAS PANCREÁTICAS E FIBROBLASTOS

As etapas presentes no cultivo celular e na preparação das amostras a partir das células tumorais pancreáticas de linhagem ATCC MIA PaCa-2-CRL-1420-ATCC e para controle fibroblastos de linhagem MRC-5-CCL-171-ATCC foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde (Lab G004) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) - Campus Jardim Universitário.

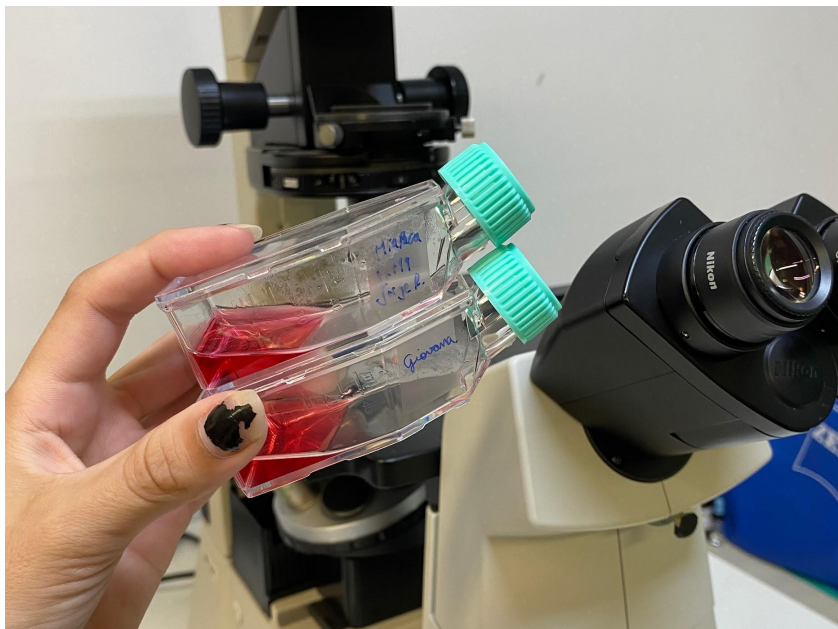
Para início do cultivo, o meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês: *Dulbecco's modified Eagle's medium*) foi preparado conforme orientação do fabricante, esterilizado a vácuo com filtro e adicionado 100 mL de soro fetal bovino (SFB) como suplemento e 10 mL da solução de antibiótico penicilina-estreptomicina no volume ajustado do meio pré-preparado para 1L final. Para todo o processo foram usados materiais estéreis.

Foram seguidos os parâmetros de condições de cultivo das células cancerígenas pancreáticas e das células de fibroblastos para controle, em temperatura de 37°C, atmosfera com umidade relativa de 80 % e 5 % de CO<sub>2</sub> na estufa, em frascos separados.

Os frascos para cultivo seguiram os padrões de tratamento para

adesão celular, sendo próprios para o estabelecimento da cultura e expansão das células. Foram escolhidas as garrafas pequenas, como mostrado na Figura 1, para atingir o número de células necessárias para os experimentos sem desperdício de meio.

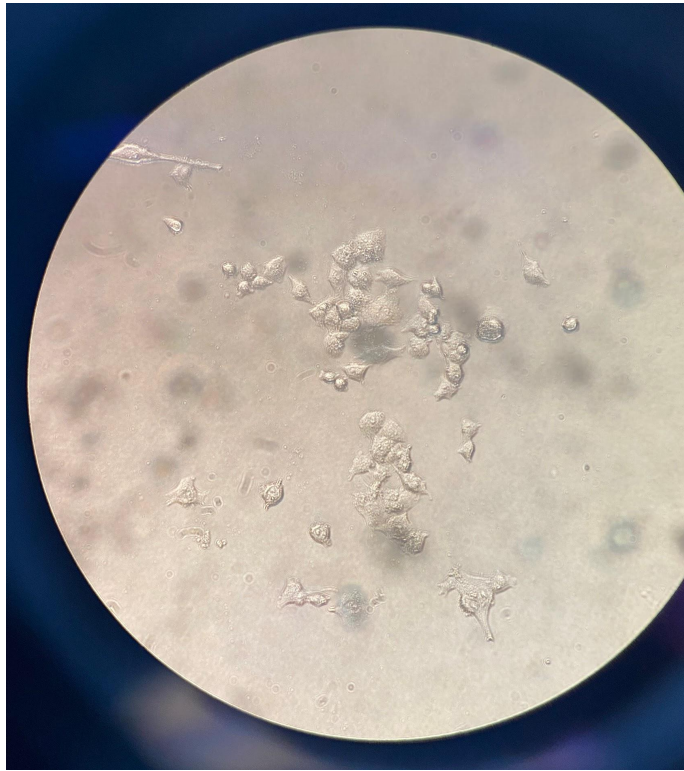
**Figura 2:** Cultivo de células MIA PaCa-2 e MRC-5.



Fonte: Imagem de autoria própria, 2022

Foram descongeladas as alíquotas de 10 mL contendo a linhagem MIA PaCa-2 de células do câncer de pâncreas, mostradas na Figura 2, preparadas previamente no laboratório. Para iniciar o cultivo, foi adicionado 20 mL de meio de cultivo DMEM completo em um frasco junto com a amostra celular e foi transferido em tubos de polipropileno de 15 mL para a centrifugação a 200 xg por 10 minutos. Descartado o sobrenadante e ressuspensionado o *pellet* de células em 10 mL de meio de cultivo DMEM completo e suplementado, os frascos foram reservados em estufa nas condições já descritas. A troca de meio de cultura foi realizada três dias após o crescimento celular. Após duas semanas foi conferida a confluência das células e preparadas as amostras para o primeiro experimento (Freshney, 1994).

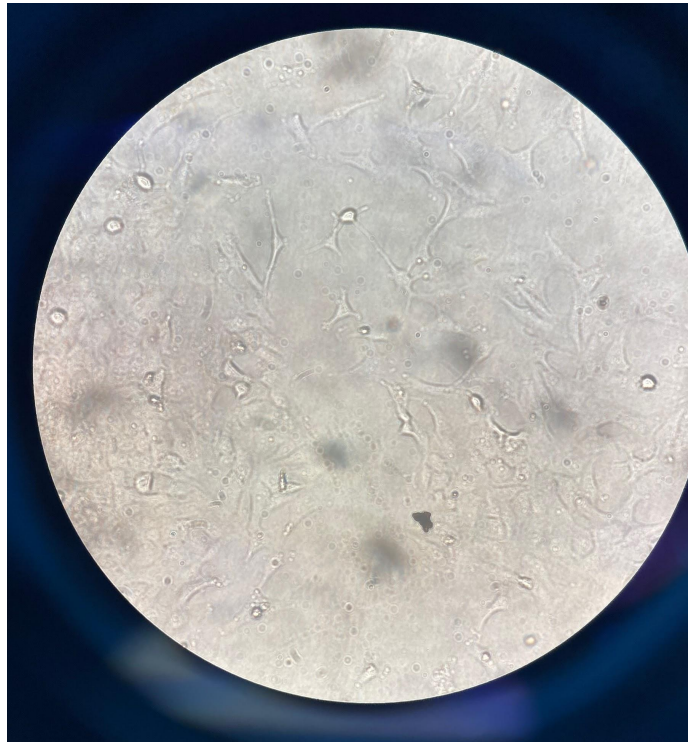
**Figura 3:** Células MIA PaCa-2 em microscópio invertido, aumento de 40x.



Fonte: Imagem de autoria própria, 2022

Para as amostras de fibroblastos de linhagem MRC5 usados para controle do ensaio, mostradas na Figura 3, após centrifugação foram lavadas com solução tampão PBS e centrifugadas novamente. Descartado o sobrenadante e ressuspendidas as células em 10 mL de meio de cultivo DMEM completo e suplementado foi reservado em estufa nas condições já descritas. O meio foi trocado com o intervalo de 3 dias por duas semanas até serem preparadas as primeiras amostras.

**Figura 4:** células MRC-5 em microscópio invertido, aumento 40x.



Fonte: Imagem de autoria própria, 2022

Para que as linhagens continuassem vivas e expandidas para os experimentos seguintes, foi adicionado 10 mL de meio completo nas garrafas de cultura após o processo de tripsinização e a retirada das células que se desprenderam para a amostra, recuperando o cultivo com as células que seguiram aderidas. O meio foi trocado depois de três dias nas mesmas condições descritas e o crescimento celular foi monitorado.

## 5.2. CULTIVO DOS *C. elegans*

Foi cultivada a linhagem de *C. elegans* N2 (tipo Selvagem) para os ensaios em placas de petri com o meio ágar NGM (Nematode Growth Medium) e *Escherichia coli* OP50 foi utilizada como fonte de alimento. Essa linhagem tem crescimento limitado e é utilizada para permitir a fácil visualização dos vermes em microscópio. A bactéria foi repicada e cultivada em meio previamente preparado de ágar-peptona líquido Luria Bertani autoclavado. Para a alimentação dos vermes foi adicionado sobre as placas com meio NGM 0,2 mL do meio líquido de *E. coli* seguida de incubação na estufa a 37° por 24 horas. Depois, as placas foram mantidas em geladeira (+-4°C) até serem utilizadas para os ensaios (Bianchi; Driscoll, 2006).

*C. elegans* foram transferidos para se reproduzirem nas placas preparadas através de pedaços de ágar com o uso de espátulas, utilizando culturas de estoque para o repique. As placas foram lacradas com papel filme, mantidas em

ambiente úmido e em incubadora com uma temperatura estável ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após três dias da realização do repique foi feita a sincronização dos vermes, momento ideal com maior número de adultos com ovos.

Para a sincronização, foi adicionada água destilada nas placas para liberação dos vermes e o líquido foi transferido para tubos tipo falcon de 15 mL. Após decantação de três minutos, foi descartado o sobrenadante e adicionado 3 mL de água destilada, 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 10M e 1,5 mL de hipoclorito de sódio a 5%. Os tubos foram mantidos em agitação no Vórtex por 3 minutos para destruição da cutícula dos vermes grávidos e obtenção dos ovos. Para parar a ação dos reagentes foi adicionado 12 mL de tampão M9 (3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5 g/L de NaCl, 1 mL/L de  $\text{MgSO}_4$  1M) seguido de centrifugação por 3 minutos, até a formação de pellet. O sobrenadante foi retirado, deixando até 2 mL da solução com os vermes e adicionado mais tampão M9 para lavagem. O processo de centrifugação e lavagem foi realizado mais duas vezes. O conteúdo final foi transferido para placas de petri vazias e deixadas na incubadora a  $20^\circ\text{C}$  por 24 h, para eclosão dos ovos e desenvolvimento dos animais até o estágio L1. Para que sigam crescendo, são transferidos para as placas de NGM preparadas com *E. coli*. Para isso, o líquido com os vermes L1 é transferido para tubos tipo falcon novamente, centrifugados e descartados os sobrenadantes, duas vezes, adicionando tampão M9 para as lavagens. Na última centrifugação o sobrenadante é retirado pela metade, os vermes são homogeneizados e o líquido é adicionado nas placas previamente preparadas.

Para que alcançassem a fase adulta de forma sincronizada, os vermes foram mantidos por dois dias na placa com *E. coli* em incubadora a  $20^\circ\text{C}$ .

### 5.3. ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA

#### 5.3.1. Preparação das amostras

A partir da cultura celular crescida, foram preparadas as amostras de células do câncer de pâncreas e do meio condicionado, onde foi crescida a cultura. Para as células inteiras, após serem tripsinizadas e centrifugadas, houve a contagem e ajuste de concentrações de diluição, sendo a  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^2$ .

Para comparação do ensaio foram utilizados os mesmos processos de tratamento e diluição para a cultura de fibroblastos.

A fim de avaliar o microambiente das células e constatar a presença de compostos extracelulares, foram preparadas amostras de meio condicionado

diluídas em 75 % e 25 %, além da utilização do meio sem diluição.

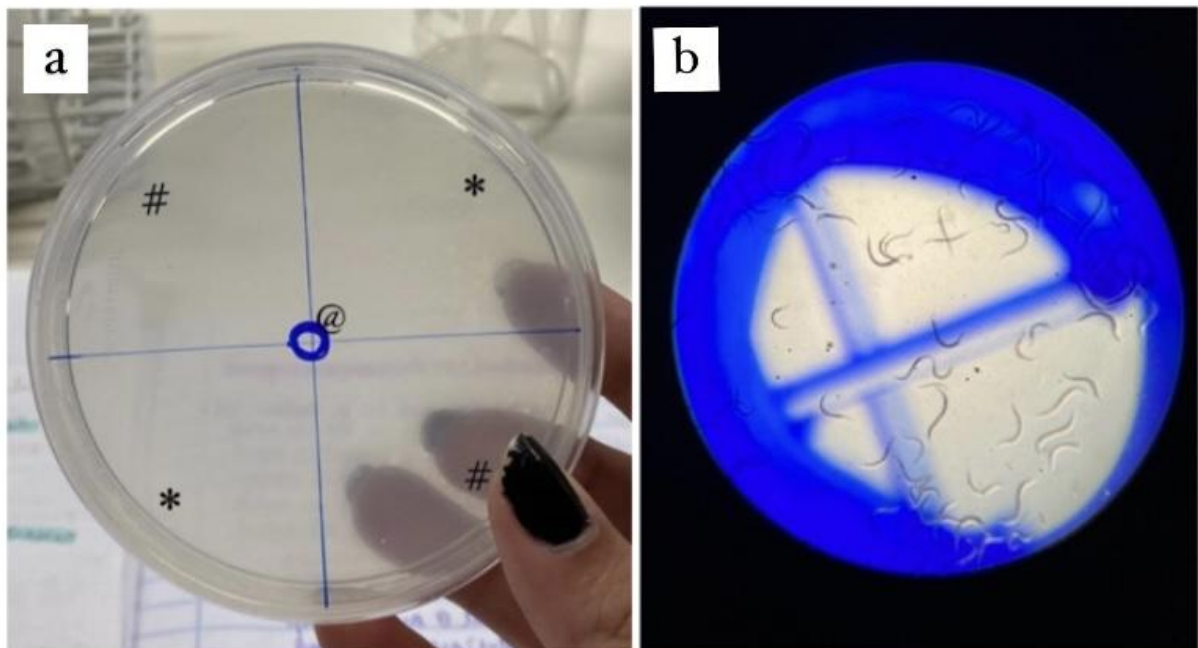
### 5.3.3. Preparação de *C. elegans*

Após os vermes sincronizados atingirem o estágio adulto, eles foram utilizados no ensaio de quimiotaxia. Foi adicionado tampão M9 sobre as placas com ágar para a soltura dos vermes e adicionado o líquido em tubos tipo falcon de 15 mL. Após decantação de 3 a 5 minutos, foi descartado o sobrenadante e adicionado mais tampão. O processo foi repetido por mais três vezes para remover a bactéria. Por fim, o sobrenadante foi retirado, deixando até 2 mL da solução com os vermes. Foi realizada a contagem dos animais em duas gotas de 5  $\mu$ L. A partir da média, foi calculado o volume necessário para atingir a quantidade aproximada de 80 vermes para cada grupo do experimento (Yoshida *et al.*, 2012).

### 5.3.4. Ensaio piloto e de repetições

As placas de petri preparadas com meio ágar NGM sem *E.coli* para os ensaios foram marcadas em sua parte inferior sendo divididas em 4 quadrantes iguais. Um círculo de raio de 0,5 cm em torno da origem, ponto central, foi marcado e identificado os quadrantes, superior esquerdo e inferior direito, como quadrantes de teste e os quadrantes superior direito e inferior esquerdo, para adição de tampão M9, como mostra a Figura 5.

**Figura 5:** Placas preparadas para o ensaio de quimiotaxia.



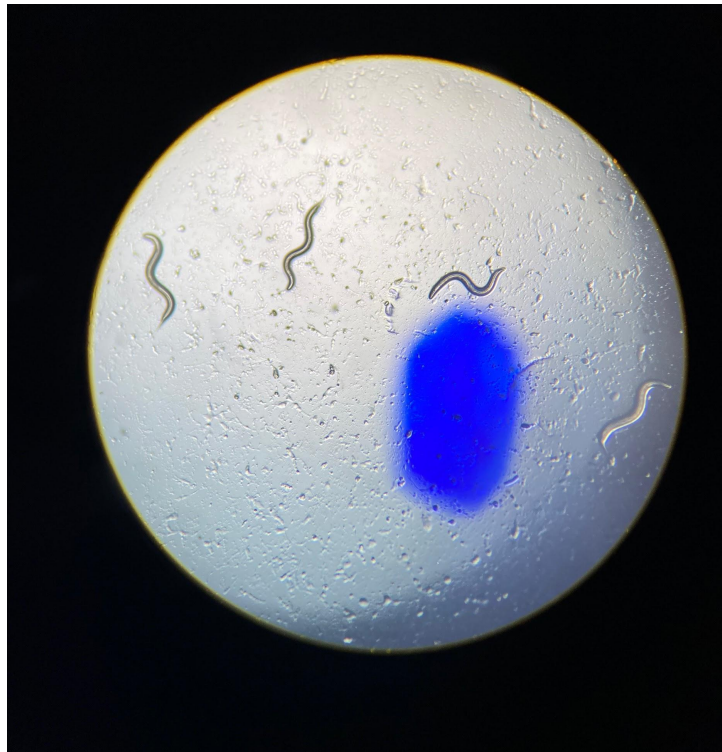
(a) Em \* são colocadas as amostras, # tampão M9 e @ os vermes. (b) círculo central com os vermes

no início do ensaio (Aumento de 10x).

Fonte: Imagens de autoria própria, 2022

Preparadas as amostras e a lavagem dos vermes, foi pipetado o volume ajustado da solução com os vermes na origem das placas e 5  $\mu$ l das amostras (células ou meio condicionado) nos quadrantes teste, assim como 5  $\mu$ l da so controle (tampão M9) nos quadrantes restantes. Assim que o líquido dos vermes e as amostras foram absorvidas no ágar, a tampa foi fechada. Após 60 min, o movimento dos vermes foi observado e aqueles que cruzaram completamente o círculo interno de cada quadrante foram contabilizados, como na Figura 6.

**Figura 6:** Vermes chegando até o ponto onde foi adicionada a amostra de meio condicionado de células MIA PaCa-2 em um dos ensaios de quimiotaxia.



O ponto azul indica onde a amostra foi adicionada.

Fonte: Imagem de autoria própria, 2022

Como controle positivo de atração olfativa, foi utilizada acetona diluída em etanol no lugar das amostras (Worthy *et al.*, 2018). Para encontrar resultados mais eficientes foram realizados ensaios com diferentes diluições (5%, 10% e 20%). Para testar se há diferença na resposta de quimiotaxia celular, foram comparados os resultados entre células cancerígenas e fibroblastos, de linhagem MRC-5 (Jacobs; Jones; Baille, 1970), assim como o seu meio condicionado.

Um último ensaio controle foi realizado para comparar os índices de

quimiotaxia com amostras do meio DMEM antes de ser utilizado no cultivo de células.

Após realização dos testes, o índice de quimiotaxia foi calculado através da fórmula:

Índice de quimiotaxia = número de vermes em ambos os quadrantes de teste - número de vermes em ambos os quadrantes de controle / Total de vermes pontuados

Uma pontuação + 1 (um) indica atração máxima para o alvo e representa 100 % dos vermes que chegam aos quadrantes contendo o alvo químico. Um índice de -1.0 (menor que um) é evidência de repulsão máxima.

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram comparados por ANOVA de uma via seguido do teste Tukey e foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem poucas referências de ensaios de quimiotaxia utilizando componentes celulares e a metodologia necessita de padronização.

Nos três primeiros testes foram usadas placas de petri de 100 mm de diâmetro e foi observado que os vermes identificaram a presença de componentes secretados pelas células. Aqueles colocados nas placas chegaram nos quadrantes das amostras apresentando valores consideráveis quando comparados aos controles, porém não chegaram completamente nos pontos de aplicação das amostras, dificultando a contagem.

Um fator de grande importância para a eficácia da metodologia foi a lavagem dos vermes antes da utilização para os ensaios. Em uma das repetições, fragmentos de *E. coli* foram transferidos para a placa do ensaio junto com os vermes. Isso gerou aglomeração e dificuldade de locomoção durante os 60 minutos indicados para realização do ensaio. Outro fator que dificultou a contagem dos vermes foi observado e pode facilitar a contagem e paralisar e impedir que eles se dispersem após alcançarem os pontos de aplicação.

Como controle de quimiotaxia dos vermes foi usada acetona, um atraente conforme descrito por Worthy *et al.*, 2018. Porém, o solvente mais utilizado nesse ensaio é a butanona em 10 % diluída e etanol, indisponível na universidade. Como não encontramos na literatura a diluição eficaz para a acetona, foram

realizados ensaios utilizando concentrações diferentes (5%, 10 % e 20% de acetona em etanol) e evidenciamos que os vermes responderam de maneira mais efetiva a concentração de 20 % do reagente como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Índices de quimiotaxia por diferentes concentrações de acetona como reagente controle de atração.

	5%	10%	20%
Ensaio 1	0,15	0,1	0,42
Duplicata	0,15	0,23	0,46

Análise por ANOVA de uma via, seguida do teste Tukey, foram considerados valores onde  $p < 0,05$ . Fonte: Tabela de autoria própria, 2022

Assim, no segundo bloco de ensaios, ajustados o tamanho da placa de petri para 60 mm de diâmetro e o controle olfativo de acetona 20%, foram testadas as concentrações celulares e porcentagem de diluições de meio condicionado para realizar a comparação e evidência de dados. Identificamos que a concentração de células inferior a  $1 \times 10^3$  não gera resultados significativos. A partir das células cancerígenas cultivadas foi possível obter a concentração máxima de  $1 \times 10^4$ , que demonstrou resultado significativo. Segundo ensaios presentes na literatura, concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  representam o pico de resposta comportamental dos vermes para as células do câncer ao mesmo tempo que demonstraram repulsa a linhagem de células normais controle. Como não foi possível chegar a essa concentração, pudemos evidenciar que a partir de  $1 \times 10^3$  os vermes respondem de maneira positiva às amostras de MIA PaCa-2, mostrando um resultado gradativo a concentrações maiores como indicam outros estudos (Hirotsu *et al.*, 2015).

Para os testes utilizando meio condicionado houve atração dos vermes para as amostras de câncer sem diluição, retiradas diretamente da cultura, assim como resultados negativos para as amostras de meio condicionado de MRC-5, cultura usada como controle de células normais. Diluições de 50% e 75% apresentaram resultados, mas não alcançaram valores significativos, expostos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Índices de quimiotaxia por diferentes concentrações de meio condicionado de células de câncer de pâncreas (MIA Paca-2) e de fibroblastos (MRC-5)

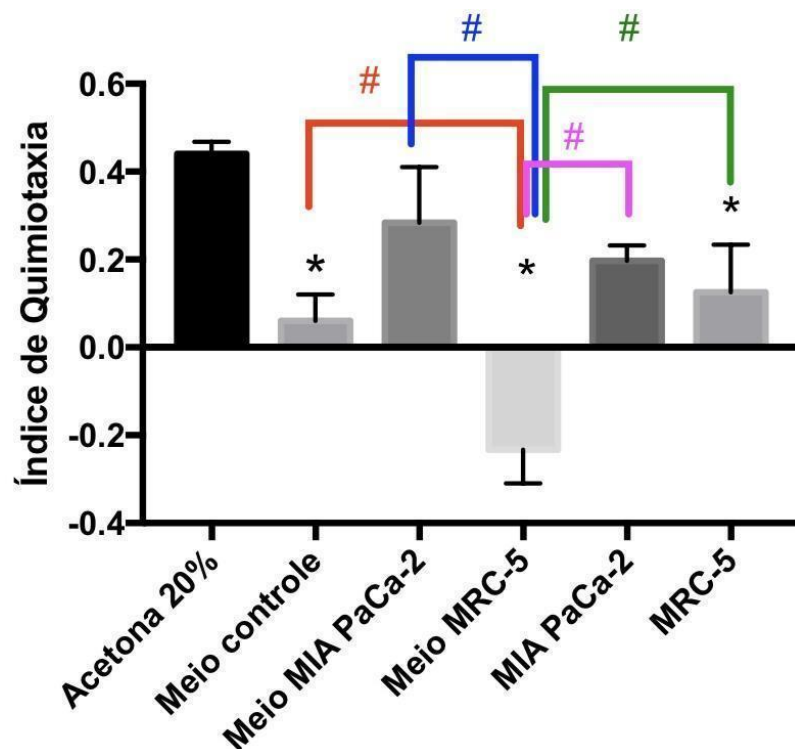
	50%	75%	100%
Meio condicionado			
MIA PaCa-2	0,1	0,01	0,43
Meio condicionado			
MRC-5	-0,3	-0,21	0,02

Análise por ANOVA de uma via, seguida do teste Tukey, foram considerados valores onde  $p < 0,05$ .

Fonte: Tabela de autoria própria, 2022

A partir desses resultados, foram considerados os índices de quimiotaxia mais satisfatórios para cada amostra e expostos na Figura 7. Considerando concentração celular  $1 \times 10^4$  e os meios condicionados sem diluição, os resultados foram comparados utilizando acetona a 20% e o meio DMEM sem que houvesse passado por cultivo celular.

**Figura 7:** índice de quimiotaxia



Acetona 20% - controle positivo de atração; Meio controle - DMEM; Meio MIA PaCa-2 e Meio MRC-5 - meio condicionado de células de câncer de pâncreas e de fibroblastos, respectivamente; MIA PaCa-2 – células de câncer de pâncreas; MRC-5 – fibroblastos. \* significa diferença estatística em relação a acetona 20% e # diferença estatística entre grupos. Análise por ANOVA de uma via, seguida do teste Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes valores onde  $p < 0,05$ .

Fonte: Gráfico de autoria própria, 2022

Os valores mais significativos de quimiotaxia positiva são referentes aos ensaios de amostras com meio condicionado da MIA PaCa-2, pois não mostram diferença estatística quando comparados aos resultados do controle positivo de acetona em 20%. As amostras de meio condicionado das células controle MRC-5 resultaram em índice de quimiotaxia negativo, sugerindo repulsão.

Os vermes não foram atraídos por reagentes do meio de cultura sem células (Meio controle), e apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle olfativo positivo. O mesmo aconteceu com as amostras de células MRC-5 usadas como controle celular, nas mesmas concentrações que as amostras de células cancerígenas, evidenciando que não há atração positiva para essas amostras.

Compostos voláteis podem atrair os *C. elegans* dependendo da concentração das amostras, assim como a acetona 20 % (Worthy *et al.*, 2018). Os resultados comparados entre os grupos mostram que eles não são atraídos pelo meio controle, assim como sugerem repulsão pelo meio em que foram cultivadas células MRC-5. Portanto, as células normais usadas como controle mantém um ambiente não atraente para os nematoides. Se comparados os grupos de testes com meio condicionado de células cancerígenas e células controle temos a maior evidência de diferença entre os resultados, sendo o primeiro deles o mais atraente e o segundo o menos atraente. Isso pode ser explicado pelo desequilíbrio do metabolismo celular, sugerindo a presença de substâncias ou a falta delas no microambiente tumoral.

A fim de analisar a presença desses compostos, o grupo controle MRC-5 comparado ao grupo de meio condicionado retirado do cultivo dessas células sugere que esses compostos sejam liberados no microambiente e estejam relacionados aos processos de sinalização e controle na divisão celular e no processo de metástase. Assim, esses dados evidenciam que o microambiente tumoral é responsável por parte do desenvolvimento do câncer, bem como as mutações genéticas presentes nas células, envolvendo processos moleculares e metabólicos (Onuchic; Chammas, 2010).

Por fim, analisados os resultados em triplicata dos ensaios, foram mostrados índices promissores de quimiotaxia para o meio condicionado de células tumorais pancreáticas, demonstrando que, nas condições descritas, os nematóides podem rastrear de maneira efetiva a presença de compostos voláteis específicos. As substâncias voláteis detectáveis no microambiente tumoral são produto direto do metabolismo celular, sem que haja biotransformação. Essas evidências sugerem que

o rastreamento dessas substâncias pode localizar as células de interesse, servindo como biomarcadores do local onde a doença se desenvolve. Além disso, descobrir maneiras de controlar esse ambiente sinalizador poderiam ser uma forma de conter a doença e evitar a metástase.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram necessárias adaptações do ensaio de quimiotaxia com *C. elegans*, como tamanho das placas de petri utilizadas, número de lavagens do meio com nematoides para evitar a interferência de bactérias na locomoção dos animais, diferentes concentrações celulares e diluições de meio condicionado (de cultivo celular). Esses fatores foram cruciais para a obtenção de bons resultados. Além disso, a acetona gerou resposta significativa como atraente, sugerindo uma alternativa de controle pouco avaliada na literatura.

Os resultados sugerem que ainda é necessária uma melhor padronização da metodologia para se obter constatações mais significativas e confiáveis. Entretanto, foi possível evidenciar mudanças no microambiente tumoral do câncer de pâncreas rastreadas pelo olfato de *C. elegans*, sugerindo que o metabolismo dessas células produzem compostos voláteis em níveis desordenados quando comparados a amostras do controle, que podem auxiliar na compreensão e na identificação precoce da doença.

## REFERÊNCIAS

ALEMAR, B.; GREGÓRIO, C.; ASHTON-PROLLA, P. MiRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: A Review. **Biomarker Insights**, v. 10, p. BMI.S27679, 2015

AMORIM, M. *et al.* Câncer de mama: Reprogramação do metabolismo tumoral. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, p. 1937, 2018

AMRUTKAR, M.; GLADHAUG, I. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. **Cancers**, v. 9, n. 12, p. 157, 2017

BIANCHI, L.; DRISCOLL, M. Culture of embryonic *C. elegans* cells for electrophysiological and pharmacological analyses. **WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. Pasadena (CA): WormBook. 2006**

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394-424, 2018

BORGES, J. **Papel da autofagia no desenvolvimento de câncer pancreático e resistência terapêutica.** Monografia (Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2019

CHEN, X. *et al.* A. Study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. **Cancer**, v. 110, n. 4, p. 835–844, 2007.

DEBERARDINIS, R.; SAYED, N.; DITSWORTH, D.; THOMPSON, C. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 1, p. 54–61, 2008

FILHO, V.; MONCAU, J. Cancer mortality in Brazil 1980-1995: regional patterns and time trends. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 48 n. 3, 2002

FRESHNEY, R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. **Nova York: Wiley-Liss**, 4. ed. 1994

HIROTSU, T. *et al.* A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. **PLoS One**, v. 10 n. 3 e0118699, 2015

HIROTSU, T.; IINO, Y. Neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans* is regulated by the Ras-MAPK pathway. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 517–530, 2005

HUNT, P. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 50–59, 2017

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **ABC do câncer. 4ª edição revista e atualizada ed., Rio de Janeiro, Ministério da saúde.** 2018

JACOBS, J.; JONES, C.; BAILLE, J. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. **Nature 227(5254)**, p. 168–170, 1970

KIERSZENBAUM, A.; TRES, L. **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução À Patologia.** 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2012

LANZA, E. *et al.* *C. elegans*-based chemosensation strategy for the early detection of cancer metabolites in urine samples. **Scientific reports**, v. 11, n. 17133, 2021

MATSUMURA, K. *et al.* Compostos voláteis urinários como biomarcadores para câncer de pulmão: um estudo de prova de princípio usando assinaturas de odor em modelos de camundongos de câncer de pulmão. **PLoS Um.** 2010

MCCULLOCH, M. *et al.* Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. **Integrative cancer therapies**, v. 5 n.1, p. 30–39, 2006

ONUCHIC, A.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista De Medicina** v. 89 n.1 , p. 21-31, 2010

PROENÇA, T. **Perfil epidemiológico, anatomopatológico, clínico e prognóstico de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pâncreas.** Monografia

(Graduação em Medicina) - Universidade federal da fronteira sul campus passo fundo, 2020

RITCHIE, S.; AKITA, H.; TAKEMASA, I.; et al. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: potential for early detection. **BMC Cancer** v. 13, n. 416.m, 2013

SONODA, H. *et al.* Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. **Gut**, n. 60, p. 814, 2011

TROEMEL, E.; KIMMEL, B.; BARGMANN, C. Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 161–169, 1997

VIDEIRA, R. *et al.* Oncogenes and cancer development. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, v. 6, n.1, p. 71-76, 2002

VINCENT, A. *et al.* Pancreatic cancer. **Lancet** (*Londres, Inglaterra*), 2011

WORTHY, S. *et al.* Identification of attractive odorants released by preferred bacterial food found in the natural habitats of *C. elegans*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 0201158, 2018

YOSHIDA, K. *et al.* Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. **Nat Commun**, n. 3, p. 739, 2012