UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Estudos proteômicos da transição epitélio-mesenquimal induzida
por TGF- β e EGF em linhagens celulares de câncer de pâncreas**

Gabriela Norma Solano Canchaya

Ribeirão Preto, SP

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Estudos proteômicos da transição epitélio-mesenquimal induzida
por TGF- β e EGF em linhagens celulares de câncer de pâncreas**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador:

Prof. Dr. Vítor Marcel Faça

Ribeirão Preto, SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Solano-Canchaya, Gabriela N.

Estudos proteômicos da transição epitélio-mesenquimal induzida por TGF- β e EGF em linhagens celulares de câncer de pâncreas./Solano-Canchaya, Gabriela N.; Orientador. Prof. Dr. Vítor Marcel Faça. – Ribeirão Preto, 2016.

133f. 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Área de concentração: Bioquímica) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Células epiteliais de câncer de pâncreas.
2. Transição epitelial-mesenquimal.
3. Fatores de crescimento.
4. SILAC.
5. Análise proteômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SOLANO-CANCHAYA, Gabriela Norma

Título: Estudos proteômicos da transição epitélio-mesenquimal induzida por TGF- β e EGF em linhagens celulares de câncer de pâncreas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Aquilo que caracteriza ao homem de ciência não é a possessão do conhecimento ou de verdades irrefutáveis, mas bem a busca desinteressada e incessante da verdade.”

Karl Popper

Dedico aos meus pais Norma e Leonardo, porque todos meus logros não são só meus, mas também são os deles, por sempre me terem dado um constante apoio e imenso amor. Ao meu pai por sempre me encorajar a pensar e refletir em todos os campos da ciência e filosofia. A minha mãe por nunca ter me deixado desistir e me encorajar para terminar tudo aquilo começado.

Ao meu irmãozinho José Gabriel, por estar sempre transformando os problemas em brincadeiras e assim ver o lado mais alegre da vida.

À Vera, minha mãe brasileira, porque os agradecimentos não são suficientes para expressar o valor que dou ao seu apoio constante nesta longa jornada chamada doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Marcel Faça, por ter me dado a oportunidade de começar algo realmente novo, a confiança depositada para a execução do projeto e o apoio concedido nesses anos de estudo.

Ao Prof. Adriano Sebollela, pela amizade e os conselhos proporcionados nestes últimos anos do doutorado, sempre tentando me ajudar a melhorar como estudante e ser humano.

Ao Prof. Eduardo Brandt, pelo tempo e dedicação investido ao me ensinar a química da síntese de peptídeos, pelos seus conselhos como professor que ajudaram muito na minha formação como cientista.

Aos meus companheiros do Laboratório de Proteômica do Câncer, especialmente Guilherme Lanfredi e Edson Galdino, por fazer mais alegre o tempo de trabalho. À Carolina Thomé e Germano Ferreira, pela ajuda nos momentos-chaves do desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

À Vanessa Caixeta e Giselle Villa Flor Brunoro, por sua grande amizade, por sempre me brindar apoio nos momentos mais difíceis e ajudar a me focar naquilo que é importante.

À Ana Gaspari, Vannessa Espitia e Silvia Sánchez, por dividir seu tempo comigo nestes quatro anos de estância no Brasil e assim fazê-lo mais alegre e cheio de novidades culinárias e visitas ao cinema.

À Niége Silva, pela ajuda desinteressada, a amizade espontânea e apoio incondicional. Seus conselhos sempre foram de muita ajuda para me fazer crescer como ser humano.

À Andressa Barbán de Patrocínio, pelo carinho e apoio brindado ao longo de nossos anos como estudantes de doutorado.

À Angelita Stabile, Wilson Rogerio, Edvaldo Ribeiro e Priscila Angelotti, graças a vocês conheci caminhos diferentes aos acadêmicos de muitos quilômetros corridos e risadas cheias de adrenalina que têm feito desta etapa da minha vida tão especial.

Ao Dr. René Zahedi e ao seu grupo de pesquisa no ISAS, Margherita Dell'Aica, Humberto Gonczarowska, Denissa Hathazi, Karsten Biss, Stefan Lorocho, Oliver Pagel, Xuan, Ruzzanna, Verena Tinnefield, Fiorella Solari, Gerta Sherma, que fizeram parte de minha vida de doutoranda um tempo curto, mas cheio de ensinamentos que me ajudaram a crescer profissional e pessoalmente.

Ao Rafael Robles e à Sandra Palma, pelas noites de açaí com conversas amenas e diferentes que faz esquecer as preocupações do dia a dia.

À Niele Mendes e à Raquel Campos por fazer de meus últimos meses de doutorado mais gostosos e cheios de diversão.

A todos os alunos do Departamento de Bioquímica, por terem me ajudado sempre, alegres e de bom ânimo, sempre dispostos a me ensinar quando tenho precisado.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Odette, Silvana, Sílvia, Silvinha, Zuleica, Cacilda, pelo carinho e ajuda proporcionados, quando foi preciso.

À central analítica da USP-SC e ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, pelo acesso ao espectrômetro de massas onde os dados proteômicos foram coletados.

À FAPESP pelas bolsas e pelo apoio financeiro concedidos: doutorado (2011/22086-9); BEPE-estágio no exterior (2015/07711-5) e Projeto Jovem Pesquisador (2011/09740-1).

ESTUDOS PROTEÔMICOS DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL INDUZIDA POR TGF- β E EGF EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PÂNCREAS

RESUMO

O câncer de pâncreas é considerado um dos adenocarcinomas mais agressivos, ocupando o quarto lugar de mortes devidas a câncer, isto é dado principalmente a seu desenvolvimento silencioso e a sua complexidade genética, tornando-o de difícil detecção. Consequentemente, o diagnóstico desta doença ocorre apenas em fase tardia, quando o tratamento é apenas para fins paliativos. As anomalias genéticas mais frequentes no câncer de pâncreas invasivo estão relacionadas à ativação por mutações do gene *KRAS* e à inativação dos genes supressores de tumor *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* e *BRCA2*. Além destas conhecidas vias de sinalização, fatores de crescimento como o TGF- β e EGF também apresentam papel fundamental na progressão e metástase do câncer de pâncreas. Interessantemente, TGF- β e EGF são também indutores do processo denominado transição epitelial-mesênquimal (EMT), onde células epiteliais normais, durante a embriogênese, ou células cancerosas durante a progressão tumoral e metástase, perdem seus contatos intracelulares e adquirem caráter migratório. Desta forma a EMT, induzida por altos níveis de TGF- β e/ou EGF, é considerada como um dos mecanismos de progressão tumoral em adenocarcinomas. No presente estudo, foram estudados os proteomas e o fosfoproteoma da EMT do PanCa. Assim, células de câncer de pâncreas PANC-1 foram induzidas à EMT em cultura com os fatores de crescimento TGF- β 1 ou TGF- β 2 e EGF, e após a indução, marcadores moleculares e propriedades funcionais de migração e invasão foram confirmados. Duas condições de indução da EMT foram estabelecidas, para as quais foram desenvolvidas as análises proteômicas quantitativas. A abordagem foi baseada em marcação isotópica de células em cultura (SILAC), em conjunto com fracionamento celular e de proteínas intactas, e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para identificação de proteínas em larga escala. No total, aproximadamente 5.000 proteínas foram identificadas, e a maioria delas quantificadas com precisão nas duplicatas experimentais. Foram selecionadas 37 proteínas com expressão diferencial estatisticamente significativa nos experimentos proteômicos, as quais participam principalmente em processos de biogênese, adesão e apoptóticos. A análise de redes de interação revelou que as proteínas alteradas estavam principalmente localizadas em vias de sinalização que controlam processos de organização da matriz extracelular, splicing alternativo e regulação da apoptose. A análise do fosfoproteoma foi feita usando TGF- β 1 como agente indutor da EMT nas células PANC-1,

usando a estratégia ERLIC para o enriquecimento de fosfopeptídeos. No total, foram identificados 5.965 fosfopeptídeos não redundantes, correspondendo a um total de 2.250 fosfoproteínas analisadas, sendo quantificadas 2.053 ao menos em duas replicatas, e destas foram identificados 61 fosfopeptídeos regulados pertencentes a 55 fosfoproteínas, relacionados com processos de regulação do mRNA e vias de sinalização ligadas à adesão celular. Em conclusão, nosso estudo elucida potenciais novos alvos para inibição da EMT, controle da metástase, ou para auxiliar no diagnóstico da doença, quando devidamente validada.

Palavras chaves: Células epiteliais de câncer de pâncreas. Transição epitelial-mesenquimal. Fatores de crescimento. SILAC. Análise proteômica.

PROTEOMICS STUDIES OF EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION INDUCED BY TGF- β AND EGF IN PANCREATIC CANCER CELL LINES

ABSTRACT

Pancreatic cancer kills more than 200 thousand people worldwide every year. Also, pancreatic cancer is considered one of the most aggressive adenocarcinomas and difficult to diagnose since it develops silently and presents a high genetic complexity. Consequently, the diagnostic is often late, when the pancreatic cancer has already metastasized and the treatment has only palliative purposes. The most frequent genetic alterations observed in pancreatic cancer are related to mutations in *KRAS* oncogene and *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* and *BRCA2* tumor suppressor genes. In addition to these known frequent mutations, growth factors such as TGF- β and EGF play important roles in pancreatic cancer progression and metastasis. Interestingly, TGF- β and EGF are also inducers of the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), in which epithelial cells lose their intracellular contacts and acquire migratory capacities. Therefore, EMT is considered one of the mechanisms responsible for tumor progression and metastasis in adenocarcinomas in addition of being correlated to the process of generating cancer stem cells. In our present study, pancreatic cancer cell line PANC-1 was induced to EMT by using growth factors TGF- β 1 or TGF- β 2 and EGF. Both molecular and functional properties, such as invasion and migration, were evaluated in PANC-1 cells undergoing EMT and confirm the induction. Two conditions of EMT induction were properly established and in-depth quantitative proteomic analysis based on stable isotope labeling in cell culture (SILAC) followed by cellular and protein fractionation were assessed. In total, 5.000 proteins were identified and most of them were accurately quantified in duplicate experiments. Thirty-seven proteins were selected as differentially expressed with statistical significance, and were related mainly with biogenesis, adhesion and apoptosis processes. Interaction network analysis showed that regulated proteins were predominantly participating in signaling pathways linked to extracellular matrix organization, alternative splicing and apoptosis regulation. Phosphoproteome analysis was done using TGF- β 1 as EMT-inductor agent on PANC-1 cells and ERLIC strategy for phosphopeptides enrichment. In total, were identified 5.965 non-redundant phosphopeptides corresponding to approximately 2.250 analyzed

phosphoproteins, thereof 2.053 were quantified in at least two replicates. At comparison, were identified 61 regulated phosphopeptides belonging to 55 phosphoproteins, which were related with mRNA regulation processes and signaling pathways linked to cellular adhesion. In conclusion, our study highlighted potential new targets for EMT inhibition, metastasis control or to help in pancreatic cancer diagnosis, when careful validated.

Keywords: Pancreatic cancer epithelial cells. Epithelial-Mesenchymal Transition. Growth Factors. SILAC. Proteomic Analysis

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL2 – Proteína Abelson tirosina-quinase 2

ACN - Acetonitrila

AGR2 – Gradiente anterior 2 homólogo

AHNAK - Proteína associada a diferenciação de neuroblastos AHNAK

ALPP – Fosfatase alcalina, isoenzima Reagan

ALPPL2 – Fosfatase alcalina, isoenzima Nagao

CA 19.9 - Antígeno de câncer 19-9

CDH1 – E-caderina

CDH2 – N-caderina

CID – Dissociação induzida por colisão

COL1A1 – Colágeno tipo I alfa-1

CRABP2 – Proteína de ligação ao ácido retinóico celular 2

CSCs – Células-tronco tumorais

CT – Controle

CTCs- Células tumorais circulantes

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DTT – Ditioneitol

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGFR – Receptor do Fator de crescimento epidermal

EMT - Transição epitélio-mesenquimal

ERLIC – Cromatografia de interação hidrofílica com repulsão eletrostática

FA – Ácido fórmico

FAMMM - Síndrome do mola-melanoma múltiplo atípico familiar Síndrome melanoma mole múltiplo atípico familiar

IAA – Iodoacetamida

INCA - Instituto Nacional do Câncer

ITGA2 – Integrina alfa-2

ITGA5 – Integrina alfa-5

ITGA6 – Integrina alfa-6

ITGB3 – Integrina beta-3

ITGB4 – Integrina beta-4

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MARCKS – Substrato cinase C rico em alanina miristoilada

MET – Transição mesenquimal-epitelial

MMP2 - Metaloproteinase de matriz 2

MRM - Monitoramento de reações múltiplas

MS - Espectrometria de massas

P4H2 – Prolil-4-hidroxilase 2

PADI2 – Peptidil Arginina Desaminase do tipo 2

PanCa – Câncer de Pâncreas

PanIN - Neoplasias intraepiteliais pancreáticas

PANTHER Pathway – “Protein Analysis Through Evolutionary Relationships”

PDAC – Adenocarcinoma Pancreático

PLOD1 – Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 1

PLOD2 – Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 2

PODXL - Podocalixina

PSM – “Peptide Spectrum Match”

RAB3GAP1 – Subunidade catalítica da proteína ativadora de Rab3 GTPase

SFB – Soro Fetal Bovino

SILAC - Isótopos estáveis de aminoácidos em cultura de células

SMAD – Proteína homóloga mãe contra decapentaplégico

STRING – “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins”

TFA – Ácido Trifluoroacético

TGF- β - Fator de crescimento transformante-beta

THRAP3 – Proteína associada a receptor de hormônio da tireoide 3

UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

VIM – Vimentina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer de Pâncreas	1
1.2	Bases Moleculares da Progressão do Câncer de Pâncreas	4
1.3	A Metástase e a Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT)	6
1.4	O Papel do TGF- β e EGF no Câncer de Pâncreas e na EMT	9
1.5	O Estudo Proteômico da EMT no Câncer	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Cultura de Linhagens Celulares de Câncer de Pâncreas	14
3.2	Teste de Ativação dos Receptores de TGF- β e EGF	14
3.3	Indução da Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT)	15
3.4	Ensaio de Migração Celular	16
3.5	Ensaio de Invasão	17
3.6	Obtenção de Extratos Celulares Proteicos	17
3.7	Quantificação de Proteínas	18
3.8	SDS-PAGE e Western-blotting de Proteínas	18
3.9	Marcação Isotópica Estável da Linhagem Celular PANC-1 submetida à EMT com aminoácidos em cultura celular (SILAC)	19
3.10	Análise Proteômica da Transição Epitélio-Mesenquimal	20
3.10.1	Fracionamento celular	20
3.10.2	Fracionamento de proteínas por SDS-PAGE	20
3.10.3	Digestão <i>IN SITU</i>	23
3.10.4	Purificação de peptídeos por extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i> , SPE)	23
3.10.5	Aquisição de dados por LC-MS/MS	24
3.10.6	Análise de dados	25
3.11	Análise Bioinformática	25
3.11.1	Processamento dos dados e análise estatística	25
3.11.2	Análise de ontologia gênica	26
3.11.3	Análise de redes de interação de proteínas	27
3.12	Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para a análise de B-actina na cultura celular com marcação isotópica SILAC	27
3.12.1	Digestão de proteínas	27
3.12.2	Purificação de peptídeos através da extração em fase sólida (SPE)	28
3.12.3	Coleta de dados por MRM	28
3.13	Análise Temporal do Fosfoproteoma na Transição Epitélio-Mesenquimal	29
3.13.1	Cultura celular em meio SILAC-3plex	29
3.13.2	Indução da transição epitélio-mesenquimal nas células PANC-1 crescidas em meio SILAC	29
3.13.3	Lise celular e processamento de amostras	30
3.13.4	Digestão e purificação das amostras	31

3.13.5	Enriquecimento em fosfopeptídeos	31
3.13.6	Análise do fosfoproteoma por LC-MS/MS	32
3.13.7	Análise preliminar dos dados	33
3.14	ENSAIO DE MORTE CELULAR	33
4	RESULTADOS	35
4.1	RESPOSTA CELULAR AO TRATAMENTO COM TGF-BETA E/OU FATOR DE EGF	35
4.1.1	Atividade dos receptores de TGF- β e EGF	35
4.1.2	Alterações fenotípicas após tratamento com TGF- β e/ou EGF	38
4.1.3	Alterações ao nível de proteína após tratamento com TGF- β e/ou EGF	40
4.1.4	Avaliação da capacidade de migração da linhagem celular PANC-1 após tratamento com TGF- β e/ou EGF	45
4.1.5	Avaliação da capacidade de invasão da linhagem celular PANC-1 após tratamento com TGF- β e/ou EGF	49
4.2	MARCAÇÃO ISOTÓPICA DA LINHAGEM CELULAR PANC-1 SUBMETIDA À EMT COM AMINOÁCIDOS EM CULTURA CELULAR (SILAC)	51
4.3	ESTUDO PROTEÔMICO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA LINHAGEM CELULAR PANC-1	53
4.3.1	Fracionamento celular e de proteínas	53
4.3.2	Análise de dados obtidos por LC-MS/MS	56
4.3.3	Análises das alterações do proteoma na EMT	61
4.4	ANÁLISE DE ONTOLOGIA GÊNICA DAS PROTEÍNAS ALTERADAS e IDENTIFICADAS NOS EXPERIMENTOS PROTEÔMICOS 1 E 2	69
4.4.1	Análise da função molecular e processos biológicos alterados durante a indução da EMT - experimento 1	69
4.4.2	Análise da função molecular e processos celulares alterados durante a indução da EMT - experimento 2	74
4.5	ANÁLISE DE REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA	80
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS PROTEÍNAS REGULADAS	83
4.7	ANÁLISE PRELIMINAR DO FOSFOPROTEOMA NA INDUÇÃO DA EMT	85
4.7.1	Padronização da técnica ERLIC para enriquecimento de fosfopeptídeos	85
4.7.2	Obtenção e análise dos dados do fosfoproteoma	87
4.8	AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR APÓS INDUÇÃO DA EMT	90
5	DISCUSSÃO	92
6	CONCLUSÕES	102
7	REFERÊNCIAS	103
8	APÊNDICES	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	PRINCIPAIS VIAS E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO GENETICAMENTE ALTERADOS NO CÂNCER DE PÂNCREAS.	6
FIGURA 2.	VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELO TGF-B E SUA IMPLICÂNCIA NA EMT.	10
FIGURA 3.	ESQUEMA DE FRACIONAMENTO SUBCELULAR DOS EXTRATOS CELULARES PROTEICOS PROVENIENTES DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO ISOTÓPICA NO AMINOÁCIDO LISINA E SUBMETIDAS À EMT.	22
FIGURA 4.	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE TGF-B EM CÉLULAS PANC-1 USANDO TGF-B1 OU TGF-B2	36
FIGURA 5.	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF EM CÉLULAS PANC-1	36
FIGURA 6.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EGF NA FOSFORILAÇÃO DO SEU RECEPTOR AO LONGO DO TEMPO	37
FIGURA 7.	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE TGF-B EM CÉLULAS CAPAN-2 USANDO TGF-B1 OU TGF-B2	37
FIGURA 8.	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF EM CÉLULAS CAPAN-2	38
FIGURA 9.	AValiação MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR PANC-1 AO TRATAMENTO COM TGF-B E/OU EGF POR 48 H	39
FIGURA 10.	AValiação MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR CAPAN-2 AO TRATAMENTO COM TGF-B E/OU EGF POR 72 H	40
FIGURA 11.	ANÁLISE POR <i>WESTERN-BLOTTING</i> DAS CÉLULAS PANC-1 TRATADAS COM TGF-B E/OU EGF POR 72 H	41
FIGURA 12.	ANÁLISE POR <i>WESTERN-BLOTTING</i> DA INDUÇÃO DA EMT EM CÉLULAS PANC-1 USANDO TGF-B	42
FIGURA 13.	EFEITO DO TGF-B NO NÍVEL DE PROTEÍNAS VINCULADAS À EMT AO LONGO DO TEMPO	42
FIGURA 14.	ANÁLISE POR <i>WESTERN-BLOTTING</i> DA INDUÇÃO DA EMT EM CÉLULAS PANC-1 USANDO EGF E/OU TGF-B	44
FIGURA 15.	EFEITO DO EGF E TGF-B NO NÍVEL DE PROTEÍNAS VINCULADAS À EMT AO LONGO DO TEMPO	44
FIGURA 16.	EFEITO O TGFb2 (10 NG/ML) E EGF (50 NG/ML) NA MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM CELULAR PANC-1	46
FIGURA 17.	EFEITO DO TGF-B NA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS PANC-1 APÓS 48 HORAS DE ADIÇÃO	47
FIGURA 18.	EFEITO DO EGF NA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS PANC-1 APÓS 48 HORAS	48
FIGURA 19.	EFEITO DO EGF (50 NG/ML) E TGF-B1 (10 NG/ML) OU TGF-B2 (10 NG/ML) NA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS PANC-1 APÓS 48 HORAS	49
FIGURA 20.	EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EGF E TGF-B NA CAPACIDADE DE INVASÃO DAS CÉLULAS PANC-1 AO LONGO DE 48 HORAS DE TRATAMENTO	50
FIGURA 21.	MONITORAMENTO DE INCORPORAÇÃO DE ISÓTOPOS NO PEPTÍDEO DE ACTINA BETA HUMANA	52
FIGURA 22.	MODELO DE CULTURA DAS CÉLULAS PANC-1 CRESCIDAS NO MEIO SILAC A SEREM SUBMETIDAS À INDUÇÃO DA EMT	53
FIGURA 23.	ESQUEMA DE PROCESSAMENTO PARA A OBTENÇÃO DAS REPLICATAS DE PAR REVERSO SILAC	54
FIGURA 24.	GÉIS DO FRACIONAMENTO DAS CÉLULAS PANC-1, CRESCIDAS EM MEIO-SILAC E INDUZIDAS À EMT	56
FIGURA 25.	DIAGRAMA DE VENN REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES CITOPLASMÁTICAS E NUCLEARES NO EXPERIMENTO 1	58
FIGURA 26.	DIAGRAMA DE VENN REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES CITOPLASMÁTICA, NUCLEAR E DE MEMBRANA NO EXPERIMENTO 2	60
FIGURA 27.	HISTOGRAMAS REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS RAZÕES H/L NA ESCALA LOG2 DO EXPERIMENTO 1 E 2	62
FIGURA 28.	DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1, EGF 50 NG/ML E TGF-B1 10 NG/ML POR 72 H	64
FIGURA 29.	DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2, EGF 50 NG/ML E TGF-B2 10 NG/ML POR 48 H	65
FIGURA 30.	DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS ALTERADAS OBSERVADAS NO EXPERIMENTO 2, EGF 50 NG/ML E TGF-B2 10 NG/ML POR 48 H	66
FIGURA 31.	PROCESSOS BIOLÓGICOS ENRIQUECIDOS NO EXPERIMENTO 1	73
FIGURA 32.	PROCESSOS BIOLÓGICOS ENRIQUECIDOS PERTENCENTES ÀS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2	79
FIGURA 33.	REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS REGULADAS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM EGF +TGFb1	81
FIGURA 34.	REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS REGULADAS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM EGF +TGFb2, EXPERIMENTO 2	82

FIGURA 35.	PROTEÍNAS REGULADAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO- MESENQUIMAL. _____	83
FIGURA 36.	COMPARAÇÃO POR COMPARTIMENTO CELULAR DAS PROTEÍNAS REGULADAS NA INDUÇÃO DA EMT _____	84
FIGURA 37.	IMUNOISTOQUÍMICA EM TUMORES DE CÂNCER DE PÂNCREAS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE PROTEÔMICA DA INDUÇÃO DA EMT _____	85
FIGURA 38.	DISTRIBUIÇÃO DOS FOSFOPEPTÍDEOS APÓS ENRIQUECIMENTO COM ERLIC DO EXTRATO CELULAR DIGERIDO DE PANC-1 _____	86
FIGURA 39.	FOSFOPEPTÍDEOS REGULADOS APÓS A ADIÇÃO DE TGF-B1 10 NG/ML POR 15 E 60 MINUTOS NAS CÉLULAS PANC- 1 _____	88
FIGURA 40.	REDE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO FOSFOPROTEOMA NOS TEMPOS 15 E 60 MINUTOS APÓS ADIÇÃO DE TGF-B1 _____	90
FIGURA 41.	PORCENTAGEM DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS PANC-1 APÓS A INDUÇÃO À EMT. _____	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	ANTICORPOS USADOS PARA AVALIAR A RESPOSTA CELULAR APÓS ADIÇÃO DE TGF- β E EGF E EMT	15
TABELA 2.	TRATAMENTOS USADOS PARA A INDUÇÃO DA EMT NAS CÉLULAS PANC-1	16
TABELA 3.	SUBFRAÇÕES CELULARES OBTIDAS APÓS MISTURA DE SUAS CONTRAPARTES LEVE E PESADA	21
TABELA 4.	MISTURAS DE SILAC-3PLEX PARA A ANÁLISE DO FOSFOPROTEOMA	30
TABELA 5.	ALTERAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES DURANTE A INDUÇÃO DA EMT NA LINHAGEM PANC-1	45
TABELA 6.	DIFERENÇAS NA PORCENTAGEM DE ABERTURA DA RISCA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO COM TGF- β (10 NG/ML)	47
TABELA 7.	DIFERENÇAS NA PORCENTAGEM DE ABERTURA DA RISCA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO COM EGF (50 NG/ML)	48
TABELA 8.	DIFERENÇAS NA PORCENTAGEM DE ABERTURA DA RISCA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO COM EGF (50 NG/ML) E TGF- β 1 (10 NG/ML) OU TGF- β 2 (10 NG/ML)	49
TABELA 9.	MEDIDAS EM ABSORBÂNCIA DAS CÉLULAS PANC-1 CAPAZES DE PASSAR PELO MATRIGEL® APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO	50
TABELA 10.	CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS EXTRATOS CELULARES OBTIDOS APÓS INDUÇÃO DA EMT NA LINHAGEM PANC-1 CRESCIDA NO MEIO SILAC	55
TABELA 11.	CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS APLICADAS NO GEL PARA SDS-PAGE APÓS FRACIONAMENTO CELULAR	55
TABELA 12.	NÚMERO DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS NO PROTEOMA DAS CÉLULAS PANC-1 INDUZIDAS À EMT USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 1 (EXPERIMENTO 1)	57
TABELA 13.	COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS E QUANTIFICADAS POR COMPARTIMENTO CELULAR E REPLICATA DAS CÉLULAS PANC-1 INDUZIDAS À EMT USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 1 (EXPERIMENTO 1)	58
TABELA 14.	NÚMERO DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS NO PROTEOMA DAS CÉLULAS PANC-1 INDUZIDAS À EMT USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 2 10 NG/ML (EXPERIMENTO 2)	59
TABELA 15.	COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS E QUANTIFICADAS POR COMPARTIMENTO CELULAR E REPLICATA DAS CÉLULAS PANC-1 INDUZIDAS À EMT USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 2 10 NG/ML (EXPERIMENTO 2)	60
TABELA 16.	PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1, USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 1 10 NG/ML E SUAS RESPECTIVAS DISTRIBUIÇÕES NOS COMPARTIMENTOS CELULARES ANALISADOS	67
TABELA 17.	PROTEÍNAS ALTERADAS NO EXPERIMENTO 2, USANDO EGF 50 NG/ML E TGF- β 2 10 NG/ML E SUAS RESPECTIVAS DISTRIBUIÇÕES NOS COMPARTIMENTOS CELULARES ANALISADOS	68
TABELA 18.	FUNÇÃO MOLECULAR DETALHADA DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1	70
TABELA 19.	FUNÇÕES MOLECULARES ENRIQUECIDAS BASEADAS NAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1	71
TABELA 20.	PROCESSOS BIOLÓGICOS DETALHADOS DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1	72
TABELA 21.	PROCESSOS BIOLÓGICOS ENRIQUECIDOS BASEADOS NAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 1	74
TABELA 22.	FUNÇÃO MOLECULAR DETALHADA DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2	75
TABELA 23.	FUNÇÕES MOLECULARES ENRIQUECIDAS BASEADAS NAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2	76
TABELA 24.	DISTRIBUIÇÃO DETALHADA POR PROCESSOS BIOLÓGICOS DAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2	77
TABELA 25.	PROCESSOS BIOLÓGICOS ENRIQUECIDOS BASEADOS NAS PROTEÍNAS REGULADAS NO EXPERIMENTO 2	79
TABELA 26.	ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO POR FUNÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO FOSFOPROTEOMA	89

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2012, aproximadamente 14 milhões de novos casos foram diagnosticados, mais de 8 milhões de mortes foram causadas pelo câncer e aproximadamente 33 milhões de pessoas sobrevivem com a doença (WHO, GLOBOCAN 2012). Nos Estados Unidos, as mortes pela causa do câncer, independente da origem, sexo e idade, ocupam o segundo lugar após as doenças cardíacas, estimando-se para 2015 mais de um milhão e meio de novos casos diagnosticados e mais de meio milhão de mortes (Siegel; Miller e Jemal, 2015). No Brasil, para o biênio 2016-2017 estima-se que aproximadamente 600 mil novos casos serão detectados (INCA, 2016a).

1.1 O CÂNCER DE PÂNCREAS

O pâncreas é uma glândula do aparelho digestivo, localizada na parte superior do abdômen e atrás do estômago, dividido em três partes: a cabeça (lado direito); o corpo (seção central) e a cauda (lado esquerdo). Do ponto de vista funcional, está composta por dois tipos de populações celulares morfológicamente diferentes de origem endodérmica, dando origem ao pâncreas exócrino e endócrino. O pâncreas exócrino está composto pelas células acinares e ductais, sendo as primeiras encarregadas da produção e secreção de enzimas digestivas, enquanto as segundas estão encarregadas da secreção de mucinas e bicarbonato que ajudam ao balanço fisiológico hidrolítico. O pâncreas endócrino está formado por cinco tipos de células secretoras de hormônios, dentre as quais destacam-se as ilhotas de Langerhans, responsáveis da produção de insulina, o hormônio responsável pela regulação dos níveis de glicose no sangue (Pan e Wright, 2011).

Uma vez que anatomicamente o pâncreas está localizado na cavidade mais profunda do abdômen, atrás de outros órgãos, a detecção precoce de neoplasias que o atingem fica dificultada. Portanto, o câncer de pâncreas (PanCa) se desenvolve geralmente de maneira silenciosa e assintomática, sendo que mais de 90% dos pacientes são diagnosticados apenas

após o aparecimento de sintomas clínicos como dor abdominal e diabetes, característicos das etapas metastáticas, convertendo seu prognóstico a menos favorável e elevando sua taxa de mortalidade (Kamisawa et al., 2016).

Nos Estados Unidos, o PanCa ocupa a quarta posição de mortes atribuídas ao câncer, principalmente devido a sua taxa de mortalidade praticamente iguala sua taxa de incidência. Assim, para 2015 foram estimados 49.000 novos casos de PanCa e 40.000 mortes. Somado a este fato está a baixa taxa de sobrevivência após 5 anos de diagnóstico, que é de 7% (Siegel; Miller e Jemal, 2015). No mundo este panorama não muda muito, na Inglaterra, por exemplo, para 2013 se estimaram 9.408 casos, havendo acontecido em 2012 mais de 8.500 mortes devido à doença (Cancer Research UK, 2016). No Brasil, o número de mortes para 2013 superou 8.710, e segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) é responsável por 4% do total das mortes causadas por câncer (INCA, 2016b).

O PanCa é uma doença cuja base genética é bastante complexa e heterogênea, apesar de ser raro antes dos 30 anos de idade, o risco de desenvolvê-lo aumenta significativamente após os 50 anos de idade, principalmente na faixa entre 65 e 80 anos, havendo uma maior incidência no sexo masculino (Siegel; Miller e Jemal, 2015). Além da idade, existem outros fatores de riscos associados ao PanCa, como histórico familiar de PanCa, síndrome de neoplasia endócrina múltipla de tipo1 (MEN1), síndrome de Lynch, síndrome de von Hippel-Lindau, síndrome de Peutz-Jeghers, câncer hereditário de mama ou de ovário e síndrome melanoma mole múltiplo atípico familiar (FAMMM) (Kamisawa et al., 2016). Outros fatores de risco associados com a doença são o abuso dos derivados do tabaco, sendo que os fumantes possuem duas vezes mais chances de desenvolver a doença do que os não fumantes. O abuso de álcool, dietas ricas em gorduras, obesidade e histórico de pancreatite crônica ou de diabetes mellitus nos últimos 20 anos também são fatores de risco para o PanCa (Kamisawa et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Dada a complexidade da doença, a maioria dos casos é diagnosticada em fase avançada, restando poucas alternativas de tratamento que dependem do grau de espalhamento do tumor. Assim, quando o tumor for localizado e o médico considerar conveniente, a única opção de cura é a ressecção tumoral em associação com radioterapia e/ou quimioterapia, com a finalidade de aumentar o período de sobrevivência. Nestes casos

os fármacos mais usados são gemcitabina, administrada sozinha ou em combinação com agentes alquilantes, como oxaliplatino ou cisplatina, ou erlotinib (inibidor do EGFR). Entretanto, nos casos de metástase, o tratamento é apenas para fins paliativos e é recomendado o uso de Folforinox, que tem dado melhores resultados ao aumentar a taxa de sobrevivência em mais de dois meses (Tsvetkova e Asmis, 2014; Hidalgo et al., 2015).

Na atualidade, existem diferentes exames não invasivos para diagnóstico de PanCa, sendo que o mais indicado é a tomografia computadorizada do abdômen usando líquido de contraste para melhorar a visualização do tumor e estimar se a ressecção do tecido é uma opção terapêutica. Outros exames que podem ser solicitados são ultrassonografia abdominal; ressonância nuclear de vias biliares e da região do pâncreas; e também a biópsia do tecido (Kamisawa et al., 2016). No entanto, não existe um biomarcador serológico eficiente para a detecção precisa do câncer de pâncreas nem nos estádios precoces. O CA 19-9 (*Carbohydrate Antigen*) ou sialil-Lewis A, expresso na superfície celular como glicolípido ou proteína O-glicosilada, é o biomarcador de rotina usado para o diagnóstico do PanCa, com uma sensibilidade de 79-81% e uma especificidade de 82 ao 90%, mas que produz resultados falso-positivos em casos como pancreatite crônica e hiperbilirrubinemia, e falso-negativos em pacientes carentes do fator Lewis (5-10% da população). Assim, seu uso fica reservado para o prognóstico de sobrevivência em pacientes submetidos à ressecção do pâncreas (Ballehaninna e Chamberlain; 2012). Dadas limitações do CA 19-9, associações do mesmo e outros marcadores séricos vêm sendo testados, por exemplo, a associação com CEA tem mostrado a melhora da especificidade para 92% (Ni et al., 2005) e a associação com LAMC-2 e CA125 tem mostrado complementariedade ao CA 19.9 para a detecção precoce do PanCa (Chan et al., 2014). Painéis mais complexos de biomarcadores também melhoram a sensibilidade do método de detecção e a detecção precoce da doença (Faça et al., 2008a). Independentemente disso, a busca de novos biomarcadores mais confiáveis tem sido o foco de muitas pesquisas na área (Ballehaninna e Chamberlain, 2013), um exemplo é na identificação da proteína Glipican-1 para a detecção do estadiamento tumoral no câncer de pâncreas (Melo S. A. et al., 2015).

1.2 BASES MOLECULARES DA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PÂNCREAS

Do ponto de vista patológico, o câncer de pâncreas, especificamente o Adenocarcinoma Pancreático (PDAC, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) que afeta 90% dos casos de PanCa detectados, é um tipo de neoplasia invasiva produtora de mucina que gera uma intensa reação desmoplásica estromal (Siegel; Miller e Jemal, 2015). Esta reação origina-se a partir de três tipos precursores, as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanIN) principalmente, seguido por neoplasias císticas macroscópicas de tipo intrapapilar mucinosa (IPMN) e as mucinosas (MCN) (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013).

Do ponto de vista biológico, o câncer de maneira geral é visto como o grupo de células que adquirem capacidades ilimitadas de duplicação e de evasão da senescência pela aquisição de inúmeras alterações genéticas necessárias para garantir sua sobrevivência. Como consequência, se formam os tumores, convertendo assim progressivamente as células normais em células neoplásicas. Segundo o estudo clássico de Hanahan e Weinberg, estas mutações conferem às células transformadas algumas características comuns entre a maioria dos tipos de câncer, que são a autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada, invasão a outros tecidos e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011).

Neste contexto, supõe-se que o processo de progressão tumoral do PanCa inicia quando células procedentes de lesões precursoras locais, em grande maioria as PanINs, tornam-se cancerosas, ao adquirir gradualmente alterações genéticas e epigenéticas seletivas e clonais, que as dotam de uma alta heterogeneidade tumoral e plasticidade celular, conseguindo assim não só sobreviver no seu microambiente mas também modificá-lo para suprir com suas necessidades metabólicas (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013; Falasca; Kim e Kassari, 2016; Ying et al., 2016). Dentro das alterações genéticas adquiridas ao longo deste processo, destacam-se como mais frequentes no PDAC as relacionadas com a ativação por mutações do gene *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) e a inativação dos genes supressores tumorais: *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *TP53* (tumor protein p53 / tumor supressor P53), *SMAD4* (SMAD Family member 4) e *BRCA2*

(Breast Cancer 2 susceptibility protein). Além disso, perdas cromossômicas, amplificações gênicas e encurtamento de telômeros são comumente observados (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013; Falasca; Kim e Kassari, 2016). Cabe ressaltar que as alterações de *KRAS* é a alteração genética precoce mais observada nas lesões do tipo PanINs (neoplasia pancreática intraepitelial), enquanto as inativações de *TP53*, *SMAD4* e *BRCA2* ocorrem apenas em estágios mais avançados e invasivos (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013; Hidalgo et al., 2015; Ying et al., 2016).

Como consequência, os estados avançados de PanCa apresentam muitas alterações genéticas, as quais podem alterar principalmente 12 vias ou processos de sinalização (Figura 1), como por exemplo a via de sinalização do TGF- β , do *KRAS* e de apoptose em 100% dos casos estudados (Jones et al., 2008). Entretanto, além das alterações genéticas principais no PDAC, existem outras alterações, em menor proporção, que subclassificam o PDAC em três categorias: clássico, quase mesenquimal e exócrino (Collison et al., 2011). Existem ainda quatro subtipos: estável, com rearranjo local, disperso, instável (Waddell et al., 2015). Cada um destes tipos e os subtipos de PDAC apresentam respostas diferentes às estratégias quimioterápicas empregadas na atualidade. Recentemente, Bailey e col. (2016) tem proposto uma outra classificação do PanCa baseada em 4 subtipos moleculares (de tipo escamoso, progenitor pancreático, imunogênico e ADEX, de diferenciação aberrante em exócrino e endócrino) correlacionados respectivamente com suas características histopatológicas. Assim, esta alta heterogeneidade tumoral poderia explicar a falha do tratamento do PanCa, dado que este é usualmente detectado nos estados de progressão tumoral mais avançados, onde as células transformadas espalham-se em órgãos distantes e vitais, comprometendo suas funções através do crescimento de uma nova massa tumoral, o que leva a morte do paciente. Portanto, assume-se que os métodos mais efetivos, para melhorar os índices de morbidade e mortalidade do PanCa, são a prevenção ou a suspensão da metástase, bem como eliminação de células metastáticas do tumor primário ou a detecção precoce (Hidalgo et al., 2015).

FIGURA 1. Principais vias e processos de sinalização geneticamente alterados no câncer de pâncreas.

Reproduzido de Jonas et al., 2008.

1.3 A METÁSTASE E A TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL (EMT)

Como resultado da progressão tumoral, as células neoplásicas são dotadas de alterações genéticas e fenotípicas que permitem que elas se desloquem do seu lugar de origem e colonizem sítios distantes da sua origem. Isto acontece através de uma sucessão de eventos biológicos que constituem a denominada cascata de invasão-metástase pela qual milhões de células cancerosas deixam a massa tumoral primária, convertendo-se em células tumorais circulantes (CTC) que conseguem alcançar a corrente sanguínea e sobreviver aos rigores do transporte através do mesmo para localizar o sítio secundário e instalar-se nele, sobreviver ao novo microambiente e adaptar o mesmo para reiniciar seus programas de proliferação, produzindo assim a formação do tumor secundário (Valastyan e Weinberg, 2011). Dado que estes eventos são desafiadores para as CTCs, a metástase é considerada um processo bastante ineficiente, depende das alterações genéticas e epigenéticas adquiridas durante a progressão tumoral e que variam dramaticamente entre os tipos de tumores e

também entre os pacientes (Vanhranta e Massagué, 2013). No caso do PanCa, a progressão tumoral se inicia uma década antes da aparição dos clones parenterais fundadores do tumor, que precisam de ao menos 5 anos mais para iniciarem o processo tumorigênico (Yachida et al. 2010).

O processo que leva as células epiteliais se desligarem e abandonarem a camada epitelial não é um processo espontâneo nem nas células normais nem nas cancerosas. Tanto as células epiteliais normais como as células cancerosas de origem epitelial estão em contato próximo com células vizinhas, através de junções firmes (“tight junctions”), junções aderentes (“adherens junctions”), desmossomos e junções comunicantes (“gap junctions”), as quais em conjunto com as moléculas de adesão, como caderinas e integrinas que se conectam ao citoesqueleto, asseguram a integridade estrutural, formando uma camada de células *in vivo* (Lamouille; Xu; Derynck, 2014). Entretanto, nas células cancerosas, as alterações genéticas adquiridas, destacadas anteriormente, com ajuda do seu próprio microambiente, alteram os mecanismos que controlam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, permitindo que as células de origem epitelial do tumor deixem o sítio primário e adquiram as características migratórias. Um mecanismo, que pretende explicar como as células epiteliais cancerosas adquirem as características necessárias para que a metástase ocorra, é chamado de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Ye e Weinberg, 2015).

A EMT é um processo biológico importante durante a embriogênese, a regeneração tecidual e o câncer. Durante a embriogênese, EMT de tipo 1, o programa EMT permite que células epiteliais e que eram previamente componentes integrais das camadas epiteliais do tecido quebrem suas associações com suas vizinhas, adquiram características motoras e migrem para outras localidades, tanto próximas quanto distantes no embrião em desenvolvimento. Na regeneração tecidual, a EMT (de tipo 2) está encarregada da reconstrução de tecidos após dano e está associada com a formação de fibroblastos e inflamação. As células neoplásicas utilizam o programa da EMT (de tipo 3) para adquirir fenótipos associados com estágios avançados do câncer, contribuindo na cascata de invasão-metástase para o deslocamento das mesmas pela aquisição do fenótipo mesenquimal para a busca de sítios secundários de formação tumoral (Kalluri e Weinberg, 2009).

Como em quase todas as decisões associadas à morfogênese, o processo de EMT é desencadeado por sinais que as células epiteliais recebem do microambiente ao seu redor. Quando tais sinais são disparados, as células de um carcinoma têm a capacidade de, em apenas um passo, ativar o programa dormente da EMT para adquirir os fenótipos necessários para a invasão do tumor primário, intravasão, translocação a sítios distantes através da corrente sanguínea e sistema linfático, extravasão e iniciação de micrometástase. Para a colonização em um novo sítio, é necessário que a nova colônia se adapte ao microambiente do novo tecido e para isso também é necessária uma reprogramação das características epiteliais destas células invasoras, em um processo reverso à EMT, chamado de transição mesenquimal-epitelial (MET) (Thiery e Sleeman, 2006, Stankic et al., 2013) (Figura 2). Entretanto, como os processos de EMT-MET estão relacionados muito intimamente, tem se observado em trabalhos recentes que a repressão da EMT desencadeia o processo de colonização metastática, tornando assim a EMT um alvo terapêutico ambíguo (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012).

Diferentes tipos de estímulos dentro do microambiente das células cancerosas podem ativar o processo da EMT, dentre os quais destacam-se fatores de crescimento, citocinas, hipóxia entre outros. Esses estímulos disparam vias de sinalização como as mediadas pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), o fator de crescimento epidermal (EGF), a proteína morfogênica óssea (BMP), a via Wnt- β -catenina, Notch, Hedgehog, e também vias com a finalidade de ativar a expressão de fatores de transcrição relacionados com a EMT como *SNAIL*, *SLUG*, entre outros, para finalmente ativar a expressão de genes relacionados com a EMT (Gonzalez e Medici, 2015). De fato, TGF- β e EGF têm papel crítico na regulação da metástase, apesar de desconhecidos os efeitos cooperativos destes dois fatores de crescimento (Wendt; Smith e Schiemann, 2010; Liu et al., 2015).

Além disso, estudos recentes têm mostrado uma relação entre a EMT e aquisição de propriedades de tipo células-tronco, o que indicaria que a ativação da EMT poderia servir como uma fonte de geração de células-tronco cancerosas (CSC) (Ye e Weinberg, 2015). Assim, em um modelo celular de PanCa, foi observado que *SNAIL*, fator de transcrição relacionado com a EMT, não somente promovia as características da EMT mas também características de tipo CSC (Zhou et al. 2013). Outra propriedade atribuída à EMT com respeito ao PanCa tem sido a aquisição de resistência à quimioterapia (Zheng et al., 2015).

1.4 O PAPEL DO TGF- β E EGF NO CÂNCER DE PÂNCREAS E NA EMT

Além das mutações genéticas citadas acima, a aquisição em autossuficiência das células neoplásicas em fatores de crescimento permite que o tumor evolua para estágios mais avançados e finalmente alcance estágios metastáticos (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011). Dentre estes fatores de crescimento promotores da progressão tumoral podem se destacar o TGF- β (Massagué, 2008; Achyut e Yang, 2011) e o EGF (Huang, et al., 2012).

TGF- β é considerado um fator importante na progressão tumoral, não somente por ser um fator pró-angiogênico e imunossupressor, mas também pelo seu papel como indutor da EMT (Katsuno; Lamouille e Denryck, 2013), cuja importância foi descrita anteriormente. Contudo, o TGF- β possui uma dualidade de funções no contexto do câncer. Assim, em células pré-malignas, o TGF- β atua como fator inibidor da proliferação de células epiteliais e consequentemente supressor tumoral. Isto se dá através do recrutamento e fosforilação de seu receptor, desencadeando uma cascata de sinalização que termina com a ativação de diversos fatores de transcrição chaves na supressão tumoral, como os da família *SMAD*. Em contrapartida, em estágios mais avançados do câncer, a união de TGF- β com seu receptor ativa outras vias de sinalização independentes de *SMAD* como a da PI3K quinase (fosfoinositol-3-fosfato), envolvidas na motilidade e migração das células tumorais (Bachman e Park, 2005; Yang e Moses, 2008) (figura 2). No caso do PDAC, essa dualidade tem sido recentemente relacionada à inativação de *SMAD4*, que bloqueia o disparo de mecanismos de apoptose, aos quais a EMT induzida por TGF- β poderia levar (David et al., 2016).

Evidências clínicas recentes vêm demonstrando a ligação entre o TGF- β e a progressão tumoral e, portanto, estimulam a pesquisa desse mecanismo como alvo terapêutico. Terapias anti-TGF- β estão atualmente sendo testadas em estudos pré-clínicos. Entretanto, atacar diretamente a via TGF- β apresenta risco substancial, já que ela está envolvida em múltiplos processos homeostáticos e também em processos de supressão tumoral, e o desenvolvimento de inibidores de TGF- β para uso clínico ainda requer um amplo e profundo entendimento desta via de sinalização (Yang e Moses, 2008).

FIGURA 2. Vias de sinalização mediada pelo TGF-β e sua implicância na EMT.

(a) Ilustração das mudanças fenotípicas induzidas pela EMT (b) via de sinalização da EMT induzida por TGF-β durante a progressão tumoral. Reproduzido de Katsuno et al. 2013.

Além do TGF-β, outro fator de crescimento que induz a capacidade invasiva das células tumorais é o EGF, através do seu receptor EGFR. O par ligante/receptor EGF/EGFR está diretamente relacionado à progressão de diversos tipos de adenocarcinomas e em especial no PanCa (Navas et al., 2012), ora por mutações que ativam constitutivamente EGFR e desencadeiam o crescimento descontrolado da massa tumoral, ora por excesso do próprio EGF, recentemente este balanço tem sido relacionado com a expressão de microRNA 10b (Ouyang et al 2014). Logo abaixo do EGFR nesta via de sinalização encontra-se *KRAS*, que além de frequentemente mutado em PanCa também confere características migratórias e invasivas quando ativado, e cujo efeito tumorigênico tem sido relacionado com seu efeito ativador do EGFR (Ardito et al., 2012). Finalmente, EGF também vem sendo relacionado com a ativação do processo de EMT (Colabufo et al., 2011; Huang et al., 2012).

1.5 O ESTUDO PROTEÔMICO DA EMT NO CÂNCER

Como já apresentado anteriormente, a EMT está envolvida em alguns mecanismos e moléculas-chaves relacionados à metástase do câncer. Portanto, o entendimento mais amplo dos mecanismos cooperativos que regulam a EMT traz, sem dúvida, novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias focadas no tratamento eficaz do câncer metastático de origem epitelial ou um melhor diagnóstico precoce do mesmo, com o objetivo de diminuir a taxa de mortalidade. Esta abordagem é especialmente importante para PanCa onde a falta de ferramentas eficazes de detecção e de terapia leva à alta taxa de mortalidade, conforme já discutido. Neste sentido, métodos de análise global de alterações moleculares são atrativos para caracterizar os eventos cooperativos que ocorrem durante a EMT, uma vez que permitem a identificação das múltiplas vias ativadas ou desativadas simultaneamente.

A análise proteômica baseada em espectrometria de massas evoluiu de simples ferramenta de identificação e caracterização de proteínas isoladas ou de mapeamento de picos de massas em amostras clínicas, para se estabelecer como uma plataforma voltada para a análise de proteomas complexos, através da comparação de milhões de espectros de massas com bancos de dados, e assim fornecer a identificação de milhares de proteínas presentes em uma amostra (Cox e Mann, 2011). Esta abordagem já teve impacto significativo nas ciências da vida na última década, com especial atenção na pesquisa de biomarcadores para o câncer, incluindo o PanCa, e que vem continuamente se beneficiando dos últimos avanços tecnológicos (Faça et al., 2008a; Hanash; Pitteri e Faça et al., 2008; Hanash e Taguchi, 2010).

A caracterização do perfil proteômico alterado durante a EMT já foi foco de alguns estudos. Foram comparadas linhagens celulares de câncer de próstata com alto e baixo potencial metastático, sendo demonstrado o papel da proteína de citoesqueleto vimentina (Wei et al., 2008), ou da proteína EPLIN (Zhang et al., 2011) na promoção da característica de invasão das células. A análise proteômica de uma linhagem de câncer de pulmão, induzida ao processo de EMT por TGF- β , mostrou a elevação dos níveis de proteínas envolvidas na migração celular, como filaminas, ezrina, tropomiosina e também proteínas relacionadas à adesão celular, como integrinas e cofilina (Keshamouni et al., 2006; Keshamouni et al., 2009). Também foi estudado o processo de intercomunicação molecular entre as células do estroma

e as células epiteliais de câncer de cólon, indicando a ativação de vias de sinalização nas células estromais relevantes para o acionamento da EMT nas células do câncer (Sheehan et al., 2008). Também foi observado o papel do micro-RNA miR-200 na indução da EMT em células metastáticas de câncer de pulmão em modelo murino e a alteração na expressão de proteínas e peptidases relacionadas à matriz extracelular (Schliekelman et al., 2011).

Além disso, uma das grandes vantagens de estudar diretamente as proteínas é que a detecção e quantificação podem ser feitas considerando-se todas as modificações pós-traducionais relacionadas ao processo em estudo. Desta forma, em um estudo proteômico detalhado de células metastáticas de câncer de ovário, demonstrou-se a existência de um dinâmico processo de secreção de proteases e inibidores e também de clivagem de domínios extracelulares de moléculas de adesão, como caderinas e integrinas (Faça et al., 2008b; Faça et al., 2009). Portanto, o estudo das proteínas, suas modificações pós-traducionais (i.e. fosforilações) e as vias de sinalização envolvidas na EMT induzida em células de câncer de pâncreas, utilizando métodos avançados de análise global de alterações do proteoma, têm potencial de levar a um melhor entendimento de como a EMT opera no PanCa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações proteômicas, durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT), em linhagens celulares de câncer de pâncreas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Implementar o modelo de transição epitélio-mesenquimal em cultura para linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas de câncer de pâncreas; induzir a transição epitélio-mesenquimal por TGF- β e EGF nestas linhagens; adequar as linhagens celulares a meios de cultura contendo isótopos estáveis de aminoácidos, a fim de desenvolver experimentos de quantificação relativa das alterações proteômicas durante a EMT.
- ii. Obter extratos subcelulares das linhagens celulares submetidas à EMT, contendo separadamente proteínas de superfície, proteínas nucleares e proteínas citoplasmáticas e fracionar as proteínas intactas por métodos de eletroforese.
- iii. Isolar e analisar o fosfoproteoma durante estágios iniciais da transição epitélio-mesenquimal.
- iv. Coletar os dados proteômicos detalhados por espectrometria de massas de alta resolução acoplados à cromatografia líquida (LC-MS/MS) e analisar esses dados.
- v. Propor uma lista de proteínas prioritárias para avaliação detalhada, comparando os dados gerados com os dados previamente publicados, disponíveis em bancos de dados públicos e selecionados por análise bioinformática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PÂNCREAS

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens de câncer de pâncreas PANC-1 (BCRJ-021, lote 000833) e CAPAN-2 (ATCC-0058, lote 000430), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As duas linhagens foram isoladas originalmente de pacientes de sexo masculino afetados por câncer na cabeça do pâncreas e metástase na parede duodenal com tempos de sobrevivência diferente e diferentes alterações genéticas nos genes *KRAS*, *TP53* e *P16* (Deer et al., 2010). Estas linhagens foram expandidas em DMEM *high glucose* (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penstrep® (Gibco®), incubadas a 37°C e 5% CO₂, sendo os tempos de duplicação de 52 h para a linhagem PANC-1 e de 96 h para a linhagem CAPAN-2. As duas linhagens celulares foram criopreservadas em SFB suplementado com DMSO 5%, a -196°C em nitrogênio líquido.

3.2 TESTE DE ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES DE TGF- β E EGF

A ativação dos receptores TGF- β e EGF foi avaliada nas linhagens celulares PANC-1 e CAPAN-2, cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% Penstrep®, até alcançarem 70% de confluência, para depois serem incubadas por 16 horas em meio DMEM sem SFB. Após o período sem SFB, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por um período de 5, 15 e 30 minutos em meio DMEM, contendo 1% penicilina/streptomicina (Penstrep®) e os fatores de crescimento: TGF- β 1 10 ng/ml (R&D, Cat# 204-B-010), TGF- β 2 10 ng/ml (R&D, Cat# 302-B2-010) ou EGF (R&D, Cat# 236-E6-200) nas concentrações de 10, 30 e 50 ng/ml, respectivamente. Terminados os respectivos períodos de incubação para cada citocina, foram obtidos os extratos proteicos, e a ativação dos receptores de TGF- β e EGF foi avaliada por SDS-PAGE seguida de *western-blotting* utilizando anticorpos específicos contra proteínas fosforiladas específicas listadas na Tabela 1.

TABELA 1. Anticorpos usados para avaliar a resposta celular após adição de TGF- β e EGF e EMT

ANTICORPO (*)	MASSA (KDA)	CAT#	ISOTIPO
E-Caderina (24E10)	135	3195	IgG de coelho
EGF Receptor (C74B9)	175	2646	IgG de coelho
GAPDH (14C10)	37	2118	IgG de coelho
N-Caderina	140	4061	IgG de coelho
Phospho-Smad2(Ser465/467)/Smad3(Ser423/425) (D27F4)	52,60	8828	IgG de coelho
Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5)	175	3777	IgG de coelho
Smad2/3 (D7G7)	52,60	8685	IgG de coelho
Snail (C15D3)	29	3879	IgG de coelho
Vimentina (D21H3)XP®	57	5741	IgG de coelho
β -Actina (13E5)	45	4970	IgG de coelho
β -Catenina (D10A8) XP®	92	8480	IgG de coelho

(*) Todos os anticorpos foram adquiridos da Cell Signaling

3.3 INDUÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL (EMT)

Para a indução da EMT, as células PANC-1 e CAPAN-2 crescidas até 70% de confluência em meio DMEM suplementado com 10% FBS e 1% Penstrep® foram submetidas a jejum de soro por 16 horas. Ao fim do período, as células lavadas três vezes com PBS estéril foram incubadas em meio DMEM sem SFB suplementado com os fatores de crescimento como indicado na Tabela 2. As variações morfológicas e moleculares foram avaliadas a cada 24 horas por um período de até 72 h. No caso das variações morfológicas, foram obtidas fotos a cada 24 h usando um microscópio de contraste de fases PrimoVert Zeiss® em lente de ampliação de 20x. Para estudar variações ao nível de proteínas, foram obtidos extratos proteicos por cada condição descrita na Tabela 2 e em tempo (24, 48 e 72 h), seguido da análise por *western-blotting* utilizando anticorpos contra as proteínas características da EMT (Tabela 1). As citocinas empregadas nesta etapa foram TGF- β 1 10 ng/ml (R&D, Cat# 204-B1-010, SIGMA CAT#8541), TGF- β 2 10 ng/ml (R&D, Cat# 302-B2-010, SIGMA CAT# 2815) e/ou EGF (R&D, Cat# 236-E6-200, SIGMA CAT#E9644).

TABELA 2. Tratamentos usados para a indução da EMT nas células PANC-1

FATOR DE CRESCIMENTO	CONCENTRAÇÃO
TGF- β 1	10 ng/ml
TGF- β 2	10 ng/ml
TGF- β Controle	HCl 0,1M estéril
EGF	50 ng/ml
EGF + TGF- β 1	50 ng/ml + 10 ng/ml
EGF + TGF- β 2	50 ng/ml + 10 ng/ml
EGF Controle	PBS estéril + HCl 0,1M estéril

3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular empregado foi o de fechamento de ranhuras (*“scratch wound-healing assay”*) baseado no protocolo de Liang, Park e Guan, 2007. Para isto, a linhagem celular PANC-1 foi cultivada em placas de ensaio de 12 poços (1.75×10^5 células/poço). Após a adesão e crescimento das células em monocamada confluyente por um período de 24 horas, estas foram submetidas a jejum de soro durante 16 horas. Em seguida, com ajuda de uma ponteira plástica estéril, foram feitos riscos de aproximadamente 1 mm de espessura ao longo do eixo vertical e horizontal em cada poço, utilizando-se uma ponteira de 200 μ l. Então, as monocamadas foram lavadas cuidadosamente com PBS a 37°C por duas vezes, antes de submetê-las às condições de tratamento descritas na Tabela 2. A migração celular foi observada em um microscópio de contraste de fases PrimoVert Zeiss® em lente de ampliação de 4X, as imagens foram capturadas cada 24 horas, em um período total de 48 horas, usando uma câmera AxioCam ERc5S Zeiss®. A migração celular foi calculada em porcentagem de fechamento dos riscos usando a diferença da área entre os tempos de 24 e 48 horas. As medições foram feitas em triplicatas. As análises quantitativas foram feitas utilizando-se o programa ImageJ. Para a análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni no programa GraphPad PRISMA.

3.5 ENSAIO DE INVASÃO

O ensaio de invasão foi realizado em sistema “*transwell*”, utilizando-se Matrigel® seguindo o método descrito por Merzark et al. (1994) com modificações. Para isto, foram preparados insertos contendo uma camada de Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD®, Cat. N° 354234), conforme as instruções do fabricante. Depois, foram adicionadas 500.000 células tratadas com TGF- β e/ou EGF (como descrito na Tabela 1) em cada inserto e sob cada inserto foi colocado meio DMEM suplementado com 10% SFB. Após 24 e 48 horas de tratamento, os insertos foram limpos com PBS, fixados em metanol por 15 minutos e secos. Logo os insertos foram corados com Giemsa a 1%, lavados em água para retirar o excesso de corante e secados em temperatura ambiente (TA). Para fins quantitativos, o corante absorvido foi dissolvido adicionando-se metanol absoluto, a leitura da absorbância foi realizada a 655 nm em leitor de placas iMark Microplate Absorbance Reader (Biorad®). Todas as condições testadas foram analisadas em triplicata. Para a análise estatística, usou-se o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni no programa GraphPad PRISMA.

3.6 OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES PROTEICOS

Para obtenção dos extratos celulares proteicos, as células tratadas com os fatores de crescimento foram lavadas três vezes com tampão PBS (1X) gelado, e logo em seguida foi adicionado o tampão de Ureia 8M/Tris 0.2 M contendo inibidor de proteases (SIGMA, Cat #P1860) e ortovanadato de sódio 1 mM. As células foram coletadas após raspagem e os pellets celulares resultantes foram submetidos a três ciclos de sonicação de 5 minutos e esfriamento de 5 minutos em banho de gelo, seguido de centrifugação por 30 minutos a 20.000 x g para coletar finalmente os sobrenadantes que foram armazenados a -20°C para análises posteriores.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas dos extratos celulares proteicos foi determinada usando o método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1, cat# 500-0201, BIORAD®), em ensaio de microplaca, seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata.

3.8 SDS-PAGE E WESTERN-BLOTTING DE PROTEÍNAS

O SDS-PAGE foi realizado usando uma concentração de 30 ou 50 µg de proteína dos extratos celulares proteicos obtidos anteriormente. Em resumo, as amostras foram desnaturadas usando β-mercaptoetanol, diluído em tampão de amostra Laemmli (BIORAD® Cat# #1610737) e fervidas por 5 minutos. Antes da corrida eletroforética, as amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm por 5 minutos. Para a corrida eletroforética, foram usados géis de poliacrilamida em gradiente de 8-16% (Amersham™ ECL™ GE). As condições de corrida foram de 160 v por 90 minutos em tampão de corrida gelado (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3) no sistema de corrida Amersham ECL Gel Box®.

Para o *western-blotting*, as proteínas separadas nos géis foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham Hybond P 0.2, Cat# 10600021) em sistema de transferência por submersão (BioRad® TransBlot SD Cell), usando tampão de transferência gelado (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%) e aplicando 300mA por 2,5 h. Terminado o processo de transferência, as membranas foram bloqueadas por uma hora com uma solução de TBS-T (Tris 0.005M, NaCl 0.138M, KCl 0.0027M, pH 7.4, Tween 20, 0.1%) contendo 5% de leite desnatado, foram lavadas quatro vezes com tampão TBS-T e em seguida foi adicionado o anticorpo primário (ver Tabela 1) diluído 1:1000, a exceção dos anticorpos anti-β-actina e anti-GAPDH que foram diluídos 1:2000, segundo instruções do fabricante. As membranas foram incubadas *overnight* em câmara fria sob agitação. Após incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes com tampão TBS-T, incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, *Cell Signaling*) diluído 1:2000 em TBS-T contendo 5% de leite

desnatado, durante 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas usando kit de quimiluminescência (Amersham ECL Prime GE®, Cat# RPN2232) seguindo as instruções do fabricante, e documentadas usando fotodocumentador (ChemiDoc™ MP System, Biorad®). As bandas reveladas foram quantificadas por densitometria, usando o software Image J. Após quantificação, o valor obtido pela densitometria foi dividido pelo valor obtido nas proteínas constitutivas avaliadas (β -actina ou GAPDH). Os anticorpos empregados estão listados na Tabela 2.

3.9 MARCAÇÃO ISOTÓPICA ESTÁVEL DA LINHAGEN CELULAR PANC-1 SUBMETIDA À EMT COM AMINOÁCIDOS EM CULTURA CELULAR (SILAC)

A marcação isotópica foi realizada em células PANC-1 cultivadas no meio de cultura SILAC™ DMEM-Flex (Invitrogen®), reconstituído e seguindo as instruções do fabricante, e usando os isótopos de lisina leve $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_7\text{-Lys}$ e pesado $^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_7\text{-Lys}$, suplementado com 10% SFB dialisado (GIBCO®) e 1% de Pentstrep®. As células foram cultivadas em meio leve ou pesado e expandidas por cinco gerações seguintes. Os extratos celulares proteicos obtidos em cada passagem foram digeridos com tripsina e analisados através do monitoramento de reações múltiplas (MRM) para verificar o grau de incorporação dos aminoácidos marcados.

Para o experimento final, as células foram expandidas no meio de cultura contendo isótopos estáveis de lisina, utilizando-se placas de 150 cm² de superfície para a cultura das células, as quais foram submetidas a jejum de soro por 16 h e tratadas em duplicata com TGF- β 1 e EGF (50 ng/mL) durante 72 h para o experimento 1 e com TGF- β 2 (10 ng/ml) e EGF (50 ng/mL) durante 48 h para o experimento 2, o esquema geral do tratamento descreve-se graficamente na parte superior da Figura 3.

3.10 ANÁLISE PROTEÔMICA DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

3.10.1 Fracionamento celular

Com a finalidade de aumentar a cobertura e detalhamento da análise proteômica, preparou-se o fracionamento subcelular conforme descrito por Adam et al. (2008). Para isto, o extrato celular proteico foi coletado usando tampão hipotônico M (HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM e Na₄P₂O₇·10H₂O 1mM) e inibidor de protease (Sigma-P1860), homogeneizado, passando-se primeiramente em seringa e posteriormente no homogeneizador, (Modelo D-130, Biosystems®) por 2 minutos. A concentração de proteínas de cada extrato foi determinada pelo método de Bradford descrito em seções anteriores. A seguir, foram feitas as misturas dos extratos leves e pesados (induzidos à EMT e respectivos controles), denominadas replicatas 1 e 2, usando a mesma concentração de proteínas. Posteriormente, as replicatas foram submetidas a fracionamento (Figura 3), para obter frações enriquecidas em proteínas de membrana, citoplasma e núcleo, conforme a Tabela 3. Os tampões empregados foram *Buffer A* (ácido 2-(N-morpholino)-etano sulfônico 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6.5), *Buffer B* (50% *Buffer A*, Triton X-100 2% (v/v), inibidores de fosfatase e proteases), *Buffer C* (ureia 8M, CHAPS 2% e inibidor de proteases); no caso da extração da fração nuclear foram feitos três ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique®) a 45W por 5 minutos cada, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento da amostra sem aquecimento, seguido de centrifugação a 20.000g por 30 minutos a 4°C. Todas as amostras foram estocadas a -80°C.

3.10.2 Fracionamento de proteínas por SDS-PAGE

As frações subcelulares provenientes das replicatas do procedimento anterior foram analisadas usando a estratégia proteômica denominada gel-LC-MS. Para isto as replicatas (Tabela 3) foram diluídas 1:1 em tampão de corrida Laemmli (BIORAD® Cat #1610737) e as proteínas foram reduzidas usando ditioneitol (DTT, Biorad® Cat#1610611) em razão 1:1 com

relação à concentração inicial de proteínas, fervendo as mesmas por 5 minutos. Após a redução da cisteína, as replicatas foram alquiladas adicionando Iodoacetamida (IAA, SIGMA Cat#I1149) em razão 1:3 com relação à concentração de DTT e incubando as amostras no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o processo, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% pré-fabricado (10% Mini-PROTEAN® TGX™, BIORAD®, Cat#4561033). As condições de corrida foram 100 V (12 mA) durante 1 hora em tampão Tris-Glicina-SDS. O gel obtido foi fixado por 1 hora, corado com solução de Comassie durante 2 horas para depois ser descorado com uma solução de metanol 20% por 12 h. O gel foi documentado, e cada raia (representado uma amostra ou replicata) foi cortada em pedaços de 1 cm. Cada fragmento foi armazenado em tubos eppendorff, até o processamento.

TABELA 3. Subfrações celulares obtidas após mistura de suas contrapartes leve e pesada

SUBFRAÇÃO CELULAR	REPLICATAS	NOME
Nuclear	Controle Leve + Tratamento Pesado	N_CtLTxtH
	Controle Pesado + Tratamento Leve	N_CtHTxtL
Citoplásmica	Controle Leve + Tratamento Pesado	C_CtLTxtH
	Controle Pesado + Tratamento Leve	C_CtHTxtL
Membrana	Controle Leve + Tratamento Pesado	M_CtLTxtH
	Controle Pesado + Tratamento Leve	M_CtHTxtL

FIGURA 3. Esquema de fracionamento subcelular dos extratos celulares proteicos provenientes de células com marcação isotópica no aminoácido lisina e submetidas à EMT. (*) Meio SILAC™ DMEM-Flex, contendo o aminoácido lisina ou seu isótopo pesado. Linhagem celular empregada, PANC-1. Controle = PBS + HCl, Tratado = EGF 50 ng/ml e TGF-β1 por 72 h (experimento 1) ou EGF 50ng/ml e TGF-β2 10 ng/mL por 48 h (Experimento 2). As setas indicam as etapas seguidas. A seta tracejada indica que a replicata 2 seguiu as mesmas etapas independentemente.

3.10.3 Digestão *IN SITU*

Antes de digerir as amostras, os fragmentos obtidos do gel SDS-PAGE foram lavados três vezes em solução 50 mM NH_4HCO_3 ($\text{pH} > 8$)/50% acetonitrila (ACN) e incubados a temperatura ambiente em agitação constante por 14 h para depois ser lavados adicionalmente duas vezes, finalmente os fragmentos foram desidratados pela adição de ACN pura por 10 minutos e secos em concentrador a vácuo (SAVANT™ Speedvac™) por 30 minutos. A digestão das proteínas contidas nos fragmentos de gel foi feita hidratando-se as bandas em 20 μl de solução de tripsina (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 37°C por 30 minutos em agitação constante seguido da adição de 100 a 150 μl de solução 100 mM NH_4HCO_3 ($\text{pH} > 8$) para cobrir o fragmento de gel. A digestão foi realizada a 37°C em agitação constante por 14 h. Os peptídeos digeridos localizados dentro dos fragmentos do gel foram extraídos pela adição sequencial de diferentes concentrações de ACN, da seguinte maneira: o sobrenadante inicial de cada tubo foi retirado e reservado, depois em cada tubo foram adicionados 100 μl de solução 50% acetonitrila (ACN)/0,1% ácido fórmico (FA) e incubados por 1h 30 minutos (min) em agitação constante a temperatura ambiente (TA), o sobrenadante resultante foi reservado junto com o sobrenadante inicial e imediatamente depois foram adicionados 100 μl de solução 70% ACN/0,1% FA, e as amostras foram incubadas novamente por 1h 30 min em agitação constante a TA, e os sobrenadantes resultantes foram reservados com os sobrenadantes anteriores. Finalmente, as amostras foram tratadas com 100 μl de ACN pura e incubadas por 1h e 30 min em agitação constante a TA, o sobrenadante resultante foi reservado com os das etapas anteriores. Os sobrenadantes pertencentes a cada fração de gel contendo os peptídeos digeridos foram secos em concentrador a vácuo (SAVANT™ Speedvac™) até ficar aproximadamente 10 μl de líquido na parte inferior do tubo.

3.10.4 Purificação de peptídeos por extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE)

A purificação dos peptídeos obtidos de cada amostra foi feita usando ponteiras de 10 μl dotadas com resina C_{18} (ZIPTIP SUPELCO™, ThermoFischer®). Inicialmente, as ponteiras foram

condicionadas passando por elas três vezes 10 µl de solução ACN pura/0.1% FA e equilibradas pela adição de três vezes de 10 µl de solução 5%ACN/0.1% FA. Os peptídeos pertencentes a cada amostra foram carregados passando os mesmos três vezes pela resina C₁₈. Em seguida, foi realizada uma etapa de lavagem adicionando-se três vezes 10 µl de solução 5%ACN/0.1% FA; a eluição dos peptídeos foi feita passando pela ponteira três vezes 10 µl de solução 50% ACN/0.1% FA. Finalmente, as amostras foram secas em concentrador a vácuo (SAVANT™ Speedvac™) e ressuspendidas em 10 µl de ACN 5%/0.1% FA para injeção no sistema de LC-MS/MS.

3.10.5 Aquisição de dados por LC-MS/MS

As amostras de peptídeos purificadas provenientes do fracionamento celular, seguido do fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, foram injetadas individualmente em um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Finnigan) disponível na Central Analítica do Instituto de Química de São Carlos – USP, sob coordenação do professor Emanuel Carrilho. Foram injetados 10 µL de cada amostra no sistema de cromatografia líquida (representando 50% de cada fração) em uma coluna de 15 centímetros (75 µm ID), empacotada com resina C₁₈. Cada corrida cromatográfica desenvolveu-se em um gradiente linear de 5 a 35% de ACN/FA 0,1% por 90 minutos a um fluxo de 250 nL/min. Os espectros foram adquiridos em modo dependente de dados na faixa de m/z de 400 a 1800 onde os 10 íons mais abundantes de carga +2 ou +3 de cada espectro MS foram selecionados para fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão) e análise MS/MS. Utilizou-se uma janela de exclusão de 45 segundos para eliminar a redundância de sequenciamento dos peptídeos abundantes. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: tensão de capilaridade de 2,5KV, temperatura de capilar 200C, resolução de 100.000 e valor *FT-target* de 2.000.000.

3.10.6 Análise de dados

O processamento dos dados foi feito utilizando o pacote de processamento de dados proteômicos *LABKEY SERVER* (Nelson et al., 2011) que fornece automaticamente a lista de proteínas identificadas e também a quantificação relativa de experimentos SILAC. Como banco de dados, foi usada a base de dados curada da UniProt (Human Proteome – v. Apr/2014) para garantir a validade da identidade das proteínas identificadas. A análise quantitativa baseou-se nos peptídeos contendo isótopos de lisinas (leve e pesado). As informações quantitativas foram extraídas automaticamente usando o programa “Q3”, desenvolvido para obter a relação de quantificação para cada par de peptídeos identificados por MS/MS que contém lisina, computando-se a média das razões dos peptídeos pesado/leve observada para cada proteína. Também foram obtidos os desvios-padrão para as proteínas que apresentaram mais que uma razão quantitativa. Para geração das listas de identificação e quantificação de proteínas, o critério de qualidade dos peptídeos identificados foi obtido pelo algoritmo *PeptideProphet* (Keller et al., 2002). Somente peptídeos que atingiram uma taxa de erro inferior a 1% foram agrupados na sequência das proteínas, utilizando-se o algoritmo *ProteinProphet* (Nesvizhskii et al., 2003) que também resolve o problema de inferência de proteínas.

3.11 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

3.11.1 Processamento dos dados e análise estatística

Para fins de análise quantitativa e estatística dos experimentos 1 e 2, foi empregado o programa Perseus (<http://www.biochem.mpg.de/5111810/perseus>). Para isto foram analisados independentemente os dados de cada compartimento celular de cada experimento proteômico, dando no total seis grupos de análise, 2 para o experimento 1 e 3 para o experimento 2. Em primeiro lugar, as listas de proteínas foram filtradas considerando-se somente as proteínas que apresentavam como mínimo um peptídeo identificado nas duas replicatas e obteve-se o $\log_2$ das razões H/L. Depois, as distribuições dos dados na escala $\log_2$

foram plotadas gerando-se histogramas por cada grupo, aqueles grupos, cuja distribuição central achava-se deslocada do centro igual a 0, foram normalizados com respeito à moda. Com os dados normalizados quando for o caso, novos histogramas foram obtidos para corroborar que a nova distribuição dos dados fosse centralizada perto de zero. Após os dados foram novamente filtrados para gerar listas, contendo somente as proteínas que tinham sido quantificadas em ambas as replicatas, isto foi feito por cada grupo de trabalho. Para poder observar as tendências das proteínas que estavam aumentadas ou diminuídas em nossos experimentos, usamos como critério de corte para identificar as proteínas alteradas uma razão tratado/controle maior que 1,5 para aquelas proteínas que sofreram aumento com respeito ao controle ("*upregulated*") e com uma razão menor de 0,66 para aquelas proteínas que diminuíram com respeito ao controle ("*downregulated*"). Para análise estatística foi usada a função teste T para uma amostra (*one sample T-test*) do programa Perseus, considerando-se aquelas proteínas reguladas com significância estatística aquelas com uma diferença T (*T-difference*) maior e igual que 0,59 ou menor e igual -0,59.

3.11.2 Análise de ontologia gênica

A análise de ontologia gênica inicial das proteínas diferencialmente expressas nos experimentos 1 e 2 foi realizada na plataforma Panther (<http://www.pantherdb.org/>), com a finalidade de avaliar a função molecular e os processos biológicos nos quais as proteínas diferencialmente expressas estariam envolvidas (Mi e Thomas, 2009). Para uma análise detalhada, foi utilizado o programa FunRich (Pathan M. et al., 2015) focado na análise de perfis funcionais; nesta plataforma foram realizadas análises de enriquecimento baseado nos termos de ontologia gênica (Gene Ontology – GO) segundo função molecular e função biológica, usando como base de dados de fundo (background) a base de dados curada UniProt pertencente à espécie *Homo sapiens*, usando como critério de corte para considerar que a função assinada e predominante em nossas listas um valor $p \leq 0,05$ corrigido pelo método de Benjamini e Hochberg (método BH ou FDR, *False Discovery Rate*).

3.11.3 Análise de redes de interação de proteínas

Com a finalidade de obter informação do conjunto de proteínas diferencialmente expressas identificadas em nossos experimentos sobre as possíveis redes de interações, assim como funções e processos biológicos nos que estariam participando, foi feita uma análise das redes de interação dos genes pertencentes às proteínas reguladas em nosso estudo, usando a ferramenta STRING – “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes” (<http://string-db.org/>) a qual utiliza uma base de dados com interações previstas e conhecidas, as quais incluem associações diretas e indiretas no contexto genômico, técnicas experimentais, coexpressão e busca em bases de dados (Szklarczyk et al., 2011). Para corroborar e localizar as proteínas reguladas dentro de possíveis redes de interação, utilizou-se a base de dados curada de vias de sinalização REACTOME (<http://www.reactome.org/>), a qual integra bases de dados como NCBI Gene, Ensembl e UniProt, plataformas de busca UCSC e HapMap Genome, além de buscas em PubMed e Gene Ontology entre outras (Croft et al. 2014; Milacic et al. 2012).

3.12 MONITORAMENTO DE REAÇÕES MÚLTIPLAS (MRM) PARA A ANÁLISE DE B-ACTINA NA CULTURA CELULAR COM MARCAÇÃO ISOTÓPICA SILAC

3.12.1 Digestão de proteínas

Foram digeridas alíquotas de 50 ou 100 µg de proteínas, procedentes de extratos celulares proteicos obtidos como descrito anteriormente e quantificados pelo método de Bradford. Para isto, as amostras foram reduzidas adicionando-se 33 µl de DTT 100 mM e incubadas por 30 minutos a 37°C em agitação constante e alquiladas com 7 µl de IAA 0,5M recém-preparada, e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Terminando a alquilação, foram adicionados 740 µl de Tris 100 mM, pH 8,5 e a tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega®) diluída em Tris 0,2M (concentração 0,1 µg/µl) foi adicionada para atingir uma razão de 1:20 da enzima com relação à proteína. As amostras foram incubadas a 37°C

por 14 h, e a reação de digestão foi interrompida adicionando ácido fórmico 10% até alcançar $\text{pH} < 2$.

3.12.2 Purificação de peptídeos através da extração em fase sólida (SPE)

As amostras digeridas foram purificadas em colunas C^{18} de 1 mL OASIS-HLB (Waters®). As colunas foram condicionadas previamente passando três vezes 1 ml de acetonitrila pura (ACN) e equilibradas três vezes usando 1 ml de 5% ACN/0,01% ácido fórmico. Em seguida, as amostras foram carregadas duas vezes na coluna e submetidas à lavagem duas vezes com 1 ml de solução 5% ACN/0,01% ácido fórmico. Finalmente, os peptídeos foram eluídos com solução 70% ACN/0,01% de ácido fórmico. O material eluído foi seco em concentrador a vácuo (SAVANT™ Speedvac™) e ressuspendido em 50 μl de 5% ACN/0,01% de ácido fórmico, contendo um padrão interno com marcação pesada para melhorar a quantificação. O material foi posteriormente injetado no sistema de LC-MS/MS.

3.12.3 Coleta de dados por MRM

Os dados foram gerados por espectrometria de massas em modo MRM em um espectrômetro XEVO TQ-S (Waters). A cromatografia foi realizada em uma coluna cromatográfica UPLC de 15 cm, usando gradiente de 5 a 22% de solvente B, sendo o solvente A: ACN 5% com ácido fórmico (AF) 0,1% e o solvente B 100% com AF 0,1%. O espectrômetro de massas foi programado com as devidas transições para o peptídeo prototípico de β -actina, utilizando-se voltagem constante de ionização (3,5kv). Os demais parâmetros de operação foram definidos por ajustes semanais para obter melhores respostas de intensidade dos peptídeos-padrão.

3.13 ANÁLISE TEMPORAL DO FOSFOPROTEOMA NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

Os experimentos relacionados com este estudo foram desenvolvidos completamente nas instalações do Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften- ISAS e.v., Dortmund – Alemanha.

3.13.1 Cultura celular em médio SILAC-3plex

As células PANC-1 foram crescidas em médio DMEM-SILAC (Thermo Scientific, Cat. Cod. 89985), possuindo três tipos diferentes de marcação (SILAC 3-plex). Para isto, foram preparados três tipos de meio SILAC contendo combinações dos aminoácidos Arg e Lys isotopicamente marcados e adquiridas da Euroisotop®. No geral, o meio DMEM-SILAC-3plex foi preparado contendo 10% SFB dialisado, 100 U/mL penicilina/100 µg/mL estreptomicina, 4 mM glutamina e 200 mg/L prolina, que foi adicionada para superar o problema da conversão de arginina em prolina (Bendall et al., 2008) e foi suplementado de três diferentes maneiras. Assim, o meio SILAC pesado continha 84 mg/L $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ -Arg e 143 mg/L $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -Lys (SILAC R10K8), o SILAC meio u 84 mg/L $^{13}\text{C}_6$ -Arg e 143 mg/L D_4 -Lys (SILAC R6K4) e o SILAC leve 84mg/L $^{12}\text{C}_6$ -Arg e 143 mg/L $^{12}\text{C}_6$ -Lys (SILAC R0K0). Para garantir mais 95% de incorporação, as células foram mantidas em cultura por cinco passagens sucessivas, e a porcentagem de incorporação foi confirmada por LC-MS/MS após digestão de amostras, seguindo o protocolo descrito à continuação.

3.13.2 Indução da transição epitélio-mesenquimal nas células PANC-1 crescidas em meio SILAC

Para o estudo do fosfoproteoma foi escolhido o tratamento por TGF- β 1 como a melhor condição de indução da EMT. Assim, as células PANC-1 marcadas com R0K0, R6K4 e R10K8 na quinta passagem crescidas em placas de 150 cm² a 70% de confluência, e submetidas a jejum de soro por 16 h, foram tratadas com TGF- β 1 10 ng/mL por 15 e 60 minutos, como controle

usaram-se células marcadas com R0K0, R6K4 e R10K8 crescidas e submetidas a jejum de soro da mesma maneira, mas sem adição do TGF- β .

3.13.3 Lise celular e processamento de amostras

Após os tratamentos de 15 e 60 minutos terminarem, as células foram lavadas três vezes com DPBS gelado e lisadas pela adição de 1% SDS suplementados com coquetel inibidor de protease Complete Mini® e coquetel inibidor de fosfatase PhosSTOP® (Roche). Os pellets celulares foram recuperados e homogeneizados através de três rodadas de 30 s de sonicação, usando uma energia de 40 W, seguindo-se de 30 s de incubação em gelo. Depois os lisados celulares foram centrifugados a 18.000 g a 4°C por 20 minutos, e as proteínas de interesse no sobrenadante foram reduzidas adicionando DTT a uma concentração final de 10 mM e incubando a 56°C por 30 minutos, e alquiladas com IAA a uma concentração final de 20 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

Concluída a etapa de redução e alquilação, as proteínas foram precipitadas pela adição de nove volumes de etanol (LiChrosolve®) e incubadas a -40°C por 2 h. Terminado o período de incubação, as proteínas precipitadas foram centrifugadas a 13.500g a 4°C por 1 hora, descartando-se o sobrenadante e solubilizando os pellets resultantes em 6 M Gu.HCl (cloreto de guanidino). A concentração das proteínas foi determinada usando o método do ácido bicintronínico (BCA, Thermo Scientific®), seguindo as instruções do fabricante. Finalmente foram geradas três misturas ou replicatas de 6 mg cada uma, contendo 2 mg de proteína por cada ponto de tempo testado (controle, 15 e 60 minutos) nos diferentes médios SILAC usados, ver Tabela 4.

TABELA 4. Misturas de SILAC-3plex para a análise do fosfoproteoma

	CONTROLE	15 min	60 min
Replicata 1	M	L	H
Replicata 2	H	M	L
Replicata 3	L	H	M

(*) H = SILAC pesado (R10K8); M = SILAC meio (R6K4); L = SILAC leve (R0K0)

3.13.4 Digestão e purificação das amostras

Com o propósito de digerir as amostras, as misturas de 6 mg de proteínas geradas anteriormente primeiro foram diluídas 20 vezes com 50 mM de bicarbonato de amônia e ajustadas para conter 1 mM CaCl_2 , e foi adicionada tripsina (SIGMA, T-1426) em uma razão 1:20 (tripsina:proteína). As amostras foram incubadas durante 16 h a 37°C em agitação constante, para finalmente parar a reação, adicionando ácido fórmico a uma concentração final de 2%. Cabe ressaltar que a melhor razão de tripsina:proteína foi determinada primeiro digerindo 50 µg de proteína com três diferentes tipos de razões tripsina:proteína (1:10, 1:20 e 1:30) e realizando controles de digestão de 1 µg da proteína digerida em um sistema HPLC implementado com coluna monolítica para revelar a eficiência da digestão (Burkhart et al., 2012).

As amostras foram purificadas usando colunas de 6 mL Bond Elut® C18 de 1g (Varian). As colunas foram preparadas passado 6 mL de 100% ACN, 2x de 6 mL de 60% ACN e três vezes de 6 mL de 2% de ácido fórmico. Depois, as amostras foram carregadas duas vezes e antes de eluir com 60% ACN as colunas foram lavadas com três vezes de 6 mL de 2% de ácido fórmico. O eluído final de cada amostra recuperado foi dividido em duas partes iguais em volume e secos a vácuo, conseguindo-se 2 frações de aproximadamente 3 mg por cada replicata. Finalmente, as amostras secas foram lavadas três vezes com 50% de metanol e secas a vácuo novamente antes de ser armazenadas a -40°C.

3.13.5 Enriquecimento em fosfopeptídeos

O método de enriquecimento em fosfopeptídeos utilizado foi o fracionamento por cromatografia de interação hidrofílica e repulsão eletrostática (ERLIC, *Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography*) descrito por Loroach et al., 2015; com algumas modificações para garantir a máxima recuperação em fosfopeptídeos da amostra. Em resumo, o ERLIC consistia de um sistema Famos-Switchos-Ultimate (Dionex) acoplado a uma bomba analítica e a uma coluna PolyWAX® (9,4 x 100 mm, partículas de 5 µm, 300Å, PolyLC®), o sistema de solventes usado foi 20 mM Ácido Metilfosfônico, 70% ACN a pH 2,0 (ERLIC A) e 200

mM fosfato de trietilamina, 60% ACN pH 2,0 (ERLIC B). As corridas cromatográficas foram feitas usando um fluxo de 3 mL/min e o seguinte gradiente: 7 minutos 100% ERLIC A, um incremento linear de 0 a 100% de ERLIC B em 5 min seguido por 100% ERLIC B durante 10 min. As amostras a ser injetadas foram diluídas em solvente ERLIC A e, após cada corrida cromatográfica, a coluna foi equilibrada novamente durante 23 min com 100% ERLIC A. No total, foram coletadas 21 frações (F6-F26) por cada replicata a partir do minuto 8 até o minuto 22. Todas as frações foram marcadas cuidadosamente e secadas a vácuo. As frações coletadas foram purificadas usando *spin-tips* RP-SPE C18 que foram condicionadas primeiro três vezes com 200 µl 50% ACN, três vezes de 100 µl de 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) para serem carregadas duas vezes com amostra diluída em 0,1% TFA, posteriormente foram realizadas três etapas de lavagem usando 0,1% TFA e os peptídeos foram eluídos quatro vezes com 150 µl 50% ACN. Finalmente, todas as frações purificadas foram secadas a vácuo.

3.13.6 Análise do fosfoproteoma por LC-MS/MS

A análise LC-MS/MS foi realizada em um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado em linha com um nano-HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas em 0,1% TFA antes de serem carregadas, e a corrida cromatográfica foi realizada a 60°C com um fluxo de 270 nL/min usando 0,1% TFA (fase móbil A) e 84% ACN, 0,1% TFA (fase móbil B), usando um gradiente lineal de 3% a 35% de fase móbil B. O tempo de aquisição para as frações F6 a F18 foi de 90 minutos, enquanto para as frações F19 a F26 de 60 minutos, usando o método de fragmentação por CID. Os espectros foram adquiridos em modo dependente na faixa de 300 – 1500 m/z no Orbitrap Velos (Thermo Finnigan), com uma resolução de 60.000 ($m/z = 400$) usando o *mass lock* de 10136 m/z de polixilosano. Os 15 íons mais abundantes foram selecionados e fragmentados no *ion trap* com uma energia de colisão normalizada de 35%. Utilizou-se uma janela de exclusão de 10 s e foram excluídos da fragmentação os íons de carga +1 ou 0. Os valores-alvo do controle de ganho automático de íons foram estabelecidos a 10^6 e 10^4 para o MS e MS/MS respectivamente, sendo o tempo máximo de acumulação de íons de 100 ms.

3.13.7 Análise preliminar dos dados

Os arquivos foram processados usando o programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) usando-se Mascot como ferramenta de busca contra a base de dados Uniprot para humanos. Os critérios de busca estabelecidos foram de tolerância de *error* a 10 ppm para os íons precursoros e 0,5 Da para os íons fragmentados, sítios de *misscleavage* para tripsina ≤ 2 , e a carbamidometilação nos resíduos de Cys foi estabelecida como modificação fixa enquanto a oxidação da Met, fosforilação de Ser/Thr/Tyr, acetilação de N-terminal e marcação pesada da Lys (D_4 , + 4; $^{13}C_6$, $^{15}N_2$, + 8) ou da Arg ($^{13}C_6$, + 6; $^{13}C_6$, $^{15}N_4$, + 10) foram estabelecidas como modificações variáveis. Todas as PSMs (peptide-spectrum matches) foram filtradas usando o algoritmo de validação de PSM *target-decoy* com um FDR de $\leq 1\%$ a nível de PSM. A localização dos sítios de fosforilação foi feita usando o algoritmo phosphoRS 3.1 com um valor de confiança de ao menos 90% (Taus et al., 2011). Para fins quantitativos, foi estabelecido como critério de inclusão que somente os fosfopeptídeos com sítios de fosforilação, acima de 90% de confiança dada pelo algoritmo phosphoRS, fossem considerados. Para identificar as fosfoproteínas reguladas, foram calculados os log2 das razões para todos os fosfopeptídeos que reunissem os requisitos de nosso critério de inclusão. Uma proteína foi considerada regulada quando a diferença com respeito ao controle fosse mais de duas vezes em, pelo menos, duas das três replicatas.

3.14 ENSAIO DE MORTE CELULAR

Este ensaio foi realizado marcando-se as células apoptóticas com Anexina V – Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (BD BioSciences Pharmingen™) e as necróticas com iodeto de propídio. Para isto, foram usados cultivos celulares da linhagem PANC-1 em placa de ensaio de seis poços (6×10^5 células/poço), que foram induzidas a EMT por 48 h como descrito anteriormente, usando TGF- $\beta 2$ 10 ng/mL, EGF 50ng/mL e TGF- $\beta 2$ 10ng/mL, e como controle negativo utilizou-se DMSO 3% diluídos em meio DMEM sem soro. Terminado o período de incubação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C. Os pellets celulares resultantes foram lavados cuidadosamente duas vezes com PBS gelado, centrifugados a 300g por 5 minutos a 4°C e ressuspensos em 300 μ L de tampão de ligação 1X (10X Annexin V Binding

Buffer, Código 556547, BD Pharmingen™). Posteriormente, as células foram coradas com 5 µl de Anexina e 50 µl de solução de Iodeto de Propídio (PI) e incubadas protegidas da luz a temperatura ambiente. As células foram analisadas usando citômetro de fluxo BD FACScalibur™ (BD, Bioscience,) e em triplicata técnica.

4 RESULTADOS

4.1 RESPOSTA CELULAR AO TRATAMENTO COM TGF-BETA E/OU FATOR DE EGF

4.1.1 Atividade dos receptores de TGF- β e EGF

Com a finalidade de avaliar a ativação dos receptores para EGF e TGF- β nas nossas duas linhagens de câncer de pâncreas PANC-1 e CAPAN-2, submetemos as mesmas à ação dos fatores de crescimento empregados em nosso estudo (TGF- β 1, TGF- β 2 e EGF) por um período de tempo curto (5, 15 e 30 minutos) e verificamos o grau de ativação dos seus respectivos receptores por *western-blotting*, usando anticorpos contra a proteína SMAD2/3 fosforilada no caso do TGF- β e contra o receptor de EGF fosforilado no caso do EGF.

Como observado na Figura 4, na linhagem PANC-1 tanto a adição de TGF- β 1 como a β 2 conseguiram fosforilar a proteína SMAD2/3, proteína *downstream* a via de sinalização do receptor TGF- β , indicando indiretamente que o receptor de TGF- β nesta linhagem celular encontra-se ativado. No caso do receptor de EGF (EGFR), foi possível observar diferentes graus de fosforilação ao longo do tempo e em diferentes concentrações de EGF, ver Figura 5. Assim, a concentração mínima usada para observar a ativação do EGFR foi de 10 ng/mL de EGF, porém a maior atividade do receptor foi observada após 30 minutos da adição de 30 ng/mL de EGF. Para os tratamentos com 50 ng/mL de EGF, foi observado um efeito de ativação crescente e proporcional ao longo do tempo (Figura 6).

No caso da linhagem CAPAN-2, a adição de TGF- β não levou à fosforilação da proteína SMAD2/3, pois só foi possível detectar a versão não fosforilada da proteína (Figura 7). Entretanto, as duas concentrações de EGF empregadas conseguiram ativar EGFR (Figura 8), além de se observar que o receptor se encontra fosforilado a partir dos primeiros 5 minutos após o tratamento.

FIGURA 4. Análise por *western blotting* da ativação do receptor de TGF- β em células PANC-1 usando TGF- β 1 ou TGF- β 2

Foi carregado no gel SDS-PAGE um total de 50 μ g de extrato celular proteico. Anticorpos usados foram anti-Smad2/3 (Cell Signaling, CAT# 8685), anti-Phospho-Smad2(Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) (Cell Signaling, CAT# 8828) e anti- β -actina (Cell Signaling, CAT# 4970). Ct = controle. As setas mostram as bandas da proteína fosforilada marcada.

FIGURA 5. Análise por *western blotting* da ativação do receptor de EGF em células PANC-1

Foi carregado no gel SDS-PAGE um total de 30 μ g de extrato celular proteico. Anticorpos usados foram anti-EGF Receptor (Cell Signaling, CAT# 2646), anti-Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (Cell Signaling, CAT# 3777) e anti-GAPDH (Cell Signaling, CAT# 2118). CT = Controle.

FIGURA 6. Efeito da concentração de EGF na fosforilação do seu receptor ao longo do tempo

Linhagem celular, PANC-1. P-EGFR, receptor de EGF fosforilado; EGFR, receptor de EGF total. As barras representam a diferença da razão proteína/GAPDH dos tratamentos frente ao controle na análise por densitometria da intensidade das bandas.

FIGURA 7. Análise por *western blotting* da ativação do receptor de TGF- β em células CAPAN-2 usando TGF- β 1 ou TGF- β 2

Foi carregado no gel SDS-PAGE um total de 50 μ g de extrato celular proteico. Anticorpos usados foram anti-Smad2/3 (Cell Signaling, CAT# 8685), anti-Phospho-Smad2(Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) (Cell Signaling, CAT# 8828) e anti-GAPDH (Cell Signaling, CAT# 2118). Ct = controle.

FIGURA 8. Análise por *western blotting* da ativação do receptor de EGF em células CAPAN-2

Foi carregado no gel SDS-PAGE um total de 50 µg de extrato celular proteico. Anticorpos usados foram anti-EGF Receptor (Cell Signaling, CAT# 2646), anti-Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (Cell Signaling, CAT# 3777) e anti-GAPDH (Cell Signaling, CAT# 2118). CT = Controle

4.1.2 Alterações fenotípicas após tratamento com TGF-β e/ou EGF

Os tratamentos com TGF-β1 ou β2 provocaram mudanças fenotípicas na linhagem celular PANC-1. Assim, as células passaram de um fenótipo epitelial para outro com características das células mesenquimais, mais alongadas como fibroblastos e espalhadas na placa, condizente com o descrito na literatura para a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Ye e Weinberg, 2015). Estas mudanças foram observadas a partir das 24 h após adição dos fatores de crescimento e continuaram até por um período de 72 h. Além disso, as células tratadas com uma mistura de EGF com TGF-β1 ou β2 também sofreram alterações fenotípicas semelhantes às observadas nas células tratadas com TGF-β. Porém, as células tratadas apenas com EGF 50 ng/mL não sofreram grandes mudanças fenotípicas, quando comparadas com o controle (Figura 9).

No caso da linhagem CAPAN-2, tanto o tratamento com TGF-β como com EGF, e as diferentes misturas dos mesmos não conseguiram mudar o fenótipo das células mesmo após um período de incubação de até 72 h (Figura 10).

FIGURA 9. Avaliação morfológica da linhagem celular PANC-1 ao tratamento com TGF- β e/ou EGF por 48 h

(A) = Controle; (B) = TGF- β 1 (10 ng/mL); (C) = TGF- β 2 (10 ng/mL); (D) = EGF (50 ng/mL); (E) = EGF (50 ng/mL) + TGF- β 1 (10 ng/mL); (F) = EGF (50 ng/mL) + TGF- β 2 (10 ng/mL). Aumento 10x.

FIGURA 10. Avaliação morfológica da linhagem celular CAPAN-2 ao tratamento com TGF- β e/ou EGF por 72 h

(A) = Controle; (B) = EGF (50 ng/mL); (C) = EGF (50 ng/mL) + TGF- β 1 (10 ng/mL); (D) = EGF (50 ng/mL) + TGF- β 2 (10 ng/mL). Aumento 10x.

4.1.3 Alterações ao nível de proteína após tratamento com TGF- β e/ou EGF

Considerando que as mudanças fenotípicas foram observadas em até 72 h de tratamento para a linhagem celular PANC-1, foram coletados os extratos celulares proteicos neste ponto do tratamento para serem analisados por *western-blotting* usando anticorpos contra proteínas envolvidas na EMT. Utilizou-se para isso o kit específico *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit* (Cell Signaling, Cat #9782) (Figura 11).

Ao comparar os perfis obtidos com o controle, foram observadas mudanças em intensidade de banda para algumas proteínas envolvidas na EMT. Assim, as bandas correspondentes às proteínas N-Caderina, Snail e Claudina-1 foram mais intensas nos tratamentos quando comparadas ao controle, enquanto a intensidade da banda correspondente à E-caderina encontra-se reduzida nos tratamentos com TGF- β , mas não no tratamento por EGF, na qual a intensidade foi maior. No caso da proteína Vimentina,

observou-se um incremento na intensidade da banda em todos os tratamentos. No caso de Zeb1 e Slug, não se observaram variações comparadas ao controle.

FIGURA 11. Análise por *western-blotting* das células PANC-1 tratadas com TGF-β e/ou EGF por 72 h

Foram carregados no gel 50 µg de extrato celular proteico. CT = Controle; β1 = TGF-β1 (10 ng/mL); β2 = TGF-β2 (10 ng/mL); EGF = EGF 50 ng/mL; EGF + β1 = EGF 50 ng/mL + TGF-β1 (10 ng/ml); EGF + β2 = EGF 50 ng/ml + TGF-β2 (10 ng/ml).

As mudanças fenotípicas observadas aconteceram a partir das 24 h de tratamento, assim foram analisados extratos celulares proteicos nos pontos de tempo de 24 e 48 h, com o objetivo de avaliar com mais detalhe como as alterações fenotípicas observadas são evidenciadas ao nível proteico. Após tratamento das células PANC-1 com TGF-β1 ou 2, foi observada uma diminuição na intensidade da banda de E-caderina após 48 horas, enquanto as bandas correspondentes às proteínas vimentina, β-catenina e SNAIL aumentaram mais após 24 h e prioritariamente no tratamento com TGF-β2 (Figura 12). Isto se pode observar

também na Figura 13 ao avaliar que a razão Snail/GAPDH e β -catenina/GAPDH era maior às 24 h de tratamento e preferencialmente nas células tratadas com TGF- β 2.

FIGURA 12. Análise por *western-blotting* da indução da EMT em células PANC-1 usando TGF- β

Foi carregado um total de 50 μ g de extrato celular proteico. Anticorpos usados foram adquiridos da Cell Signaling®. As linhas do gel correspondem respectivamente a: (CT = Controle; β 1 = TGF- β 1 10 ng/ml; β 2 = TGF- β 2 10 ng/ml).

FIGURA 13. Efeito do TGF- β no nível de proteínas vinculadas à EMT ao longo do tempo

Linhagem celular, PANC-1. Concentração de TGF- β 1 ou β 2 = 10 ng/mL. As barras representam a diferença da razão proteína/GAPDH dos tratamentos frente ao controle na análise por densitometria da intensidade das bandas.

No caso do tratamento da linhagem celular PANC-1 com EGF 50 ng/mL, células cujo fenótipo não mudou visivelmente após tratamento, não se observaram também diferenças moleculares em intensidade de banda das proteínas vimentina, β -catenina e Snail com respeito ao controle após 48 h. Porém, nos tratamentos nos quais as misturas de EGF com TGF- β foram empregadas, foi observado que tanto a adição de EGF (50 ng/mL) + TGF- β 1 (10 ng/mL) como a adição de EGF (50 ng/mL) + TGF- β 2 (10 ng/mL) levaram a um aumento na intensidade das bandas da maioria das proteínas avaliadas, diferença que foi mais intensa após 48 h de tratamento, como se mostra na Figura 14. Particularmente, estas diferenças são mais bem visualizadas na Figura 15, onde a razão do Snail/GAPDH frente ao controle é claramente maior após 48 h da adição de TGF- β 1 + EGF e TGF- β 2 + EGF, sendo levemente maior no primeiro caso. Para as proteínas vimentina e β -catenina, foi observado um aumento não muito pronunciado da intensidade da banda, quando comparado com o controle (ver Figuras 14 e 15). No caso particular da proteína E-caderina (CDH1), observa-se que está diminuída comparada ao controle nas misturas de citocinas. Entretanto, no tratamento individual de 48 h com EGF 50 ng/mL, CDH1 mostra incremento na intensidade comparado ao controle.

Em resumo, ao comparar as respostas da linhagem celular PANC-1 à adição de TGF- β e/ou EGF ao longo de 48 h, foi observado que a adição de qualquer das isoformas de TGF- β (1 ou 2) e a mistura com EGF levaram à redução dos níveis de E-caderina quando comparado com o controle, especialmente as 24 h no caso do tratamento com TGF- β e as 48 h no caso da mistura de EGF + TGF- β . No caso de vimentina e β -catenina, aparentemente teve um maior incremento quando unicamente foi adicionado TGF- β , especialmente após 24 h de tratamento. Pelo contrário para Snail, o maior incremento foi observado quando foi usada a mistura de EGF e TGF- β após 48 h de tratamento, ver Tabela 5.

FIGURA 14. Análise por *western-blotting* da indução da EMT em células PANC-1 usando EGF e/ou TGF-β

Foi carregado um total de 50 µg de extrato celular proteico. Os anticorpos usados foram adquiridos da Cell Signaling®. As linhas do gel correspondem respectivamente a: (CT = Controle; EGF = EGF 50ng/ml; EGF + β1 = EGF 50 ng/ml + TGF-β1 10 ng/ml; EGF + β2 = EGF 50 ng/ml + TGF-β2 10 ng/ml).

FIGURA 15. Efeito do EGF e TGF-β no nível de proteínas vinculadas à EMT ao longo do tempo

Linhagem celular, PANC-1. Concentração de EGF = 50 ng/mL e do TGF-β1 ou β2 = 10 ng/mL. As barras representam a diferença da razão proteína/GAPDH dos tratamentos frente ao controle na análise por densitometria da intensidade das bandas.

TABELA 5. Alteração dos marcadores moleculares durante a indução da EMT na linhagem PANC-1

	24 HORAS						48 HORAS			
PROTEÍNA	TGF-β1 (10 ng/mL)	TGF-β2 (10 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	TGF-β1 (10 ng/mL) + EGF (50 ng/mL)	TGF-β2 (10 ng/mL) + EGF (50 ng/mL)	TGF-β1 (10 ng/mL)	TGF-β2 (10 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	TGF-β1 (10 ng/mL) + EGF (50 ng/mL)	TGF-β2 (10 ng/mL) + EGF (50 ng/mL)
E-Caderina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
β-Catenina	(+±)	(+±)	(-)	(±)	(±)	(±)	(+±)	(±)	(±)	(±)
Vimentina	(+)	(+)	(-)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)
Snail	(++)	(++)	(+±)	(++)	(++)	(+±)	(+±)	(±)	(++++)	(++++)

Os símbolos indicam (-) diminuição da intensidade; (+) aumento leve; ($\pm$) aumento leve a moderado; (++) aumento moderado a forte; (++++) aumento forte. As comparações foram baseadas na diferença da razão proteína/GAPDH dos tratamentos frente ao controle avaliado por densitometria das bandas.

4.1.4 Avaliação da capacidade de migração da linhagem celular PANC-1 após tratamento com TGF- β e/ou EGF

Com a finalidade de verificar se o tratamento com TGF- β e/ou EGF exerce algum efeito nas propriedades de migração da linhagem celular PANC-1, foram avaliadas as diferenças na capacidade das células de migrar em placa, ao longo de um espaço determinado através do ensaio de “wound-healing”. Para este fim, foi usada a técnica da risca e o comportamento foi fotodocumentado das células a cada 24 h por um período de 48 h, ver Figura 16, figura representativa do experimento.

FIGURA 16. Efeito o TGF β 2 (10 ng/mL) e EGF (50 ng/mL) na migração celular da linhagem celular PANC-1

As linhas tracejadas delimitam a área livre de células. As células foram tratadas até as 48 h. As microfotografias foram obtidas com aumento de 10x.

As diferenças entre os tratamentos empregados, descritos na Tabela 2, foram avaliadas comparando as médias da porcentagem de abertura com os seus respectivos controles. Dado que os experimentos não foram executados em simultâneo, estes foram agrupados em três grupos, consistindo em o grupo 1 dos tratamentos com TGF- β 1 ou β 2 (10 ng/mL cada um), o grupo 2 do tratamento com EGF (50 ng/mL) e o grupo 3 dos tratamentos com EGF (50 ng/mL) + TGF- β 1 (10 ng/mL) ou TGF- β 2 (10 ng/mL). Cada grupo possui seus respectivos controles.

Para estabelecer os grupos que seriam comparados pelo teste estatístico, primeiro foram comparados os controles com a migração em 24 h e 48 h sem tratamentos, onde foi observada uma diferença significativa. Ao comparar os tratamentos do grupo 1 com respectivo controle, não foi observada uma diferença significativa tanto para o TGF- β 1 como β 2, exceto para o tratamento às 48 h com TGF- β 2 (Tabela 6 e Figura 17). Para o TGF- β 1 foi observada uma maior diferença, ao comparar os resultados às 48 h com o início do

tratamento, mas não quando foi comparado com o controle. No grupo 2, se observou que a adição do EGF produz diferenças significativas tanto após 24 h como 48 h de tratamento, como se pode observar na Tabela 7 como na Figura 18.

No caso do grupo 3, tanto as misturas de EGF (50 ng/mL) com TGF- β 1 (10 ng/mL) ou TGF- β 2 (10 ng/mL), foram observadas diferenças significativas para os dos tratamentos às 24 como às 48 h tanto quando foram comparados com o controle como quando os grupos foram com o início do tratamento, ver a Tabela 8 e a Figura 19. Além, o tratamento com EGF + TGF- β 2 apresentou uma menor área de abertura da risca que o tratamento com EGF + TGF- β 1.

TABELA 6. Diferenças na porcentagem de abertura da risca após 48 horas de tratamento com TGF- β (10 ng/mL)

TEMPO	% DE ABERTURA DA RISCA		
	CONTROLE	TGF-B1	TGF-B2
24 horas	91,39 $\pm$ 5,64	90,31 $\pm$ 1,38	83,53 $\pm$ 2,27
48 horas	88,30 $\pm$ 4,86(*)	83,27 $\pm$ 2,08	78,78 $\pm$ 4,45(*)

Os valores representam média $\pm$ DP (n=3). *P < 0,05

FIGURA 17. Efeito do TGF- β na capacidade de migração das células PANC-1 após 48 horas de adição

O número de asteriscos indica a diferença entre os grupos avaliados, (*) baixa, (***) alta. A linha com barras laterais indica os grupos comparados.

TABELA 7. Diferenças na porcentagem de abertura da risca após 48 horas de tratamento com EGF (50 ng/mL)

TEMPO	% DE ABERTURA DA RISCA	
	CONTROLE	EGF
24 horas	92,32 ± 4,16	83,00 ± 2,08 (*)
48 horas	90,72 ± 2,16	73,72 ± 1,40 (*)

Os valores representam média ± DP (n=3). *P < 0,05

FIGURA 18. Efeito do EGF na capacidade de migração das células PANC-1 após 48 horas
O número de asteriscos indica a diferença entre os grupos avaliados, (*) baixa, (**) média, (***) alta.
A linha com barras laterais indica os grupos comparados.

TABELA 8. Diferenças na porcentagem de abertura da risca após 48 horas de tratamento com EGF (50 ng/mL) e TGF- β 1 (10 ng/mL) ou TGF- β 2 (10 ng/mL)

TEMPO	% DE ABERTURA DA RISCA		
	CONTROLE	EGF + TGF-B1	EGF + TGF-B2
24 horas	96,01 $\pm$ 0,88	80,55 $\pm$ 4,20 (*)	77,90 $\pm$ 3,24 (*)
48 horas	87,76 $\pm$ 2,37	68,51 $\pm$ 6,18 (*)	63,24 $\pm$ 1,74 (*)

Os valores representam média $\pm$ DP (n=3). *P < 0,05

FIGURA 19. Efeito do EGF (50 ng/mL) e TGF- β 1 (10 ng/mL) ou TGF- β 2 (10 ng/mL) na capacidade de migração das células PANC-1 após 48 horas

O número de asteriscos indica a diferença entre os grupos avaliados, (*) baixa, (**) média, (***) alta.

4.1.5 Avaliação da capacidade de invasão da linhagem celular PANC-1 após tratamento com TGF- β e/ou EGF

Para verificar se a adição do TGF- β e/ou EGF tinha algum efeito positivo ou negativo nas propriedades de invasão da linhagem celular PANC-1, foi usado o ensaio de invasão em “transwell” o qual consistiu em avaliar a quantidade de células capazes de atravessar uma

camada de Matrigel®. Como se observa na Tabela 9, foram avaliados os pontos de tempo usando no total de cinco tratamentos os quais foram comparados com o controle. Neste caso particular, usamos a análise por grupos comparando o controle ao tratamento ao longo do tempo. Não foram obtidas diferenças significativas ao comparar os cinco tratamentos com respeito ao controle ao longo do tempo, exceto para o tratamento com TGF-β2 (10 ng/mL) e EGF (50 ng/mL), o qual apresentou uma leve diferença, quando comparado ao controle e ao tratamento de TGF-β2 (10 ng/mL) após 24 h (Figura 20).

TABELA 9. Medidas em absorvância das células PANC-1 capazes de passar pelo Matrigel® após 48 horas de tratamento

	ABSORVÂNCIA (nm)	
	24 HORAS	48 HORAS
Controle	0,292 ± 0,020	0,323 ± 0,003
TGF-β1	0,297 ± 0,032	0,334 ± 0,014
TGF-β2	0,312 ± 0,027	0,342 ± 0,018
EGF	0,309 ± 0,024	0,328 ± 0,018
EGF + TGF-β1	0,292 ± 0,015	0,338 ± 0,021
EGF + TGF-β2	0,262 ± 0,010	0,368 ± 0,013(*)

Os valores representam média ± DP (n=3). *P < 0,05

FIGURA 20. Efeito dos tratamentos com EGF e TGF-β na capacidade de invasão das células PANC-1 ao longo de 48 horas de tratamento

A concentração de TGF-β1 ou β2 empregada foi de 10 ng/mL e de EGF foi de 50 ng/mL. O asterisco indica a diferença entre os grupos avaliados, e a linha com barras laterais indica o grupo comparado.

4.2 MARCAÇÃO ISOTÓPICA DA LINHAGEN CELULAR PANC-1 SUBMETIDA À EMT COM AMINOÁCIDOS EM CULTURA CELULAR (SILAC)

Como a linhagem celular PANC-1 foi a única capaz de desenvolver uma resposta biológica à adição dos fatores de crescimento mencionadas anteriormente, esta foi selecionada para dar continuidade a nossos experimentos proteômicos de larga escala. Assim, para aplicação de uma estratégia proteômica quantitativa, foi necessário marcar as células PANC-1 que iriam ser submetidas a nossos tratamentos usando a estratégia SILAC (Marcação isotópica estável com aminoácidos em cultura celular) (Ong et al., 2012).

A linhagem PANC-1 foi crescida tal como se descreve na seção 3.9 de materiais e métodos e os extratos proteicos celulares obtidos por cada “passagem” ou geração foram analisados para avaliar o grau de incorporação do aminoácido lisina ($^{13}\text{C}_6$). Para a verificação da incorporação do isótopo pesado de lisina nas proteínas de PANC-1, realizamos uma rápida análise por MRM das primeiras três gerações, monitorando um fragmento de massa 906,45 correspondente ao peptídeo triptico da proteína actina beta (HQGVMVGMGQK (+2) – $m/z = 586,3$). Assim definimos a transição $583,3 > 906,45$ para o peptídeo contendo o aminoácido lisina natural, e a transição $586,3 > 912,45$ foi utilizada para detectar o peptídeo que já incorporou o aminoácido pesado, isotopicamente marcado ($^{13}\text{C}_6$ Lys)(ion+2 $m/z = 589,3$). Os métodos utilizados para preparo de amostra e análise estão descritos na seção 3.12 de materiais e métodos.

Conforme pode ser observado na Figura 21, já a partir da segunda passagem, a quantidade do peptídeo contendo o aminoácido lisina natural já é bastante baixa em comparação com o peptídeo contendo o aminoácido pesado. Na terceira passagem, apenas traços (<3%) do peptídeo natural são detectados. Além disso, pode-se observar que já na terceira passagem em meio SILAC, a razão para uma mistura de células crescidas no meio leve e pesado já se aproxima de 1:1. Portanto, estes resultados demonstraram que a linhagem celular PANC-1 pode ser crescida e marcada isotopicamente pela estratégia SILAC e que gerações após a terceira estão prontas para serem submetidas ao tratamento de indução da EMT. Para garantir a estabilidade da linhagem, as células foram expandidas até a quinta geração para nossos experimentos posteriores.

Após crescer as células até a quinta geração, estas foram submetidas aos tratamentos de indução da EMT que indicaram as maiores alterações funcionais, moleculares e morfológicas. Foram escolhidos dois tratamentos de indução da EMT os quais seguiram o mesmo modelo de cultura apresentado na Figura 22. O primeiro tratamento, denominado a partir daqui como EXPERIMENTO 1, constituiu em tratar as células PANC-1 após jejum de soro com EGF 50 ng/mL e TGF- β 1 10 ng/mL por 72 horas. No segundo tratamento, denominado a partir daqui como EXPERIMENTO 2, foi usado EGF 50 ng/mL e TGF- β 2 10 ng/mL por 48 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata (par-reverso), conforme apresentado na Figura 22.

FIGURA 21. Monitoramento de incorporação de isótopos no peptídeo de Actina Beta humana

O método desenvolvido monitora o peptídeo tríptico da proteína actina beta HQGVMVGMGQK (+2) através das transições 583,3>906,45 (peptídeo leve) e 586,3>912,45 (peptídeo pesado). O experimento utilizou gradiente de separação de 3 a 25% de acetonitrila em 12 minutos, em coluna C18 (1 x 150mm), utilizando o sistema Acquity UPLC- Xevo TQS (Waters).

FIGURA 22. Modelo de cultura das células PANC-1 crescidas no meio SILAC a serem submetidas à indução da EMT

As células PANC-1 foram crescidas até a quinta geração de depletadas de soro por 16 h antes de ser tratadas. Controle= sem adição de citocinas; Tratado = adição de EGF e TGF- β segundo o tipo de experimento (1 ou 2)

4.3 ESTUDO PROTEÔMICO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA LINHAGEM CELULAR PANC-1

4.3.1 Fracionamento celular e de proteínas

Para a análise detalhada das modificações do proteoma durante o processo da EMT em câncer de pâncreas (PanCa), utilizamos a abordagem denominada gel-LC-MS, baseada nas análises de peptídeos provenientes do fracionamento de proteínas pertencentes a cada compartimento celular em SDS-PAGE (Faça et al., 2007). Portanto, terminado o tempo da indução da EMT em cada experimento, foram obtidos quatro extratos celulares proteicos, para os quais foi determinada a concentração de proteínas (tabela 10). Depois, os extratos foram misturados equitativamente, obtendo-se duas replicatas, a primeira contendo o extrato celular sem tratamento (controle) procedente de meio SILAC leve (Lys $^{12}\text{C}_6$) e extrato celular submetido ao tratamento procedente de meio SILAC pesado (Lys $^{13}\text{C}_6$), enquanto a segunda replicata era composta de extrato celular sem tratamento (controle) procedente de meio SILAC pesado (Lys $^{13}\text{C}_6$) e extrato celular submetido a tratamento procedente de meio SILAC leve (Lys $^{12}\text{C}_6$). Esta estratégia de replicatas também é denominada de replicata de par reverso (Figura 23). Tanto a replicata 1 como a 2 foram enriquecidas em frações contendo proteínas de membrana, citoplasma e núcleo tal como se descreve na Figura 3 obtendo no final seis frações por cada experimento (Tabela 3, Tabela 11).

Para o fracionamento em gel, foram carregados 50 µg de proteínas das frações citoplasmática e nuclear e 30 µg da fração de membrana, que foram separadas por SDS-PAGE tal como se observa na Figura 24. Os géis foram processados conforme o descrito na seção de materiais e métodos e como se observa na Figura 24. No total, foram obtidas 72 frações, 36 por cada experimento as quais foram preparadas para sua posterior análise por LC-MS/MS. Entretanto, devido a problemas técnicos, para o experimento 1 somente foram analisadas 24 frações para o experimento, correspondentes às frações citoplásmicas e nucleares. No caso do experimento 2, foram analisadas as 36 frações obtidas, sendo 12 frações para cada compartimento celular (citoplasma, núcleo e membrana).

FIGURA 23. Esquema de processamento para a obtenção das replicatas de par reverso SILAC

Replicata 1 = mistura do extrato celular controle (sem tratamento), marcadas com Lys ¹²C₆ (Leve) e do extrato celular tratado (Experimento 1 ou 2) marcadas com Lys ¹³C₆ (pesada); Replicata 2 = mistura de extrato celular controle marcado com Lys ¹³C₆ (pesada) e extrato celular tratado marcado com Lys ¹²C₆ (leve).

TABELA 10. Concentrações de proteínas totais dos extratos celulares obtidos após indução da EMT na linhagem PANC-1 crescida no meio SILAC

NOME DA REPLICATA	TIPO DE MISTURA	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
		CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (µg/µl)	
Replicata 1	CONTROLE PESADO	4,48	1,03
CtH/TxL	TRATADO LEVE	6,23	1,72
Replicata 2	CONTROLE LEVE	5,29	1,04
CtL/TxH	TRATADO PESADO	5,33	1,22

* CtH/TxL = mistura 1:1 do controle pesado com tratado leve; CtL/TxL = mistura 1:1 do controle leve com tratado pesado

TABELA 11. Concentrações das amostras aplicadas no gel para SDS-PAGE após fracionamento celular

	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS µg/µl					
	Fração Citoplasmática		Fração Nuclear		Fração de Membrana	
	Rep 1	Rep2	Rep 1	Rep 2	Rep1	Rep2
EXPERIMENTO 1	6,47	7,51	8,43	7,55	1,60	1,44
EXPERIMENTO 2	1,23	1,38	1,40	1,62	1,18	0,93

FIGURA 24. Géis do fracionamento das células PANC-1, crescidas em meio-SILAC e induzidas à EMT

Foram usados géis de poliacrilamida, 10% Mini-PROTEAN® TGX™, BIORAD®. Na imagem A, Experimento 1; 1 = Núcleo, controle leve e tratamento pesado (CtL/TxH), 2= Núcleo, controle pesado e tratamento leve (CtH/TxL), 3 = Citoplasma, (CtL/TxH); 4 = Citoplasma, (CtH/TxL); 5 = Membrana, (CtL/TxH); 6= Membrana, (CtH/TxL). Na imagem B, Experimento 2; 1 = Núcleo, (CtL/TxH), 2= Núcleo, (CtH/TxL), 3 = Citoplasma, (CtH/TxL); 4 = Citoplasma, (CtL/TxH); 5 = Membrana, (CtL/TxH); 6= Membrana, (CtH/TxL). PM = peso molecular. As linhas contínuas indicam o esquema de corte do gel, gerando-se assim os fragmentos de 1 cm, ver seção de materiais e métodos.

4.3.2 Análise de dados obtidos por LC-MS/MS

As 60 frações obtidas a partir de nossa abordagem proteômica de gel-LC-MS/MS foram analisadas nas instalações da Central Analítica do Instituto de Química de São Carlos – USP e geraram mais de 800.000 espectros que foram adquiridos ao longo de 96 horas de corrida em um espectrômetro de massas Orbitrap Velos (Thermo Scientific).

Os dados obtidos foram analisados usando a plataforma LabKey Server (Nelson et al., 2011), processando as frações provenientes de cada raia do gel (ver Figura 24) como uma única fração. Desta forma os resultados foram agrupados em 10 conjuntos de dados, quatro pertencentes ao experimento 1 (2 frações nucleares e 2 citoplasmáticas) e seis do experimento 2 (2 frações nucleares, 2 citoplasmáticas e 2 nucleares). No total, foram

detectados aproximadamente 19.745 peptídeos nos dois experimentos proteômicos. Para a identificação das proteínas, usamos como critérios de qualidade um valor de acurácia ProteinProphet > 0,90 e não foram consideradas proteínas com menos de um peptídeo identificado. Com esses parâmetros, a taxa de erros na identificação de proteínas é inferior a 1%.

Para o experimento 1, foram identificadas aproximadamente 2.000 proteínas por compartimento celular, como se observa na Tabela 12. Ao comparar as proteínas identificadas nas frações de núcleo e citoplasma usando o programa Venny (Oliveros JC, 2007-2015), foi observado que 49% destas foram identificadas em ambos os compartimentos celulares, enquanto aproximadamente 20% eram exclusivas de cada compartimento (Figura 25A). Com respeito às proteínas quantificadas, observou-se que aproximadamente 56% apresentaram resultados dentro de nossos critérios de qualidade (Tabela 12) e, destas, 48% foram identificadas nos dois compartimentos estudados, 23% na fração citoplásmica e 29% na fração nuclear (Figura 25B).

TABELA 12. Número de proteínas identificadas e quantificadas no proteoma das células PANC-1 induzidas à EMT usando EGF 50 ng/ml e TGF- β 1 (Experimento 1)

	# Proteínas Identificadas	#Proteínas Quantificadas	%Proteínas Quantificadas
Total	3895	2176	55.9
Citoplasma	2038	1688	82.8
Núcleo	2242	1811	80.8

FIGURA 25. Diagrama de Venn representando a distribuição das proteínas nas frações citoplasmáticas e nucleares no experimento 1

A = representa a distribuição das proteínas totais identificadas no experimento 1; B = representa a distribuição das proteínas marcadas e quantificadas no experimento 1. O Software Venny foi usado para gerar a imagem, foram consideradas proteínas com ao menos um peptídeo identificado e um peptídeo quantificado, ProteinProhet > 0.90

Ao comparar as replicatas por compartimento celular, obtivemos na fração citoplasmática um total de 1.424 proteínas quantificadas em duplicata e 1.471 na fração nuclear, representando aproximadamente 89% das proteínas quantificadas (Tabela 13).

TABELA 13. Comparação das proteínas totais e quantificadas por compartimento celular e replicata das células PANC-1 induzidas à EMT usando EGF 50 ng/ml e TGF- β 1 (Experimento 1)

	# Proteínas Quantificadas Totais	#Proteínas Quantificadas Exclusivas	#Proteínas Quantificadas em duplicata	%Proteínas Quantificadas
Citoplasma				
Replicata 1	1552	128	1424	91,8
Replicata 2	1565	141		91,0
Núcleo				
Replicata 1	1636	165	1471	89,9
Replicata 2	1652	181		89,0

*Replicata 1: Controle Pesado/Tratado Leve; Replicata 2: Controle Leve/Tratado Pesado

No experimento 2, foi identificado um total de 3.200 proteínas. Cerca de 2.000 proteínas foram identificadas em cada compartimento celular, das quais aproximadamente 2.400 foram quantificadas, representando 75% das proteínas totais identificadas (Tabela 14). Das proteínas totais identificadas, 49% podem ser observadas nos três compartimentos celulares, enquanto aproximadamente 7-10% são exclusivas de cada compartimento celular (Figura 26A). Além disso, ao comparar as proteínas quantificadas, 46% foram identificadas nos três compartimentos e entre 8 e 11% das proteínas quantificadas eram exclusivas de um compartimento celular específico (Figura 26B).

Ao comparar as replicatas por compartimento celular, obtivemos na fração citoplasmática um total de 1.597 proteínas devidamente quantificadas em ambas as replicatas, 1.414 no compartimento nuclear e 1.616 na fração de membrana (Tabela 15), representando mais de 85% das proteínas totais quantificadas e identificadas no experimento 2.

A complementariedade de identificações e quantificações de proteínas, dentre os diferentes compartimentos (subproteomas) nos experimentos 1 e 2, mostra a importância do fracionamento celular para uma melhor cobertura do proteoma.

Os detalhes de todas as proteínas identificadas e quantificadas no presente estudo são apresentados no CD em anexo, Apêndice 1.

TABELA 14. Número de proteínas identificadas e quantificadas no proteoma das células PANC-1 induzidas à EMT usando EGF 50 ng/ml e TGF- β 2 10 ng/mL (Experimento 2)

	# Proteínas Identificadas	#Proteínas Quantificadas	%Proteínas Quantificadas
Total	3188	2404	75,4
Citoplasma	2341	1879	80,3
Núcleo	2272	1793	78,9
Membrana	2438	1754	71,9

FIGURA 26. Diagrama de Venn representando a distribuição das proteínas nas frações citoplasmática, nuclear e de membrana no experimento 2

A = representa a distribuição das proteínas totais identificadas no experimento 2; B = representa a distribuição das proteínas marcadas e quantificadas no experimento 2. O Software Venny foi usado para gerar a imagem, foram consideradas proteínas com ao menos um peptídeo identificado e um peptídeo quantificado, ProteinProhet > 0,90

TABELA 15. Comparação das proteínas totais e quantificadas por compartimento celular e replicata das células PANC-1 induzidas à EMT usando EGF 50 ng/ml e TGF- β 2 10 ng/mL (Experimento 2)

	# Proteínas Quantificadas Totais	#Proteínas Quantificadas Exclusivas	#Proteínas Quantificadas em duplicata	%Proteínas Quantificadas
Citoplasma				
Replicata 1	1723	126	1597	92,7
Replicata 2	1754	157		91,0
Núcleo				
Replicata 1	1658	244	1414	85,3
Replicata 2	1552	138		91,1
Membrana				
Replicata 1	1746	130	1616	92,6
Replicata 2	1773	157		91,1

*Replicata 1: Controle Pesado/Tratado Leve; Replicata 2: Controle Leve/Tratado Pesado

4.3.3 Análises das alterações do proteoma na EMT

Como resultado do uso da estratégia de análise proteômica detalhada e baseada no fracionamento celular, foi produzido um grande volume de dados, gerando-se extensas listas com aproximadamente 2.000 proteínas identificadas e quantificadas por cada compartimento celular estudado em cada experimento proteômico (Tabelas 12 e 14). Como descrito na seção de materiais e métodos, os dados foram filtrados, e a distribuição das razões das intensidades das proteínas marcadas com isótopos pesados pelas intensidades das amostras marcadas com isótopos leves (denotado H/L) foi avaliada (Figura 27A e 27B). Estas distribuições são esperadas com centro (moda) sobre o valor 0 (intensidades H/L =1), já que a maior parte do proteoma não deve variar durante a indução da EMT. Para o caso das frações nucleares tanto do experimento 1 como 2 cuja distribuição estava levemente deslocada do centro, estas foram normalizadas com respeito à moda. No caso do experimento 1, usou-se um coeficiente de correção de -0,028093 para a primeira replicata e de -0,410076 para a segunda; para o experimento 2, os coeficientes de correção foram de -0,41315 e -0,2409417 para a primeira e segunda replicata respectivamente (Figura 27C e 27D). Estes ajustes corrigem pequenos erros metodológicos decorrentes do processo de extração e mistura dos extratos proteicos.

Como apenas algumas proteínas identificadas sofrem grandes alterações de quantidade após a indução da EMT, para identificá-las foi estabelecido como fator de corte a razão tratado/controle maior a 1,5 para aquelas proteínas que sofreram aumento com respeito ao controle ("*upregulated*") e menor que 0,66 para aquelas proteínas que diminuíram com respeito ao controle ("*downregulated*"). Considerando os critérios mencionados anteriormente e lembrando que as frações nucleares tanto do experimento 1 como 2 foram normalizadas antes de proceder as análises. No total, foram obtidas para o experimento 1, 26 proteínas alteradas na fração citoplasmática e 23 na fração nuclear. Os dados correspondentes ao experimento 1 são apresentados nas Tabelas 16 e 17. Para o experimento 2, a fração citoplasmática evidenciou 20 proteínas alteradas, a fração nuclear 28 e a de membrana 13, detalhes sobre a quantificação em replicata dos experimentos 1 e 2 podem ser achados no apêndice 2 do CD em anexo.

FIGURA 27. Histogramas representando a distribuição das razões H/L na escala Log2 do experimento 1 e 2

(A) $\text{Log}_2(\text{H/L})$ da fração citoplasmática do experimento 1 tanto da replicata 1 (CctHtxL) como da replicata 2 (CctLtxH) sem normalizar, (B) $\text{Log}_2(\text{H/L})$ da fração citoplasmática do experimento 1, replicatas 1 e 2, após filtrar para conservar os peptídeos quantificados em comum. (C) $\text{Log}_2(\text{H/L})$ da fração nuclear do experimento 2, tanto da replicata 1 (NctHtxL) como da replicata 2 (NctLtxH) sem normalizar, (D) $\text{Log}_2(\text{H/L})$ da fração nuclear do experimento 2, replicatas 1 e 2, após normalização com respeito à moda.

Para visualizar graficamente as proteínas alteradas em ambos os experimentos e por compartimento celular, foram plotados gráficos de dispersão usando o $\log_2$ da razão controle/tratado de cada amostra e seu par reverso, tendo como eixo “X” a razão do controle pesado/tratado leve e no eixo “Y” a razão do controle leve/tratado pesado. Assim ficaram distribuídas as proteínas aumentadas ou “*upregulated*” no quadrante esquerdo superior e as diminuídas ou “*downregulated*” no quadrante direito inferior. Os gráficos gerados para os experimentos 1 e 2 são apresentados nas Figuras 28 a 30.

Com o objetivo de avaliar de uma forma mais exaustiva e gráfica as proteínas alteradas tanto no experimento 1 como 2, as listas de proteínas alteradas por cada compartimento celular analisado foram combinadas em uma única lista por experimento, as proteínas duplicadas foram removidas e os dados dos compartimentos remanescentes foram adicionados através de busca manual nas listas de proteínas geradas com o programa Perseus. Como resultado final, foi obtida uma lista para cada experimento onde se comparam as razões tratado/controle para todas as proteínas alteradas com respeito aos compartimentos celulares estudados. Assim, nossa lista final para análise detalhada para o experimento 1 contém 40 proteínas alteradas e para o experimento 2, 49 proteínas as quais estão listadas nas Tabelas 16 e 17. Para melhorar a visualização, os dados foram arranjados em forma decrescente com respeito à fração nuclear no experimento 1 e 2.

FIGURA 28. Distribuição das proteínas reguladas no Experimento 1, EGF 50 ng/mL e TGF- β 1 10 ng/mL por 72 h

O gráfico representa o Log_2 da razão Controle/Tratado da replicata e seu par reverso de cada proteína quantificada.

FIGURA 29. Distribuição das proteínas reguladas no Experimento 2, EGF 50 ng/mL e TGF- β 2 10 ng/mL por 48 h

O gráfico representa o Log₂ da razão Controle/Tratado da replicata e seu par reverso de cada proteína quantificada para a fração citoplasmática e de membrana.

FIGURA 30. Distribuição das proteínas alteradas observadas no Experimento 2, EGF 50 ng/mL e TGF-β2 10 ng/mL por 48 h

O gráfico representa o Log₂ da razão Controle/Tratado da replicata e seu par reverso de cada proteína quantificada na fração nuclear.

Como pode ser observado nas tabelas anteriores (Tabelas 16 e 17), existem proteínas alteradas em dois ou três dos compartimentos celulares analisados. A proteína ARMC9 contendo domínio LisH (ARMC9) ou a subunidade alfa da enzima prolil 4-hidroxilase-2 (P4HA2), no caso do experimento 1, e o inibidor do ativador de plasminógeno 1 (SERPINE1), no caso do experimento 2, apresentam regulação global durante a EMT. Entretanto, em outros casos, a regulação apresenta variações entre os compartimentos, como por exemplo no experimento 1 onde é observado que glicogenina-1 (GYG) e a proteína 1 de tipo Niban (FAM129B) estão aumentadas no citoplasma mas não no compartimento nuclear (Tabela 16), enquanto calponina 3 (CNN3) no experimento 2 está diminuída no compartimento citoplasmático e levemente aumentada na membrana (Tabela 17). Este comportamento pode estar relacionado a processos de translocação subcelular, mas que não puderam ser avaliados no presente estudo.

TABELA 16. Proteínas reguladas no experimento 1, usando EGF 50 ng/mL e TGF- β 1 10 ng/mL e suas respectivas distribuições nos compartimentos celulares analisados

GEN	PROTEÍNA	Log ₂ (Tratado/ Controle)	
		CITOPLASMA	NÚCLEO
PLOD2	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	1,32	1,58
P4HA2	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	1,20	1,58
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	1,92	1,46
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	1,21	1,38
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0,64	1,09
ARMC9	LisH domain-containing protein ARMC9	0,86	0,99
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	0,46	0,95
TP53I3	Quinone oxidoreductase PIG3	0,78	0,93
MRPL41	39S ribosomal protein L41, mitochondrial		0,91
HSPB1	Heat shock protein beta-1	0,63	0,90
PPP1R9B	Neurabin-2		0,85
CD109	CD109 antigen	0,64	0,85
PSMC1	26S protease regulatory subunit 4	-0,02	0,84
ERO1L	ERO1-like protein alpha	0,72	0,80
MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18	0,38	0,75
ITGA5	Integrin alpha-5		0,67
MAGED2	Melanoma-associated antigen D2	0,95	0,39
FAM129B	Niban-like protein 1	0,81	0,20
OSTF1	Osteoclast-stimulating factor 1	1,36	0,09
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	-0,78	0,08
UTRN	Utrophin	0,88	0,01
SDHA	Succinate dehydrogenase, mitochondrial	-1,09	-0,08
AGR2	Anterior gradient protein 2 homolog	-1,18	-0,21
ITGA6	Integrin alpha-6		-0,63
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1		-0,68
SQSTM1	Sequestosome-1		-0,79
PPL	Periplakin	-0,51	-0,82
FLOT1	Flotillin-1		-0,97
L1CAM	Neural cell adhesion molecule L1	-1,01	-1,15
MGMT	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase		-1,40
GPRC5A	Retinoic acid-induced protein 3		-1,48
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	1,70	
SAMHD1	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase	1,54	
TRMT11	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog	1,37	
AHSA1	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	1,10	
GYG1	Glycogenin-1	0,82	
MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	-0,68	
DPH1	Diphthamide biosynthesis protein 1	-0,96	
BCAM	Basal cell adhesion molecule	-1,20	
ZFAND5	AN1-type zinc finger protein 5	-1,27	

*As variações das cores verdes representam o grau de aumento com respeito ao controle, as cores amarelas representam câmbio nenhum entre o controle e o tratamento, enquanto as cores vermelhas representam o grau de diminuição com respeito ao controle. A cor cinza representa que não houve quantificação.

TABELA 17. Proteínas alteradas no experimento 2, usando EGF 50 ng/mL e TGF- β 2 10 ng/mL e suas respectivas distribuições nos compartimentos celulares analisados

GEN	PROTEÍNA	Log ₂ (Tratado/ Controle)		
		CITOPLASMA	NÚCLEO	MEMBRANA
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4	-0,03	2,04	-0,14
TBCD	Tubulin-specific chaperone D	0,37	1,98	0,59
SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	1,47	1,86	1,16
ITGB3	Integrin beta-3		1,73	1,18
UAP1	UDP-N-acetylgalactosamine	0,86	1,44	0,64
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	1,56	1,28	0,62
SLC29A1	Equilibrative nucleoside transporter 1		1,23	0,85
TGFB1	Transforming growth factor-beta-induced	0,94	1,18	0,87
SLC2A1	Solute carrier family 2, facilitated glucose		1,17	1,01
PTP4A2	Protein tyrosine phosphatase type IVA 2		1,08	
TGM2	Protein-glutamine gamma-	0,92	1,04	0,60
PGM2L1	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	0,53	1,04	0,34
CDK5	Cyclin-dependent-like kinase 5		1,04	
NT5E	5'-nucleotidase	0,71	1,04	0,98
CTPS1	CTP synthase 1	0,60	0,95	0,20
SMC3	Structural maintenance of chromosomes	-1,84	0,95	
ITGA5	Integrin alpha-5	0,40	0,93	0,78
LARS	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,14	0,85	0,23
ANPEP	Aminopeptidase N	0,41	0,84	0,67
GLS	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	0,86	0,80	0,82
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-	0,61	0,76	0,34
ITGA2	Integrin alpha-2	0,26	0,75	0,59
FLNA	Filamin-A	0,57	0,64	0,34
VIM	Vimentin	0,60	0,46	0,29
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,71	0,07	0,72
ERH	Enhancer of rudimentary homolog	0,24	-0,21	0,91
PADI2	Protein-arginine deiminase type-2	-0,66	-0,59	-0,36
L1CAM	Neural cell adhesion molecule L1	-1,07	-0,69	-0,60
PPL	Periplakin	-0,86	-0,75	-0,94
ALPP	Alkaline phosphatase Regan isozyme	-0,44	-0,85	-0,77
CDH1	Cadherin-1	-0,63	-0,87	-1,28
ITGB4	Integrin beta-4		-0,88	-0,55
ALPL2	Alkaline phosphatase Nagao isozyme	-0,44	-0,90	-0,63
CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	-0,54	-0,91	-0,43
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes	0,22	-1,10	
AGR2	Anterior gradient protein 2 homolog	-0,48	-1,19	-0,42
GOLIM4	Golgi integral membrane protein 4		-1,23	
ENG	Endoglin			0,78
PODXL	Podocalyxin			1,03
AMIGO2	Amphoterin-induced protein 2			1,75
STEAP3	Metalloreductase STEAP3			1,22
BPGM	Bisphosphoglycerate mutase	1,61		
LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-	1,53		
XPOT	Exportin-T	1,02		
PRRC2C	Protein PRRC2C	0,99		
PRKACA	cAMP-dependent protein kinase catalytic	0,73		-0,15
PTGR2	Prostaglandin reductase 2	-0,95		
PIP4K2C	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase	-0,96		
CNN3	Calponin-3	-1,25		0,48

*As variações das cores verdes representam o grau de aumento com respeito ao controle, as cores amarelas representam câmbio nenhum entre o controle e o tratamento, enquanto as cores vermelhas representam o grau de diminuição com respeito ao controle. A cor cinza representa que não houve quantificação.

4.4 ANÁLISE DE ONTOLOGIA GÊNICA DAS PROTEÍNAS ALTERADAS E IDENTIFICADAS NOS EXPERIMENTOS PROTEÔMICOS 1 E 2

Após concluídas as análises para determinar as proteínas diferencialmente expressas nas células PANC-1 submetidas à indução da EMT, as proteínas selecionadas (Tabelas 16 e 17) foram divididas em proteínas com abundâncias aumentadas (*“upregulated”*) ou diminuídas (*“downregulated”*) nos compartimentos celulares estudados. Estas proteínas foram analisadas de acordo com as ontologias gênicas das quais fazem parte. Para isto foi utilizado o software Panther (<http://www.pantherdb.org>) o qual nos forneceu listas de proteínas classificadas, segundo sua função molecular e os processos biológicos nos quais atuam e o software FunRich (<http://www.funrich.org>) para a análise funcional das proteínas reguladas cujas listas completas de análises se apresentam no CD em anexo (Apêndices 3 e 4).

4.4.1 Análise da função molecular e processos biológicos alterados durante a indução da EMT - experimento 1

Para o experimento 1, onde as células PANC-1 foram tratadas com EGF e TGF- β 1 por 72 horas, a busca pelas funções moleculares evidenciou que as proteínas reguladas apresentam como principal função a atividade catalítica, ou seja, trata-se de enzimas. Também foram identificadas funções de receptores, regulação de enzimas, atividade estrutural e transporte (Tabela 18). As proteínas envolvidas em cada uma destas funções são listadas na Tabela 18. Para uma análise mais detalhada da função molecular das proteínas reguladas, também foi realizada uma análise de enriquecimento das proteínas com abundâncias aumentadas ou diminuídas separadamente no citoplasma e no núcleo. Foram consideradas somente aquelas funções com significância estatística com um p-valor corrigido $\leq 0,05$ (Tabela 19).

Como pode se observar na Tabela 18, no experimento 1 tanto a atividade estrutural, relacionada com a matriz extracelular e o citoesqueleto, como a atividade catalítica são as principais representadas. Observando-se na análise de enriquecimento (Tabela 19) que

funções moleculares relacionadas com a atividade estrutural como, por exemplo, atividade procolágeno-lisina dioxigenase, estão aumentadas enquanto certas atividades catalíticas como a de succinato desidrogenase estão diminuídas de acordo o descrito na literatura sobre EMT (Aspuria et al., 2014; Lamouille; Xu e Derynck, 2014; Ye e Weinberg, 2015).

TABELA 18. Função molecular detalhada das proteínas reguladas no Experimento 1

Função Molecular	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Interação	9	25	Interação com ácidos nucleicos	MGMT; ZFAND5;MCM7; MRPL41
			Interação com proteínas	ZFAND5; ICAM1; SQSTM1; UTRN; PPL; AHSA1
Receptor	5	14		MCAM; L1CAM; GPRC5A; COL1A1; BCAM
Regulação de enzimas	1	3		AHSA1
Atividade estrutural	4	11	Constituinte estrutural da matriz extracelular	COL1A1
			Constituinte estrutural do citoesqueleto	UTRN; PPL
			Constituinte estrutural dos ribossomos	MRPL41
Atividade catalítica	15	42	Atividade helicase	MCM7
			Atividade hidrolase	L1CAM; MCM7; PSMC1
			Atividade oxidoreductase	P4HA1; P4HA2; AGR2; ERO1L; PLOD2; SDHA; PLOD1; TP53I3
			Atividade transferase	MAT2A; MGMT; MCM7
Transportador	2	6	Atividade de transportador transmembrana	STXBP1;COL1A1

(*) Número de hits = Número de genes que encaixam nas categorias avaliadas, pode existir redundância

TABELA 19. Funções moleculares enriquecidas baseadas nas proteínas reguladas no Experimento 1

Função Molecular	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
Aumentada			
Interação com ácido ascórbico	4	20	1,36E-06
Atividade procolágeno-lisina 5-dioxigenase	2	10	1,19E-04
Atividade procolágeno-lisina 4-dioxigenase	2	10	2,73E-04
Atividade oxidoreductase, incorporação de oxigênio	2	10	9,23E-04
Ligação a filamentos de actina	2	10	4,43E-02
Atividade ATPase ativadora de proteasoma	1	5	4,52E-02
Diminuída			
Atividade DNA metilado-[proteína]-cisteína S-metiltransferase	1	8	0,01
Atividade metionina adenosiltransferase	1	8	0,03
Atividade succinato desidrogenase	1	8	0,03
Atividade de receptor de laminina	1	8	0,02

A análise dos processos biológicos, representados pelas proteínas reguladas no experimento 1, indicou os processos metabólicos e celulares como os principais representados (Tabela 20). Na análise detalhada das proteínas envolvidas em cada processo destacado (Tabela 20), observam-se proteínas representando comunicação celular e ciclo celular e processos apoptóticos, todos estes relevantes para a EMT. Na análise de enriquecimento de todas as proteínas reguladas totais, observa-se que as proteínas reguladas acham-se principalmente enriquecidas em processos de adesão e reorganização da matriz extracelular, ver Figura 31, isto pode ser corroborado na análise de enriquecimento das proteínas aumentadas e diminuídas, ver Tabela 21.

TABELA 20. Processos biológicos detalhados das proteínas reguladas no Experimento 1

Função Biológica	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Organização dos componentes celulares/ Biogênese	1	1,30		UTRN
Processos celulares	17	22,40	Comunicação celular	ZFAND5; STXBP1; SQSTM1; L1CAM; MCAM; BCAM
			Ciclo celular	MCM2; L1CAM
			Outros	ICAM; UTRN; MGMT; PPL; PLOD2; DPH1; GPRC5A; PLOD1; MAGED2; COL1A
Localização	3	3,90	Transporte	STXPB1; ERO1L; COL1A1
Processos apoptóticos	2	2,60	Indução da apoptose	L1CAM
			Outros	MAGED2
Reprodução	1	1,30	Geração de gametas	MAGED2
Regulação biológica	4	5,30	Processos homeostáticos	AGR2; COL1A1
			Regulação de processos biológicos	SQSTM1
			Regulação de função molecular	AHSA1
Resposta a estímulo	6	7,90	Resposta a estímulo externo	SQSTM1
			Resposta a estresse	HSPB1; MGMT; AHSA1; COL1A1
			Outros	ICAM1
Processos de desenvolvimento	6	7,90	Morfogêneses de estrutura anatômica	UTRN; COL1A1
			Morte celular	L1CAM; MAGED2
			Desenvolvimento de ectoderma	MCAM; L1CAM; COL1A1; BCAM
			Desenvolvimento de mesoderma	L1CAM; COL1A1
			Desenvolvimento de sistemas	MCAM; L1CAM; BCAM
Processos multicelulares	5	6,60		ZFAND5; STXBP1; HSBP1; L1CAM; COL1A1

Função Biológica	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Adesão biológica	7	9,20	Adesão celular	PLOD2; L1CAM; PLOD1; BCAM; ITGA5; MCAM
			Outros	ICAM1
Processos metabólicos	20	26,30	Processos biossintéticos	DPH1
			Processos catabólicos	SQSTM1
			Geração de metabolitos	ZFNAD5; ERO1L; SDHA
			Processos metabólicos de	MGMT
			Processos metabólicos	ZFAND5; P4HA2; SQSTM1; MCM7; MRPL41; HSPB1; ERO1L; GYG1;
			Processos metabólicos de	AGR2
			Outros	PSMC1
Processos do sistema imunitário	4	5,30	Ativação de macrófagos	COL1A1
			Outros	HSPB1; L1CAM; AHSA1

(*) Número de hits = Número de genes que encaixam nas categorias avaliadas, pode existir redundância

FIGURA 31. Processos biológicos enriquecidos no Experimento 1

(*) p-valor corrigido pelo método de BH ou FDR

TABELA 21. Processos biológicos enriquecidos baseados nas proteínas reguladas no Experimento 1

Processo Biológico	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
Aumentado			
Organização da matriz extracelular	5	21,74	0,04
Processos celulares de modificação de proteína	3	13,04	0,04
Adesão células-substrato	2	8,70	0,05
Resposta celular a estímulo hormonal	2	8,70	0,05
Diminuído			
Adesão celular mediada por integrinas	2	13,33	0,01
Regulação positiva da ensambleção das junções celulares	1	6,67	0,04
Regulação positiva da produção de moléculas de adesão celular	1	6,67	0,04
Regulação positiva da adesão célula-célula mediada por caderina	1	6,67	0,04
Adesão célula-matriz	2	13,33	0,04
Regulação da tradução de sinais da proteína Ras	1	6,67	0,04
Regulação negativa da atividade do receptor ativado por EGF	1	6,67	0,04
Adesão celular	3	20,00	0,04
Regulação positiva da adesão célula-célula	1	6,67	0,04
Regulação positiva da adesão heterotípica célula-célula	1	6,67	0,04

4.4.2 Análise da função molecular e processos celulares alterados durante a indução da EMT - experimento 2

Na análise das proteínas reguladas no experimento 2, onde células PANC-1 foram tratadas com EGF e TGF- β 2 por 48 horas, todas as proteínas alteradas foram correlacionadas com sete funções moleculares: interação de fatores de transcrição aos ácidos nucleicos; interação, receptor, regulação enzimática, atividade estrutural e catalítica e de transportador,

sendo as funções mais abundantes as de atividade catalítica e de interação, ver Tabela 22. Com a finalidade de detalhar as funções moleculares das proteínas reguladas, foram também realizadas análises de enriquecimento com as proteínas aumentadas e diminuídas. Para essa análise, foram consideradas somente aquelas funções com um p-valor corrigido (FDR) $\leq 0,05$, ver Tabela 23. Assim também para experimento 1, funções relacionadas com a interação com a matriz extracelular e a síntese de colágeno estão aumentadas, mudanças descritas anteriormente como relacionadas com a EMT.

TABELA 22. Função molecular detalhada das proteínas reguladas no Experimento 2

Função Molecular	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Interação de fatores de transcrição com ácidos nucleicos	2	4,10	Interação de fatores de transcrição a sequências específicas de DNA	ERH; PRRC2C
Interação	13	26,50	Interação a íons de cálcio	LTBP2
			Interação a fosfolipídios dependente de cálcio	LTBP2
			Interação à cromatina	SCM3; SCM1A
			Interação a ácidos nucleicos	HNRNPM; SMC3; ERH; SMC1A; XPOT; PRRC2C
			Interação a proteínas	FLNA; LTBP2; TGFBI; PPL; TBCD; CNN3
			Outros	CDH1
Receptor	5	10,20	Atividade de receptor à citocina	ENG
			Atividade proteína quinase de receptor transmembrana	ENG
			Atividade de serina/treonina proteína quinase de receptor transmembrana	ENG
			Outros	RBBP4; ITGB4; L1CAM; ITGB3
Regulação enzimática	2	4,10	Atividade ativadora de enzima	TBCD
			Atividade inibidora de enzima	SERPINE1
Atividade estrutural	5	10,20	Constituinte estrutural de matriz extracelular	LTBP2
			Constituinte estrutural de citoesqueleto	FLNA; PPL; CNN3; VIM

Função Molecular	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Atividade catalítica	21	42,90	Atividade de regulação enzimática	SERPINE1; TBCD
			Atividade hidrolase	GLS; PTP4A2; SERPINE1; ANPEP; PADI2; SMC3; NT5E; SMC1A; L1CAM; TBCD; PRRC2C
			Atividade ligase	CTPS1
			Atividade oxidoreductase	PTGR2; AGR2; PLOD1
			Atividade transferase	PIP4K2C; TGM2; ENG; CDK5; UAP1; PGM2L1
			Outros	L1CAM; ANPEP;
Transportador	1	2,00	Atividade de transportador transmembrana	SLC29A1

(*) Número de hits = Número de genes que encaixam nas categorias avaliadas, pode existir redundância

TABELA 23. Funções moleculares enriquecidas baseadas nas proteínas reguladas no experimento 2

Função Molecular	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
Aumentada			
Interação com a matriz extracelular	2	6,06	2,78E-02
Atividade de mediador citoplásmico do receptor do TGF- β	1	3,03	3,47E-02
Atividade bisfosfoglicerato mutase	1	3,03	3,47E-02
Atividade CTP sintase	1	3,03	3,06E-02
Atividade procolágeno-lisina 5-dioxigenasa	1	3,03	3,01E-02
Diminuída			
Atividade fosfatase alcalina	2	18,18	2,86E-04
Interação com proteína ativadora de GTPase	1	9,09	3,34E-02
Interação com gamma-catenina	1	9,09	3,50E-02
Interação com receptor de EGF	1	9,09	4,30E-02

Na análise dos processos biológicos relacionados com as proteínas reguladas, observaram-se 11 termos, com proteínas também relacionadas a processos metabólicos e celulares, assim como descrito no experimento 1. A categoria principal observada (Tabela 24) foi a de processos de desenvolvimento, subdividida em desenvolvimento do ectoderma ou endoderma. Estes resultados correlacionam-se diretamente com o processo de EMT, de fundamental importância no desenvolvimento embrionário.

TABELA 24. Distribuição detalhada por processos biológicos das proteínas reguladas no Experimento 2

Função Molecular	Nº genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Organização dos componentes celulares/Biogênese	7	8,60	Biogênese de componentes celulares	TBCD
			Organização de componentes celulares	RBBP4; FLNA; SMC3; TGFBI; VIM; SMC1A; TBCD
Processos celulares	19	23,50	Comunicação celular	RBBP4; LTBP2; ITGB4; ENG; CDK5; L1CAM; ITGB3
			Ciclo celular	PTP4A2; SMC3; SMC1A; CDK5; L1CAM; PRKACA;
			Movimento de componentes celulares	FLNA
			Segregação de cromossomos	SMC3; SMC1A
			Outros	PIP4K2C; PPL; VIM; CDH1; PTP4A2; TGFBI; PLOD1; TBCD
Localização	2	2,50	Transporte	RBBP4; SLC29A1
Processos apoptóticos	1	1,20	Indução da apoptose	L1CAM
Regulação biológica	4	4,90	Processos homeostáticos	AGR2
			Regulação de processos biológicos	SERPINE1; ERH; TBCD
			Regulação da função molecular	SERPINE1; TBCD
Resposta a estímulo	2	2,50	Resposta a estímulos externos	ITGB4; ITGB3

Função Molecular	N° genes	% com respeito ao número de hits	Categoria GO	Gene
Processos de desenvolvimento	9	11,10	Morfogênese da estrutura anatômica	FLNA; VIM
			Morte	L1CAM
			Desenvolvimento de ectoderma	CRABP2; L1CAM
			Desenvolvimento de mesoderma	ENG; ALPP; L1CAM; CDH1; ALPPL2
			Desenvolvimento de sistemas	ENG; ALPP; L1CAM; CDH1; ALPPL2
			Outros	LTBP2
Processos multicelulares	4	4,90		L1CAM; CNN3; CDH1; PRKACA
Adesão biológica	6	7,40	Adesão celular	ITGB4; L1CAM; ITGA5; ITGB3; PLOD1
			Outros	ITGA5
Processos metabólicos	26	32,10	Processos catabólicos	TBCD
			Processos metabólicos de compostos de nitrogênio	TBCD
			Processos metabólicos de compostos contendo	PIP4K2C; TBCD; PGM2L1
			Processos metabólicos primários	RBBP4; GLS; PTP4A2; ANPEP; PIP4K2C; PADI2; PTGR2;
			Processos metabólicos de compostos de enxofre	AGR2
Processos do sistema imunitário	1	1,20		L1CAM

(*) Número de hits = Número de genes que encaixam nas categorias avaliadas, pode existir redundância

Considerando-se todas as proteínas reguladas conjuntamente, observa-se que os processos biológicos predominantes estão relacionados com a adesão e diferenciação celular (Figura 32), as quais estão predominantemente aumentadas (Tabela 25), fato já descrito por estar relacionado com a EMT (Ye e Weinberg, 2015). Além de observar o aumento da via de sinalização do receptor do TGF- β , coerente com nosso modelo de estudo onde TGF-B foi usado como um de nossos fatores de indução.

FIGURA 32. Processos biológicos enriquecidos pertencentes às proteínas reguladas no Experimento 2

(*) p-valor corrigido pelo método de BH ou FDR

TABELA 25. Processos biológicos enriquecidos baseados nas proteínas reguladas no Experimento 2

Função Biológica	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
Aumentada			
Organização da matriz extracelular	7	20,00	3,73E-03
Adesão celular	6	17,14	3,18E-02
Diferenciação celular de mesoderma	2	5,71	4,21E-02
Via de sinalização mediada por integrinas	3	8,57	3,83E-02
Secreção de proteína	2	5,71	3,71E-02
Hidroxilação de resíduos peptidil-lisina	1	2,86	3,84E-02
Angiogênese	4	11,43	3,82E-02
Vias de sinalização ativada por colágeno	1	2,86	3,84E-02
Estabelecimento da localização de proteínas	2	5,71	3,94E-02
Via de sinalização do receptor do TGF-β	3	8,57	4,23E-02
Regulação negativa da adesão celular	2	5,71	4,43E-02
Diminuída			
Defosforilação	2	14,29	3,58E-02
Montagem das junções celulares	2	14,29	4,16E-02
Regulação da desmontagem de cromatina	1	7,14	3,67E-02
Citrulação de proteína	1	7,14	3,46E-02

4.5 ANÁLISE DE REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

A análise das redes de interação entre as proteínas diferencialmente expressas em nossos dois experimentos foi feita fazendo uso do banco de dados on-line *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING). Com a finalidade de observar a maior quantidade de interações entre as proteínas reguladas identificadas com certo grau de confiança, usamos para nossa busca o parâmetro de grau de interação mínimo de $\geq 0,400$. Como se pode observar (Figura 33), no experimento 1, composto por 40 proteínas reguladas com um coeficiente de agrupamento ("*clustering*") = 0,714, existem duas redes de proteínas bastante definidas. A rede 1 encontra-se relacionada com processos de organização da matriz extracelular ligados à sinalização de integrinas e à formação de colágeno (setas verdes). Estes processos foram também evidenciados pela análise de ontologia gênica apresentada anteriormente. A rede 2 relaciona-se principalmente com a regulação da apoptose, assim como processos de formação de vesículas. Esses processos celulares foram corroborados na base de dados "*Reactome Pathway Database*" (<http://www.reactome.org/>) assim, como a participação das proteínas não reguladas que não apareceram agrupadas em nossa rede, mas que estão localizadas dentro do grupo de processos de organização da matriz.

Para o experimento 2 (Figura 34), usamos os mesmos parâmetros, observou-se que para as 48 proteínas reguladas e analisadas, e um coeficiente de agrupamento de 0,712, existe também uma correlação principalmente com os processos de organização da matriz extracelular entre os quais se destacam as integrinas e outras proteínas relacionadas com a adesão celular como CDH1 e COL1A1. Ao mesmo tempo nossa rede central irradia-se e liga-se a outras proteínas que formam parte de outros processos biológicos como desenvolvimento do mesoderma (PRKACA) e morfogêneses (CDK5) e processos do metabolismo de ribonucleósidos de pirimidina, NTE5, CTPS1 e ERH (Processo Biológico GO:0006213). Outros grupos aparentemente governados por nossa rede central são a reorganização do fuso mitótico (GO:0007052) que ao mesmo tempo encontra-se relacionado com a maquinaria de splicing alternativo (GO:0000380), HNRPNM; o metabolismo de compostos contendo fosfato (GO: 006796) englobando as proteínas NTE5; ALPPL2, ALPP, UAP1, PGML2, ERH, PRKACA, CDK5 que se apresentam em diversas ramificações vinculadas a nossa rede central

especificamente com ITGA2. Mais uma vez, os dados de interação proteína-proteína se destacam.

FIGURA 33. Rede de interações entre as proteínas reguladas na resposta ao tratamento com EGF + TGF β 1

Rede calculada utilizando a ferramenta STRING. Os grupos de moléculas delimitados pelas linhas tracejadas vermelhas representam as principais redes alteradas durante a EMT das células PANC-1. As setas verdes indicam subprocessos levados a cabo na rede. As proteínas que não superaram nosso coeficiente de agrupamento de 0,714 foram excluídas do gráfico para melhorar a visualização.

FIGURA 34. Rede de interações entre as proteínas reguladas na resposta ao tratamento com EGF +TGF β 2, Experimento 2

Rede calculada utilizando a ferramenta STRING. Os grupos de moléculas delimitados pelas linhas tracejadas vermelhas representam a rede principal alterada durante a EMT das células PANC-1. As setas laranja representam processos biológicos diferentes dos da rede principal, ver texto para descrição detalhada. A rede tem um coeficiente de agrupamento de 0,712 e aquelas que não superaram este critério foram excluídas do gráfico para melhorar a visualização.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS PROTEÍNAS REGULADAS

Com o intuito de filtrar mais rigorosamente as proteínas reguladas destacadas por nossos experimentos proteômicos, usamos como ferramenta de análise estatística programa Perseus. Assim, avaliamos de forma individual todas as proteínas identificadas e quantificadas em duplicata por cada fração celular estudada, criando “vulcano plots” através da diferença do teste T (“T-Test Difference”) frente ao $-\log$ do p valor no teste T (“-Log T-test p-value”). De todas as proteínas avaliadas, foram detectadas 20 proteínas usando como valor de corte valor $p \leq 0,05$ (Figura 35).

FIGURA 35. Proteínas reguladas estatisticamente significativas na transição epitélio-mesenquimal.

(A) Distribuição das proteínas identificadas e quantificadas da fração citoplasmática no Experimento 2, os pontos e nomes em vermelho indicam as proteínas reguladas significativas (B) Distribuição das proteínas identificadas e quantificadas da fração nuclear no Experimento 1, os pontos e nomes em vermelho indicam as proteínas reguladas e significativas

Após criar as listas das proteínas reguladas, estas foram comparadas com as listas apresentadas nas seções anteriores. Como era de esperar, estas listas de proteínas reguladas filtradas estatisticamente encontram-se dentro das listas principais das proteínas reguladas tanto no experimento 1 como no experimento 2. Ao comparar as listas de proteínas reguladas

do experimento 1 e 2, somente foi encontrada uma proteína em comum, PLOD1, a qual encontra-se aumentada em ambos os experimentos. Para conhecer a expressão das proteínas reguladas nos dois experimentos proteômicos, foram comparados os log2 das razões (H/L) das replicatas por cada fração celular analisada, ver Figura 36. A fração de membrana não foi incluída no gráfico, visto que foi analisada apenas no experimento 2.

FIGURA 36. Comparação por compartimento celular das proteínas reguladas na indução da EMT

A variação das tonalidades das cores indica a variação do aumento ou diminuição da expressão da proteína na escala Log2. As cores vermelhas indicam diminuição da expressão ($\text{Log}_2(\text{H/L}) \leq -0,59$) enquanto as cores verdes indicam aumento da expressão ($\text{Log}_2(\text{H/L}) \geq 0,59$). Os asteriscos indicam proteínas cuja expressão é similar nos dois experimentos.

Através do gráfico (Figura 36), evidenciamos que as proteínas CRABP2, PLOD1, SERPINE1, PADI2 são alteradas tanto por EGF (50 ng/ml) e TGF-β1 (10 ng/mL) quanto por EGF

(50 ng/ml) e TGF- β 2 (10 ng/mL). Sendo as mesmas evidenciadas mediante imunoistoquímica em tecido de adenocarcinoma de pâncreas (Figura 37). Estas proteínas são, portanto, alvos interessantes para estudos de ativação/inibição da EMT em células PANC1.

FIGURA 37. Imunoistoquímica em tumores de câncer de pâncreas das proteínas identificadas na análise proteômica da indução da EMT

(A) PLOD1-citoplasma/membrana média intensidade; (B) CRABP2 –citoplasma/ núcleo/ membrana média intensidade; (C) SERPINE1 – citoplasma média intensidade; (D) PADI2 – citoplasma/membrana média intensidade. Todas as imagens foram reproduzidas do “The Human Protein Atlas” <http://www.proteinatlas.org/>

4.7 ANÁLISE PRELIMINAR DO FOSFOPROTEOMA NA INDUÇÃO DA EMT

4.7.1 Padronização da técnica ERLIC para enriquecimento de fosfopeptídeos

Com a finalidade de estudar a ativação das proteínas relacionadas com a EMT nos momentos iniciais do tratamento, foi feita a análise temporal do fosfoproteoma da indução da EMT sob a adição de TGF- β 1 (10 ng/mL). Para isto, foi empregada a técnica de enriquecimento de fosfopeptídeos ERLIC adaptada para trabalhar em escala analítica para enriquecer amostras na escala dos miligramas. Para padronização, inicialmente foram enriquecidas 4 mg de extrato celular de PANC-1 sem tratamento e as frações obtidas no

sistema ERLIC foram analisadas em corridas rápidas por LC-MS/MS para identificar aquelas com maior número de fosfopeptídeos. Como pode se observar na Figura 38, da fração 2 até a 30 foram observados os fosfopeptídeos enriquecidos de nossa amostra, considerando que após a fração 26 a quantidade dos mesmos diminuía bastante. Entretanto, foi na fração 6 onde os fosfopeptídeos começavam a aparecer em maior abundância (Figura 44b), selecionando-se assim as frações 6 até a 26 para análise do fosfoproteoma.

FIGURA 38. Distribuição dos fosfopeptídeos após enriquecimento com ERLIC do extrato celular digerido de PANC-1

(A) Distribuição total dos fosfopeptídeos ao longo da corrida cromatográfica, todas as frações foram purificadas usando *spin-tips* RP-SPE C18 (B) Comparação da distribuição dos fosfopeptídeos frente aos peptídeos não fosforilados das frações 1 a 6, os fosfopeptídeos foram extraídos mediante troca iônica (SCX) usando Hypersep™ *spin-tips* para evitar a perda de fosfopeptídeos devido a sua baixa abundância com respeito aos peptídeos não fosforilados. Foram digeridos aproximadamente 4mg de material. O tempo de corrida foi de 30 minutos. Os fosfopeptídeos identificados possuem um nível de confiança PhosphoRS $\geq 90\%$.

4.7.2 Obtenção e análise dos dados do fosfoproteoma

A análise do fosfoproteoma resultante da indução da EMT sob o efeito do TGF- β 1 foi realizada em triplicata, para dois pontos de tempo, 15 e 60 minutos. Conforme descrito na seção 3.13.1, a marcação isotópica SILAC-3plex permitiu essa comparação de controle vs. 2 tempos de tratamento em um único experimento. Para isto, as frações enriquecidas em fosfopeptídeos correspondentes a cada replicata (ver Tabela 4) foram analisadas por LC-MS/MS, sendo no total 63 corridas analisadas, dando um tempo de análise líquido de 82.5 horas, número estimado de espectros coletados (~10.000 por hora). Este imenso volume de dados resultou na identificação de 5.965 fosfopeptídeos não redundantes (4.384 fosfopeptídeos para a replicata 1, 2.040 para a replicata 2 e 2.768 para a replicata 3) correspondendo a um total de 2.250 fosfoproteínas analisadas. De todos os fosfopeptídeos observados, 2.053 foram quantificados ao menos em duas replicatas, aumentando a significância dos dados. Assim, no geral foram identificados 61 fosfopeptídeos regulados pertencentes a 55 fosfoproteínas (Figura 39). Como se observa, os peptídeos foram agrupados segundo o tempo de estimulação e organizados de forma decrescente, usando como referência o log2 da razão tratamento (15 ou 60 min)/controle (T0). Caber ressaltar que certas proteínas tais como AHNK e CTNND1 apresentaram mais de um fosfopeptídeo regulado (Figura 39).

Adicionalmente, foram realizadas análises de função molecular e processo biológico como descrito nos estudos anteriores (Tabela 26), observando-se que as alterações do fosfoproteoma estavam bastante relacionadas com processos de regulação do mRNA. Isto foi corroborado pela análise de interação de redes, usando STRING (Figura 40) onde se observam duas redes de proteínas, sendo a rede 1 enriquecida principalmente em funções relacionadas com metabolismo de ácidos nucleicos e o processamento do RNA, enquanto a rede 2 com uma variedade de funções relacionadas principalmente à localização de proteínas e à organização de organelas. Portanto, esta análise preliminar do fosfoproteoma também evidencia que mesmo nos momentos iniciais da indução da EMT, vias importantes relacionadas às funções da célula com características mesenquimais já estão ativadas.

FIGURA 39. Fosfopeptídeos regulados após a adição de TGF-B1 10 ng/mL por 15 e 60 minutos nas células PANC-1

Os * denotam os genes que apresentaram diferentes sequências de fosfopeptídeos alterados. A letra p minúsculo e em vermelho nos nomes das sequências denota o sítio de fosforilação na sequência. As cores vermelhas indicam redução da expressão, enquanto as verdes indicam aumento.

Dado que as fosforilações são modificações pós-traducionais dinâmicas que indicam possíveis ativações *downstream* a via de sinalização da proteína envolvida, uma busca das

fosfoproteínas reguladas em nosso estudo frente à base de dados KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) foi feita. Presilinin-1 (PSEN1) foi achada na via de sinalização do WNT (ko04310) relacionada diretamente com β -catenina cuja alteração e característica da EMT foram descritas anteriormente. CTNND1 (Catenin delta-1) relacionada com as junções aderentes (ko04520) especificamente interagindo com caderina, cuja regulação está intimamente ligada à EMT. EXOC4 (*Exocyst complex component 4*) relacionada com as junções celulares (ko04530). ACIN1 (*Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus*) e SRRM1 (*Serine/arginine repetitive matrix protein 1*) relacionadas com a via de vigilância de mRNA (ko03015) encarregada do controle de qualidade dos mRNA produzidos na célula. Porém, muitas das proteínas reguladas em nosso estudo não foram relacionadas com uma via de sinalização descrita nessa base de dados.

TABELA 26. Análise de enriquecimento por função biológica e molecular do fosfoproteoma

Função Biológica	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
Regulação negativa da poliadenilação de mRNA	3	6,12	3,87E-03
Monoubiquitinação de histona	3	6,12	3,17E-03
Resposta celular ao estímulo do dano do DNA	7	14,29	2,93E-03
Processamento da forquilha de replicação	3	6,12	6,02E-03
Regulação positiva da ubiquitinação de histona H2B	2	4,08	1,06E-02
Regulação positiva do estabelecimento da localização celular na membrana plasmática	3	6,12	1,24E-02
Ativação da atividade GTPase	3	6,12	1,21E-02
Ubiquitinação da histona H2B	2	4,08	1,81E-02
Regulação positiva da reciclagem de receptores	2	4,08	2,71E-02
Regulação positiva do splicing de mRNA, mediante spliceosoma	2	4,08	2,66E-02
Função Molecular	Nº de genes	% de genes	p-valor corrigido (método de BH)
União a poli(A) RNA	14	26,92	9,08E-03

células tratadas com TGF- β 2 são mais resistentes à apoptose, quando comparadas com o tratamento com DMSO. Ainda o tratamento combinado com EGF + TGF- β 2 aumenta ainda mais a resistência à morte. Estes resultados corroboram os resultados proteômicos e confirmam dados da literatura que indicam a resistência ao tratamento com agentes apoptóticos de células metastáticas.

FIGURA 41. Porcentagem de morte celular em células PANC-1 após a indução à EMT. Foi empregada uma concentração de TGF-B2 10 ng/mL e de EGF 50 ng/mL.

5 DISCUSSÃO

O câncer de pâncreas caracteriza-se por apresentar uma alta heterogeneidade tumoral e plasticidade celular, fato pelo qual se optou inicialmente por usar em nosso modelo de estudo da transição epitélio-mesenquimal dois tipos de linhagens celulares com diferenças nos genes-chaves participantes na progressão tumoral em PDAC. Assim, as duas linhagens possuíam mutações ativadoras no gene K-Ras e inativadores no gene CDKN2A. PANC-1 possuía mutações inativadoras no gene p53, mas não CAPAN-2 e ambas linhagens não apresentavam alterações no gene DPC4/SMAD4 (Deer et al., 2010). Além das características genéticas, as duas linhagens usadas procediam de pacientes com sobrevida bastante diferente. Enquanto para PANC-1 a taxa de sobrevida foi de aproximadamente 3 meses para CAPAN-2 a sobrevivência foi de quase 6 anos (Deer et al., 2010), o que além de nos indicar que as linhagens vieram de etapas diferentes da progressão tumoral, poderia também indicar diferentes respostas na indução da EMT.

Estudos da EMT em diferentes modelos celulares de câncer têm sido descritos (Gonzalez e Medici, 2014), seja mediante a ativação dos fatores de transcrição ligados à EMT como SNAIL (Nishioka et al., 2010) ou HIF-1 (Ye et al., 2016), a ativação de vias de sinalização relacionadas com a mesma (Fender AW et al., 2015) ou mediante a adição de citocinas ou fatores de crescimento (Li et al., 2012; Borthwick et al., 2012). O câncer de pâncreas não tem sido exceção, usando-se, por exemplo, a superexpressão SNAIL (Nishioka et al., 2010) ou NF- κ B (Maier et al., 2010), ou a adição de fatores de crescimento como TGF β (Ellenrieder et al., 2001) ou PDGF-BB (Su et al. 2013) como indutores da EMT. Assim, a escolha do TGF- β como indutor da EMT em nosso estudo foi feita com base em referências de estudos relacionados com a EMT e TGF- β (Kim et al., 2015; Ellenrieder V et al., 2001). Entretanto, no caso do EGF, apesar de ter sido descrito como indutor em outros tipos de câncer, como, por exemplo, ovário (Cheng; Auersperg e Leung, 2012) e próstata (Bhat et al., 2014), sua função como fator desencadeante da EMT não foi ainda descrita para PDAC. Dado seu papel como promotor da invasão regulada por MMP2 em PDAC (Binker et al. 2009), além de ativador do seu receptor (EGFR) como passo-chave na progressão tumoral desencadeada por K-Ras (Navas et al., 2012), e que sua falta inibiria a EMT (Chang et al., 2012) motivaram a escolha deste fator de

crescimento para nosso estudo. De fato, o EGF já tem sido descrito como fator intensificador da EMT desencadeada por TGF- β (Buonato; Lan e Lazzara, 2015).

Como a indução da EMT depende da sinalização através de várias vias de sinalização desencadeadas pela ligação dos fatores de crescimento escolhidos aos seus respectivos receptores, decidimos inicialmente testar o funcionamento dos receptores para TGF- β e EGF em nossas linhagens celulares. Com este objetivo, procedemos a avaliar as fosforilações de proteínas *downstream* da cascata de sinalização. No caso do TGF- β , foram analisadas as proteínas SMAD2/SMAD3 e para EGF o receptor (EGFR) fosforilado. Uma vez que estudos prévios da EMT em PanCa já haviam descrito a concentração de TGF- β 10 ng/ml para a indução da EMT (Ellenrieder V et al., 2001), usamos esta concentração como referência para nossos experimentos. Ao invés de usar somente a isoforma 1 (TGF- β 1) para todos nossos experimentos, decidimos usar também a isoforma 2 (TGF- β 2), já que a expressão das duas isoformas tem sido relacionada com prognósticos menos favoráveis no câncer gástrico (Ma et al., 2013). Para o EGF, a ausência de concentrações de referência na literatura nos fez testar diferentes concentrações que variaram desde os 10 ng/mL até 100 ng/mL.

Nas células PANC-1, tanto a ação do TGF- β 1 como TGF- β 2 conseguiram fosforilar o dímero SMAD2/3 (Figura 4), comprovando neste caso que a via de sinalização do TGF- β *downstream* dependente de SMAD estaria ativa (Gonzalez e Medici, 2014). Entretanto, em CAPAN-2 não foi observado o mesmo efeito (Figura 7), sugerindo que mesmo não possuindo alterações no gene DPC4/SMAD4 e possuindo o dímero SMAD 2/3 intrínseco à via do TGF- β dependente de SMAD, o TGF- β poderia estar exercendo algum efeito mediante a via independente, mas que não pudemos verificar.

No caso do EGF, foi mostrado que concentrações baixas como 10 ng/mL já conseguiam ativar o receptor (Figura 5). Entretanto, o grau de ativação avaliado através da intensidade da banda (ver Figura 6) mostrava que a ativação máxima foi conseguida a partir de 30 ng/mL. Porém, nesta concentração, a ativação não foi constante, observando-se que aos 5 minutos era maior que aos 15, sendo máxima aos 30 minutos. A concentração de EGF de 50 ng/mL possuía um aumento da intensidade menor que a concentração de 30 ng/mL, porém esse aumento era gradual, ao longo do tempo (Figura 6). Assim, considerando que a concentração de 50 ng/mL permitiria uma ativação gradual do seu receptor ao longo do tempo, decidimos

usar esta para nossos estudos. Com respeito à linhagem CAPAN-2 (Figura 8), tanto a concentração de 50ng/mL como de 100 ng/mL mostram ativação do receptor, apesar de em menor intensidade quando comparada àquela observada para PANC-1.

Com as concentrações de nossos indutores escolhidas, procedemos a nossa primeira tentativa de avaliar se estes fatores eram capazes de ativar o processo de EMT. Como se observa na Figura 9, a linhagem PANC-1 sofreu uma mudança fenotípica característica da EMT (Ye e Weinberg, 2015), começando a adquirir um formato de tipo mesenquimal a partir das 24 horas de tratamento, o que se estendeu por um período de 72 horas. A simples visualização ao microscópio não permitiu diferenciar se TGF- β 1 ou β 2 causava maior ou menor mudança morfológica das células. Além disso, se observou que as células tratadas apenas com EGF não foram capazes de mudar sua morfologia para adquirir um formato mais mesenquimal, enquanto o tratamento conjunto com TGF- β 1 ou 2 promoveu este processo, fato que poderia ser relacionado ao efeito intensificador do EGF na EMT relacionada à ativação por TGF- β (Buonato; Lan e Lazzara, 2015). Infelizmente, a linhagem CAPAN-2 não respondeu às nossas tentativas de indução da EMT com TGF- β e EGF (Figura 10), mesmo que ainda fosse prolongando o tratamento por 96 horas, sendo que a morfologia epitelial não foi alterada. Este fato poderia ser relacionado ao fato de que mesmo estando ativa a via de sinalização do EGF, esta por si só não foi eficiente na ativação de fatores de transcrição *downstream* responsáveis pela EMT, como acontece durante a indução por TGF- β (Borthwick et al., 2012), já que nesta linhagem não foi possível uma clara ativação da via de sinalização do TGF- β dependente de SMAD. Além disso, estes diferentes efeitos dos fatores de crescimentos usados, se devem certamente ao fato de que mesmo as duas linhagens sendo derivadas de PDAC, PANC-1 vem de um tipo de câncer mais agressivo que CAPAN-2, corroborando-se este fato com a sobrevida do paciente cujo tumor foi fonte das células empregadas. Também não podemos descartar o papel das diferentes mutações importantes para a progressão tumoral que as duas linhagens apresentam (Deer et al., 2010).

A EMT (transição epitelial-mesenquimal) é um processo complexo, no qual convergem diversas vias de sinalização que levam ao aumento da expressão de certos conjuntos de proteínas e à diminuição de outros, fazendo que as células cancerosas percam suas características epidermais e adquiram características mesenquimais (Ye e Weinberg, 2015; Thiery e Sleeman, 2006), como as propriedades invasivas que culminam com a disseminação

do tumor. É assim que o aumento da expressão ZEB-1, repressor transcripcional de CDH1, produz uma diminuição dos níveis de E-caderina, enfraquecendo assim as interações célula-célula e produzindo um aumento nuclear da concentração da β -catenina que regula a coordenação da adesão celular e atua como fator de transcrição pela via Wnt/ β -catenina (Schmalhofer; Brabletz e Brabletz, 2009). A desregulação da β -catenina, em conjunto com outros fatores de transcrição tais como SNAIL e SLUG, também com expressão aumentada durante este processo, disparam a EMT, promovendo a expressão de proteínas que conferem características de suas congêneres mesenquimais, como o aumento de N-caderina (CDH2), proteína de membrana expressa em células mesenquimais, e o de vimentina (VIM), proteína dos filamentos intermediários expressa em células mesenquimais (Lamouille; Xu e Derynck; 2014).

Considerando-se essas alterações moleculares, para poder distinguir quais condições de indução da EMT foram mais eficientes, monitorou-se o aumento dos níveis de Vimentina, N-caderina, β -catenina e ZEB-1 e diminuição dos níveis de E-caderina. Em nossa análise baseada (Figura 11), usamos marcação com anticorpos contra a proteína de interesse, considerando que a avaliação do aumento ou a diminuição da intensidade das bandas com respeito aos respectivos controles se faz de modo semiquantitativo. Como controle interno, foi sempre utilizada a marcação com β -actina, proteína do citoesqueleto celular cuja concentração não se altera durante a EMT e deve ser constante sempre que se carregue uma mesma concentração de amostra. Como se observa (Figura 11), não existem grandes diferenças dos níveis de Vimentina entre os diferentes tratamentos. Ao mesmo tempo se observa aumento de intensidade de banda de N-caderina, apesar da diferença entre os tratamentos não ser evidente (Figura 11). No caso de SNAIL e Claudina-1, se observa maior intensidade nos tratamentos com TGF- β 2 e TGF- β 2 + EGF, quando comparado aos tratamentos com TGF- β 1 e EGF + TGF- β 1. Baseando-se nesses resultados, o TGF- β 2 parece ter um maior efeito na indução da EMT, quando comparado ao TGF- β 1. Estes resultados são interessantes uma vez que o efeito das isoformas do TGF- β na EMT e no câncer tem sido recentemente explorado em PDAC e em outros tipos de câncer (Kimura et al., 2013; Ma et al., 2013; Gao et al., 2014).

Os processos celulares como a EMT são dinâmicos, onde cascatas de sinalização são ativadas e desativadas, conforme os estímulos extracelulares, para poder conseguir a

homeostase celular com o propósito de garantir sua sobrevivência (Gonzalez e Medici, 2014). Neste contexto e considerando que a ativação dos respectivos receptores para TGF- β e EGF em nosso modelo celular já é evidenciada a partir dos 5 minutos de contato ligando-receptor, decidimos testar como estes fatores de crescimentos afetavam as células ao longo do tempo. Para isto, decidimos testar dois pontos de tempo 24 e 48 h e contrastar o fenótipo sob microscópio com a expressão das proteínas relacionadas à EMT. Assim, como pode se observar (Figuras 12 e 13), a resposta de PANC-1 ao tratamento com TGF- β 1 ou 2 leva à expressão reduzida de E-caderina após 48 h de tratamento, enquanto outras como SNAIL, Vimentina e β -catenina mostraram maior expressão já após 24 h de tratamento. EGF por sua vez (Figuras 14 e 15) não foi capaz de reduzir os níveis de E-caderina, sendo de fato observado um aumento em relação ao controle e também não elevou os níveis de SNAIL. Já a utilização da combinação TGF- β 1 ou TGF- β 2 com EGF elevou os níveis de SNAIL em até em 12 vezes, valores bem acima dos observados para os tratamentos com os fatores de crescimento individualmente. Esses resultados mais uma vez indicaram que o EGF tem um efeito intensificador na indução da EMT e estaria ligado ao papel do EGFR na progressão tumoral de PDAC (Navas et al., 2012; Buonato et al. 2015).

Em mamíferos existem três isoformas de TGF- β (1, 2 e 3), com identidade de sequência de aminoácidos de 70 a 80%, mas com diferente expressão *in vivo*, dependente do momento do desenvolvimento e tecido, como, por exemplo, na embriogênese (Wu e Hill, 2009) ou no câncer, onde a expressão de certas isoformas tem sido relacionada com estádios mais ou menos avançados (Ma et al., 2013). No câncer de pele, a expressão do TGF- β 1 tem sido associada com estados mais diferenciados enquanto o está associado TGF- β 2 a células altamente invasivas e malignas (Gold et al., 2000). Em osteosarcoma, o TGF- β 1 tem sido relacionado com a promoção da migração e invasão celular (Li; Li e Cheng, 2014). Já no PanCa, o aumento da expressão de TGF- β já havia sido relacionado com prognósticos menos favoráveis, especialmente a isoforma TGF- β 2 em estágios mais invasivos (Friess et al., 1993). Recentemente, TGF- β 2 tem sido relacionado com um potencial invasivo mediado por HOXA2 no PanCa (Cui et al., 2013), enquanto TGF- β 1 tem sido relacionado com o desencadeamento da EMT (Liu et al., 2013) e como possível indicador de risco de PDAC (Jacobs et al., 2014). Portanto, pode-se inferir que as isoformas do TGF- β no contexto do câncer têm um papel particular dependendo do tipo de câncer e do estadiamento tumoral, aplicando-se o mesmo

para o PDAC onde a função específica de cada tipo de isoforma na evolução do câncer ainda está sendo estudada.

Assim, para caracterizar melhor nosso modelo de indução da EMT com respeito ao efeito das isoformas de TGF- β e o possível efeito potenciador da EMT do EGF, decidimos avaliar como os diferentes tratamentos de indução à EMT afetavam as propriedades de migração e invasão das células PANC-1. Como se observa (Figura 17), o TGF- β 1 ou 2 sem adição de EGF não afetou as propriedades de migração intrínsecas de PANC-1, enquanto o tratamento conjunto com EGF teve um efeito significativamente maior (Figura 19). O EGF aparentemente provocou uma alteração da migração significativa, mas este pode estar relacionado ao aumento da taxa de duplicação celular e não a um efeito de migração. Com respeito às propriedades de invasão, pode-se observar que as células PANC-1 possuíam características intrínsecas de migrar que foram levemente aumentadas ao tratamento com EGF e TGF- β 2 (Figura 20).

Considerando todos esses dados apresentados e discutidos, podemos inferir que em nosso modelo de estudo a ação conjunta do TGF- β e EGF desencadeia um processo de transdiferenciação nas células PANC-1 cujas mudanças fenotípicas iniciam as 24 horas, e que podem ser mantidas até por 72 horas. Além disso, estas mudanças fenotípicas estão acompanhadas de mudanças ao nível de expressão das proteínas marcadoras da EMT, entre os quais destacam-se a diminuição de E-caderina e o aumento do fator de transcrição SNAIL. Acompanhando estas mudanças fenotípicas e proteicas, se observa ainda um aumento na capacidade de migração e invasão das células tratadas. Concluímos que tais modelos representam a indução da EMT. Além disso, como as duas isoformas de TGF- β empregadas demonstraram ser capazes de ativar o processo da EMT, e o tratamento conjunto com EGF e TGF- β 1 ou 2 parece ser mais eficiente na indução da EMT, decidimos investir em análises proteômicas utilizando as duas condições.

Empregamos na análise proteômica uma estratégia de fracionamento para permitir a identificação e quantificação de proteínas de mais baixa abundância e uma maior cobertura do proteoma. O fracionamento subcelular também permite o acompanhamento da expressão diferencial de proteínas em locais distintos da célula, como núcleo, citoplasma e membrana em nosso caso. Apesar de não explorado neste estudo, a análise destes subproteomas

permitiria a identificação e quantificação de processos de translocação subcelular de proteínas, que também estão envolvidos no processo de EMT, como já descrito acima para a proteína β -catenina. Dessa forma, tivemos bons resultados expressos através do grande número de proteínas identificadas e quantificadas que permitiram evidenciar a regulação de proteínas de média/baixa abundância, durante o processo da EMT.

Nas duas análises proteômicas do Experimento 1 (indução da EMT por EGF + TGF- β 1), do Experimento 2 (indução da EMT por EGF + TGF- β 2), pudemos observar muitas proteínas pertencentes a diferentes processos biológicos alterados. Destacamos, dentre estas, aquelas proteínas integradas em redes enriquecidas principalmente com processos de reorganização da matriz extracelular e regulação da adesão celular (Figuras 33 e 34 e Tabelas 21 e 25). Resultados similares também já foram descritos em estudos prévios, relacionando EMT e câncer (Keshamouni et al.; 2006; Keshamouni et al., 2009). Essas mudanças produzidas pela adição de EGF e TGF- β podem ser observadas após 48 h e são mantidas até as 72 h após a adição do agente indutor. É interessante ressaltar que, no caso do experimento 1, observa-se aumento de enzimas relacionadas ao metabolismo do colágeno (PLOD2, PLOD1, P4H2) como a expressão de um tipo de colágeno (COL1A1). O aumento da expressão de P4H2 e COL1A1 já tem sido descrito no câncer de mama como fatores relacionados com mau prognóstico clínico, assim como a progressão tumoral e metástases (Xiong G. et al., 2014), mas cujo papel no desenvolvimento do câncer ainda precisa ser estudado mais profundamente. De fato, por se tratar de proteína secretada, o aumento de COL1A1 deveria ser muito mais evidente se o meio condicionado das células tivesse sido também explorado em nossos estudos.

Outras proteínas não diretamente relacionadas com nossa rede de interação principal, mas que já têm sido identificadas como proteínas candidatas importantes para o processo de progressão tumoral, foram também identificadas no nosso estudo. AGR2 é um antígeno de superfície tumoral relacionado com a promoção do desenvolvimento tumoral (Dumartin et al., 2011) e cujas concentrações são elevadas em plasma de pacientes com câncer comparadas com a de pacientes sem a doença (Makawita et al., 2011), podendo assim servir como um potencial biomarcador para diagnóstico do câncer. MARCKS é uma proteína miristoílda identificada como possível biomarcador em câncer de pulmão (Hanada et al., 2013) e está relacionada com as capacidades migratórias e invasivas no câncer de fígado (Song et al., 2015). Outro fato que chamou atenção em nossos dados foi o aumento da expressão de OSTF1 (fator

1 estimulante de osteoclastos), o qual não tem sido descrito na bibliografia com referência ao câncer de pâncreas, porém outro fator estimulante de osteoclastos (MIP-1) cuja secreção por parte de células de carcinoma renal tem sido vinculada com a metástase óssea (Kominsky et al., 2008), portanto, o papel dessa proteína na EMT e consequentemente na metástase merece ser considerado para futuras pesquisas. Outras proteínas de igual interesse identificadas foram CNN3 e PODXL que como ALPP e ALPP2 são consideradas possíveis biomarcadores de outros tipos de câncer (Bukowczan et al., 2014; Dua et al., 2015; Laitinen et al., 2015; Nakarai et al., 2015) porém também participam de funções específicas na matriz celular, e sua expressão tem sido relacionada com a regulação mediante microRNAs (Liu e Jin, 2016; Chijiwa et al., 2016).

Outra categoria relevante de proteínas identificada em nossos estudos e relacionada com a organização de matriz celular e a adesão celular são as integrinas. Diferenças interessantes foram identificadas neste caso, pois enquanto no experimento 1 (EGF/TGF- β 1), observaram-se o aumento de ITGA5 e a diminuição de ITGA6, no experimento 2 (EGF/TGF- β 2) podem-se observar o aumento de ITGB3, ITGA2 e ITGA5 e a diminuição de ITGB4. Porém, contrário ao descrito na literatura, na qual o aumento da expressão de ITGB4 tem sido ligado com a EMT, tendo sido inclusive proposto como marcador de prognóstico em PDAC, em nossos estudos na linhagem celular PANC-1, ITGB4 encontra-se diminuído (Masugi et al., 2015). De maneira similar se apresenta ITGA2, a qual se encontra aumentada no câncer de próstata e é relacionada com um aumento na migração celular (Chin et al., 2015), embora no câncer de cólon, a diminuição da sua expressão foi relacionada com aumento da migração celular (Ferraro et al., 2014). Ainda, o aumento de ITGA2 em conjunto com a ação do colágeno de tipo I tem sido relacionado com características mesenquimais e expressão de marcadores de tipo de células-tronco (Kirkland, 2009). No caso de ITGB3, uma redução na sua expressão tem sido vinculada com inibição da capacidade proliferativa, invasiva e de migração em câncer de pulmão (Ni R. et al, 2015). De maneira geral, a classe de integrinas tem papel fundamental na EMT, assim como evidenciado em nossos dados. Estudos detalhados desta classe de proteínas também merece atenção, visto que diferenças sutis entre as isoformas das integrinas e os diversos tipos de câncer são descritas na literatura.

As análises bioinformáticas também evidenciaram alterações significativas em processos metabólicos das células. Dentre algumas proteínas desta classe identificadas em nossos experimentos, chama atenção a proteína PADI2, envolvida em processos de citrulação de proteínas e cuja diminuição na expressão em câncer de cólon, assim como observado em nosso experimento 2 (EGF/TGF- β 2), tem sido relacionada com um mau prognóstico (Cantariño N. et al., 2016). Outra proteína identificada como diminuída durante a EMT, CRABP2, tem sido destacada como marcador do câncer de próstata (Okuducu A.F. et al, 2005), pois sua função está relacionada com a inibição do crescimento tumoral (Vreeland A.C. et al., 2014).

Além dos estudos de alterações globais do proteoma descritos acima, também investimos em um detalhado estudo de alterações dos padrões de fosforilação de proteínas, durante a EMT. Modificações pós-traducionais como a fosforilação governam muitas das vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral. Além disso, o controle pós-traducional é independente de alterações dos níveis de expressão de muitas proteínas, não sendo possível estudá-lo simplesmente medindo níveis de expressão gênica ou proteica. Nossos estudos das alterações do fosfoproteoma, durante as etapas iniciais de indução da EMT, utilizaram uma estratégia bastante moderna (SILAC 3-plex) e que permitiu analisar dois diferentes estágios (15 e 60 min). Apesar de ainda preliminar, devido ao grande volume e complexidade dos dados obtidos, nossa análise fosfoproteômica demonstrou a regulação temporal de mais de 50 proteínas.

Algumas proteínas identificadas em nosso estudo já têm sido recentemente descritas na literatura como envolvidas em várias etapas da progressão tumoral e nos mais diversos tipos de cânceres, apesar da implicância no processo da EMT ainda não ter sido explicitada (Williams; McNeilly e Coppolino et al., 2014; Greuber et al., 2013). A proteína RAB3GAP1, proteína cuja fosforilação aumenta ao longo do estímulo por TGF- β 1 tem sido associada com o processo de autofagia (Spang et al., 2014.), processo necessário para o crescimento tumoral no câncer de pâncreas (Yang et al., 2011). Outra proteína interessante é a THRAP3, descrita por promover a resistência celular frente a agentes de dano ao DNA (Beli et al., 2012) e ao mesmo tempo como encarregada pela função moduladora do splicing alternativo de pré-mRNA (Sato T., et al. 2014), e cujo aumento da fosforilação já tem sido descrito como associado ao crescimento celular independente de andrógenos no câncer de próstata (Ino Y. et al. ,2016).

Merece destaque aqui também a proteína ABL2, pertencente à família Abelson (ABL) de proteínas tirosina-kinases sem função de receptor, que com a proteína ABL1 estão associadas com a tradução de sinais extracelulares relacionados com a proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular. Mesmo ABL1 tendo sido descrita primeiro como um oncogene indutor de leucemia, ABL2 tem chamado a atenção dos pesquisadores como alvo terapêutico, dado seu aumento de expressão em tumores sólidos e seu papel constitutivamente ativo na metástase de tumores sólidos (Greuber et al., 2013). Finalmente, a proteína AHNAK, a qual em nosso estudo apresentou três diferentes peptídeos fosforilados de expressão claramente diminuída, tem sido descrita como um regulador negativo do crescimento celular e como supressor tumoral ligado à via de sinalização do TGF- β (Lee et al., 2014).

De maneira geral, nosso estudo proteômico e fosfoproteômico pode elucidar diversas proteínas envolvidas no processo de EMT. Várias destas já foram descritas na literatura como importantes na própria EMT ou em estágios diferentes de progressão tumoral, suportando os nossos dados obtidos através da plataforma proteômica. Entretanto, como todo estudo em larga escala, muitas proteínas identificadas como diferencialmente expressas ou diferencialmente fosforiladas não têm ainda apoio na literatura, sendo assim de fundamental importância estender os estudos para associá-las com processos relevantes para o tratamento ou diagnóstico do câncer. Fica evidente, portanto, que nosso estudo contribui com potenciais novos alvos associados à EMT, e eventualmente importantes para o controle e inibição da metástase do câncer de pâncreas e dos demais adenocarcinomas.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi implementado um modelo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) em cultura para a linhagem celular PANC1, derivada de adenocarcinoma de câncer de pâncreas. Duas combinações de tratamentos, utilizando isoformas de TGF- β e EGF, acarretaram mudanças fenotípicas e de níveis de expressão de proteínas marcadoras da EMT, além de aumentar as propriedades intrínsecas de migração e, em menor escala, de invasão das células, confirmando assim a indução do fenótipo esperado da EMT.

Na análise proteômica, em primeiro lugar, conseguimos marcar metabolicamente as células PANC-1 pela estratégia SILAC. Utilizando uma abordagem de fracionamento de proteínas para aumentar a qualidade dos dados proteômicos, obtivemos extratos subcelulares contendo separadamente proteínas de superfície, proteínas nucleares e proteínas citoplasmáticas provenientes de frações intactas que foram subsequentemente separadas por SDS-PAGE. Foram desenvolvidos dois experimentos proteômicos completos com coleta de dados por espectrometria de massas de alta resolução, acoplados à cromatografia líquida (LC-MS/MS), para duas condições de indução (EGF + TGF- β 1 e EGF + TGF- β 2). Em paralelo, foi executado com sucesso um experimento de análise das alterações temporais do fosfoproteoma, durante os estágios iniciais da EMT.

As análises proteômicas e fosfoproteômica resultaram na identificação de mais de 5.000 proteínas e 6.000 sítios de fosforilação, todos com as devidas replicatas, garantido excelente qualidade dos resultados. Através de análise bioinformática, foram evidenciados processos celulares e proteínas envolvidas na EMT e na reorganização da matriz extracelular, maquinaria de apoptose e metabolismo. Vários desses processos bem como as proteínas que os compõem já foram correlacionados com a progressão do câncer de pâncreas ou de outros tipos de adenocarcinomas. Muitas outras proteínas identificadas podem representar potenciais novos alvos para inibição da EMT, controle da metástase, ou para auxiliar no diagnóstico da doença.

7 REFERÊNCIAS

ACHYUT, B. R.; YANG, L. Transforming growth factor- β in the gastrointestinal and hepatic tumor microenvironment. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1167-78, oct. 2011.

ADAM, R.M. et al. Rapid preparation of nuclei-depleted detergent-resistant membrane fractions suitable for proteomics analysis. **BMC Cell Biology**, v. 9, n.1, p. 1471-2121, 5 jun. 2008.

ARDITO, C.M. et al. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 22, n. 3, p. 304-17, 11 set. 2012.

ASPURIA, P.J. et al. Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. **Cancer and Metabolism**, v. 2, p. 2049-3002, 15 dez. 2014.

BACHMAN, K. E.; PARK, B. H. Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. Tumor promoter. **Current Opinion in Oncology**, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan. 2005.

BAILEY, P. et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 47-52, 3 mar. 2016.

BALLEHANINNA, U.K., CHAMBERLAIN, R.S. Biomarkers for pancreatic cancer: promising new markers and options beyond CA 19-9. **Tumour Biology** v. 34, n.6, p. 3279-92, dec. 2013.

BALLEHANINNA, U.K., CHAMBERLAIN, R.S. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence based appraisal. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 3, n.2, p. 105-19, jun. 2012.

BELI, P. et al. Proteomic Investigations Reveal a Role for RNA Processing Factor THRAP3 in the DNA Damage Response. **Molecular Cell**, v. 46, n. 2, p. 212-25, 27 abr. 2012.

BENDALL, S.C. et al. Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1587-97, set. 2008.

BHAT, F.A. et al. Quercetin reverses EGF-induced epithelial to mesenchymal transition and invasiveness in prostate cancer (PC-3) cell line via EGFR/PI3K/Akt pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1132-9, nov. 2014.

BINKER, M.G. et al. EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 2, p. 445-50, 6 fev. 2009.

BORTHWICK, L.A. et al. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Driven Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is Accentuated by Tumour Necrosis Factor α (TNF α) via Crosstalk Between the SMAD and NF- κ B Pathways. **Cancer Microenvironment**, v. 5, n. 1, p. 45-57, abr. 2012.

- BUKOWCZAN, J. et al. Regan isoenzyme of alkaline phosphatase as a tumour marker for renal cell carcinoma. **Annals of Clinical Biochemistry**. v. 51, n. 5, p. 611-4, set. 2014.
- BUONATO, J.M., LAN, I.S., LAZZARA, M.J. EGF augments TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition by promoting SHP2 binding to GAB1. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 21, p. 3898-909, 1 nov. 2015.
- BURKHART, J.M. et al. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1454-62, 2 fev. 2012.
- CANCER RESEARCH UK (2016). Cancer Statistics for UK. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/pancreatic-cancer>>. Acesso em: Março, 2016
- CANTARIÑO, N. et al. Downregulation of the Deiminase PADI2 is an Early Event in Colorectal Carcinogenesis and Indicates Poor Prognosis. **Molecular Cancer Research**, pii: molcanres.0034.2016, 8 jun. 2016. In Press
- CHAN, A. et al. Validation of biomarkers that complement CA19.9 in detecting early pancreatic. **Clinical Cancer Research**; v. 20, n. 22, p. 5787-95, 15 nov. 2014.
- CHANG, Z.G. et al. Suppression of the epidermal growth factor receptor inhibits epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer PANC-1 cells. **Digestive Diseases and Sciences**, vol. 57, n. 5, p.1181-9, maio 2012.
- CHENG, J.C., AUERSPERG, N., LEUNG, P.C. EGF-induced EMT and invasiveness in serous borderline ovarian tumor cells: a possible step in the transition to low-grade serous carcinoma cells? **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34071, 2012.
- CHIJIIWA, Y. et al. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 4, p.1688-1700, abr. 2016.
- CHIN, S.P. et al. Regulation of the ITGA2 gene by epigenetic mechanisms in prostate cancer. **Prostate**, v. 75, n. 7, p. 723-34, maio 2015.
- COLABUFO, N. A. et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors and multidrug resistance: perspectives. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 1811-23, 1 jan. 2011.
- COLLISSON, E.A. et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. **Nature Medicine**, vol. 17, n. 4, p. 500-3, abr. 2011.
- COX, J.; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. Annual review of biochemistry, v. 80, p. 273-99, jun. 2011.
- CROFT, D. et al. The Reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Research**. V. 42 (Database issue), p. D472-7, jan. 2014.
- CUI, X.P. et al. HOXA10 promotes cell invasion and MMP-3 expression via TGF β 2-mediated activation of the p38 MAPK pathway in pancreatic cancer cells. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 7, p. 1442-51, jul. 2014.

- DAVID, C.J. et al. TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT. **Cell**, v. 164, n. 5, p. 1015-30, 25 fev. 2016.
- DEER, E.L. et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. **Pancreas**, v. 39, n. 4, p. 425-35, maio 2010.
- DUA, P. et al. ALPPL2 Aptamer-Mediated Targeted Delivery of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine to Pancreatic Cancer. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 180-7, ago. 2015.
- DUMARTIN, L. et al. AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D. **Cancer Research**, v. 71, n. 22, p. 7091-102, 15 nov. 2011.
- ELLENRIEDER, V. et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. **Cancer Research**, v. 61, n. 10, p. 4222-8, 15 maio 2001.
- FAÇA, V.M. et al. A mouse to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e123, 10 jun 2008a.
- FAÇA, V.M. et al. Contribution of protein fractionation to depth of analysis of the serum and plasma proteomes. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 9, p. 3558-65, set. 2007.
- FAÇA, V.M. et al. In-depth proteomics to define the cell surface and secretome of ovarian cancer cells and processes of protein shedding. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 728-30, 1 fev. 2009.
- FAÇA, V.M. et al. Proteomic analysis of ovarian cancer cells reveals dynamic processes of protein secretion and shedding of extracellular domains. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2425, 18 jun. 2008b.
- FALASCA, M.; KIM, M.; CASARI, I. Pancreatic cancer: current research and future directions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n. 2, p. 123-132, 12 jan. 2016.
- FENDER, A.W. et al. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 11, p. 2517-27, nov. 2015.
- FERRARO, A.; BONI, T.; PINTZAS, A. EZH2 regulates cofilin activity and colon cancer cell migration by targeting ITGA2 gene. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115276, 30 dez. 2014.
- FRIESS, H. et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. **Gastroenterology**, v. 105, n. 6, p. 1846-56, dez. 1993.
- GAO, J. et al. TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p.72, 9 set. 2014.
- GOLD, L.I. et al. TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 5, p. 579-88, abr. 2000.

GONZALEZ, D.M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. **Science Signaling**, vol. 7, n. 344, p. re8, 23 set. 2014.

GREUBER, E.K. et al. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. **Nature Reviews. Cancer**, v. 13, n. 8, p. 559-71, ago. 2013.

HANADA, S. et al. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. **Cancer Biomarkers: section A of Disease Markers**, v. 13, n. 4, p. 289-98, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 4 mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 7 jan. 2000.

HANASH, S. M.; PITTERI, S. J.; FACA, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 571-9, 3 abr. 2008.

HANASH, S.; TAGUCHI, A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 9, p. 652-60, set. 2010.

HIDALGO, M. et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. **Pancreatology**, v. 15, n. 1, p. 8-18, jan – fev. 2015.

HUANG, M. et al. EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. **Oncogene**, v. 31, n. 22, p. 2783-93, 31 maio 2012.

INO, Y. et al. Phosphoproteome analysis demonstrates the potential role of THRAP3 phosphorylation in androgen-independent prostate cancer cell growth. **Proteomics**, v. 16, n. 7, p. 1069-78, abr. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, INCA (2016a). Estimativa 2016. Incidência do câncer no Brasil. <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: junho, 2016

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, INCA (2016b). Câncer de pâncreas. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>>. Acesso em: junho, 2016.

JACOBS, E.J. et al. Serum transforming growth factor- β 1 and risk of pancreatic cancer in three prospective cohort studies. **Cancer Causes and Control**, v. 25, n. 9, p. 1083-91, set. 2014.

JONES, S. et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1801-6, 26 set. 2008.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, jun 2009.

KAMISAWA, T. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, pii: S0140-6736(16)00141-0, 29 jan. 2016. In press.

- KATSUNO, Y., LAMOUILLE, S., DERYNCK, R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 1, p. 76-84, jan. 2013.
- KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383-92, 15 out. 2002.
- KESHAMOUNI, V.G. et al. Differential protein expression profiling by ITRAQ-2D-LC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 5, p. 1143-54, maio 2006
- KESHAMOUNI, V.G. et al. Temporal quantitative proteomics by ITRAQ 2D-LC-MS/MS and corresponding mRNA expression analysis identify post-transcriptional modulation of actin-cytoskeleton regulators during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 1, p. 35-47, jan 2009.
- KIM, S. et al. Elevated TGF- β 1 and - β 2 expression accelerates the epithelial to mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 151-8, set. 2015.
- KIMURA, C. et al. Endothelium-dependent epithelial-mesenchymal transition of tumor cells: exclusive roles of transforming growth factor β 1 and β 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4470-81, out. 2013.
- KIRKLAND, S.C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 2, p. 320-6, 21 jul. 2009.
- KOMINSKY, S.L. et al. Macrophage inflammatory protein-1 delta: a novel osteoclast stimulating factor secreted by renal cell carcinoma bone metastasis. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1261-6, 1 mar 2008.
- LAITINEN, A. et al. Podocalyxin as a Prognostic Marker in Gastric Cancer. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145079, 16 dez. 2015.
- LAMOUILLE, S.; XU J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178-96, mar. 2014,
- LEE, I.H. et al. Ahnak functions as a tumor suppressor via modulation of TGF β /Smad signaling pathway. **Oncogene**, v. 33, n. 38, p. 4675-84, 18 set. 2014.
- LI, C.W. et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p.1290-300, 1 mar. 2012.
- LI, F.; LI, S.; CHENG, T. TGF- β 1 promotes osteosarcoma cell migration and invasion through the miR-143-versican pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 2169-79, 2014.
- LIANG, C.C., PARK, A.Y., GUAN J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, p. 329 – 333, 1 mar. 2007.

- LIU, Q. et al. Gli1 promotes transforming growth factor-beta1- and epidermal growth factor-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. **Surgery**, v. 158, n. 1, p. 211-24, jul. 2015.
- LIU, R.; JIN, J.P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. **Gene**, v. 585, n. 1, p. 143-53, 1 jul. 2016.
- LOROCH, S. et al. Multidimensional electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) for quantitative analysis of the proteome and phosphoproteome in clinical and biomedical research. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1854, n. 5, p. 460-8, maio 2015.
- MA, G.F. et al. Transforming growth factor- β 1 and - β 2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54249, 2013.
- MACGREGOR-DAS, A.M.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.A. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 107, n. 1, p. 8-14, jan. 2013.
- MAIER, H.J. et al. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 295, n. 2, p. 214-28, 28 set. 2010.
- MAKAWITA, S. et al. Integrated proteomic profiling of cell line conditioned media and pancreatic juice for the identification of pancreatic cancer biomarkers. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 10, p. M111.008599, out. 2011.
- MASSAGUÉ, J. TGF-beta in cancer. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 215-30, Jul 2008.
- MASUGI, Y. et al. Upregulation of integrin β 4 promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. 2015. **Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 95, n. 3, p. 308-19, mar. 2015.
- MELO, S.A. et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 177-82, 9 jul. 2015.
- MERZAK, A. et al. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. **Br J Cancer**, v. 70, n. 2, p. 199-203, ago. 1994.
- MI, H.; THOMAS, P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. **Methods in Molecular Biology**, v. 563, p.123-140, 2009.
- MILACIC, M. et al. Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in Reactome. **Cancers (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 1180-211, 8 nov. 2012.
- NAKARAI, C. et al. Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastases in colorectal cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 15, n. 3, p. 333-41, ago. 2015.
- NAVAS, C. et al. EGF receptor signaling is essential for K-Ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 22, n. 3, p. 318-30, 11 set. 2012.

- NELSON, E.K. et al. LabKey Server: an open source platform for scientific data integration, analysis and collaboration. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 71, 9 mar. 2011.
- NESVIZHSKII, A.I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-58, 1 set. 2003.
- NI R., HUANG Y., WANG J. miR-98 targets ITGB3 to inhibit proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 2689-97, 22 set. 2015.
- NI, X.G., et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 31, n. 2, p.164-9, mar. 2005.
- NISHIOKA, R. et al. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 2, p. 149-57, out. 2010.
- OCAÑA, O.H. et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. **Cancer Cell**, v. 22, n. 6, p. 709-24, 11 dez. 2012.
- OKUDUCU, A.F. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 5, p. 1273-82, nov. 2005.
- OLIVEROS, J.C. (2007-2015). Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Disponível em <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>. Acesso em: março, 2016.
- ONG, S.E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 1, n. 5, p. 376-86, maio 2002.
- OUYANG, H. et al. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions. **Oncogene**, v.33, n. 38, p.4664-74.18 set. 2014.
- PAN, F.C.; WRIGHT, C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 3, p. 530-65, mar. 2011.
- PATHAN, M. et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, n. 15, p. 2597-601, ago. 2015
- SATOH, T. et al. Coordinated regulation of transcription and alternative splicing by the thyroid hormone receptor and its associating coregulators. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, n. 1, p. 24-9, 15 ago. 2014.
- SCHLIEKELMAN, M.J. et al. Targets of the tumor suppressor Mir-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 24, p. 7670-82, 15 dez. 2011.

- SCHLIEKELMAN, M.J. et al. Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 24, p. 7670-82, 15 dez. 2011
- SCHMALHOFER, O.; BRABLETZ, S.; BRABLETZ, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 151-66, jun. 2009.
- SHEEHAN, K.M. et al. Signal pathway profiling of epithelial and stromal compartments of colonic carcinoma reveals epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 323-31, 10 jan. 2008.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL A. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, jan - fev. 2015.
- SONG, J. et al. miR-34c-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting MARCKS. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 12728-37, 1 out. 2015.
- SPANG, N. et al. RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2297-309, 2014.
- STANKIC, M., et al. TGF- β -Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. **Cell Reports**, v. 5, n. 5, p. 1228-42, 12 dez. 2013.
- SU, A. et al. MicroRNA-221 Mediates the Effects of PDGF-BB on Migration, Proliferation, and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71309, 13 ago. 2012.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 561-568, jan. 2011.
- TAUS, T. et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 12, p. 5354-62, 2 dez. 2011
- THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 131-42, fev. 2006.
- TSAI, J.H. et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. **Cancer Cell**, v. 22, n. 6., p. 725-36, 11 dez. 2012.
- TSVETKOVA, E.V.; ASMIS, T.R. Role of neoadjuvant therapy in the management of pancreatic cancer: is the era of biomarker directed therapy here?. **Current Oncology**, v. 21, n. 4., p. e650-7, ago. 2014.
- VALASTYAN, S., WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-92, 14 out. 2011.
- VANHARANTA, S., MASSAGUÉ, J. Origins of metastatic traits. **Cancer Cell**, v. 24, n. 4, p. 410-21, 14 out. 2013.
- VREELAND, A.C. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34065-73, 5 dez. 2014.

- WADDELL, N. et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 495-501, 26 fev. 2015
- WEI, J. et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via SRC regulation. **Anticancer Research**, v. 28, n. 1A, p. 327-34, jan – fev. 2008.
- WENDT, M. K.; SMITH, J. A.; SCHIEMANN, W. P. Transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. **Oncogene**, v. 29, n. 49, p. 6485-98, dez. 2010.
- WILLIAMS, K.C.; MCNEILLY, R.E.; COPPOLINO, M.G. SNAP23, Syntaxin4, and vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) mediate trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during invadopodium formation and tumor cell invasion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 13, p. 2061-70, 1 jul. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2015). GLOBOCAN, 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: março, 2016.
- WU, M.Y.; HILL, C.S. TGF- β Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. **Developmental Cell**, v. 16, n. 3, p. 329-43, mar. 2009.
- XIONG, G. et al. Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. **BMC Cancer**, v. 14, p. 1, 2 jan. 2014.
- YACHIDA, S. et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1114-7, 28 out. 2010.
- YANG, L.; MOSES, H. L. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer?. **Cancer Research**, v. 68, n. 22, p. 9107-11, 15 nov. 2008.
- YANG, S. et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes and Development**, v. 25, n. 7, p. 717-29, 1 abr. 2011.
- YE, L.Y. et al. Hypoxia-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Induces an Immunosuppressive Tumor Microenvironment to Promote Metastasis. **Cancer Research**, v. 76, n. 4, p. 818-30, 15 fev. 2016.
- YE, X., WEINBERG, R.A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 675-86, nov. 2015.
- YING, H. et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes and Development**, v. 30, n. 4, p. 355-85, 15 fev. 2016.
- ZHANG, Q. et al. Pancreatic cancer epidemiology, detection, and management. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, p. 8962321, 2016.
- ZHANG, S. et al. Eplin downregulation promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. **Oncogene**, v. 30, n. 50, p. 4941-52, 15 dez. 2011.
- ZHENG, X. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 525-30, 26 nov. 2015.

ZHOU, W. et al. Snail Contributes to the Maintenance of Stem Cell-Like Phenotype Cells in Human Pancreatic Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87409, 29 jan. 2014.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1 CD com os dados completos das proteínas identificadas após a indução a EMT de células PANC-1 com EGF + TGF- β 1 (Experimento 1) e EGF + TGF- β 2 (Experimento 2).

APÊNDICE 2 CD com dados completos de quantificação das proteínas reguladas presentes nas frações citoplasmáticas, nucleares e de membrana (Experimento 2 exclusivamente) após a indução a EMT de células PANC-1 com EGF +TGF- β 1 (Experimento 1) e EGF + TGF- β 2 (Experimento 2).

APÊNDICE 3 CD com dados completos da análise de enriquecimento das proteínas reguladas presentes após a indução a EMT de células PANC-1 com EGF +TGF- β 1 (Experimento 1)

APÊNDICE 4 CD com dados completos da análise de enriquecimento das proteínas reguladas presentes após a indução a EMT de células PANC-1 com EGF + TGF- β 2 (Experimento 2)