

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

CAMILLA RODRIGUES PEREIRA BORGES

Efeito do silenciamento de *SHOC2* na sobrevivência e no controle do estresse oxidativo em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

Ribeirão Preto

2018

CAMILLA RODRIGUES PEREIRA BORGES

Efeito do silenciamento de *SHOC2* na sobrevivência e no controle do estresse oxidativo em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa da Silva Silveira

Ribeirão Preto

2018

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

Borges, Camilla Rodrigues Pereira

Efeito do silenciamento de *SHOC2* na sobrevivência e no controle do estresse oxidativo de linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático. Ribeirão Preto, 2018.

62p: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em ciências, área de concentração Genética.

Orientador: Silveira, Vanessa da Silva

1. Tumor pancreático, 2. proteínas de arcabouço, 3. KRAS, 4. MAPK, 5. reprogramação metabólica, 6. glutatona.

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2015/10694-5)
- Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camilla Rodrigues Pereira Borges

Efeito do silenciamento de *SHOC2* na sobrevivência e no controle do estresse oxidativo em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico especialmente

*Aos meus pais **Josafá Rodrigues Pereria e Mariângela Borges Pereira**, pelo carinho, compreensão, apoio e amor incondicional, em todos os momentos da minha vida! Ao meu namorado, **Guilherme Garca Dias**, por estar presente, me ajudando para que eu pudesse dar início a essa caminhada.*

Agradecimentos

A **Prof^ª. Dr^ª. Vanessa da Silva Silveira**, pela orientação deste trabalho, por me dar a oportunidade de crescer tanto profissionalmente quanto como pessoa, pela paciência, sinceridade e palavras amigas durante toda a pós-graduação, além de ser um grande exemplo de profissionalismo.

À **Profa. Dra. Rosane Gomes de Paula Queiroz**, pela recepção, apoio, disponibilidade e dedicação prestadas sempre quando necessárias desde o início do desenvolvimento desse trabalho até a sua conclusão.

À **Pamela Viani de Andrade**, pela amizade, disponibilidade e indescritível apoio para o término deste trabalho.

À **Profa. Dra. Denise Crispim Tavares**, pela professora maravilhosa que me fez apaixonar pela genética, pelo incentivo e por me ajudar a dar início nesta carreira.

Ao pessoal do laboratório de biologia molecular: **Augusto, Carol, Gabi Molinari, Gabi Vieira, Graziella Gustavo, Karina, Keteryne, Kleiton, Lara, Lenisa, Mariana, Mirella, Régia, Taciane, Veridiana e Verena**. Obrigada pelo apoio em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Ao **Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq)** pela concessão da bolsa de mestrado. E **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2015/10694-5)** pelo auxílio financeiro.

A **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho

Muito Obrigada!

O pessimista reclama do vento. O otimista espera que ele mude. O sábio ajusta as velas.

Jhon Maxwell

RESUMO

BORGES, C. R. P. Efeito do silenciamento de *SHOC2* na sobrevivência e no controle do estresse oxidativo em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático. 2018. 62f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é o tumor pancreático mais comum e apresenta um dos piores prognósticos. A primeira alteração crítica que desencadeia o processo de progressão tumoral, é a ativação desregulada do gene *KRAS*, na qual está presente em 90% dos casos. Várias iniciativas terapêuticas buscaram como alvo direto a atividade da oncoproteína RAS, sem no entanto, obter resultados satisfatórios. Desta forma, a investigação de moléculas efetoras *downstream* às vias reguladas por RAS, poderiam resultar em estratégias mais eficazes. Dentre estas moléculas efetoras estão as MAPKs, que modulam diversos processos celulares essenciais para o desenvolvimento tumoral, onde a cascata RAS/RAF/MEK/ERK representa uma importante via canônica de transdução de sinais. A transdução de sinais desta via pode ser favorecida por proteínas conhecidas como proteínas de arcabouço, como SHOC2, funcionando como uma plataforma para ligação de RAS-RAF-1 e consequentemente potencializando sua ligação. KRAS, têm sido associado à regulação de vias metabólicas importantes, como a glicólise que interferem diretamente na capacidade de proliferação e sobrevivência celular, para o estabelecimento e manutenção da biologia tumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da proteína SHOC2 na indução do estresse oxidativo e capacidade de sobrevivência de linhagens celulares de ADP. Foram realizados os ensaios de morte celular por apoptose, avaliação da capacidade clonogênica e quantificação dos níveis de glutatona e quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio. As linhagens celulares MIA PaCa2 e PANC-1 apresentaram uma redução significativa da capacidade de formação de colônias. A taxa de apoptose induzida pelo tratamento com Gemcitabina não diferiu entre as linhagens modificadas para silenciar a função de SHOC2. No ensaio da quantificação dos níveis de glutatona e na produção de espécies reativas de oxigênio, os resultados não foram concordantes com o esperado. Para análise dos níveis proteicos de p-ERK1/2, podemos observar uma redução na sua expressão, mesmo se mostrando de maneira sutil. Os resultados sugerem que pode haver alguma relação entre o silenciamento de *SHOC2*, estresse oxidativo e sobrevivência, porém existem outras vias alternativas modulando este processo.

Palavras-chave: Tumor pancreático, proteínas de arcabouço, KRAS, MAPK, reprogramação metabólica, glutatona.

ABSTRACT

BORGES, C. R. P. Effect of SHOC2 knockdown on survival and oxidative stress control in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. Dissertation (Master's Degree) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2018, 62p.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common pancreatic tumor and has one of the worst prognoses. The first critical change that triggers the process of tumor progression is the dysregulated activation of the KRAS gene, in which it is present in 90% of cases. Several therapeutic initiatives aimed directly at the activity of the RAS oncoprotein, without, however, obtaining satisfactory results. Thus, investigating downstream effector molecules on RAS-regulated pathways could result in more effective strategies. Among these effector molecules are MAPKs, which modulate several cellular processes essential for tumor development, where the RAS / RAF / MEK / ERK cascade represents an important canonical pathway for signal transduction. Signal transduction of this pathway may be favored by proteins known as scaffold proteins, such as SHOC2, serving as a platform for RAS-RAF-1 binding and hence potentiating its interaction. KRAS, have been associated with the regulation of important metabolic pathways, such as glycolysis, for the establishment and maintenance of tumor biology. Thus, the objective of this work was to investigate the role of SHOC2 in the induction of oxidative stress and survival capacity of ADP cell lines. Cell death assays were performed by apoptosis, and quantification of glutathione levels and the production of reactive oxygen species were performed. MIA PaCa2 and PANC-1 cell lines showed a reduction in colony formation capacity. Gemcitabine-mediated cell death by apoptosis has not been induced after SHOC2 knockdown. Also, the measurement of reactive oxygen species and quantification of glutathione levels did not reveal any change mediated by SHOC2. The analysis of ERK1 / 2 activation has shown a discrete reduction in its expression. The results suggest that there may be some relationship between SHOC2 silencing, oxidative stress and survival, but there are other alternative pathways modulating this process which needs claryfication.

Keywords: Pancreatic tumor, scaffold proteins, KRAS, MAPK, metabolic reprogramming, glutathione.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de ativação de ERK mediado pela ação de SHOC2.	21
Figura 2. Fluxograma de atividades.	26
Figura 3. Vetores lentivirais.	29
Figura 4. Análise da expressão gênica e proteica das linhagens de ADP.	36
Figura 5. Ensaio de citotoxicidade para Puromicina.	36
Figura 6. Análise da expressão gênica e proteica das linhagens transduzidas.	37
Figura 7. Ensaio clonogênico.	38
Figura 8. Ensaio de morte celular por apoptose.	40
Figura 9. Análise da expressão proteica dos efetores da via ERK/MAPK.	41
Figura 10. Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).	42
Figura 11. Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona total.....	43
Figura 12. Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada.	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Enunciando o problema	14
1.2 Alternativas terapêuticas	16
1.3 Biologia do adenocarcinoma ductal pancreático: papel da glutatona e o controle do estresse oxidativo.....	17
1.4 Ativação da via RAS/RAF/MEK/ERK e o possível papel de SHOC2 no controle do estresse oxidativo no adenocarcinoma ductal pancreático	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura.....	26
3.2 Perfil de STR (<i>Short Tandem Repeat</i>).....	27
3.3 Amostras de pacientes	27
3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	27
3.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	27
3.6 Ensaio de citotoxicidade.....	28
3.7 Silenciamento gênico.....	28
3.8 Extração e quantificação de proteínas totais.....	30
3.9 Análise da expressão proteica por <i>Western Blot</i>	30
3.10 Ensaio Funcionais	31
3.10.1 Ensaio de morte celular por apoptose.....	31
3.10.2 Ensaio clonogênico.....	31
3.10.3 Ensaio de quantificação dos níveis de glutatona	32
3.10.4 Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	33
3.10.5 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Perfil de STR (<i>Short Tandem Repeat</i>).....	35
4.2 Análise da expressão gênica e proteica das linhagens de ADP.....	35
4.3 Ensaio de citotoxicidade para Puromicina.....	36
4.4 Análise da expressão gênica e proteica das linhagens transduzidas.....	37

4.5 Ensaio clonogênico.....	38
4.6 Ensaio de morte celular por apoptose.....	39
4.7 Análise da expressão proteica de p-ERK1/2 e ERK1/2 total nas linhagens transduzidas..	41
4.8 Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	42
4.9 Ensaio de quantificação dos níveis de glutatona	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enunciando o problema

O pâncreas é dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda e desempenha um importante papel no sistema gastrointestinal, sendo caracterizado como uma glândula mista por possuir funções exócrina e endócrina (Rafacho *et al.*, 2014).

A porção exócrina produz e secreta enzimas digestivas para o intestino através das células acinares aglomeradas ao redor dos ductos pancreáticos, regulando o metabolismo de nutrientes do organismo; a porção endócrina, através das ilhotas de Langerhans, produz e secreta hormônios como insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, que atuam no controle do metabolismo energético e regulam a forma de utilização da glicose (Rafacho *et al.*, 2014).

A insulina, produzida pelo pâncreas, controla a entrada de glicose nas células, sendo o substrato inicial para a produção de energia celular através da fosforilação oxidativa ou da glicólise anaeróbica (Rafacho *et al.*, 2014).

Os tumores pancreáticos podem atingir tanto a porção exócrina como a endócrina, sendo que os que afetam a porção exócrina são os tipos de tumores pancreáticos mais comuns. O tumor da porção exócrina mais frequente acomete principalmente as células ductais e é conhecido como adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), mais frequentemente localizado na cabeça do pâncreas (aproximadamente 70-80% dos casos) (Modolell *et al.*, 1999; (Krautz *et al.*, 2011)

O ADP representa mais de 90% dos tumores pancreáticos invasivos, e é uma das formas mais letais de câncer representando a oitava causa de morte por câncer no mundo e a quarta nos Estados Unidos (Ryan *et al.*, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o ADP é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de cânceres diagnosticados e por 4% do total de mortes por essa doença no Brasil (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. INCA, 2015).

Dentre todos os tipos de tumores sólidos, o ADP apresenta um dos piores prognósticos, com uma sobrevida global em 5 anos de apenas 5%. As razões para essa baixa sobrevida incluem a falta de sintomas iniciais que permitam o diagnóstico precoce, a elevada resistência do tumor ao tratamento quimioterápico e a elevada capacidade metastática das células tumorais (Hidalgo *et al.*, 2010); (Stathis e Moore, 2010). Sendo assim, no momento do diagnóstico a doença frequentemente encontra-se em estágio bastante avançado em cerca de

80% dos casos e conseqüentemente, apresenta-se com prognóstico altamente desfavorável devido à progressão tumoral já avançada e à invasão de órgãos adjacentes (Distler *et al.*, 2013).

Em relação ao quadro clínico, o ADP pode apresentar variações dependendo da localização anatômica do tumor, mas os sintomas mais comumente apresentados são icterícia, dor abdominal, esteatorréia e perda de peso. (Porta *et al.*, 2005).

Os eventos responsáveis pelo desenvolvimento do ADP ainda não são totalmente conhecidos. Entretanto, epidemiologicamente, os principais fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer incluem idade, tabagismo (Leenders *et al.*, 2012), pancreatite crônica, diabetes mellitus, síndrome metabólica, baixos níveis de vitamina D no soro e histórico familiar de câncer de pâncreas (Koorstra *et al.*, 2008).

Estudos sobre o desenvolvimento histológico do ADP possibilitaram a identificação de lesões precursoras não invasivas que foram utilizadas como referência para o desenvolvimento de um modelo de progressão tumoral com múltiplos passos (Koorstra *et al.*, 2008). Estima-se que o processo de desenvolvimento do ADP, desde o evento mutacional inicial até o estágio final da doença, dure de 10 a 30 anos. Durante esse processo existem três períodos críticos da evolução da doença: o primeiro (T1) está relacionado com a formação de lesões precursoras; o segundo (T2) compreende o período desde a lesão precursora até o desenvolvimento do subclone metastático, e finalmente o último período (T3) representa o estágio de disseminação metastática até o eventual óbito do paciente (Yachida *et al.*, 2010). Dentre as lesões que originam o ADP estão quatro lesões precursoras distintas: neoplasia mucinosa cística (NMC), neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI), neoplasia intraepitelial pancreática (NIP- estágios 1-3) e neoplasias papilares intraductais tubulares (NPITs). Tais lesões apresentam graus variados de displasia e o acúmulo gradual de alterações genéticas é o principal responsável por desencadear a progressão de lesões em estágio inicial benigno para o desenvolvimento de neoplasias malignas (Ottenhof *et al.*, 2009).

Atualmente, o conjunto de processos moleculares e os respectivos eventos celulares envolvidos com a progressão do ADP já são bem conhecidos (Rosenfeldt *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014). Dentre as principais alterações genéticas destaca-se a ativação desregulada do gene *KRAS*, presente em mais de 90% dos casos (Jones *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2014). Essa ativação é a primeira alteração crítica que desencadeia o processo de progressão tumoral, sendo detectada em aproximadamente 99% das lesões NIP-1 (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013). Conforme as lesões NIP-1 adquirem novas alterações genéticas, ocorre a

progressão para os estágios mais avançados e com maior grau de displasia. Mutações adicionais envolvendo a perda de função do gene supressor tumoral *CDKN2A* são frequentes em lesões NIP-2 (90%) e finalmente a inativação das proteínas P53 e SMAD4 também contribuem para a progressão do câncer pancreático e são encontradas em lesões NIP-3. Além destas, alterações em outros genes supressores tumorais e genes de reparo, como o *BRCA2*, podem estar envolvidas com a progressão e disseminação tumoral (Real *et al.*, 2008; Blackford *et al.*, 2009; Yachida *et al.*, 2010).

1.2 Alternativas terapêuticas

A abordagem terapêutica para o tratamento do ADP ainda é um desafio. Embora a intervenção cirúrgica possa ser realizada na fase inicial do desenvolvimento tumoral, a maioria dos casos de ADP apresenta-se em um estágio avançado ao diagnóstico, com doença localmente avançada ou metastática, inviabilizando a ressecção cirúrgica completa (Vincent *et al.*, 2011). Diante desse cenário, a sobrevida global em cinco anos, após a ressecção cirúrgica é de apenas 5% (Siegel *et al.*, 2013). Além da ressecção cirúrgica, diversos estudos já comprovaram que a quimioterapia, como um tratamento adjuvante, pode elevar discretamente a sobrevida global dos pacientes. Atualmente é consenso que todos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica com intuito curativo são candidatos à terapia adjuvante com a gemcitabina e as fluoropirimidinas, como o 5-FU (fluorouracil) (Liao *et al.*, 2013).

O quimioterápico citotóxico gemcitabina é um análogo de nucleosídeo que age inibindo a síntese de DNA e foi estabelecida como terapia padrão na década de 1990 por apresentar resposta mais satisfatória em relação às fluoropirimidinas (Burriss *et al.*, 1997; Mini *et al.*, 2006). Ainda assim, os derivados de fluoropirimidinas, como o 5-FU, também são utilizados em doses monoterápicas, como agentes antracíclicos (doxorubicina e epirrubicina), taxanos (docetaxel e paclitaxel), camptotecinas (topotecano e irinotecano) entre outros (Wils *et al.*, 1985; Saif, 2011). A intensificação do tratamento utilizando esquemas de poliquimioterapia também tem sido proposto e um dos principais estudos clínicos a utilizar a combinação de drogas propôs um esquema conhecido como FOLFIRINOX (combinação de 5-FU, irinotecano e oxaliplatina) (Kim, 2011). Este estudo foi o primeiro esquema de combinação de drogas testado a conferir um ganho na taxa de sobrevida de pacientes com ADP metastático. Contudo, em estudos subsequentes, foi demonstrado que a toxicidade entre os pacientes recebendo FOLFIRINOX era extremamente elevada, levando à descontinuidade da maioria destes estudos (Conroy *et al.*, 2011; Gourgou-Bourgade *et al.*, 2013). Assim,

mesmo tendo um avanço na taxa de sobrevida, o uso da poli-quimioterapia é limitado, pois depende do estado geral do paciente no momento do tratamento (Infante *et al.*, 2011). Outro esquema de combinação de drogas alternativo que resultou em aumento da sobrevida é o uso de gemcitabina associada à nab-paclitaxel, que proporcionou uma maior taxa de resposta (23 versus 7%) e maior sobrevida global (8,5 versus 6,7 meses) em relação ao grupo sob uso isolado de gemcitabina (Von Hoff *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que embora os esquemas de combinações de drogas pareçam promissores, os índices de resposta não são capazes de elevar de maneira significativa a taxa de sobrevida global dos pacientes (Vincent *et al.*, 2011). Geralmente, os pacientes que recebem a combinação de drogas apresentam um discreto aumento na taxa de sobrevida global devido ao aumento excessivo da toxicidade da politerapia (Von Hoff *et al.*, 2013). Por meio dessas observações e buscando encontrar novas alternativas terapêuticas para o tratamento dos pacientes acometidos pela doença, é necessário elucidar a complexa biologia tumoral do ADP (Bardeesy e Depinho, 2002).

1.3 Biologia do adenocarcinoma ductal pancreático: papel da glutatona e o controle do estresse oxidativo

Das várias características específicas do ADP está a presença de um microambiente estromal altamente denso e fibrótico, o que dificulta a difusão de oxigênio e dos nutrientes necessários para a manutenção do tumor. Este estroma denso cria um escudo impedindo a vascularização adequada, reduzindo o acesso de drogas quimioterápicas e favorecendo o aparecimento de zonas de hipóxia, atuando portanto, como uma forte pressão seletiva para a adaptação e sobrevivência de células com potencial maligno e agressivo (Koong *et al.*, 2000).

Entretanto, para que as células tumorais possam resistir a tais condições do microambiente e manter as altas taxas de proliferação mesmo na presença de baixas concentrações de oxigênio (microambiente hipóxico), são necessários ajustes no seu status metabólico. Tal ajuste, tem sido amplamente investigado e é conhecido como reprogramação do metabolismo (ref). Esse processo, também conhecido como “Efeito Warburg”, é baseado na ativação da glicólise (independente da presença de oxigênio) para garantir que as células tumorais obtenham a reserva energética necessária para sustentar seu crescimento. É curioso ressaltar que mesmo com uma produção de ATP inferior comparada à fosforilação oxidativa, a ativação glicólise representa uma importante vantagem para as células tumorais, pois o

processo de produção de energia é mais rápido e além de fornecer energia, disponibiliza metabólitos intermediários essenciais para a proliferação celular (Vander Heiden *et al.*, 2009).

Além da reprogramação do metabolismo da glicose, as células tumorais, diferentemente das células normais, também apresentam uma dependência do metabolismo da glutamina (glutaminólise) para suprir os processos anabólicos de energia, pois a glutamina contribui para a síntese de macromoléculas, fornecendo carbono para o ciclo de Krebs e nitrogênio para a síntese de aminoácidos não essenciais. Além disso, a glutamina é responsável por fornecer e manter os níveis intracelulares de NADPH, que é essencial para e manter a homeostase redox (Wise e Thompson, 2010; Dang, 2012).

O desequilíbrio do estado redox e o aumento do estresse oxidativo em decorrência do elevado índice metabólico está associado com a progressão tumoral em diversos tipos de neoplasias. O acúmulo de EROs pode promover quebras no DNA e, conseqüentemente, levar à instabilidade genômica e à ativação de moléculas regulatórias importantes envolvidas com a proliferação celular e sobrevivência das células tumorais (Ziech *et al.*, 2011; Glasauer e Chandel, 2014). Curiosamente, no ADP (promovido pelo *KRAS* mutado) as células tumorais apresentam uma preferência por baixos níveis intracelulares de EROs para um estado de crescimento ótimo. Este fato demonstra que o estresse oxidativo representa uma dualidade na progressão tumoral, onde baixos níveis de EROs podem ser essenciais para a promoção do tumor, enquanto que níveis elevados de EROs, ao contrário, podem ser extremamente tóxicos para a célula tumoral (Kong *et al.*, 2013).

Son e colaboradores (2013) relataram que as células de ADP podem modular o metabolismo de glutamina no qual o aspartato dela derivado é utilizado para conversão em piruvato, o que resulta no aumento significativo da razão NADPH/NADP⁺. A molécula de NADPH será utilizada pela glutatona para manter o estado redox da célula (Gaglio *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2013). A glutatona é um agente antioxidante sintetizado no interior das células de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos que a compõem, glutamato, cisteína e glicina. Está localizada prioritariamente no citoplasma (85-90%), podendo também estar em compartimentos como mitocôndrias, peroxissomos, núcleo e retículo endoplasmático (Bounous *et al.*, 1989). A ocorrência da glutatona pode ser sob a forma reduzida (GSH - monomérica) e/ou oxidada (GSSG – dimérica). A forma biologicamente ativa da glutatona e mais frequente é a forma reduzida (ref). O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ação antioxidante geram um estado de estresse oxidativo; nessa circunstância, a glutatona reduzida converte-se em GSSH levando a uma diminuição na razão

GSH/GSSG, e sendo portanto, um importante indicador do estado redox da célula (Ballatori *et al.*, 2009).

Tendo em vista que a redução de glutamina ou a inibição de qualquer enzima da via pode causar um aumento significativo dos níveis de EROs, pode-se inferir que as células de ADP são estritamente dependentes do funcionamento desta cadeia de reações envolvidas na glutaminólise. Esse processo está sob o controle de diversas moléculas sinalizadoras e apresenta características específicas que são tumor-dependentes. É interessante a observação de que diversas proteínas oncogênicas envolvidas na proliferação celular como, por exemplo, a proteína KRAS, também têm sido associadas à regulação de vias metabólicas importantes, como a glicólise e a glutaminólise, para o estabelecimento e manutenção da biologia tumoral (Chiaradonna *et al.*, 2006). Particularmente no ADP, pode-se citar a participação da atividade oncogênica de KRAS, que além de impulsionar a proliferação celular descontrolada, também é uma das principais responsáveis pelo controle desses processos (Guillaumond *et al.*, 2013).

A participação de KRAS na ativação da glicólise ocorre tanto pela indução da expressão de genes essenciais para a via glicolítica (como *SCL2A1* e *LDHA*) (Gaglio *et al.*, 2011), como também pelo envolvimento com a produção de intermediários críticos para a glicólise como a glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P) e frutose-1,6-bifosfato, mostrando que KRAS^{G12D} pode regular múltiplos passos da via glicolítica (Ying *et al.*, 2012). Curiosamente, estudos recentes relatam que a reprogramação metabólica mediada pela atividade de KRAS não é totalmente dependente de HIF1 α ; dessa forma a clássica ligação entre o microambiente hipóxico e o metabolismo ainda não está totalmente clara. Nesse contexto, Son e colaboradores (2013) sugerem que os maiores ajustes do metabolismo no ADP (promovido essencialmente pela ativação de *KRAS*) são na realidade regulados pela atividade de MAP quinases, como a ERK (Son *et al.*, 2013). Em conjunto essas informações apontam para a necessidade de estudos que possam elucidar o complexo processo metabólico no ADP e a interação de vias de sinalização que regulam esses processos de forma tecido-dependente.

1.4 Ativação da via RAS/RAF/MEK/ERK e o possível papel de SHOC2 no controle do estresse oxidativo no adenocarcinoma ductal pancreático

Diversos genes têm sido frequentemente descritos com funções alteradas no adenocarcinoma pancreático, porém a mutação do gene *KRAS* (conforme previamente mencionado), é a principal delas e responsável por desencadear o desenvolvimento do ADP.

O proto-oncogene *KRAS* é um dos três genes da família *RAS* (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*) que são sabidamente os oncogenes mais frequentemente mutados em inúmeras neoplasias. Componente da família de GTPases, o gene *KRAS* é responsável por ativar múltiplas vias de sinalização por interações entre receptores de membrana e posterior transmissão de informações da membrana celular para o núcleo (Gysin *et al.*, 2011). A ativação de *KRAS* é a alteração genética mais frequentemente encontrada no ADP, estando presente em aproximadamente 95% dos casos (Jones *et al.*, 2008).

A proteína oncogênica *KRAS* resulta predominantemente de uma mutação de ponto que geralmente afeta um dos seguintes resíduos da proteína: G12, G13 ou Q61. Em 85% dos casos de ADP, a proteína *KRAS* possui uma substituição de uma glicina (G) na posição 12 por ácido aspártico (*KRAS*^{G12D}) (Scheffzek *et al.*, 1997). A partir desta mutação, há a ativação constitutiva de *KRAS* (*RAS* ligado a GTP) e, conseqüentemente, a estimulação constante de inúmeras vias de sinalização *downstream*, que modulam processos importantes para a progressão tumoral do ADP (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

Várias iniciativas terapêuticas buscaram como alvo direto a atividade da oncoproteína *RAS*, sem no entanto, obter resultados satisfatórios. Um dos principais motivos é a interação entre as vias de sinalização e alças de regulação por *feedback*. Desta forma, a investigação de moléculas efetoras *downstream* às vias reguladas por *RAS*, poderia resultar em estratégias mais eficazes (Berndt e Sebti, 2011). Dentre as principais cascatas de sinalização ativadas pela proteína *RAS* estão as vias de transdução de sinais composta por *MAPKs* (proteínas quinases ativadas por mitógenos). As *MAPKs* modulam diversos processos celulares essenciais para o desenvolvimento tumoral. Dentre eles pode-se destacar o aumento da proliferação celular, a inibição de apoptose, a reprogramação metabólica, a alteração do microambiente tumoral, a evasão da resposta imune, a migração celular, controle do estresse oxidativo entre outros (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

As três principais proteínas *MAPK* efetoras envolvidas com mecanismos de sinalização incluem as proteínas *ERK* (quinase regulada por sinal extracelular), *JNK* (quinase c-Jun N-terminal) e *p38* (quinase ativada por stress) (Krishna e Narang, 2008). Em células normais, a ativação da *MAPK-p38* e da *JNK* está geralmente associada à indução de apoptose, enquanto proteínas *ERK1/2* ativadas estão envolvidas na regulação de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas, além de induzir a proliferação celular e inibir a apoptose (Cross *et al.*, 2000; Yue e Mulder, 2000; Johnson e Lapadat, 2002).

A proteína *ERK1/2* é a molécula efetora da via *RAS/RAF/MEK/ERK* que representa uma importante via canônica de controle da proliferação e sobrevivência celular (ref.)

Existem proteínas que se ligam aos componentes da via RAS/RAF/MEK/ERK, fornecendo arcabouços que favorecem a interação e portanto, potencializam a sinalização da cascata RAS/ERK de diversas maneiras: primeiro, permitem a montagem de complexos de moléculas de sinalização; segundo, mantêm as moléculas sinalizadoras em seus locais específicos; terceiro, ajustam a sinalização controlando o *feedback* positivo e negativo; por último, protegem as moléculas sinalizadoras da inativação (Kolch, 2005). Várias dessas proteínas, também conhecidas como moléculas adaptadoras, foram primeiramente identificadas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (Morrison e Davis, 2003) e dentre elas está a proteína SHOC2, também conhecida como SUR-8 e composta basicamente de repetições de leucina, um domínio que está envolvido em interações proteína-proteína.

No processo de ativação da via RAS, que já é bastante conhecido, a presença da SHOC2 aumenta consideravelmente a afinidade de ligação entre RAS e RAF1 e conseqüentemente a sinalização dos eventos subsequentes da cascata (Li et al., 2000; Rodriguez-Viciano et al., 2006). Acredita-se que a proteína SHOC2 funcione como um arcabouço para a ligação das proteínas RAS-RAF1 favorecendo sua transdução de sinais, pois SHOC2 funciona como uma reguladora da subunidade catalítica da proteína fosfatase 1 (PP1c). Assim, quando RAS está ligado a GTP, SHOC2 promove a translocação de PP1c para a membrana, onde PP1c desfosforila RAF1 na Ser259, um resíduo inibitório importante, permitindo sua ligação estável com RAS ativada e desencadeando assim a ativação catalítica de RAF1 e a transmissão eficiente da sinalização para as proteínas *downstream*, MEK e ERK (Figura 1) (Cantley, 2002).

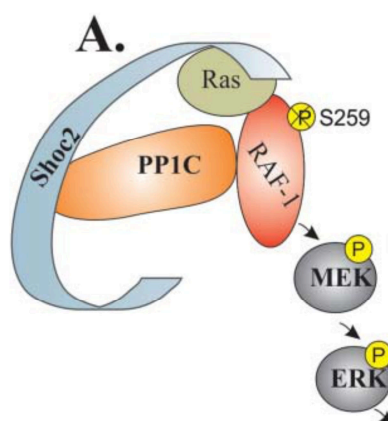


Figura 1 – Modelo de ativação de ERK mediado pela ação de SHOC2. A) Modelo esquemático que descreve como a atividade ERK1 / 2 é transduzida através do arcabouço mediado por SHOC2 e que incorpora RAS-RAF1. No complexo com Shoc2, PP1c desfosforila a Serina 259 inibidora de Raf-1 para facilitar a transmissão do sinal. Figura modificada de E. R. Jang & E. Galperin, (2016).

Em células tumorais, essa complexa rede de ativação oncogênica (constitutiva) de RAS pode promover a proliferação descontrolada e a sobrevivência de células tumorais pela regulação de vias de sinalização *downstream* (Gysin *et al.*, 2011).

Neste contexto, após destacar a importância de KRAS no processo metabólico e no controle do estresse oxidativo no ADP, e considerar a participação da proteína adaptadora SHOC2 na ativação da via RAS/ERK, este trabalho visa testar a hipótese de que a atividade da proteína SHOC2, enquanto moduladora da ativação da via RAS/ERK, afeta a produção de EROs e conseqüentemente a agressividade tumoral em células de ADP.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da proteína SHOC2 no controle do estresse oxidativo e na capacidade de sobrevivência de linhagens celulares de ADP.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o impacto do silenciamento do gene *SHOC2*:

- Em eventos de morte celular por apoptose e capacidade de sobrevivência clonogênica;
- Em eventos relacionados à indução de estresse oxidativo, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e da dosagem de níveis de glutatona;
- Na modulação da via RAS/ERK/ por meio da expressão de efetores *downstream* da via.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O delineamento experimental do trabalho está representado na Figura 2.

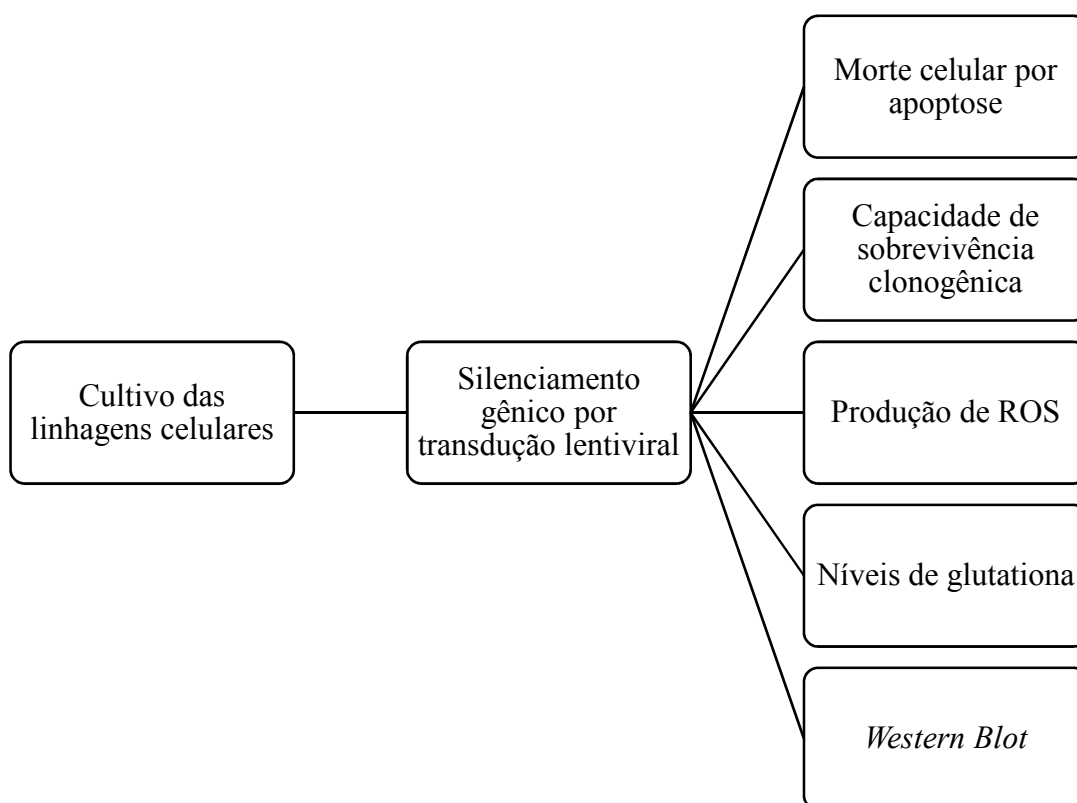


Figura 2. Fluxograma de atividades.

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Neste estudo foram utilizadas três linhagens celulares: AsPC-1 (adenocarcinoma ductal pancreático, ATCC® CRL-1682™), PANC-1 (carcinoma epitelial pancreático, ATCC® CRL-1469™) e MIA PaCa-2 (linhagem de carcinoma pancreático, ATCC® CRM-CRL-1420™). Todas as linhagens foram cultivadas em RPMI (Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de SBF, 100U/mL, penicilina e 100µg/mL estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

3.2 Perfil de STR (*Short Tandem Repeat*)

Para confirmação das linhagens, foi realizada a análise do perfil de STR pelo Laboratório de Genética Bioquímica da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões.

3.3 Amostras de pacientes

Foram utilizadas amostras de tecido pancreático normal (adjacentes ao tumor) como controle para se estabelecer o perfil de expressão gênica do gene *SHOC2* nas linhagens celulares estudadas. A coleta das amostras de tecido pancreático normal foi realizada pela equipe do Serviço de Cirurgia e Endoscopia do Sistema Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Imediatamente após a cirurgia, as amostras foram congeladas a -80°C e posteriormente submetidas ao processo de extração de RNA conforme descrito a seguir. Estas amostras compõem um biorrepositório aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Processo 4910/2008).

3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Células das linhagens AsPC-1, PANC-1 e MIA PaCa-2 e das amostras de tecido normal foram coletadas e foi realizada a extração de RNA total a partir do reagente Trizol® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.) conforme instruções do fabricante. O RNA foi armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Após o processo de extração, as amostras de RNA foram submetidas à síntese de cDNA utilizando-se o kit *High Capacity* (Life Technologies). Para tanto, utilizou-se 500ng de RNA, segundo as recomendações do fabricante. Após a reação de síntese do cDNA, procedeu-se à reação de qRT-PCR.

3.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para avaliar a expressão do gene *SHOC2* nas linhagens e tecidos normais, as análises de qRT-PCR foram realizadas no aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sondas TaqMan® foram adquiridas *on demand* (Life Technologies, EUA). Como controles endógenos foram utilizados 2 genes: *β-actina* e *GAPDH*. As reações de PCR foram realizadas para cada amostra em triplicata e a quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001). Como amostra de referência (calibrador) foi utilizada a linhagem REH de leucemia linfoblástica aguda (controle positivo para a expressão do gene estudado).

3.6 Ensaio de citotoxicidade

Para permitir a seleção das células transduzidas (metodologia descrita a seguir), as partículas lentivirais utilizadas para silenciamento gênico contêm o gene de resistência à Puromicina (Sigma-Aldrich, Inc.) e portanto, foi necessário determinar a dose de droga que seria utilizada na seleção das células após a transdução. Com isso, o ensaio de proliferação foi realizado com o intuito de determinar a concentração mínima de Puromicina necessária para reduzir no máximo o número de células viáveis.

Foram plaqueadas 2.250 células viáveis por poço em placas de 96 poços, em um volume final de 100µL. A contagem das células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer utilizando como corante o Azul de Tripán 0,4% (1:1). As células foram tratadas com quatro diferentes concentrações da droga (1µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL e 6µg/mL), definidas com base na literatura, e foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ durante todo o experimento. As placas foram fixadas com 100µL de metanol por poço durante 15 minutos, foram secas em temperatura ambiente e depois coradas com Giemsa. As placas foram então descoradas com metanol e a leitura foi realizada a cada 24 horas, totalizando 120 horas de tratamento, no aparelho iMark Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Inc.), utilizando-se a razão entre as leituras no filtro de 570nm e 595nm.

3.7 Silenciamento gênico

Com o intuito de produzir o silenciamento gênico estável, foram utilizadas moléculas de shRNA (siRNA sintetizadas na forma de pequenos grampos: *short hairpin RNA*) empacotadas em partículas lentivirais. Posteriormente, as linhagens celulares foram transduzidas e o vetor utilizado foi inserido de maneira estável no genoma da célula. Para o silenciamento do gene alvo foram utilizados dois clones lentivirais validados, clonados no vetor pLKO (TRC.N0000151603/TRC.N0000152103; shRNA específicos; Sigma Aldrich –

para garrafas de 25cm² e, posteriormente, de 75 cm². Após a expansão da população de células foi realizada a seleção positiva por meio da droga Puomicina.

3.8 Extração e quantificação de proteínas totais

A extração de proteína total foi realizada utilizando-se o tampão de lise RIPA[®] (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) contendo inibidores de protease e fosfatase, seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Uma solução de albumina bovina (BSA, 0,1mg/mL) foi utilizada para a fazer a curva padrão. Os valores de absorbância foram obtidos por meio da leitura em espectrofotômetro iMax Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) utilizando-se o comprimento de onda de 595nm.

3.9 Análise da expressão proteica por *Western Blot*

A metodologia utilizada, de acordo com Sambrook e colaboradores (1989), foi modificada como descrito a seguir. Amostras na concentração final de 40ug de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema *Mini Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad, EUA) à voltagem constante de 80V. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, e seguiu-se o processo de imunodeteção. As membranas foram bloqueadas em solução de 5% de leite desnatado em TBST 1X por 1 hora, sob agitação constante. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários monoclonais específicos (rabbit anti-SHOC2 (1:500), *Abcam*; mouse anti-GAPDH (1:1.000), *Santa Cruz Biotechnology, EUA*; (rabbit anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) e Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)(T202/Y204 (1:1.000), *Cell Signalling Technologies*) *overnight*, sob agitação constante, e posteriormente lavadas 3 vezes por 10 min em TBST 1X. Finalmente, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit igG (GE Healthcare UK), conjugado a uma enzima *horseradish* peroxidase e acrescido do reagente Precision Protein[™] StrepTactin-HRP Conjugate (BIO-RAD Laboratories, Inc.) (1:20000). Todas as membranas foram incubadas sob agitação, a 4°C e ao fim da incubação com os anticorpos secundários, foram lavadas 5 vezes durante 5 minutos com TBST 1X. A revelação foi realizada com o *kit Clarity[™] Western ECL Blotting Substrate* (BIO-RAD Laboratories, Inc.), de acordo com instruções do fabricante utilizando-se o aparelho ChemiDoc[™] XRS+ with Image Lab[™] Software (BIO-RAD Laboratories, Inc.). A expressão da proteína ERK1/2

fosforilada foi calculada com base na expressão de Vinculina e ERK1/2 total, e normalizada pelo controle (pLKO).

3.10 Ensaios Funcionais

3.10.1 Ensaio de morte celular por apoptose

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V – Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V fluorescein isothiocyanate* - BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) e células necróticas com iodeto de propídio (PI). Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana das células. Sua exteriorização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para que as células sejam removidas. A marcação com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana.

Brevemente, 250×10^3 das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1, transduzidas para silenciamento do gene *SHOC2* (pLKO, shRNA#1 e shRAN #2), foram plaqueadas em placas de 6 poços em triplicata. Após 24h as linhagens foram tratadas utilizando-se o valor de IC50 de gemcitabina para a linhagem MIA PaCa-2 no valor de 16 μM e para a linhagem PANC-1 no valor de 0,64mM. Após tratamento de 72h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min, lavadas com 1 X PBS gelado e ressuspensas em 300 μL de 1 X Tampão de ligação para anexina V (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA). As células foram então marcadas com 5 μL de Anexina V e 50 μL de uma solução de 50 μM de iodeto de propídeo (PI), e analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences Pharmigen) contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.10.2 Ensaio clonogênico

Os efeitos do silenciamento do gene *SHOC2* sobre a capacidade clonogênica foram avaliados de acordo com o protocolo de Franken, et al. (2006). Suspensões celulares das linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 foram semeadas numa densidade de 300 células por poço em placas de 6 poços. As células foram mantidas em cultura por 13 dias a 37°C. Após esse período, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com

metanol absoluto e coradas com Giemsa a 1%. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas com lupa, e foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP) sob a fórmula:

$$EP = \frac{\text{Número de colônias formadas}}{\text{Número de células plaqueadas}} \times 100$$

Utilizando-se esse valor, foi calculada a fração de sobrevivência (FS), sob a fórmula:

$$EP = \frac{\text{Número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Número de células plaqueadas} \times EP}$$

A EP é própria de cada linhagem para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que têm a capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células plaqueadas que, após o tratamento, ainda apresentam a capacidade de formar colônia.

3.10.3 Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona

Para a quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) foi utilizado o ensaio quantitativo bioluminescente *GSH-Glo™ Glutathione Assay* (#V6911, Promega), segundo instruções do fabricante. O teste é baseado na conversão de um derivado de luciferina-NT em luciferina na presença de glutathiona, catalisada pela enzima glutathiona S-transferase (GST). O sinal luminescente gerado pela luciferase é proporcional à concentração de glutathiona presente na amostra.

Brevemente, 3×10^3 células viáveis das linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1, transduzidas para silenciamento do gene *SHOC2* (pLKO, shRNA#1 e shRNA#2), foram plaqueadas em placas de 96 poços, em triplicata. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com solução salina, PBS 1X, para posteriormente serem adicionados os reagentes para quantificação da glutathiona.

Foram adicionados 50µL por poço do reagente GSH-Glo. Esse reagente contém um substrato de Luciferina-NT e a Glutathiona S-transferase em uma diluição de 1:100 em um tampão de reação GSH-Glo. Após uma incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 50µL por poço do Reagente de detecção de luciferina diluído em tampão de reconstituição com esterase. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em luminômetro (Centro LB 960 Microplate Luminometer - Berthold)

As leituras de luminescência foram realizadas em Unidades Relativas de Luz (RLU), sendo posteriormente analisadas em uma curva padrão para identificar a concentração de glutathiona, utilizando-se diluições seriadas de uma solução padrão de glutathiona a 5mM.

3.10.4 Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a análise da produção e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi utilizado o ensaio quantitativo bioluminescente *ROS-Glo™ H2O2 Assay* (#V8820, Promega), segundo instruções do fabricante. O teste mede os níveis de peróxido de hidrogênio (H2O2), um tipo de espécie reativa de oxigênio (ROS), em culturas celulares. O sinal luminescente gerado pela transformação de um precursor de luciferina em luciferina é proporcional à concentração de H2O2 presente na amostra.

Brevemente, 3×10^3 das linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1, transduzidas para silenciamento do gene *SHOC2* (pLKO, shRNA#1 e shRNA #2), foram plaqueadas em placas de 96 poços em triplicata. Após 24h, foram adicionadas ao meio de cultura já presente nos poços, 20 μ L/poço da solução de substrato de H2O2 diluído em tampão de diluição, em uma concentração final de 25 μ M de H2O2. Após 6h de incubação em estufa a 37°C e 5% CO2, foram adicionados 100 μ L/poço do reagente de detecção de luciferina ROS-Glo. Após incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em um luminômetro (Victor X Light Multilabel Microplate Reader - PerkinElmer). As leituras de luminescência foram dadas em Unidades Relativas de Luz (RLU).

Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.10.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas estatísticos GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Os ensaios foram realizados em triplicatas, abrangendo entre dois e três experimentos independentes, considerando-se a média dos experimentos. Para a análise do ensaio clonogênico foi utilizado o teste T de Student e para a análise dos demais ensaios funcionais foram utilizados os testes One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA, de acordo com a relevância no ensaio em questão, com pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados onde $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de STR (*Short Tandem Repeat*)

As linhagens de ADP, AsPC-1, PANC-1 e MIA Paca-2 foram avaliadas pela metodologia de STR (*Short Tandem Repeat*). Os resultados obtidos (Tabela 1) foram comparados com os dados fornecidos pela ATCC (American Type Culture Collection) e a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) em seus respectivos *websites* e demonstram a autenticidade das mesmas.

Tabela 1. Resultado da análise do perfil de STR das linhagens AsPC-, PANC-1 e Mia PaCa-2.

Amostra	Concentração (ng/μl)	TH01	TPOX	CSF	D13	D16	D5	D7	VWA
AsPC-1	372	7/9.3	8/10	10/13	9/12	11	12	12/13	17
PANC-1	247,7	7/8	8/11	10/12	11	11		10	15
MIA PaCa-2	509,4	9/9.3	9	10	12/13	13	12/13	12	15

4.2 Análise da expressão gênica e proteica das linhagens de ADP

Com o intuito de avaliar a expressão de *SHOC2* em níveis gênicos e proteicos nas linhagens de ADP, foram realizados ensaios de qRT-PCR e *Western Blot*, respectivamente. A análise da expressão do gene mostrou que as linhagens PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2 apresentaram menor expressão de *SHOC2* quando comparadas às amostras de tecido pancreático normal (Tecido Normal#1 e Tecido Normal#2), como pode ser observado na Figura 4A. Na Figura 4B, entretanto, observa-se que a expressão proteica de *SHOC2* nas linhagens celulares é superior à expressão dessa proteína nas amostras de tecido normal. Na análise da expressão proteica, GAPDH foi utilizada como controle endógeno da técnica.

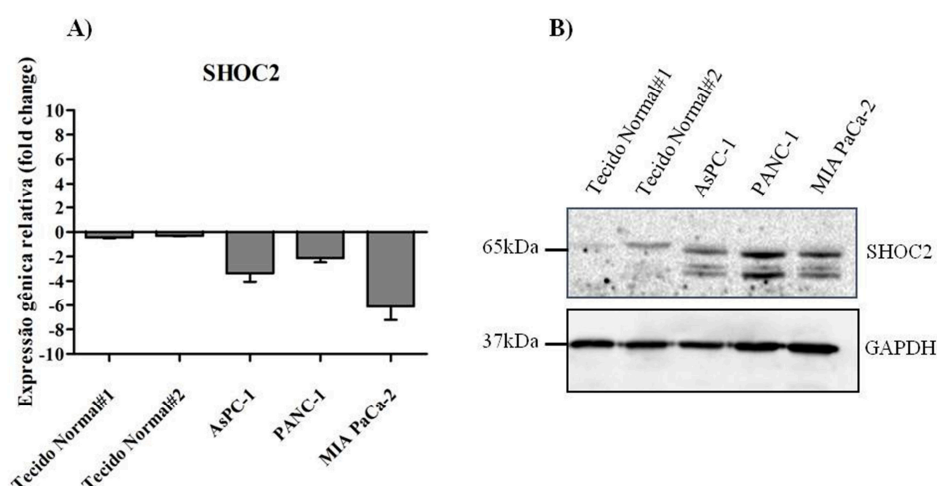


Figura 4. Análise da expressão gênica e proteica das linhagens de ADP.

A) Padrão de expressão gênica relativa de *SHOC2* das linhagens celulares e de amostras de tecido pancreático normal e tumoral. **B)** Análise de *Western Blot* para a proteína *SHOC2* nas linhagens celulares e amostras de tecido pancreático normal. (GAPDH – proteína endógena. kDa = kilodaltons)

4.3 Ensaio de citotoxicidade para Puromicina

O ensaio de proliferação celular foi realizado nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 com o intuito de avaliar a citotoxicidade da droga Puromicina. As placas foram retratadas com a droga a cada 48 horas, por um período máximo de 120 horas de tratamento. As taxas de proliferação celular foram reduzidas conforme o aumento da concentração da droga e do tempo de incubação. Para as duas linhagens avaliadas, a menor dose suficiente para selecionar a população de células transduzidas foi de 2,0 μ g/mL por 96 horas de tratamento, na qual foi observada uma redução entre 60 e 80% da capacidade proliferativa das células (Figura 5).

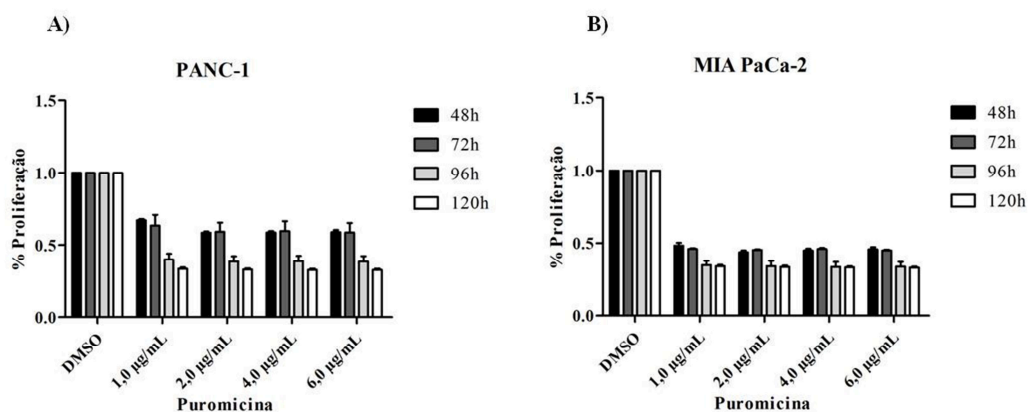


Figura 5. Ensaio de citotoxicidade para Puromicina.

Ensaio de proliferação celular nas linhagens PANC-1 (**A**) e MIA PaCa-2 (**B**) tratadas com Puromicina em gradiente de concentração (1,0 a 6,0 μ g/mL), de 48 a 120 horas de tratamento.

4.4 Análise da expressão gênica e proteica das linhagens transduzidas

Com o intuito de confirmar o silenciamento de *SHOC2* nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2, foi realizada a análise da expressão gênica por qRT-PCR e a análise de expressão proteica por *Western Blot*. O silenciamento gênico se mostrou eficiente em ambas as linhagens analisadas, uma vez que se observa nas Figura 5A e 5B a redução da expressão de *SHOC2* após a transdução com vetores lentivirais contendo shRNA#1 e shRNA#2 quando comparadas ao controle (pLKO vazio). Em ambas as linhagens, o shRNA#2 se mostrou mais eficiente que o shRNA#1 (redução de mais de 70% da expressão em relação ao controle). De maneira consistente com a expressão gênica, é possível observar na Figura 6C a redução da expressão proteica de SHOC2 em ambas as linhagens analisadas. Bem como descrito anteriormente, também na análise da expressão proteica, o shRNA#2 se mostra mais eficiente no silenciamento de *SHOC2*.

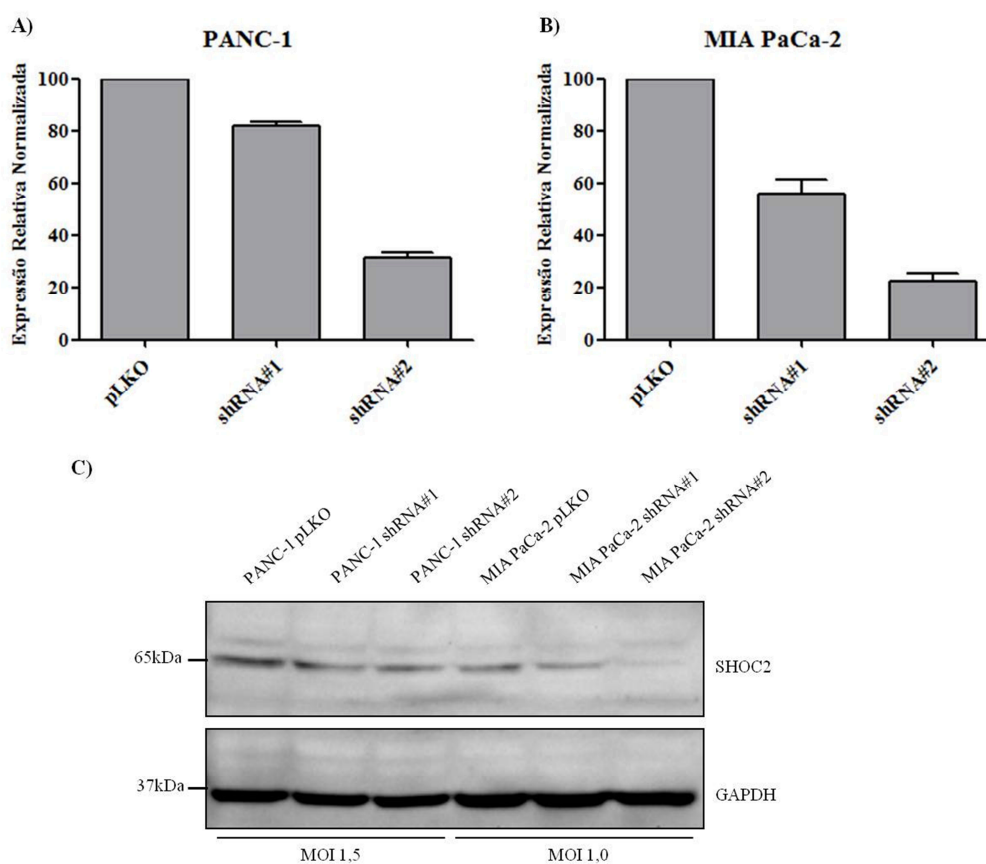


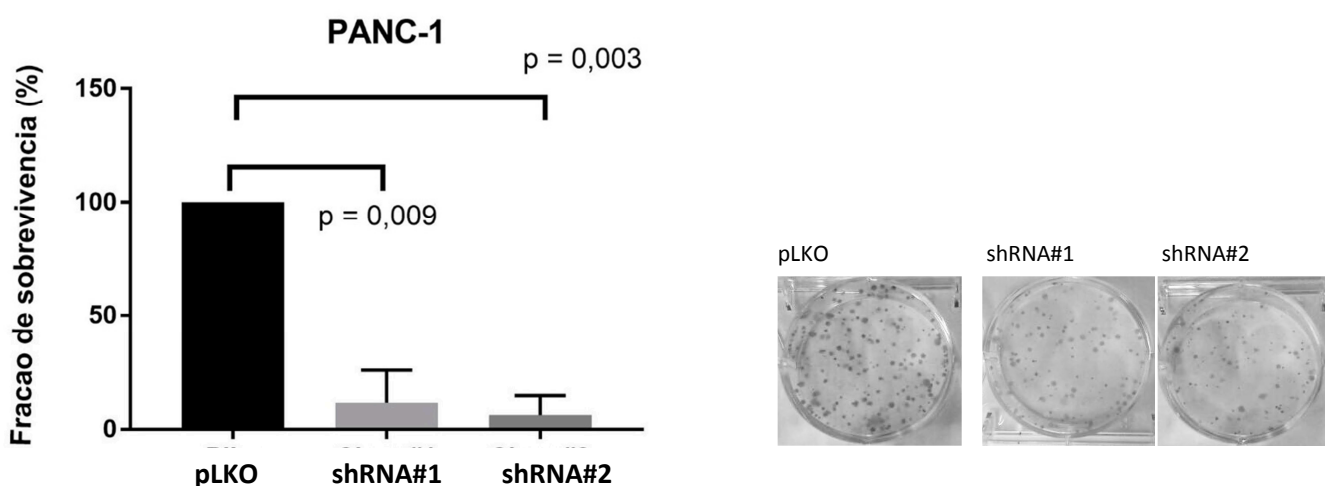
Figura 6. Análise da expressão gênica e proteica das linhagens transduzidas.

Análise da expressão gênica relativa de *SHOC2* nas linhagens celulares PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento gênico. C) Análise de expressão proteica por *Western Blot* para a proteína SHOC2 nas linhagens celulares após o silenciamento gênico. (GAPDH – proteína endógena. kDa = quilodaltons)

4.5 Ensaio clonogênico

Com o intuito de investigar os efeitos do silenciamento de *SHOC2* na capacidade de sobrevivência clonogênica das células tumorais, foi realizado o ensaio clonogênico nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2. Como observado na Figura 7A, houve uma significativa redução da capacidade de formação de colônias da linhagem PANC-1 em relação ao controle (pLKO) após o silenciamento gênico por ambos os clones analisados (shRNA#1 e shRNA#2, $p=0,009$ e $p=0,003$, respectivamente). De maneira semelhante, a Figura 7B mostra que a linhagem MIA PaCa-2 também teve sua capacidade de formação de colônias impactada de maneira significativa pelo silenciamento gênico em ambos os clones analisados ($p=0,04$ e $p=0,02$ nos clones shRNA#1 e shRNA#2, respectivamente), entretanto esse impacto foi menor que o observado na linhagem PANC-1.

A)



B)

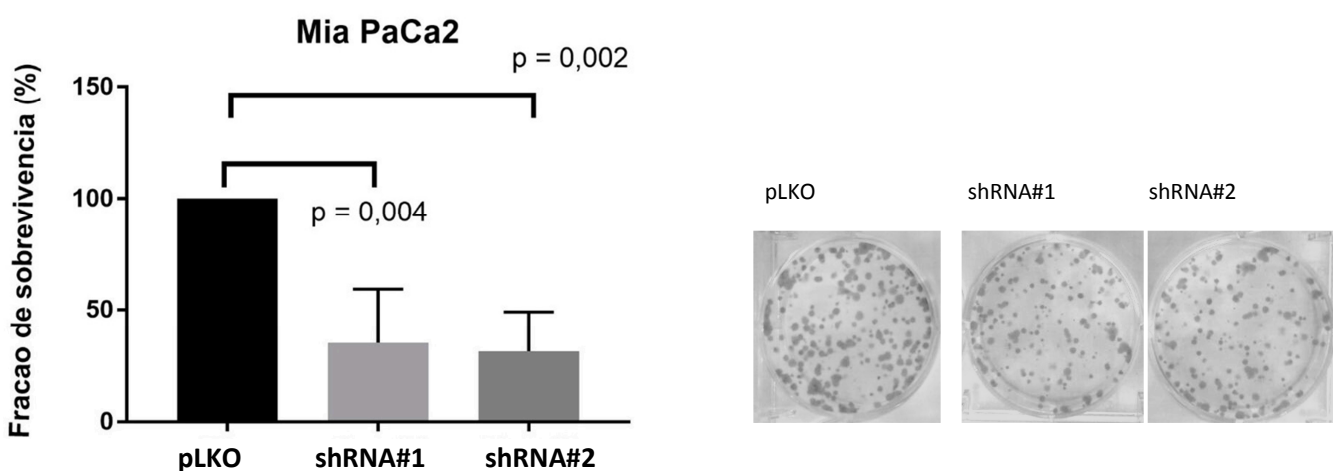


Figura 7. Ensaio clonogênico.

Ensaio clonogênico realizado nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO).

4.6 Ensaio de morte celular por apoptose

Com o intuito de determinar se o silenciamento de *SHOC2* é capaz de sensibilizar as células tumorais frente ao tratamento com o quimioterápico Gemcitabina, foi realizado o ensaio de morte celular por apoptose nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2. A porcentagem de células apoptóticas foi avaliada por meio da marcação com Anexina-V (apoptose inicial) e da marcação simultânea por Anexina-V e PI (apoptose tardia), enquanto a porcentagem de células necróticas foi avaliada por meio da marcação isolada com PI.

É possível observar na Figura 8, que o tratamento com Gemcitabina induz o aumento de morte celular por apoptose em pelo menos 50% em ambas as linhagens avaliadas, ($p = 0,002$ e $p < 0,001$ nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2, respectivamente; Two-Way ANOVA), embora nota-se que a taxa de apoptose na linhagem PANC-1 é significativamente menor quando comparada à linhagem MIA PaCa-2. Entretanto, ao analisarmos a indução de apoptose após o silenciamento de *SHOC2* (utilizando os vetores para shRNA#1 e shRNA#2) em relação aos respectivos controles (pLKO vazio), não foi observado aumento significativo de apoptose nessas células tanto na linhagem PANC-1 quanto na MIA PaCa-2 (Figura 8; One-Way ANOVA). Por fim, ao avaliarmos a interação do silenciamento gênico de *SHOC2* e o tratamento com Gemcitabina, observou-se que não houve interação significativa entre esses dois fatores com relação à indução de morte celular por apoptose ($p = 0,794$ e $p = 0,532$ nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2, respectivamente; Two-way ANOVA). Dessa maneira, os resultados sugerem que o silenciamento de *SHOC2* não seja capaz de sensibilizar as linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 frente ao tratamento quimioterápico com Gemcitabina.

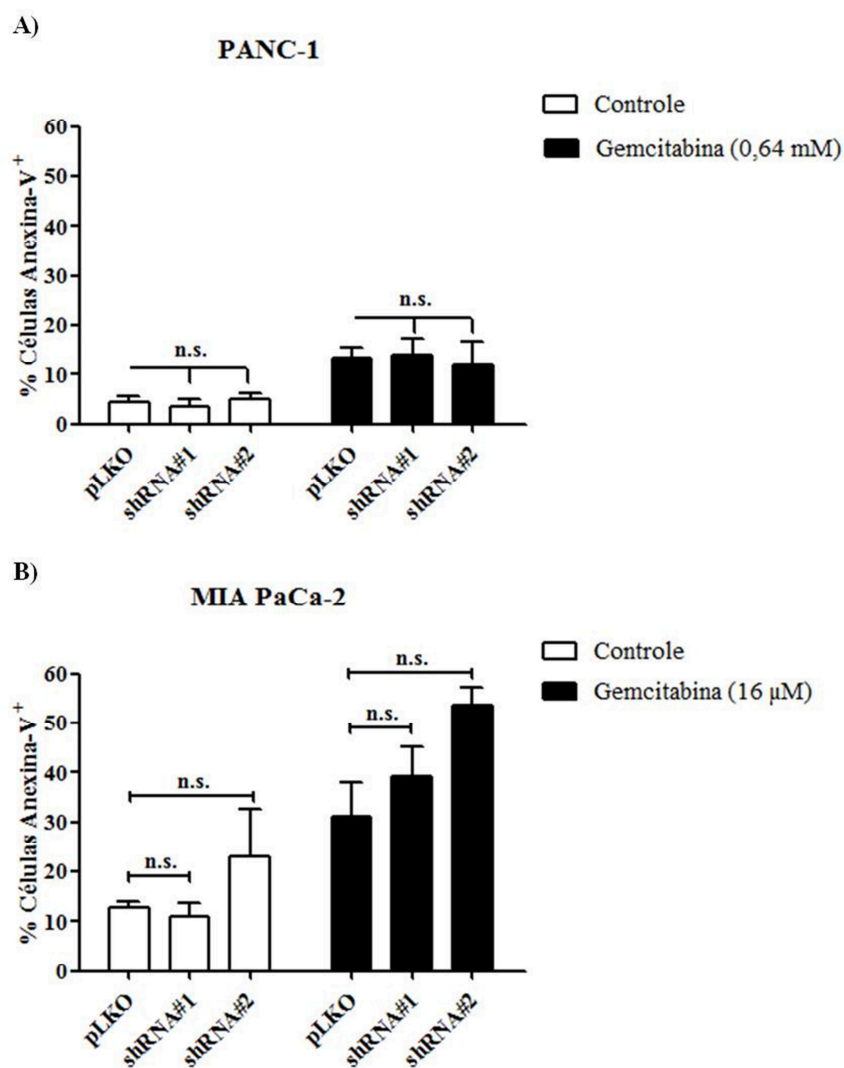


Figura 8. Ensaio de morte celular por apoptose.

Ensaio de morte celular por apoptose realizado nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO), com e sem o tratamento com o quimioterápico Gemcitabina. (n.s. = não significativo, One-Way ANOVA).

4.7 Análise da expressão proteica de p-ERK1/2 e ERK1/2 total nas linhagens transduzidas

Com o intuito de avaliar se o silenciamento de *SHOC2* impacta a ativação da via ERK/MAPK nas células tumorais, foram realizadas análises da expressão proteica de efetores *downstream* da via: o efetor final ERK1/2 e sua forma fosforilada (ativa), p-ERK1/2. Na Figura 9A é possível observar que ocorre uma redução da expressão proteica de p-ERK1/2 após o silenciamento de *SHOC2*, em relação ao controle (pLKO) em ambas as linhagens analisadas. Embora essa redução se mostre de maneira sutil na linhagem PANC-1, pode-se observar um efeito mais evidente no shRNA#1 da linhagem MIA PaCa-2 (Figura 9B).

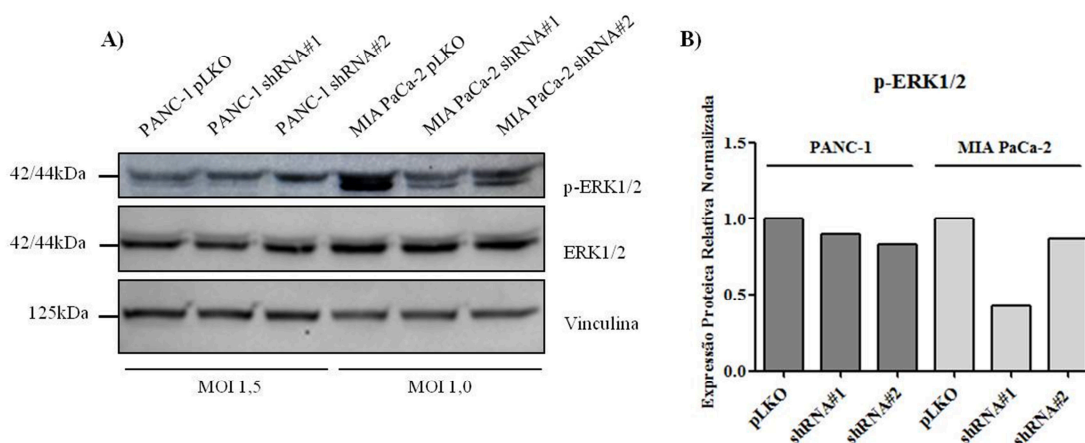


Figura 9. Análise da expressão proteica dos efetores da via ERK/MAPK.

A) Análise de expressão proteica por *Western Blot* para as proteínas p-ERK1/2 e ERK1/2 total nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO). (Vinculina – proteína endógena. kDa = kilodaltons) **B)** Quantificação relativa da expressão proteica normalizada pelo controle (pLKO).

4.8 Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Buscando compreender o papel do silenciamento de *SHOC2* na manutenção do metabolismo da célula tumoral por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), foram realizados ensaios de quantificação da produção de ROS. Na Figura 10 é possível observar que em ambas as linhagens analisadas ocorre uma redução da produção de ROS após o silenciamento de *SHOC2*, em relação ao controle (pLKO), especialmente na linhagem PANC-1, embora essa redução não seja considerada significativa.

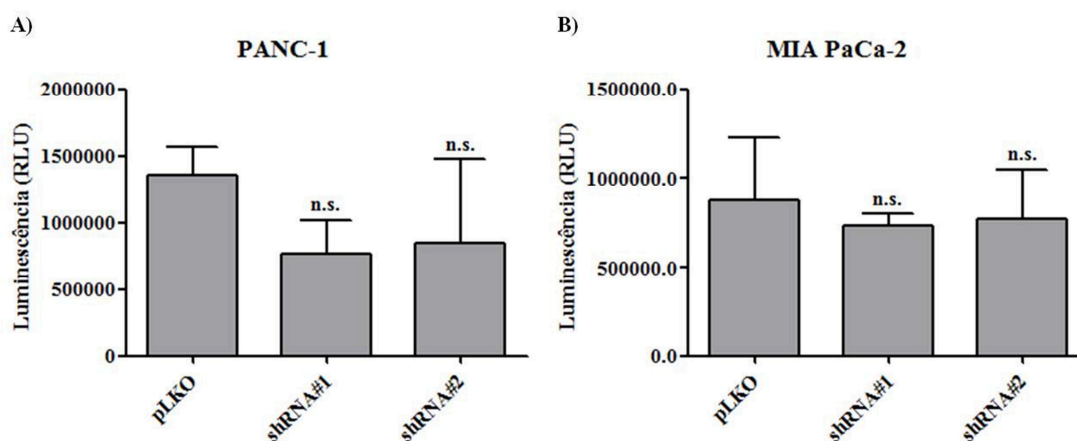


Figura 10. Ensaio de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Quantificação da produção de ROS mensurada em taxa de luminescência (RLU), realizado nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO).

4.9 Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona

A fim de compreender o papel do silenciamento de *SHOC2* na manutenção do equilíbrio redox da célula tumoral, por meio da capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, foram realizados ensaios de quantificação dos níveis de glutathiona. Nesse contexto, foram avaliados os níveis de glutathiona total, que englobam os níveis das formas reduzida e oxidada desta molécula, bem como os níveis de glutathiona reduzida e oxidada separadamente. Na Figura 11A, é possível observar que o silenciamento de *SHOC2* provoca um discreto aumento dos níveis de glutathiona total na linhagem PANC-1 em relação ao controle (pLKO vazio), especialmente no clone shRNA#1, porém esse aumento não é estatisticamente significativo. Na Figura 12A, observa-se que esse aumento é devido principalmente à elevação dos níveis de glutathiona na forma reduzida, e de maneira menos expressiva, da forma oxidada.

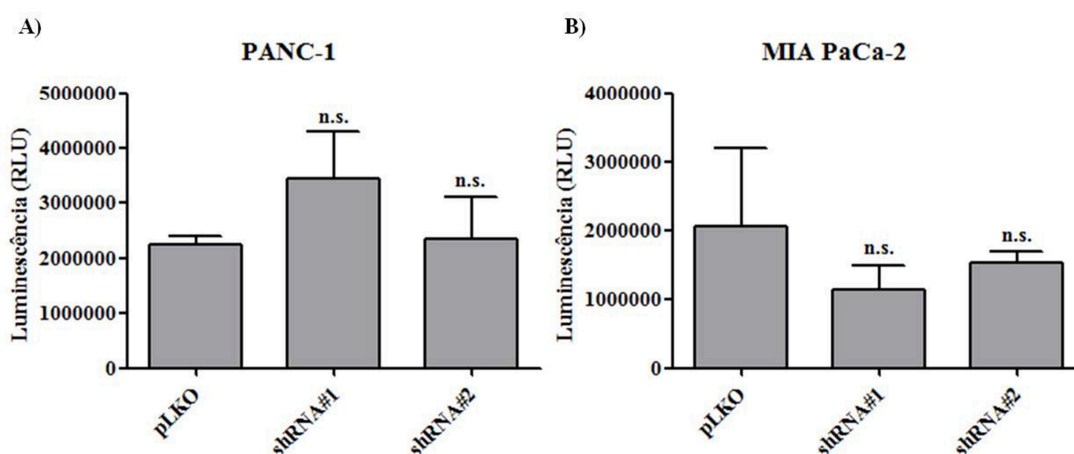


Figura 11. Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona total.

Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona total, mensurados em taxa de luminescência (RLU), realizado nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO).

Já com relação à linhagem MIA PaCa-2, observa-se na Figura 11B uma discreta redução dos níveis de glutathiona total em ambos os clones analisados, em relação ao controle, sem no entanto, apresentar significância estatística. Na Figura 12B, é possível constatar que a redução dos níveis de glutathiona total, nesse caso, se deve à diminuição dos níveis de glutathiona reduzida, e não da forma oxidada dessa molécula.

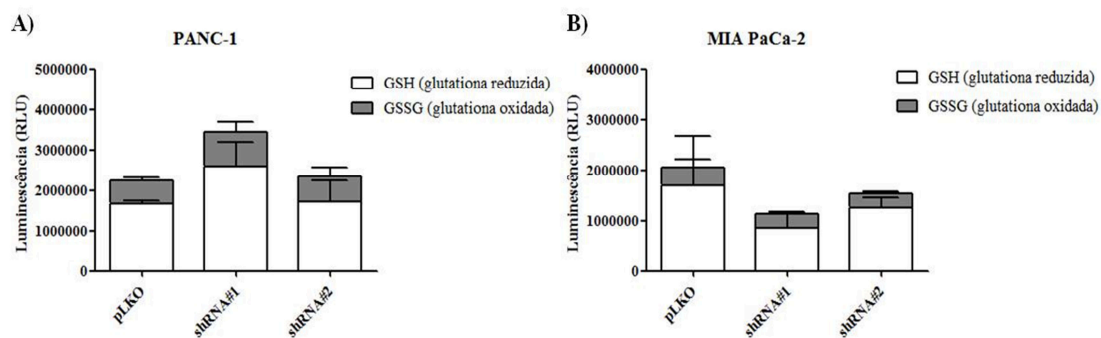


Figura 12. Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada.

Ensaio de quantificação dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada, mensurados em taxa de luminescência (RLU), realizado nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B) após o silenciamento de *SHOC2* pelos shRNA#1 e shRNA#2, em relação ao controle (pLKO).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Estima-se que em 2030 o ADP se torne a segunda principal causa de morte por câncer (Rahib *et al.*, 2014). Atualmente as opções terapêuticas são limitadas, havendo a extrema necessidade de investigar estratégias de tratamento inovadoras. No ADP a ativação do proto-oncogene *KRAS* é a alteração genética mais frequentemente encontrada, sendo responsável (entre outros processos) pela reprogramação metabólica e controle do estresse oxidativo (Hoffmann *et al.*, 2008). A estimulação de múltiplas vias de sinalização *downstream* à *KRAS*, como as vias MAPKs, é quem determina a modulação de diversos processos celulares essenciais para o desenvolvimento tumoral (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Uma das principais vias de sinalização envolvendo MAPKs é a via RAS-RAF-MEK-ERK, que está implicada na regulação de inúmeros genes que controlam a proliferação, diferenciação e a transformação celular (Castellano e Downward, 2011).

É sabido que a proteína SHOC2, também conhecida como SUR-8, atua como um adaptador, uma molécula de arcabouço que favorece a interação de RAS e RAF e portanto, a ativação de ERK (molécula efetora da via). Neste contexto, o estudo da regulação da cascata de sinalização RAS-ERK pela proteína SHOC2 fornece novas perspectivas para um melhor entendimento do desenvolvimento e progressão do ADP, como também pode contribuir para a identificação de estratégias terapêuticas mais eficazes. Com base nestas observações, nós investigamos se o silenciamento do gene *SHOC2* seria capaz de regular a capacidade de sobrevivência celular e o estresse oxidativo das células de ADP através da regulação da via de sinalização RAS/ERK.

Como previamente citado, a cascata de sinalização envolvendo ERK1/2 é responsável pela modulação de diversos processos celulares e por isso é altamente regulada. As proteínas de arcabouço, neste caso a proteína SHOC2, foi inicialmente sugerida como potencializadora, ou seja, um modulador positivo da transmissão geral dos sinais de ERK (Rodrigues Viciano *et al.*, 2006). Mais recentemente, Jeoung e colaboradores (2016), realizaram o silenciamento do gene *SHOC2* seguido de um ensaio de genômica funcional e observaram mais de 800 genes diferencialmente expressos após a inibição de *SHOC2*. Esse resultado sugere que a sinalização de ERK1/2 mediada pela ação de SHOC2 pode ativar diversas vias de sinalização alternativas (Jeoung *et al.*, 2016).

Para compreender o papel de SHOC2 na regulação da capacidade de sobrevivência das células de ADP realizamos o silenciamento do gene *SHOC2*, buscando a atenuação via de sinalização RAS-RAF-ERK. Após o silenciamento gênico a capacidade de formar colônias

das células foi altamente impactada, sugerindo que SHOC2 desempenha um papel importante para manter a sobrevivência celular. Esse é o primeiro trabalho que demonstra a participação do gene *SHOC2* especificamente na capacidade de sobrevivência clonogênica de células de ADP.

Outros estudos envolvendo o gene *SHOC2*, também relataram a sua importância em processos cruciais para a tumorigênese como motilidade e adesão. Por exemplo, Jeoung e colaboradores (2016) mostraram que o silenciamento de *SHOC2* tem um impacto significativo na expressão de diversos genes associados com a adesão celular. Para validar esse achado, ensaios funcionais em linhagens de fibroblastos NT, LV1 e SR (derivadas de COS-1) foram realizados e mostraram que o silenciamento de *SHOC2* causou a diminuição na capacidade de adesão celular das células, mediada pela redução da expressão de LGALS3BP, que é uma proteína de matriz extracelular e, portanto, essencial para o início da mobilidade e adesão celular (Jeoung *et al.*, 2016). Em consonância com nossos resultados, estes dados corroboram o potencial de *SHOC2* em modular processos importantes da biologia tumoral.

Em trabalho publicado por Kaduwal e colaboradores (2015) investigando tumores sólidos, como no melanoma, foi demonstrado um aumento da sinalização das vias RAS e PI3K mediadas por SHOC2. Neste trabalho, o silenciamento de SHOC2 foi associado à regulação do potencial metastático pela modulação da via de sinalização RAS/PI3K. Os resultados mostraram que a atividade de ERK1/2 e Akt foram significativamente reduzidas pelo silenciamento do gene *SHOC2* em todas as linhagens celulares de melanoma estudadas, apresentando uma inibição do seu potencial migratório e de suas propriedades invasivas (Kaduwal *et al.*, 2015). Concordante com este estudo, outro realizado por Young e colaboradores (2013), mostram que em células de fibrossarcoma HT-1080 ou células de carcinoma de mama, MDA-231, modificadas com *MRAS* mutante e ambas com silenciamento do gene *SHOC2*, apresentaram uma inibição significativa na capacidade tumorigênica *in vivo* destas células (Young *et al.*, 2013). Os resultados de Young e colaboradores destacam que SHOC2 é preferencialmente necessário para proliferação celular em células com a presença de mutação no gene *RAS*.

Para compreender qual mecanismo adjacente poderia estar envolvido no processo de sobrevivência mediado por SHOC2 no ADP, decidimos avaliar se o silenciamento deste gene poderia induzir a morte por apoptose das células de ADP isolado ou em combinação com a gemcitabina, quimioterápico padrão utilizado no tratamento do ADP e em outros tumores sólidos (Nagourney *et al.*, 2008). Os resultados mostraram que o silenciamento de *SHOC2* não causou nenhum impacto relevante na taxa de indução de morte celular por apoptose,

sugerindo que a inibição da capacidade clonogênica observada neste trabalho não é mediado pela indução de apoptose. Kaplan e colaboradores também avaliaram a participação de SHOC2 no processo de resistência à apoptose em células de melanoma contendo mutações nos genes B-RAF e NRAS. Neste estudo foi observado que o silenciamento de *SHOC2* não induz apoptose e também não modifica os níveis de fosforilação de ERK1/2 na presença das duas mutações; porém, quando as células são submetidas ao tratamento com um inibidor de B-RAF, ocorre uma redução significativa da fosforilação de ERK1/2 e aumento da taxa de apoptose. Esses dados mostram que mutações específicas podem modular a ativação da via e a participação de moléculas regulatórias como SHOC2 podem ser importantes principalmente para ativação mediada por mutações em genes da família RAS (NRAS, KRAS) (Kaplan *et al.*, 2012).

É sabido que a proliferação e a sobrevivência celular são diretamente reguladas pela atividade de ERK, como acima exemplificado. Sendo assim, tendo em vista que SHOC2 participa da modulação do potencial de ativação de ERK, sugere-se que essa mesma molécula possa regular a capacidade proliferativa e de sobrevivência das células por meio da ativação de ERK.

Diante desse dado, a próxima questão a ser elucidada seria a participação de SHOC2 na modulação de ERK durante esse processo. Para tanto, após o silenciamento de SHOC2 foi averiguada a ativação de ERK, via fosforilação, em ambas as linhagens investigadas. Como esperado, de fato o silenciamento de SHOC2 reduziu a fosforilação, e, portanto, a função de ERK. Esse dado corrobora nossa hipótese inicial de que SHOC2 desempenha um papel importante em vias de sobrevivência celular regulando a atividade de ERK. Vale ressaltar, porém, que em uma das linhagens (PANC-1) o silenciamento do gene *SHOC2* causou uma redução sutil da fosforilação de ERK, deixando em aberto outras possibilidades de vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular.

Em um estudo realizado para avaliar a manutenção do ADP sob o *knockdown* do gene *KRAS*, verificando qual a sua dependência para a sobrevivência celular, Pan-Yu Chen e colaboradores mostraram em seus resultados que as células de ADP são capazes de proliferar mesmo sob *knockdown* de *KRAS*, como também mantiveram sua capacidade tumorigênica *in vitro* e *in vivo*. Análises fosfoproteômicas confirmaram que a sustentação do crescimento foi resultado de uma adaptação celular por ativação de vias de sinalizações alternativas, onde identificaram a ativação da regulação de um conjunto de genes associados com tirosina quinase receptoras (RTK) e na sinalização de PI3K/Akt, possivelmente em resposta à inibição de *KRAS*, para sustentar a proliferação das células de ADP (Chen *et al.*, 2017). Em conjunto

esses dados mostram que na redução da sinalização por *RAS* outros mecanismos podem ativar vias alternativas que sustentem a proliferação e sobrevivência das células tumorais.

Em relação à proteína SHOC2, a perda da expressão gênica também pode alterar a expressão de outros fatores de transcrição. De acordo com Myoungkun e colaboradores (2016) SHOC2 foi associada à regulação de mais de 800 genes, sendo que destes, um grupo de 171 genes (entre ativados e reprimidos 80) formam um *cluster* de diferentes classes de proteínas (fatores de crescimento, aglutinantes de ácido nucleico, moléculas de sinalização e receptores) associadas à motilidade, invasão e sobrevivência celular. Os fatores de crescimento e mitógenos usam a cascata de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK para transmitir sinais de seus receptores para regular a expressão gênica e prevenir a apoptose. Outros componentes das vias RAS/RAF/MEK/ERK e RAS/PI3K/PTEN/AKT interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos a tumorigênese. Embora ambas as vias sejam normalmente relacionadas a efeitos anti-apoptóticos e de resistência a drogas, elas exibem efeitos específicos que variam de acordo com a linhagem celular (Steelman *et al.*, 2004).

Diante dos dados até agora apresentados, observamos que o silenciamento de *SHOC2* interfere com a capacidade clonogênica das células de ADP, entretanto, a redução da fosforilação de ERK1/2 e a indução de apoptose, mecanismos intuitivamente esperados, não foram observados. Nesse caso, o próximo passo para buscar elucidar o envolvimento de SHOC2 com a sobrevivência das células tumorais de ADP foi avaliar o processo de estresse oxidativo nessas células.

Além da conhecida dependência do metabolismo da glicose pelas células de ADP, mediada pela atividade oncogênica de KRAS, evidências recentes demonstraram que algumas células tumorais utilizam também o metabolismo da glutamina para suportar processos anabólicos e sustentar a proliferação celular exacerbada (Hui *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Son Jaekyoung e colaboradores, células de ADP foram sensíveis à privação de glutamina apresentando uma redução significativa na sobrevivência clonogênica. Neste trabalho também analisaram a via de conversão da glutamina que é a responsável pela manutenção do equilíbrio redox, por meio da produção de NADPH, sendo necessária para suportar o crescimento tumoral contínuo. Este NADPH tem a capacidade de manter a glutatona em sua forma reduzida (GSH), pois quando a mesma reduz ROS, passa para sua forma oxidada (GSSG), mas para continuar o ciclo de redução de mais ROS necessita voltar para sua forma reduzida, GSH. Portanto, a metabolização de glutamina, mantém a homeostase redox pela manutenção da glutatona na sua forma reduzida. Sabendo desta relação entre o metabolismo da glutamina para sustentar o crescimento tumoral das células de ADP, nós

decidimos averiguar qual o impacto do silenciamento de *SHOC2* no controle do estresse oxidativo por meio da análise da produção de espécies reativas de oxigênio e da dosagem dos níveis de glutathiona.

Na análise de quantificação de ROS não observamos diferença estatisticamente significativa após o silenciamento de *SHOC2*, assim como não houve impacto algum nos níveis de glutathiona total ou oxidada. Esses dados mostram que, aparentemente, o potencial de sinalização de ERK1/2 mediada por *SHOC2* não interfere no controle do estresse oxidativo das células de ADP. Esse dado é discrepante dos principais relatos da literatura que descrevem o papel de ERK1/2 no controle do estresse oxidativo. Por outro lado, vale ressaltar que a modulação da fosforilação de ERK1/2 que observamos após o silenciamento de *SHOC2* não diferiu muito dos níveis basais de ativação na linhagem PANC-1, o que pode ter subestimado as alterações que potencialmente poderiam ocorrer caso a redução da sinalização de ERK1/2 fosse de fato significativa. Isso porque a ativação de ERK1/2 induzida pelo estresse oxidativo é relatada em uma variedade de tipos celulares.

Estudos mostram que níveis elevados ROS ativam vias de sinalização mitogênica, como RAF/MEK/ERK, induzindo o bloqueio do ciclo celular, a senescência e a apoptose de células tumorais (Cesi *et al.*, 2017). Em alguns casos, ROS atua diretamente nos receptores de crescimento, como o EGFR, de forma independente do ligante e induzem a ativação da sinalização RAS/ERK. Este tipo de sinalização não parece estar limitado ao EGFR, pois ROS também é capaz de induzir a ativação independente do ligante do receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), causando um aumento subsequente nas atividades de RAS e ERK1/2. Esta ativação não é o único mecanismo pelo qual ROS ativa a via de sinalização ERK. ROS também induz a ativação da via de sinalização ERK1/2 em células com depleção de RAS (Slater *et al.*, 1995) por meio da inibição de proteínas fosfatases que regulam negativamente a função de ERK1/2. Desta forma, a cascata de sinalização de ERK pode ser ativada por ROS em diferentes níveis de regulação (Hentze *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que as células tumorais do ADP são conhecidas por reprogramar sua via metabólica para sustentar o crescimento tumoral (Kimmelman, 2015) como também na desregulação do metabolismo de lipídios, carboidratos e aminoácidos. Goonesekere e colaboradores realizaram uma análise de genes downregulados em tumores pancreáticos, na qual dos 471 genes downregulados 78 estão associados ao metabolismo de carboidratos. Em destaque dentre estes genes estão dois fatores de transcrição, PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) e HIF1A (subunit of heterodimeric transcription factor HIF-1). PDX1 é necessário para o desenvolvimento do pâncreas, incluindo a maturação de células β e

diferenciação duodenal, já HIF1A é o principal regulador celular na resposta ao microambiente hipóxico (Semenza, 2010), na qual pode ser afetado por KRAS para inibir o ciclo TCA (Chiaradonna *et al.*, 2006). A presença destes genes downregulados envolvidos na desregulação do metabolismo de lipídios, carboidratos e aminoácidos, pode explicar a discrepância dos nossos resultados, pois com este estudo verificamos que há uma complexa rede de interação e variados níveis de regulação desse processo.

Em conclusão, a identificação de alvos terapêuticos e desenvolvimento de drogas eficazes para o tratamento de ADP é uma necessidade para toda população, já que este tipo de tumor vai se tornar a segunda principal causa de morte por câncer, até 2030. O processo de descoberta de alvos terapêuticos é orientado pela compreensão das vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão deste tumor, pois possui uma alta complexidade devido às alterações no seu metabolismo para sustentar seu desenvolvimento tumoral. Como exploramos o papel da via RAS/RAF/ERK por modulação da proteína de arcabouço SHOC2, vemos que há alterações relevantes na proliferação e sobrevivência celular, sem, no entanto, alterar o controle do estresse oxidativo, o que dificulta a interpretação de nossos dados. Nesse caso, apesar da identificação de um fenótipo importante associada ao uma molécula reguladora nunca descrita para as células de ADP, acreditamos que outros estudos devam ser realizados para abranger outras vias de sinalização na qual estejam envolvidas na apoptose, metabolismo celular e estresse oxidativo. Assim, seremos capazes de contribuir para a elucidação dessa complexa rede de interações presente no adenocarcinoma pancreático.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- O silenciamento do gene *SHOC2* causou uma redução drástica na capacidade de sobrevivência das linhagens de ADP PANC-1 e MIA PaCa-2;
- A redução da expressão de *SHOC2* não causou impacto na taxa de apoptose das células de ADP;
- O controle do estresse oxidativo nas células de ADP não é alterado pela função de *SHOC2*;
- A ativação da via de sinalização ERK1/2 nas células de ADP é mediada por *SHOC2*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **J Gastrointest Oncol**, v. 3, n. 2, p. 105-19, Jun 2012. ISSN 2219-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811878> >.

BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897-909, Dec 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459728> >.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem**, v. 390, n. 3, p. 191-214, Mar 2009. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166318> >.

BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897-909, Dec 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459728> >.

BERNDT, N.; SEBTI, S. M. Measurement of protein farnesylation and geranylgeranylation in vitro, in cultured cells and in biopsies, and the effects of prenyl transferase inhibitors. **Nat Protoc**, v. 6, n. 11, p. 1775-91, Nov 2011. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036881> >.

BLACKFORD, A. et al. Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. **Cancer Res**, v. 69, n. 8, p. 3681-8, Apr 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351817> >.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. **Clin Invest Med**, v. 12, n. 3, p. 154-61, Jun 1989. ISSN 0147-958X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2743633> >.

BURRIS, H. A. et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. **J Clin Oncol**, v. 15, n. 6, p. 2403-13, Jun 1997. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196156> >.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040186> >.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 261-74, Mar 2011. ISSN 1947-6027. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779497> >.

CESI, G. et al. ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells. **Mol Cancer**. 2017 Jun 8;16(1):102. doi: 10.1186/s12943-017-0667-y.

CHEN, P. Y. et al. Adaptive and reversible resistance to Kras inhibition in pancreatic cancer cells. **Cancer Res**, Dec 2017. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279356> >.

CHIARADONNA, F. et al. Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1338-56, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987493> >.

CONROY, T. et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. **N Engl J Med**, v. 364, n. 19, p. 1817-25, May 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561347> >.

CROSS, T. G. et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 34-41, Apr 2000. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739649> >.

DANG, C. V. Cancer cell metabolism: there is no ROS for the weary. **Cancer Discov**, v. 2, n. 4, p. 304-7, Apr 2012. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22576206> >.

DISTLER, M. et al. Evaluation of survival in patients after pancreatic head resection for ductal adenocarcinoma. **BMC Surg**, v. 13, p. 12, Apr 2013. ISSN 1471-2482. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607915> >.

GAGLIO, D. et al. Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 523, Aug 2011. ISSN 1744-4292. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21847114> >.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 313-9, Oct 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488754> >.

GLASAUER, A.; CHANDEL, N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. **Biochem Pharmacol**, v. 92, n. 1, p. 90-101, Nov 2014. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078786> >.

GOURGOU-BOURGADE, S. et al. Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 1, p. 23-9, Jan 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23213101> >.

GUILLAUMOND, F. et al. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 10, p. 3919-24, Mar 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407165> >.

GYSIN, S. et al. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 359-72, Mar 2011. ISSN 1947-6027. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779505> >.

HENTZE, H. et al. Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 5588-95, Feb 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734564> >.

HIDALGO, L. et al. Obstructive jaundice as a complication of a peptic duodenal ulcer mimicking pancreatic cancer. **Endoscopy**, v. 42 Suppl 2, p. E294-5, 2010. ISSN 1438-8812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113877> >.

HOFFMANN, A. C. et al. High expression of HIF1 α is a predictor of clinical outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA, VEGF, and bFGF. **Neoplasia**, v. 10, n. 7, p. 674-9, Jul 2008. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592007> >.

HUI, S. et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. **Nature**. 2017 Nov 2;551(7678):115-118. doi: 10.1038/nature24057. Epub 2017 Oct 18.

INFANTE, J. R. et al. A phase I, dose-escalation study of pomalidomide (CC-4047) in combination with gemcitabine in metastatic pancreas cancer. **Eur J Cancer**, v. 47, n. 2, p. 199-205, Jan 2011. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051221> >.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, Dec 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471242> >.

JONES, S. et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1801-6, Sep 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772397> >.

KADUWAL, S. et al. Sur8/Shoc2 promotes cell motility and metastasis through activation of Ras-PI3K signaling. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33091-105, Oct 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384305> >.

KIM, R. FOLFIRINOX: a new standard treatment for advanced pancreatic cancer? **Lancet Oncol**, v. 12, n. 1, p. 8-9, Jan 2011. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050812> >.

KIMMELMAN, A. C. Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 8, p. 1828-34, Apr 2015. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878364> >.

KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 827-37, Nov 2005. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16227978> >.

KONG, B. et al. Overview on how oncogenic Kras promotes pancreatic carcinogenesis by inducing low intracellular ROS levels. **Front Physiol**, v. 4, p. 246, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062691> >.

KOONG, A. C. et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 48, n. 4, p. 919-22, Nov 2000. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072146> >.

KOORSTRA, J. B. et al. Pancreatic carcinogenesis. **Pancreatology**, v. 8, n. 2, p. 110-25, 2008. ISSN 1424-3911. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382097> >.

KRAUTZ, C. et al. An update on molecular research of pancreatic adenocarcinoma. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 5, p. 411-7, Jun 2011. ISSN 1875-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492076> >.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 22, p. 3525-44, Nov 2008. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668205> >.

LEENDERS, M. et al. Plasma cotinine levels and pancreatic cancer in the EPIC cohort study. **Int J Cancer**, v. 131, n. 4, p. 997-1002, Aug 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953524> >.

LIAO, W. C. et al. Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 11, p. 1095-103, Oct 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035532> >.

MACGREGOR-DAS, A. M.; IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. **J Surg Oncol**, v. 107, n. 1, p. 8-14, Jan 2013. ISSN 1096-9098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806689> >.

MINI, E. et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. **Ann Oncol**, v. 17 Suppl 5, p. v7-12, May 2006. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807468> >.

MORRISON, D. K.; DAVIS, R. J. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 19, p. 91-118, 2003. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570565> >.

NAGOURNEY, R. A. et al. Carboplatin plus gemcitabine repeating doublet therapy in recurrent breast cancer. **Clin Breast Cancer**, v. 8, n. 5, p. 432-5, Oct 2008. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952557> >.

OTTENHOF, N. A. et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 3, p. 375-81, Mar 2009. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19260743> >.

PAL, A. et al. Usp9x Promotes Survival in Human Pancreatic Cancer and Its Inhibition Suppresses Pancreatic Ductal Adenocarcinoma In Vivo Tumor Growth. **Neoplasia**, v. 20, n. 2, p. 152-164, Dec 2017. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248719> >.

PORTA, M. et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. **Clin Transl Oncol**, v. 7, n. 5, p. 189-97, Jun 2005. ISSN 1699-048X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960930> >.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761-74, Nov 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993244> >.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J Endocrinol**, v. 223, n. 3, p. R49-62, Dec 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271217> >.

REAL, F. X.; CIBRIÁN-UHALTE, E.; MARTINELLI, P. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. **Gastroenterology**, v. 135, n. 3, p. 724-8, Sep 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692502> >.

RODRIGUEZ-VICIANA, P. et al. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. **Mol Cell**, v. 22, n. 2, p. 217-30, Apr 2006. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630891> >.

ROSENFELDT, M. T. et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. **Nature**, v. 504, n. 7479, p. 296-300, Dec 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24305049> >.

RYAN, D. P.; HONG, T. S.; BARDEESY, N. Pancreatic adenocarcinoma. **N Engl J Med**, v. 371, n. 22, p. 2140-1, Nov 2014. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427123> >.

SAIF, M. W. Pancreatic neoplasm in 2011: an update. **JOP**, v. 12, n. 4, p. 316-21, Jul 2011. ISSN 1590-8577. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737886> >.

SCHEFFZEK, K. et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 333-8, Jul 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219684> >.

SEMENZA, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 51-6, Feb 2010. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942427> >.

SIEBURTH, D. S.; SUN, Q.; HAN, M. SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 94, n. 1, p. 119-30, Jul 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674433> >.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 11-30, Jan 2013. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335087> >.

SLATER, A. F. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol Lett**, v. 82-83, p. 149-53, Dec 1995. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8597043> >.

SON, J. et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 101-5, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535601> >.

STAMPOLIDIS, P.; ULLRICH, A.; IACOBELLI, S. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, promotes oncogenic cellular events impeded by antibody intervention. **Oncogene**, v. 34, n. 1, p. 39-52, Jan 2015. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362527> >.

STATHIS, A.; MOORE, M. J. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 3, p. 163-72, Mar 2010. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101258> >.

STEELMAN, L. S. et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, v. 18, n. 2, p. 189-218, Feb 2004. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737178> >.

TRAINI, S. et al. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by SP-2, an anti-lectin, galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) antibody. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 4, p. 916-25, Apr 2014. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24552775> >.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-33, May 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460998> >.

VINCENT, A. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 607-20, Aug 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620466> >.

VON HOFF, D. D. et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. **N Engl J Med**, v. 369, n. 18, p. 1691-703, Oct 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131140> >.

WILS, J. et al. Phase II study of epirubicin in advanced adenocarcinoma of the pancreas. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 21, n. 2, p. 191-4, Feb 1985. ISSN 0277-5379. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3857181> >.

WISE, D. R.; THOMPSON, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 8, p. 427-33, Aug 2010. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570523> >.

YACHIDA, S. et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1114-7, Oct 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981102> >.

YING, H. et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 656-70, Apr 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541435> >.

YOSHIKI, S. et al. Ras and calcium signaling pathways converge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 6, p. 1088-96, Mar 2010. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071468> >.

YOUNG, L. C. et al. An MRAS, SHOC2, and SCRIB complex coordinates ERK pathway activation with polarity and tumorigenic growth. **Mol Cell**, v. 52, n. 5, p. 679-92, Dec 2013. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211266> >.

YUE, J.; MULDER, K. M. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. **J Biol Chem**, v. 275, n. 40, p. 30765-73, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843986> >.

ZIECH, D. et al. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 711, n. 1-2, p. 167-73, Jun 2011. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419141> >.