

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MACIEL VIEIRA

**Fosfatases de dupla especificidade interferem na resposta de
células de adenocarcinoma ductal pancreático ao tratamento
com gemcitabina**

Ribeirão Preto – SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MACIEL VIEIRA

Fosfatases de dupla especificidade interferem na resposta de células de adenocarcinoma ductal pancreático ao tratamento com gemcitabina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

Ribeirão Preto – SP

2021

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.

Vieira, Gabriela Maciel

Fosfatases de dupla especificidade interferem na resposta de células de adenocarcinoma ductal pancreático ao tratamento com gemcitabina. Ribeirão Preto, 2021.

136 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Silveira, Vanessa da Silva.

1. Adenocarcinoma ductal pancreático. 2. Fosfatases de dupla especificidade. 3. Quimiorresistência.

Apoio e Suporte Financeiro

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2015/10694-5);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FAEPA;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gabriela Maciel Vieira

Título: Fosfatases de dupla especificidade interferem na resposta de células de adenocarcinoma ductal pancreático ao tratamento com gemcitabina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta Tese às minhas queridas avós:

*Minha avó materna Dalila, de quem herdei toda minha
força e garra;*

*Minha avó paterna Eva (in memoriam), que faleceu em
decorrência deste terrível tumor, objeto de meu estudo.*

Amo vocês incondicionalmente!

Agradecimentos

À toda minha família pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos. Principalmente minha mãe Sandra Mara Maciel Vieira, que é minha inspiração diária de força, dedicação e amor, meu pai Clodoaldo Gonçalves Vieira que é meu porto seguro, exemplo de bondade e amor e meu querido irmão Lucas Maciel Vieira. Amo vocês!

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira, por me orientar ao longo deste trabalho e me acolher em seu laboratório. Obrigada por todo o aprendizado, incentivo e, principalmente, por acreditar tanto em mim e ser inspiração de cientista, professora e mulher.

Ao Prof. Dr. Michael Vansaun e todo Departamento de Biologia do Câncer da *Kansas University Medical Center*, por me receberem tão bem nos 6 meses que estive lá, pelos aprendizados e experiências.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, por ter me recebido no Laboratório de Puericultura e Pediatria do Hospital das Clínicas – USP, onde realizei parte dos meus experimentos.

Às secretárias do Departamento de Genética Susie Adriana Pena Nalon e Sílvia Sant'anna Consiglieri e à secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria Evelise Visconte Juliani, pela atenção e ajuda sempre prestadas.

Às técnicas do Laboratório de Puericultura e Pediatria Dra. Rosane de Paula Gomes Queiroz, Veridiana Kill Suazo e Beth Perna, por todo auxílio e paciência.

Aos professores Dr. Geraldo Passos e Dra. Zilá Simões, além de todos os alunos dos respectivos laboratórios, por disponibilizarem os laboratórios para realização de experimentos e por terem nos acolhido quando precisamos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pela avaliação do meu trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade e pela estrutura utilizada durante a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado e apoio financeiro - Código de Financiamento 001 e pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida pelo Edital CAPES PrInt.

À Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA) pelo apoio financeiro.

À todos os colegas e amigos do LabOEx (Laboratório de Oncologia Experimental), Verena, Mariana, Pâmela, Bruno e Ilze, pelo companheirismo, discussões científicas e cafezinhos.

Aos meus amigos e colegas do GPOMP (Grupo de Pesquisa em Oncologia Molecular Pediátrica), Mirella, Keteryne, Gabriel, Rodrigo, Carolina, Luciana, Karina, Lenisa, Graziella e Ricardo, pela ajuda, apoio científico e pessoal em todos estes anos.

Ao Dr. Kleiton Borges por todas as discussões científicas, apoio e incentivo.

Aos meus demais amigos da USP de Ribeirão Preto, por tornarem minha jornada nesta cidade muito mais leve e divertida.

À todos que moraram comigo nestes anos de doutorado e aos agregados do 101, pela parceria e amizade, principalmente Maritza, Diana e Pablo. Vocês foram minha família em Ribeirão Preto, vão estar sempre em meu coração!

Aos meus amigos que fiz em Kansas City, Mark, Lígia, Levy, Nathália, Rodrigo, Taynara, Jéssyca, Lidiany, Juliana, Patrícia, Érica, Manuela e Renata. Muito obrigada por me acolherem e serem minha família no tempo que estive aí, vocês são muito especiais!

Às minhas amigas Amanda e Karin, por estarem sempre comigo mesmo distantes. Obrigada pela paciência, incentivo e amor de sempre!

À todos os demais amigos de Cascavel, por me incentivarem, apoiarem e compreenderem minha ausência.

À todas as meninas do grupo “Only Girls – PrInt/PDSE”, por todo apoio, acolhimento e incentivo durante nosso Doutorado Sanduíche e durante a finalização do doutorado. Juntas somos mais fortes!

À todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo/Abstract

VIEIRA, G. M. “**Fosfatases de dupla especificidade interferem na resposta de células de adenocarcinoma ductal pancreático ao tratamento com gemcitabina**”. 2021, 136 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é a mais comum e mais agressiva neoplasia do pâncreas, possuindo um dos piores prognósticos dentre os tumores sólidos. Mutações no gene KRAS ocorrem em 95% dos casos de ADP e causam a ativação de diversas vias de sinalização, como as vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). As principais vias de MAPK são as vias ERK, JNK e p38, que controlam processos celulares importantes para a tumorigênese e quimiorresistência. MAPKs são reguladas por mecanismos de *feedback* exercidos pela atividade de proteínas fosfatases, sendo as fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) a principal classe. O papel das DUSPs na regulação da quimiorresistência do ADP ainda é controverso e pouco explorado. Sendo assim, este trabalho visou investigar o impacto da atividade regulatória das DUSPs na quimiorresistência do ADP. Inicialmente, foi realizado um *screening* fenotípico com o *knockout* de 25 genes da família DUSP pela metodologia CRISPR/Cas9 para identificar DUSPs que exercem influência na quimiorresistência à gemcitabina. Em seguida, foi investigado o papel do alvo de escolha na resistência à gemcitabina, por meio da avaliação de expressão gênica e proteica, da resposta do alvo ao tratamento com gemcitabina, bem como a influência da modulação do alvo em ensaios funcionais e na modulação da fosforilação de quinases. Os resultados mostraram que fosfatases da família DUSP, como DUSP1, DUSP2, DUSP11 e DUSP27 estão associadas com a resistência à gemcitabina, destacando-se nesse caso a DUSP2. Adicionalmente, foi observado que DUSP2 atua na redução da proliferação celular e na indução de apoptose frente à gemcitabina. Foi demonstrado também, que a indução de DUSP2 e o tratamento com gemcitabina causam a modulação da fosforilação de proteínas quinases como ERK1/2, p38, p53 e GSK-3. Interessantemente, a DUSP2 apresenta baixos níveis de expressão em amostras de ADP comparada com o tecido normal. Além disso, foi encontrado que DUSP2 apresenta correlação na expressão gênica e proteica com DUSP1, e que estas duas fosfatases podem exercer funções redundantes e correlatas no contexto da resposta à gemcitabina em células de ADP. Em conclusão, nossos achados mostraram que DUSP2 atua na resposta à gemcitabina em células de ADP, inibindo a proliferação celular e aumentando a apoptose, por meio da modulação da fosforilação de proteínas quinases como ERK1/2, p38, p53 e GSK-3.

Palavras-Chave: Adenocarcinoma ductal pancreático. Fosfatases de dupla especificidade. Quimiorresistência.

VIEIRA, G. M. “**Dual specificity phosphatases impacts on pancreatic ductal adenocarcinoma cell response to gemcitabine treatment**”. 2021, 136 p. Doctoral Thesis - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common and aggressive neoplasm of the pancreas, having one of the worst prognosis among solid tumors. KRAS driver mutations occur in 95% of PDAC cases and cause the activation of several signaling pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK). The main MAPK pathways are MAPK/ERK, JNK, and p38 pathways, which control important cellular processes for tumorigenesis and chemoresistance. Feedback loops exerted by protein phosphatases regulate MAPKs, and the dual-specificity phosphatases (DUSP) are the main class. The role of DUSPs in PDAC chemoresistance is still controversial and poorly elucidated. Therefore, this work aimed to investigate the regulatory activity of DUSPs in PDAC chemoresistance. A phenotypic screening was carried out using the CRISPR/ Cas9 gene-editing technique to knockout 25 genes of the DUSP family in order to identify DUSPs that are important to gemcitabine resistance. Next, we investigated the role of selected DUSP in PDAC chemoresistance, evaluating gene and protein expression, response to gemcitabine, and cell response to the DUSP gene modulation. The results revealed that several DUSPs are involved in gemcitabine resistance, such as DUSP1, DUSP2, DUSP11 and DUSP27, especially DUSP2. In addition, DUSP2 is related to gemcitabine response in PDAC cell lines, by decreasing cell proliferation and increasing rates of apoptosis. We also demonstrated that DUSP2 induction and gemcitabine treatment modulated the phosphorylation of several protein kinases such as ERK1/2, p38, p53, and GSK-3. Interestingly, DUSP2 showed low gene expression in PDAC samples, compared to normal pancreas tissue. Furthermore, DUSP1 and DUSP2 demonstrated gene and protein correlation and related functions in PDAC cell lines response to gemcitabine. In conclusion, our findings showed that DUSP2 acts in PDAC cell lines response to gemcitabine, inhibiting cell proliferation and increasing apoptosis, by modulating the phosphorylation of protein kinases such as ERK1/2, p38, p53 and GSK-3.

Keywords: Pancreatic ductal adenocarcinoma. Dual specificity phosphatase. Chemoresistance.

Lista de Figuras

Figura 1 - Modelo de progressão tumoral do ADP a partir do acúmulo de alterações genéticas.....	29
Figura 2 - Ativação de RAS em células normais e células com mutação em RAS.....	34
Figura 3 - Transdução de sinal das vias de sinalização de MAPKs.....	40
Figura 4 - Fluxograma mostrando o delineamento experimental do presente estudo.....	44
Figura 5 - Vetor lentiviral para expressão estável da proteína Cas9.....	49
Figura 6 - Ensaio de viabilidade celular em linhagens de ADP tratadas com gemcitabina após A) 24, B) 48, C) 72 e D) 96 horas de tratamento.....	57
Figura 7 - Screening para identificação de alvos da família DUSP relacionados à resposta à gemcitabina em ADP.....	60
Figura 8 - Validação do screening fenotípico com a <i>DUSP1</i> e <i>DUSP2</i> nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B).....	62
Figura 9 - Análise da expressão gênica de <i>DUSP2</i> em pacientes com ADP.....	63
Figura 10 - Avaliação da expressão gênica (A) e proteica (B) de <i>DUSP2</i> em linhagens celulares de ADP humanas e de camundongos.....	65
Figura 11 - Análise de correlação entre a expressão dos genes da família DUSP.....	66
Figura 12 - Avaliação da resposta à gemcitabina em linhagens celulares de ADP humanas e de camundongos.....	68
Figura 13 - Avaliação da resposta à gemcitabina em linhagens celulares de CAFs derivadas de camundongos com ADP.....	69
Figura 14 - Avaliação da expressão proteica em linhagens celulares de ADP em resposta à privação de SBF.....	70
Figura 15 - Avaliação da expressão de <i>DUSP2</i> após tratamento com BCI e gemcitabina.....	71
Figura 16 - Avaliação da expressão proteica de <i>DUSP2</i> e da viabilidade celular após tratamento com a droga salubrinal.....	72
Figura 17 - Avaliação da expressão proteica de <i>DUSP2</i> em células de ADP após tratamento com a droga shikonina.....	73
Figura 18 - Confirmação da indução da expressão de <i>DUSP2</i> nas linhagens celulares de ADP.....	74
Figura 19 - Efeito do aumento da expressão de <i>DUSP2</i> na viabilidade (A) e proliferação celular (B) da linhagem de ADP Panc10.05.....	75
Figura 20 - Efeito do aumento da expressão de <i>DUSP2</i> na viabilidade (A) e	

proliferação celular (B) da linhagem de ADP K8484.....	76
Figura 21 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na morte celular por apoptose na linhagem de ADP Panc10.05.....	77
Figura 22 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na morte celular por apoptose na linhagem de ADP K8484.....	77
Figura 23 - Efeito <i>in silico</i> dos genes <i>DUSP2</i> (A) e <i>DUSP1</i> (B) na sensibilidade à gemcitabina em linhagens celulares de ADP.....	78
Figura 24 - Ensaio <i>Phospho Kinase Array</i> para avaliação da fosforilação de diversas proteínas quinases após indução da expressão de DUSP2 e tratamento com a gemcitabina.....	79
Figura 25 - Análise <i>in silico</i> de interação proteica de DUSP2.....	81
Figura 26 - Análise de enriquecimento de vias (A e B) e processos celulares (C) associados com o gene <i>DUSP2</i>	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Linhagens celulares de ADP utilizadas e suas principais características genéticas	45
Tabela 2 - Lista de anticorpos primários utilizados neste estudo.....	47
Tabela 3 - Valores referentes à citotoxicidade do knockout de cada gene da família DUSP em combinação com o tratamento da gemcitabina, encontrados no ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1.....	59
Tabela 4 - Fosforilação de proteínas estatisticamente significativas entre os grupos no Ensaio <i>Phosphp Kinase Array</i>	80

Lista de Siglas

ADEX	<i>Aberrantly differentiated endocrine exocrine</i>
ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina do soro bovino
CAF	Fibroblasto associado ao tumor
CCL	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de carbono
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
dFdC	Difluorodesoxicitidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUSP	Proteína fosfatase de dupla especificidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GAP	Proteínas ativadoras de GTPase
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Fator de troca de nucleotídeo guanina
GEM	Gemcitabina
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
HC	Hospital das Clínicas
HUGO	<i>Human Genome Organization</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IP	Iodeto de propídio
KEEG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoma</i>
KUMC	<i>Kansas University Medical Center</i>
LB	Meio de crescimento de bactérias Luria Bertani

MKB	Domínio de ligação a MAPK
MKP	Fosfatase de MAPK
MOI	Multiplicidade de infecção
NIP	Neoplasia intraepitelial pancreática
NMC	Neoplasia mucinosa cística
NMPI	Neoplasia mucinosa papilar intraductal
NPIT	Neoplasia papilar intraductal tubular
PBS	Tampão fosfato salino
PEB	PBS, EDTA e BSA
PTK	Proteínas tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAseq	Sequenciamento de RNA
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Sódio dodecyl sulfato
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TBS-T	Tampão Tris-salino acrescido de Tween 20
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
tracrRNA	RNA trans-ativador
USP	Universidade de São Paulo
5-FU	5-fluorouracil

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
mg	Miligrama
mL	Mililitro
h	Hora
°C	Graus Celsius
cm²	Centímetro quadrado
µm	Micrometro
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
g	Força g
min	Minuto
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
pH	Potencial hidrogeniônico
β	Beta
α	Alfa
γ	Gama

Sumário

1. Introdução.....	26
1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático	27
1.1.2. Epidemiologia, sintomatologia e fatores de risco.....	27
1.1.3. Características histológicas e moleculares.....	28
1.1.4. Classificação molecular	30
1.1.5. Tratamento	31
1.2. Mutação no gene <i>KRAS</i> e ativação de vias de MAPK.....	33
1.3. Desafio científico: proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) e o controle das vias de MAPK.....	37
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. Material e Métodos	43
3.1. Delineamento Experimental	44
3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo	44
3.3. Autenticação das linhagens celulares	45
3.4. Amostras de Pacientes	46
3.5. Análise da expressão gênica	46
3.5.1. Extração do RNA e síntese do cDNA	46
3.5.2. qRT-PCR	46
3.6. Western Blot.....	46
3.7. Triagem utilizando o método CRISPR/Cas9	48
3.8. Modulação do gene <i>DUSP2</i> em linhagens de ADP	49
3.8.1. Expansão dos vetores de expressão.....	49
3.8.2. Produção de partículas lentivirais	49
3.8.3. Transdução das linhagens de ADP com partículas lentivirais	50
3.9. Preparo e tratamento com as drogas.....	50
3.10. Ensaio de viabilidade celular.....	50
3.11. Proliferação celular (EdU)	51
3.12. Morte celular por apoptose	51
3.13. Ensaio de ativação de fosforilação (phospo-kinase array).....	52
3.14. Análises <i>in silico</i>	53

3.15.	Análise dos dados.....	53
3.15.1.	Cálculo do valor IC50	53
3.15.2.	Análise estatística da triagem de DUSPs	53
3.15.3.	Análise dos ensaios funcionais.....	54
3.15.4.	Análise do ensaio de ativação de fosforilação.....	54
4.	Resultados.....	55
4.1.	Ensaio de viabilidade celular em linhagens de ADP tratadas com gemcitabina	56
4.2.	<i>Knockout</i> gênico mediado por CRISPR/Cas9. Ensaio de <i>screening</i> para identificação de alvos da família DUSP	57
4.2.1.	Fosfatases DUSPs impactam na sensibilidade à gemcitabina em células de ADP 58	
4.3.	Validação do <i>screening</i> fenotípico em DUSP1 e DUSP2.....	61
4.4.	Análise da expressão de DUSP2 em ADP	62
4.4.1.	Padrão de expressão gênica de DUSP2 é reduzido em amostras de pacientes com ADP comparado ao tecido normal	62
4.4.2.	Avaliação da expressão gênica e proteica de <i>DUSP2</i> em linhagens celulares de ADP	64
4.5.	DUSP2 apresenta padrão de expressão gênica significativamente correlacionado com DUSP1.....	65
4.6.	Estabilidade proteica de DUSP2 está associada à sensibilidade de células de ADP ao tratamento com gemcitabina	67
4.7.	Estabilidade proteica de DUSP2 também está associada à sensibilidade de células de ADP à privação de SBF	69
4.8.	Inibição da atividade de DUSP1 impacta a expressão de DUSP2 após o tratamento com a gemcitabina.....	70
4.9.	Modulação farmacológica de DUSP2 recapitula modulação genética de DUSP2.....	71
4.10.	Indução de DUSP2 reduz proliferação e promove morte celular em linhagens celulares de ADP após tratamento com gemcitabina	73
4.11.	Impacto da indução de DUSP2 e tratamento com a gemcitabina no fosfoproteoma de quinases.....	78
4.12.	Análise <i>in silico</i> de interação proteica de DUSP2	80
4.13.	Análise de enriquecimento de DUSP2 mostra correlação com vias relacionadas à apoptose celular	81
5.	Discussão	83
6.	Conclusões	97

7. Sugestões para trabalhos futuros	99
8. Bibliografia	101
9. Anexos	116
10. Apêndice	124

1. Introdução

1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O pâncreas é um órgão secretor misto que exerce um papel fundamental na regulação da digestão de macronutrientes. Anatomicamente é dividido em cabeça, corpo e cauda e apresenta funções endócrinas e exócrinas. O pâncreas exócrino (80% da massa de tecido do órgão) libera enzimas digestivas no intestino como amilase, lipase pancreática e tripsinogênio, que são produzidas e secretadas pelas células acinares e transportadas pelo ducto pancreático. O pâncreas endócrino é composto pelas Ilhotas de Langerhans, formadas pelas células alfa, beta, delta e PP que secretam os hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. Estes hormônios são liberados diretamente na corrente sanguínea e regulam a forma de utilização da glicose ^{1; 2; 3}.

Dentre as neoplasias que acometem o pâncreas, o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é a mais comum, representando aproximadamente 95% dos casos ⁴. Os tumores neuroendócrinos e carcinomas acinares são pouco frequentes (1-2%) e ainda mais raramente podem ocorrer carcinomas coloidais, pancreatoblastomas e neoplasmas sólidos pseudopapilares ^{5; 6}.

1.1.2. Epidemiologia, sintomatologia e fatores de risco

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o ADP abrange cerca de 2% de todos os casos de câncer registrados no Brasil e é responsável por aproximadamente 4% das mortes por câncer, sendo a causa da morte de 11.099 pessoas no Brasil em 2018 ⁷. Mundialmente, 458.918 pessoas foram diagnosticadas com ADP e 432.242 pessoas morreram devido à doença em 2018, representando a 7ª causa de morte por câncer no mundo ⁸. A sociedade Americana de Câncer estima que em 2021, serão registrados 60.430 novos casos de ADP e 48.220 mortes só nos EUA ⁹.

O desenvolvimento do ADP ocorre geralmente na cabeça do pâncreas e conforme evolui para os estágios mais avançados, se infiltra nos tecidos circundantes, incluindo vasos linfáticos, baço e cavidade peritoneal, com metástases frequentes para o fígado e pulmões ³. Grande parte dos pacientes são assintomáticos, principalmente nos primeiros estágios da doença. Quando apresentam sintomas, o quadro clínico varia de acordo com a posição anatômica do tumor. O tumor na cabeça do pâncreas pode causar icterícia, dor abdominal ou nas costas, anorexia e perda de peso, náuseas e vômitos. Alguns outros sintomas como coágulos sanguíneos,

diabetes, aumento da vesícula biliar ou do fígado também podem sugerir sintomas de ADP ^{5; 10; 11; 12}. A falta de sintomas específicos, juntamente com as limitações de diagnóstico, faz com que a maioria destes pacientes obtenham um diagnóstico tardio e um dos piores prognósticos dentre os tumores sólidos, com uma sobrevida global em 5 anos de apenas 9% dos pacientes ¹³.

Dados da GLOBOCAN 2018 ⁸ mostraram que em 2018, as maiores incidências e mortalidades de ADP foram em países com altas taxas de desenvolvimento humano. O aumento das taxas nestes países provavelmente se deve ao estilo de vida menos saudável adotado, que aumenta a suscetibilidade aos fatores de risco, que estão associados à globalização, urbanização e desenvolvimento econômico ¹⁴. O ADP é mais comum em pessoas acima dos 50 anos de idade, de etnia negra e do sexo masculino ⁵. Porém, dados epidemiológicos mais recentes mostraram que a incidência em mulheres e em pessoas menores de 50 e 40 anos de idade têm crescido nos últimos anos em alguns países, principalmente naqueles com altas taxas de desenvolvimento ¹⁵.

Dentre outros diversos fatores de risco incluindo diabetes tipo 2, pancreatite crônica, excesso do uso de álcool, sedentarismo, hipertensão, dieta rica em colesterol, açúcar e carne, destacam-se o tabagismo e o sobrepeso/obesidade como os fatores de risco mais elevados ^{14; 16}. Em torno de 10% dos pacientes acometidos pela doença possuem familiares de primeiro ou segundo grau também acometidos pelo ADP. Em apenas 20% destes pacientes são identificadas mutações genéticas em genes como *BRCA2*, *BRCA1*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1*, *MLH1* e *PALB2*. O gene *CDKN2A* é o mais frequentemente mutado nestes casos, aumentando em cerca de 39 vezes o risco de desenvolvimento do ADP ao longo da vida. Algumas síndromes genéticas também aumentam o risco do desenvolvimento do ADP, como pancreatite hereditária, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Lynch, síndrome do melanoma hereditário e síndrome do câncer de mama e ovário hereditária ^{5; 12; 17; 18; 19; 20}.

1.1.3. Características histológicas e moleculares

Existem quatro tipos de neoplasias pancreáticas morfológicamente distintas e não invasivas que são precursoras do ADP: neoplasia intraepitelial pancreática (NIP), neoplasia mucinosa cística (NMC), neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI) e neoplasia papilar intraductal tubular (NPIT). Apesar de caracterizadas como lesões precursoras, tem sido demonstrado que as NMPI podem co-existir com o PDAC sem

possuir necessariamente a mesma origem genética ²¹. As NIPs são lesões microscópicas e são as que originam o ADP com mais frequência ^{22; 23}. As NIPs possuem quatro estágios (NIP-1A, NIP-1B, NIP-2 e NIP-3), correspondentes ao aumento progressivo no grau histológico, que somado ao acúmulo de mutações genéticas, culminam em uma neoplasia invasiva (**Figura 1**) ^{22; 24}. Conforme as NIPs progredem para o estágio invasivo por meio das mutações, forma-se um tumor desmoplásico denso, com muita matriz extracelular e formação de colágeno, o que condiciona o tumor a possuir baixos níveis de vascularização, característica frequente do ADP que o torna mais agressivo e resistente à administração de drogas ²⁵. Estima-se que desde a mutação inicial, formação destas lesões precursoras, sua progressão, disseminação metastática e óbito do paciente sejam necessários de 10 a 30 anos ²⁶.

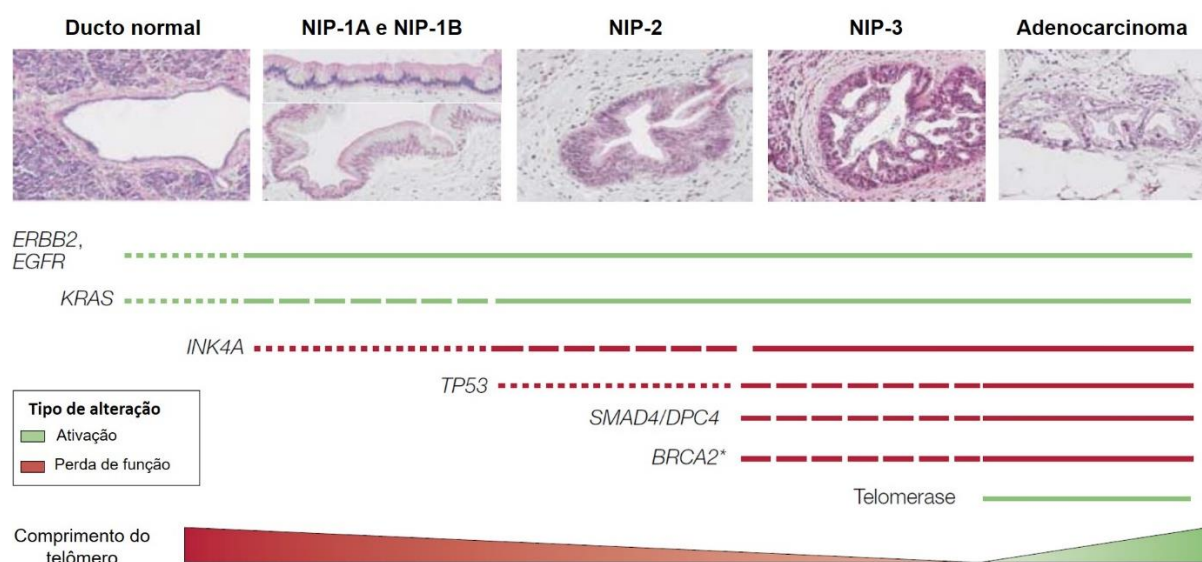


Figura 1 - Modelo de progressão tumoral do ADP a partir do acúmulo de alterações genéticas. A espessura das linhas corresponde à frequência das alterações. NIP: neoplasia intraepitelial pancreática. Adaptado de: Bardeesy; DePinho. Nat. Rev. Cancer (2002) 2:12, 897-909 ¹⁰.

A mutação inicial que promove a tumorigênese geralmente é a ativação do gene *KRAS*, que ocorre em mais de 90% dos tumores de ADP ^{5; 27}. Alterações como a ativação de *KRAS* juntamente com o encurtamento dos telômeros, que pode contribuir para a instabilidade genômica, tendem a aparecer nas lesões iniciais (NIP-1). As alterações mais frequentes nas lesões NIP-2 são a inativação de p16/*CDKN2A* e p21/*CDKN1A*. A inativação de *TP53*, *SMAD4/DPC4* e *BRCA2* ocorrem usualmente em lesões intraepiteliais mais avançadas (NIP-3) e no tumor invasivo. Estas mutações são as mais frequentes no ADP depois de *KRAS*, ocorrendo em 50-80% dos tumores

5; 22; 27. Outras mutações menos frequentes, presentes em menos de 20% dos casos de ADP, incluem alterações em genes como *ARID1A*, *GLI3*, *MLL3*, *MUC16*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *BRAF*, *AKT2*, *EGFR*, *MAP2K4*, *MYB* (Revisado em ^{5; 28}).

1.1.4. Classificação molecular

O avanço nas tecnologias moleculares em larga escala permitiu mostrar que tumores histopatologicamente indistintos podem ter características moleculares muito diferentes. Isso permitiu que diversos tumores sólidos sejam classificados conforme características moleculares em comum e esta classificação, frequentemente auxilia na tomada de decisão clínica do tratamento destes tumores. Conforme revisado por Collison e colaboradores ²⁹ diversos grupos classificaram o ADP em subgrupos moleculares baseando-se em análises do transcriptoma, divergindo um pouco no tipo das amostras utilizadas e na forma de análise.

Dentre diferentes classificações, destacam-se quatro delas. O primeiro grupo a classificar molecularmente, foi ³⁰ que utilizaram amostras de ADP primário e linhagens celulares humanas e murinas, classificando-as nos subgrupos: “clássico”; “quase-mesenquimal” e “exócrino-*like*”. Em 2015, Moffitt e colaboradores ³¹, utilizando amostras de ADP primário não tratado, metastático e “*bulk*” tumoral, conseguiram classificar o ADP nos subgrupos “clássico” e “basal-*like*” e ainda classificar dois tipos de estroma: “ativado” e “normal”. Bailey e colaboradores ²⁷, fizeram a classificação que tem sido mais amplamente utilizada, a partir de amostras de ADP primário e de “*bulk*” não tratado, dividindo nos seguintes subgrupos: “escamoso”; “progenitor pancreático”, “imunogênico” e de “células aberrantes diferenciadas endócrinas e exócrinas” (ADEX). Outra classificação relevante foi a realizada por Sivakumar e colaboradores ³², que proporcionou uma classificação com grande diferença nas características imunológicas entre os subgrupos, classificando em: 1 (*Hedgehog*); 2 (*Notch*) e 3 (Ciclo celular).

Todas essas classificações possuem características sobrejacentes e semelhanças entre si, então Collisson e colaboradores ²⁹, propuseram uma “árvore filotranscriptômica” que abrange todas as classificações baseadas no transcriptoma e sugerem dois grandes subgrupos epiteliais: “pancreático-clássico” (que pode ser subdividido em clássico-progenitor e ADEX) e “escamoso” (de pior prognóstico e pior resposta às quimioterapias); e ainda, dois subtipos estromais: “ativado” e “normal”. Estas classificações são extremamente importantes para uma possível utilização

clínica, visto que o ADP apresenta alta heterogeneidade na composição molecular, que implica em diferentes respostas às terapias. Um exemplo da aplicação destas classificações foi mostrada por ³³, que subdividiu mostras de pacientes de ADP em clássico e “basal-like” e observou que realmente o subgrupo clássico respondeu melhor à quimioterapia de primeira linha (folfirinox e/ou gemcitabina). Contudo, apesar dos avanços em descobertas de marcadores genéticos e caracterização de mutações, as implicações clínicas destes avanços ainda estão em fases iniciais, reforçando que estudos adicionais são necessários para o entendimento da interface molecular-clínica e para relacionar estas características com o prognóstico dos pacientes, afetando a tomada de decisão clínica no tratamento do ADP ²⁹.

1.1.5. Tratamento

O ADP possui uma resistência característica à maioria dos tratamentos disponíveis, como quimioterapia, radioterapia ou terapia alvo direcionada ⁵. Como já mencionado, o ADP apresenta um prognóstico altamente desfavorável por se tratar de um tumor com alto potencial invasivo. Apenas cerca de 10 a 15% dos pacientes com ADP possuem a doença em estágios iniciais (I ou II) no momento do diagnóstico. Para esses pacientes, a ressecção cirúrgica seguida de terapia adjuvante é a única opção de cura, porém para a maioria dos pacientes (mais de 80%), esta opção não é viável. Mesmo para aqueles pacientes em estágios iniciais que são submetidos à ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia adjuvante, a sobrevida em 5 anos pode aumentar apenas para até 20% ³⁴ e, na maioria deles (cerca de 80%), os pacientes apresentam recaída da doença e vão a óbito ^{5; 35}. As razões para este prognóstico tão ruim estão relacionadas às poucas opções de tratamentos eficazes, a frequente presença de micrometástases e ao desenvolvimento de quimiorresistência ³⁶.

O quimioterápico de primeira escolha para o tratamento do ADP é a gemcitabina (difluorodesoxicidina, dFdC), que é um análogo de nucleosídeo e inibe a síntese de DNA. Foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1996 para o tratamento de vários tumores sólidos e linfomas e desde 1997, é amplamente utilizada no tratamento de ADP, devido ao seu benefício em relação ao tratamento com o 5-FU 5-fluorouracil (5-FU), quimioterápico utilizado até então. A gemcitabina aumentou a taxa de sobrevida global de 4,4 para 5,6 meses e a taxa de resposta à droga para 23,8% em comparação aos 4,8% obtidos em terapias utilizando 5-FU ³⁷. Mais tarde, um estudo de fase três que comparou o 5-FU e leucovorina *versus*

gemcitabina, mostrou que não houve diferença estatística quanto à sobrevida dos pacientes, e o grupo que recebeu 5-FU e leucovorina apresentou eventos adversos sérios ³⁸. Atualmente outras drogas foram aprovadas para o tratamento do ADP, em sua maioria, em regime de poliquimioterapia e frequentemente combinado com a gemcitabina, apresentando, entretanto, taxas de citotoxicidade elevadas.

Para pacientes com ADP ressecáveis ou marginalmente ressecáveis (*borderline*), o tratamento com a gemcitabina e capecitabina comparada à monoterapia de gemcitabina obteve um ganho na sobrevida global de 25,5 meses para 28,8 meses, no entanto, demonstrou aumento no número de eventos adversos ³⁹. Posteriormente, um estudo de fase três comparou o tratamento de FOLFIRINOX (combinação de 5-FU, oxaliplatina e irinotecan) modificado com a monoterapia de gemcitabina. O tratamento com mFOLFIRINOX obteve um ganho de sobrevida global de 35 meses para 54,4 meses, contudo, a citotoxicidade também foi maior neste grupo de tratamento quando comparada à monoterapia ⁴⁰. A terapia adjuvante de nab-paclitaxel (paclitaxel ligado à nanopartícula de albumina) com gemcitabina não aumentou a sobrevida global dos pacientes, quando comparados à monoterapia ⁴¹. Portanto, nestes pacientes de baixo grau, FOLFIRINOX é indicado para pacientes menores de 76 anos com boa *performance status* ⁵ e a gemcitabina com ou sem capecitabina continua sendo a melhor opção de tratamento nos demais pacientes.

Em pacientes com ADP “localmente avançado”, geralmente a ressecção não é possível e o tratamento utilizado é a quimioterapia sistêmica também utilizada em pacientes com a doença metastática ⁴². Nestes pacientes de alto grau, a combinação de erlotinib (um inibidor de EGFR) e gemcitabina demonstrou aumentar discretamente a sobrevida em relação a gemcitabina isolada ⁴³. Outros esquemas de poliquimioterapia alternativos como o FOLFIRINOX ⁴⁴ e o nab-paclitaxel ^{45; 46} juntamente com a gemcitabina, também aumentaram a sobrevida dos pacientes quando comparados ao regime de monoterapia com gemcitabina, aumentando de 6,8 para 11,1 meses e de 6,7 para 8,5 meses, respectivamente. Porém, ambos demonstraram taxas de toxicidade elevadas, resultando em quadros graves de diarreia, náuseas, fadiga, mielopatia e neuropatia.

Nesse contexto, o tratamento do ADP ainda representa um desafio clínico muito grande e, apesar do surgimento de novas opções de tratamentos nos últimos anos, a maioria destes avanços foram através das novas combinações de quimioterápicos previamente estabelecidos ⁴⁷. Com isso, embora grande parte dos tumores adquirirem

quimiorresistência, o tratamento com a gemcitabina ou a combinação desses quimioterápicos com a gemcitabina continua sendo uma das principais estratégias na terapia neoadjuvante, adjuvante e paliativa para tratamento do ADP¹⁸. Para pacientes que não respondem ao tratamento com poliquimioterapias ou que comorbidades impedem essa estratégia, a monoterapia com gemcitabina também se torna a principal opção⁴².

Atualmente, alternativas como imunoterapias, busca de alvos no microambiente tumoral, identificação de subgrupos de pacientes para terapias individualizadas e o desenvolvimento de terapias alvo direcionadas, têm sido estratégias emergentes para a busca de tratamentos mais eficazes. Nos últimos anos, mesmo com avanços na descoberta de marcadores genéticos e caracterização de mutações, a maioria ainda não resultou na alteração da tomada de decisão clínica no tratamento do ADP. Dentre os poucos exemplos, temos o quimioterápico olaparib, que é um inibidor de PARP (poli ADP-ribose polimerase) e foi aprovado pela FDA em 2019 como a primeira terapia alvo direcionada baseada em biomarcador, para tratamento de pacientes com mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. O pembrolizumab, também já foi aprovado como primeira linha de tratamento de qualquer tumor sólido com instabilidade de microssatélite (MSI), que ocorre em 1 a 2% dos casos de ADP de baixo grau, ou seja, passíveis de ressecção cirúrgica.^{42; 48}.

O desafio encontrado em aplicar esses avanços na caracterização molecular do ADP para o tratamento, é que, frequentemente as mutações em genes que são alvos para terapias em outros tumores possuem uma frequência baixa em ADP. Além disso, as consequências funcionais da maioria dessas mutações nas vias dos genes relevantes para a progressão tumoral e quimiorresistência do ADP, ainda são desconhecidas²⁹. Outra problemática, é que é notável que estratégias de tratamento de ADP abordam na maioria das vezes, pacientes ainda não tratados e com tumor primário, quando a maioria dos pacientes possui a doença avançada. Ademais, os tratamentos acabam induzindo uma pressão seletiva que altera a composição molecular do tumor, tornando-o frequentemente mais agressivo e resistente^{29; 49}. Portanto, a busca por novas alternativas de terapia ou por alternativas que aumentem a sensibilidade às terapias utilizadas é de extrema importância e urgência.

1.2. Mutação no gene *KRAS* e ativação de vias de MAPK

Dentre as estratégias acima descritas, o desenvolvimento de terapias alvo

direcionadas tem um alto potencial de sucesso e já foi descrita para diversas neoplasias. Entretanto, para o desenvolvimento de alvos moleculares em potencial é necessário um amplo conhecimento acerca da biologia tumoral de cada neoplasia. Como já mencionado anteriormente, no decorrer da progressão do ADP ocorrem diversas alterações genéticas. Dentre elas, a mutação no proto-oncogene *KRAS* é a mais frequente, atingindo mais de 90% dos tumores de ADP^{50; 51; 52}. *KRAS* é um membro da família RAS de proteínas de ligação a guanosina trifosfato (GTP) (juntamente com *NRAS* e *HRAS*), que controlam processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular^{47; 53}. As evidências existentes sugerem que a ativação de *KRAS* é crítica para a iniciação e manutenção do ADP, já que está presente desde as lesões iniciais⁴⁷.

A proteína *KRAS*, como uma GTPase, está ativa quando ligada à uma molécula de GTP e inativa, quando ligada à uma molécula de guanosina difosfato (GDP) (**Figura 2**). Porém, *KRAS* pode ser ativada constitutivamente por um evento mutacional, geralmente uma mutação de ponto que ocorre nos resíduos G12, G13 ou Q61. Das mutações em *KRAS*, 98% ocorrem no códon 12 (de GGT a GAT ou GTT e mais raramente CGT), substituindo glicina por aspartato, valina ou arginina. A substituição G12D resultante da substituição de uma glicina (G) na posição 12 por ácido aspártico (D) é a predominante. Esta mutação *KRAS*^{G12D} leva a ativação constitutiva da via de RAS, ou seja, RAS está constantemente ligada à molécula de GTP, independente da estimulação de fatores de crescimento^{3; 54}.

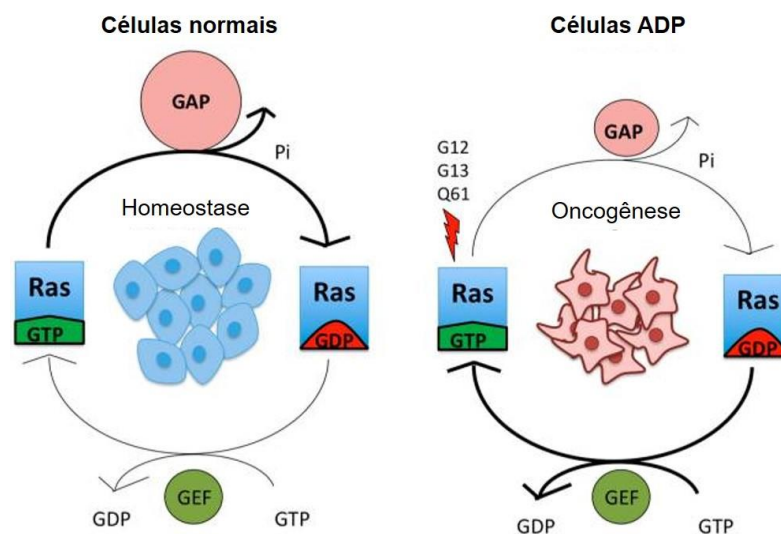


Figura 2 - Ativação de RAS em células normais e células com mutação em RAS. Proteínas RAS estão ativas quando ligadas a moléculas de GTP e inativas quando estão ligadas a moléculas de GDP. *KRAS* selvagem possui um ciclo entre suas formas ativas e inativas. Porém, mutações nos resíduos G12, G13

ou Q61 fazem com que KRAS esteja constitutivamente associado a molécula de GTP, em seu estado ativo, ativando diversas vias de sinalização que desencadeiam o processo oncogênico. As espessuras das setas indicam a intensidade de sinalização. GAP: proteínas ativadoras de GTPase, GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato. GEF: fator de troca de nucleotídeo guanina. Adaptado de Zeitouni et al. *Cancers* (2016), 8, 45⁵⁵.

A mutação que leva à ativação de *KRAS*, resulta em muitos processos fenotípicos característicos no ADP, como aumento da proliferação, supressão da apoptose, alteração do metabolismo, alteração do microambiente tumoral, evasão da resposta imune e metástase (Revisado por⁵⁶ e⁵⁷). Estes efeitos fenotípicos acontecem devido a constante ativação de cascatas de sinalização *downstream* à *KRAS*, sendo as principais, as vias RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR⁴⁷.

A via RAF/MEK/ERK, é umas das principais e mais bem descritas vias de transdução de sinais ativadas pelo mutante *KRAS* e é composta por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que são essenciais para a síntese de DNA^{58; 59}. Em resposta a estímulos intra e extracelulares, a via de sinalização das MAPK regula diversos processos celulares importantes. A atividade das MAPKs é regulada através de uma cascata de ativação de três módulos, composta por uma MAPKKK (MAP quinase quinase quinase), uma MAPKK (MAP quinase quinase) e uma MAPK (MAP quinase). As MAPKKK são quinases serina/treonina que são ativadas via fosforilação e/ou interação com pequenas moléculas de GTP da família Ras, em resposta a estímulos extracelulares. A ativação delas leva a fosforilação e consequente ativação de uma MAPKK que por sua vez, também irá fosforilar e ativar uma MAPK. A MAPK efetora, quando ativa, pode induzir a ativação de várias proteínas nucleares e citoplasmáticas^{59; 60; 61; 62}.

As três principais vias de MAPK são as vias: 1) ERK (*extracellular signal regulated kinases*) 1/2, que são ativadas em resposta a fatores de crescimento e hormônios; 2) quinase amino-terminal c-Jun (JNK 1-3) e, 3) p38 (p38 α , p38 β , p38 γ and p38 δ), que respondem a condições de estresse celular. Em conjunto, estas proteínas controlam importantes processos celulares como proliferação celular, apoptose, sobrevivência, motilidade, diferenciação e ciclo celular, evidenciando o papel oncogênico causado pela ativação constitutiva de Ras^{61; 62; 63; 64} (**Figura 3**). Essas diversas funções são contexto e tecido dependente, podendo todas elas desempenhar tanto funções oncogênicas, como funções supressoras tumorais. ERK1/2 tem como função principal o controle de proliferação celular por meio de

reguladores positivos do ciclo celular, no entanto, em alguns contextos pode desempenhar funções supressoras tumorais. A proteína JNK frequentemente apresenta atividade pró-apoptótica e de diferenciação, podendo também, ter atividades oncogênicas relacionadas à regulação do ciclo celular e da sobrevivência. Similarmente, p38 é mais conhecido pelas funções supressoras tumorais por meio da regulação negativa do ciclo celular e indução de apoptose, mas pode também estar envolvida nos processos de invasão celular, inflamação, angiogênese e proliferação celular (Revisado por ^{57; 65}).

Diversos estudos evidenciam a relação das vias de MAPKs com a quimiorresistência. A via ERK já foi relacionada com quimiorresistência em neoplasias como câncer de pulmão, mieloma, câncer de ovário, leucemia, câncer gástrico e glioblastoma ^{66; 67; 68; 69}. A relação entre a quimiorresistência à gemcitabina e as vias MAPKs também já foi descrita em estudos com câncer de bexiga e em ADP. Nesse contexto, o tratamento com gemcitabina, apesar de ter induzido apoptose, induziu também a ativação de ERK, JNK e p38, que aumentaram a quimiorresistência por meio de mecanismos como sobrevivência celular e autofagia. Em contrapartida, esta quimiorresistência foi revertida quando estas MAPKs foram inibidas ^{70; 71; 72; 73; 74; 75}. Por outro lado, já foi demonstrado que a inibição farmacológica de ERK pode aumentar a resistência à gemcitabina. Os autores também demonstraram que o efeito é droga dependente, visto que a inibição de ERK sensibilizou as linhagens de ADP para 5-FU ⁷⁶. A ativação de outra MAPK, p38, também já foi descrita por sensibilizar linhagens de ADP à gemcitabina ⁷⁷. Em conjunto, esses dados mostram que de fato as MAPKs exercem um papel fundamental no processo de quimiorresistência. Entretanto, os mecanismos pelos quais as MAPKs atuam para orquestrar redes de interação e *loops* de *feedback* em diferentes contextos que permeiam a quimiorresistência ainda são incompreendidos.

Em consequência à ativação constitutiva de Ras, que culmina na progressão do ADP, intuitivamente buscou-se a sua inibição direta como estratégia terapêutica. Porém, tanto a inibição genética como farmacológica de suas isoformas é inviável, devido à alta letalidade e toxicidade desta inibição, tornando a oncoproteína KRAS um alvo terapêutico desafiador. Com isso, a modulação de alvos *downstream* a KRAS, como MEK, ERK1/2, JNK e p38 tem sido constantemente investigados ^{47; 78}. Ressalta-se, porém, que embora a eliminação completa de alguns alvos *downstream* a KRAS, como MEK e ERK seja eficiente para conter a progressão

dos tumores com mutação de RAS, essa estratégia apresenta elevada toxicidade, inviabilizando o seu uso ⁷⁸. Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e para isso, esclarecer o exato papel dos mecanismos de regulação das MAPKs em diferentes tumores promovidos por RAS, como o ADP, é essencial.

1.3. Desafio científico: proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) e o controle das vias de MAPK

Devido aos inúmeros processos celulares controlados pelas vias MAPKs, é essencial que haja não apenas um mecanismo de controle da ativação, mas também uma rede de *loops* de *feedback* negativo. Já foi constatado que mesmo com a presença contínua de estímulos, a ativação das MAPKs é um processo reversível, indicando que estas proteínas realmente possuem um mecanismo de controle intrínseco altamente regulado ⁷⁹. A desfosforilação das MAPK, que ocorre no resíduo de treonina e/ou tirosina, é um processo crucial para que aconteça este controle ^{63; 79}.

Duas famílias de proteínas atuam nesse processo de regulação: as proteínas tirosina quinase (PTK) e principalmente, as proteínas tirosina fosfatases (PTP). Já foram descritos mais de 100 diferentes membros de PTPs, que são agrupadas em três famílias de acordo com a sequência de aminoácidos de seus domínios catalíticos, cada grupo abrangendo um conjunto de substratos específicos. A maior e principal família é a classe I, que compartilha o resíduo catalítico de cisteína na fosforilação. Esta classe é subdividida em “clássicas”, que são fosfatases específicas para tirosina, e as “fosfatases de dupla especificidade” (*dual-specificity phosphatases* – DUSPs), que desfosforilam ambos os resíduos de tirosina e serina/treonina, sendo mais bem diversificadas quanto ao substrato ^{80; 81; 82}.

As DUSPs contemplam 44 genes [segundo o banco de dados do Genoma Humano (HUGO – *Human Genome Organization* database) ⁸³] e podem ser divididas em 6 subgrupos. As DUSPs típicas, são representadas por 11 proteínas e possuem no domínio N-terminal um cluster de resíduos de aminoácidos que formam um domínio de ligação específico para MAPK (MKB). São as DUSPs mais bem estudadas e também são denominadas de fosfatases de MAPK (MKP), por já serem conhecidas como componentes chave de uma complexa rede reguladora negativa que age no controle das diferentes MAPKs ^{63; 80; 84; 85}. O segundo subgrupo possui 18 componentes e são as DUSPs atípicas, que apesar de possuírem o domínio C-

terminal conservado, não possuem no domínio N-terminal o domínio MKB^{63; 79; 80}. Apesar de não possuírem tal domínio, essas DUSPs podem ter como alvo tanto as MAPKs, quanto outras proteínas *upstream* a MAPKs^{80; 86}. Como exemplo temos a DUSP3, DUSP14 e DUSP26, que apesar da ausência do domínio MKB, também possuem como alvo as MAPKs ERK1/2, JNK e p38⁸⁶. Além destes dois subgrupos principais, existem mais 4: *Slingshot phosphatases* (SSH), *Protein tyrosine phosphatases type IVA* (PTP4A), *CDC14 phosphatases* e *PTEN protein phosphatases*, que por possuírem funções distintas e não terem como alvo as MAPKs, não serão abordadas neste trabalho⁸³.

As DUSPs compartilham um domínio catalítico C-terminal bem conservado e um domínio N-terminal não catalítico menos conservado. A especificidade das sequências contidas na região N-terminal é importante para determinar a classificação das DUSPs típicas. Elas podem ser classificadas quanto a sequência homóloga, localização subcelular e especificidade de substrato, compondo três subgrupos: induzíveis nucleares, citoplasmáticas seletivas para ERK ou específicas para as MAPKs ativadas por estresse (JNK e p38)^{63; 79; 84; 87}.

O controle e regulação da transcrição dos genes que codificam as DUSPs ocorrem de forma rápida e específica por meio de estímulos como fatores de crescimento, estresse celular, fatores mitogênicos, citocinas e expressão de alguns oncogenes⁷⁹. O gene supressor tumoral *TP53* também já foi associado com o controle de ativação de todas as DUSPs típicas nucleares, DUSP1⁸⁸, DUSP2⁸⁹, DUSP4⁹⁰ e DUSP5⁹¹. A desregulação deste controle da expressão de diversas DUSPs como DUSP1, DUSP4, DUSP6, DUSP10 e DUSP16 foi associado ao desenvolvimento do câncer, sugerindo que estas fosfatases podem ter função em processos tumorigênicos como transformação oncogênica, formação de tumor e processo metastático^{63; 85}. Entretanto, o papel das DUSPs no câncer ainda é bastante controverso, sendo tumor e contexto específico. Alguns estudos já correlacionaram a perda de função de DUSPs com o desenvolvimento e progressão tumoral, assim como outros estudos demonstraram que o aumento da expressão de algumas DUSPs, pode estar associado com a progressão tumoral e a quimiorresistência^{85; 92}.

Em tumores pancreáticos, a expressão das diversas DUSPs é altamente heterogênea. Por exemplo, as DUSP1, DUSP4 e DUSP28 já foram descritas com elevada expressão gênica^{93; 94; 95} enquanto a DUSP10, apresenta níveis reduzidos de expressão nas células de ADP⁹⁶. Por outro lado, a DUSP6 que representa uma das

principais fosfatases no controle da ativação de ERK é amplamente regulada durante a progressão do ADP, possuindo altos níveis de expressão em lesões precursoras NIPs, em contraste aos baixos níveis de expressão observados em células invasivas de ADP ^{97; 98}. Estes dados evidenciam a heterogeneidade das funções das DUSPs no aspecto intertumoral e também nos diferentes estágios da tumorigênese.

Outro ponto importante a ser considerado é a participação das DUSPs em processos de quimiorresistência. Foi descrito que a DUSP1, por exemplo, está envolvida no processo de quimiorresistência à diversas drogas como cisplatina, antraciclinas e taxanos ⁸⁷. Especificamente no ADP, que é um tumor altamente heterogêneo e resistente aos quimioterápicos atualmente disponíveis, o estudo de moléculas relacionadas ao processo de quimiorresistência à gemcitabina torna-se extremamente interessante, haja visto que este ainda é o quimioterápico mais utilizado no tratamento do ADP. Já foi demonstrado que a inibição da expressão de *DUSP1* ⁷⁵, por meio da ativação das MAPKs JNK e p38, e de *DUSP28* ⁹⁴, pela ativação de ERK1/2, sensibilizaram linhagens celulares de ADP à gemcitabina. Estes estudos dão suporte à hipótese de que as DUSPs participam do processo de quimiorresistência do ADP, mostrando a importância da investigação desta classe de fosfatases, que são moléculas chave da regulação das MAPKs e portanto, de grande interesse para a investigação de alvos terapêuticos alternativos para o ADP ⁸⁴.

Vale destacar, que alguns compostos já foram descritos com atividade de modulação da expressão de algumas DUSPs, como os compostos NSC-87877, NSC95397, salubrinal, shikonina, sanguinarine, triptolide, entre outros ^{85; 99; 100; 101}. Esses compostos viabilizam a possibilidade da modulação (inibição ou indução) química dessas moléculas, o que facilita o estudo de suas funções no câncer e também otimiza o seu potencial de utilização como alvos terapêuticos.

Considerando o exposto, a relação entre a resistência à gemcitabina no ADP e as vias MAPKs, aliado ao fato de que as DUSPs são reguladoras diretas dessas vias, pode-se considerar que, de fato, as DUSPs exercem um papel relevante no processo de quimiorresistência (**Figura 3**). Entretanto, os mecanismos pelos quais as DUSPs atuam em processos tumorigênicos e de quimiorresistência foi pouquíssimo explorado e permanece sendo um desafio, merecendo uma investigação aprofundada.

Diante do prognóstico altamente desfavorável, das altas taxas de mortalidade do ADP causados pela agressividade do tumor, da falta de tratamentos eficazes e do aumento da incidência global de ADP, principalmente entre a população mais jovem,

reforça-se a necessidade de diagnóstico precoce, prevenção e busca de tratamentos mais efetivos ¹⁴. Para isso, é de extrema importância entender os mecanismos que permeiam a progressão tumoral e consequentemente a responsividade aos tratamentos quimioterápicos e/ou alvo-dirigidos para alcançar avanços significativos para o tratamento do ADP ²⁹. Neste contexto, este trabalho visa testar a hipótese de que a atividade das fosfatases DUSPs afeta diretamente a quimiorresistência de células de ADP à gemcitabina.

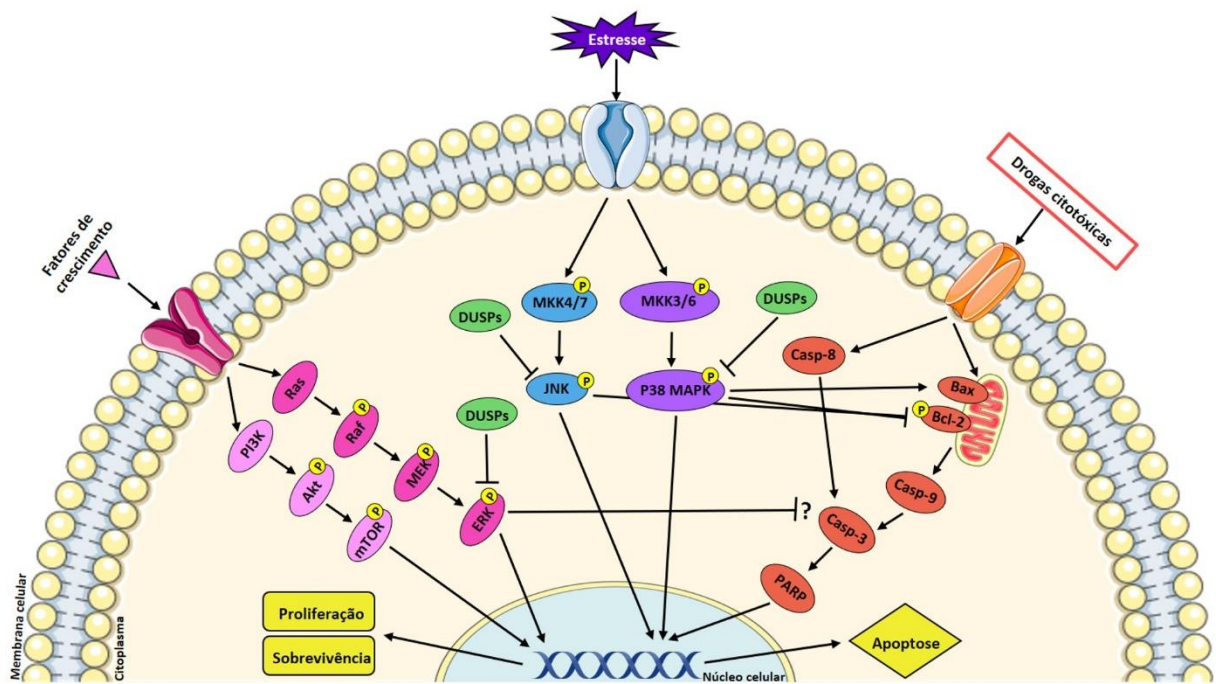


Figura 3 - Transdução de sinal das vias de sinalização de MAPKs. Em resposta à estímulos como fatores de crescimento, estresse e drogas citotóxicas, as primeiras MAPKs da via sequencial de ativação são ativadas, levando a transdução de sinais até a MAPK efetora, que quando ativada altera diversos processos celulares como proliferação, sobrevivência e apoptose. As proteínas DUSPs desfosforilam MAPKs, inativando a via de sinalização correspondente. Baseado em: Zhao et al. Journal of Surgical Research (2006) 136, 325–335 ⁷⁶; Arnoldussen et al. Mole. Cell Endocrinol. (2009) 309, 1-2:1-7 ¹⁰².

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é identificar DUSP(s) com papel relevante nos processos de quimiorresistência de células de adenocarcinoma ductal pancreático.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar uma triagem fenotípica para identificar gene(s) da família DUSP que possam modular a resposta das células de ADP ao quimioterápico gemcitabina;
- Identificar a DUSP com maior potencial de modulação de resposta à gemcitabina;
- Analisar o padrão de expressão gênica do alvo selecionado em amostras de pacientes portadores de ADP e identificar padrões de expressão com relevância clínica;
- Avaliar o impacto da modulação do alvo escolhido na eficácia do tratamento *in vitro* da gemcitabina;
- Analisar o impacto da modulação da expressão gênica do alvo identificado na regulação de proteínas quinases.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento Experimental

Os experimentos foram executados no Laboratório de Oncologia Experimental – Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e no Departamento de Biologia do Câncer da *Kansas University Medical Center* (KUMC). O delineamento experimental foi executado de acordo com o fluxograma descrito abaixo.

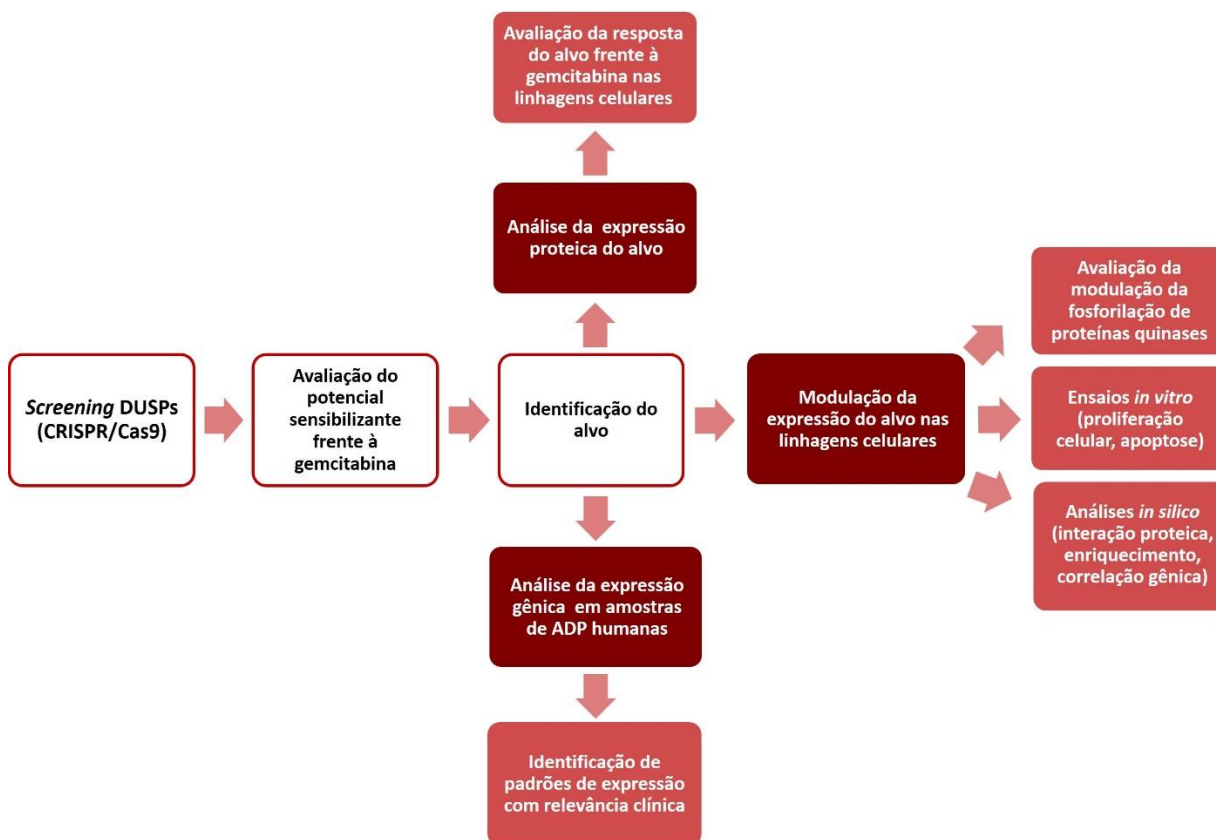


Figura 4 - Fluxograma mostrando o delianeamento experimental do presente estudo.

3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas oito linhagens celulares humanas, adquiridas e certificadas conforme critérios estabelecidos pela ATCC® (MIA PaCa-2, PANC-1, AsPC-1, Capan-2, Panc10.05, BxPC-3 e SW1990) e três linhagens celulares de camundongos previamente estabelecidas e utilizadas no laboratório do Prof. Dr. Michael Vansaun da *University of Kansas Medical Center* (P4313, K8484 e DT8082) além de linhagens

estabelecidas a partir dos fibroblastos associados ao tumor (CAFs), dos respectivos camundongos. A **Tabela 1** ilustra as principais características de identificação e genéticas das linhagens celulares de ADP. As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI suplementados com 10% de soro bovino fetal (pH 7.2–7.4), 100 mg/mL de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina em atmosfera úmida contendo 5% CO² a 37°C. Para a análise da viabilidade celular no momento do plaqueamento, foi utilizada a solução de azul de tripan (Triplan blue/ Merck, Frankfurt, Germany), seguindo instruções do fabricante.

Tabela 1 - Linhagens celulares de ADP utilizadas e suas principais características genéticas.

Nome	Espécie	Origem	KRAS	Status TP53	Outros
MIA PaCa-2	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRM-CRL-1420™	KRAS ^{G12C}	Mutado	
PANC-1	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRL-1469™	KRAS ^{G12D/+}	Mutado	
AsPC-1	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRL-1682™	KRAS ^{G12D}	Mutado	
Capan-2	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® HTB-80™	KRAS ^{G12V/+}	Selvagem	
BxPC-3	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRL-1687™	Selvagem	Mutado	
Panc10.05	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRL-2547™	KRAS ^{G12D/+}	Mutado	
SW1990	<i>Homo sapiens</i>	ATCC® CRL-2172™	KRAS ^{G12D}	Selvagem	
K8484	<i>Mus musculus</i>	Camundongo KPC	KRAS ^{G12D/+}	Mutado	PDX1 ^{cre/+}
DT8082	<i>Mus musculus</i>	Camundongo KPC	KRAS ^{G12D/+}	Mutado	PDX1 ^{cre/+}
P4313	<i>Mus musculus</i>	Camundongo KC	KRAS ^{G12D/+}	Selvagem	PDX1 ^{cre/+}
PKT82	<i>Mus musculus</i>	Camundongo PKT	KRAS ^{G12D/+}	Selvagem	PTF1A ^{cre/+} ; TGFB2 ^{flox/flox}

3.3. Autenticação das linhagens celulares

As linhagens celulares de ADP utilizadas durante o projeto foram autenticadas pela metodologia de STR (*Short Tandem Repeat*). A análise do perfil de STR foi realizada pelo Laboratório de Genética Bioquímica da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões. Os resultados obtidos foram comparados com os perfis disponibilizados pela ATCC em seu *website* e atestam a compatibilidade das linhagens segundo as diretrizes estabelecidas pela ATCC

3.4. Amostras de Pacientes

A coleta das amostras de tecidos pancreáticos livres de tumor e das amostras de ADP foi realizada pelo Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) da Universidade de São Paulo e foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CAAE: 09823218.9.0000.5440). Foram utilizadas 13 amostras de ADP e 8 amostras livres de tumor para análise de expressão gênica.

3.5. Análise da expressão gênica

3.5.1. Extração do RNA e síntese do cDNA

As amostras de pâncreas livres de tumor, amostra de tumores de ADP e linhagens celulares de ADP foram coletadas e foi realizada a extração de RNA total a partir do reagente Trizol® (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. O RNA foi quantificado no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *iScript™ Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA), também seguindo as instruções do fabricante.

3.5.2. qRT-PCR

Para quantificar a expressão gênica, foi realizada a técnica qRT-PCR com a utilização do equipamento *QuantStudio3 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) e o kit Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. As sondas Taqman® utilizadas foram: *DUSP2* (Hs00358879_m1DUSP2), *GAPDH* (Hs02786624_g1GAPDH) e *ACTB* (Hs01060665_g1ACTB). A expressão gênica foi normalizada por meio de dois genes de referência (*GAPDH* e *ACTB*) como controle interno. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ e a média da expressão gênica da linhagem celular Hela (já conhecida por expressar o gene *DUSP2*) foi utilizada como calibradora ¹⁰³.

3.6. Western Blot

As amostras de proteína total foram obtidas das linhagens celulares e extraídas utilizando o reagente *Ripa Buffer®* (Thermo Scientific) com adição de coquetel inibidor

de proteases e fosfatases. Para quantificação proteica foi utilizado o protocolo de Bradford ¹⁰⁴ com o kit BIO-RAD *DC™ Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Massas de proteína total (30-60 µg) foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas em solução bloqueadora 5% em temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários específicos para proteína de interesse (**Tabela 2**). No dia seguinte, as membranas foram lavadas em solução *Tris Buffered Saline – Tween* (TBS-T) 1% e incubadas com os anticorpos secundários correspondente, conforme especificações (*anti-mouse* ou *anti-rabbit*), por 1 h em temperatura ambiente. A visualização das bandas foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente *Clarity™ Western ECL Blotting Substrates* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA) utilizando o sistema de Imagens *ChemiDoc™ XRS+Image Lab™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). As bandas foram quantificadas quanto à expressão proteica pelo software ImageJ 1.53a (National Institutes of Health).

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários utilizados neste estudo.

Anticorpo	Código	Especificações	Empresa
CAS9	#14697S	Mouse Monoclonal	Cell Signaling
DUSP2	sc-32776	Mouse Monoclonal	Santa Cruz
DUSP1	#35217	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
p-DUSP1	#2857	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
p-ERK	#9101S	Rabbit Policlonal	Cell Signaling
ERK	#4695S	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
pSTAT3	#9145S	Rabbit Monoclonal	Cell Signaling
STAT3	#9139S	Mouse Monoclonal	Cell Signaling
Bax	sc-7480	Mouse Monoclonal	Santa Cruz
Bcl-2	sc-7382	Mouse Monoclonal	Santa Cruz
β-actina	sc-69879	Mouse Monoclonal	Santa Cruz
Vinculina	sc-73614	Mouse Monoclonal	Santa Cruz

3.7. Triagem utilizando o método CRISPR/Cas9

Para a triagem fenotípica inicial foram avaliadas quais DUSPs, têm a capacidade de modificar a resposta das células ao tratamento com a gemcitabina (elevar ou diminuir a sensibilidade). Para o *knockout* gênico de 25 diferentes DUSPs, foi utilizada a metodologia de edição do genoma mediada por RNA “guia” (Cas9) - CRISPR/Cas9. Foram utilizadas partículas lentivirais previamente selecionadas e desenhadas para o *knockout* do alvo de interesse que foram adquiridas da empresa *Dharmacon*TM (GE Healthcare, Colorado, USA). Os lentivírus possuem o gene *Cas9* permanentemente integrado ao genoma juntamente com um marcador de seleção, o gene de resistência à blasticidina (**Figura 5**). Para realização do *knockout* também é necessária a presença de um RNA trans-ativador (tracrRNA), que se liga ao crRNA, direcionando-o ao local específico de quebra. A biblioteca compreende três partículas de crRNAs isoladas para cada um dos 25 genes, além do tracrRNA, que também foram adquiridos da empresa *Dharmacon*TM (G-CUSTOM-214951 - LP_18677 crRNA Cherry-pick Library 0.5 nmol, descrita no **Anexo A**). A endonuclease Cas9 realiza o dano no DNA, que ao ser mal reparado, gera o *knockout* do gene de interesse. Para tanto, as linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2 foram transduzidas conforme instruções do fabricante com as partículas lentivirais com o gene *Cas9* e selecionadas por meio do tratamento com blasticidina. Após confirmação da expressão proteica de Cas9 por western blot, as linhagens celulares foram ressuspensas e semeadas na densidade de 3×10^3 células/poço em placas de 96 poços e transfectadas com as moléculas de tracrRNA e crRNA específico para cada DUSP, conforme instruções do fabricante. Após 48 h, o meio de transfecção foi retirado e as células foram tratadas com a droga gemcitabina com a concentração correspondente ao IC50 de cada linhagem. Após o tempo de tratamento de 72 h, o corante MTT foi adicionado e 4 h depois foi feita a leitura de absorbância para avaliação do potencial de quimiossensibilidade ou quimiorresistência do *knockout* de cada uma das DUSPs frente ao tratamento com a gemcitabina.

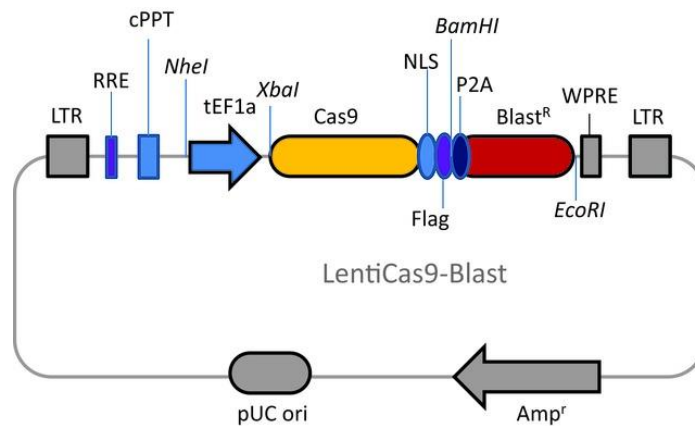


Figura 5 - Vetor lentiviral para expressão estável da proteína Cas9.

3.8. Modulação do gene *DUSP2* em linhagens de ADP

3.8.1. Expansão dos vetores de expressão

O vetor de expressão de *DUSP2* e o respectivo vetor vazio foram construídos e obtidos pelo Vector Builder (ID dos vetores: VB191010-1218mey e VB181209-1075efx), assim como demonstrado nos **Anexos B** e **C**. Os vetores inseridos em bactéria *E. coli* foram semeados em placa com meio LB e ágar suplementado com o antibiótico de seleção ampicilina, *overnight* a 37°C. Em seguida, uma colônia isolada foi selecionada e submetida à expansão clonal em meio LB líquido, também suplementado com o antibiótico de seleção, *overnight* a 37°C. Posteriormente, os plasmídeos foram purificados utilizando o kit “QIAGEN Plasmid Midi Kit” (Qiagen®) segundo instruções do fabricante. A quantificação e a pureza foram avaliadas pelo espectrofotômetro “Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

3.8.2. Produção de partículas lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas na linhagem HEK293T. Para tanto, foram semeadas cerca de $1,5 \times 10^6$ células em garrafas de 75 cm² e incubadas *overnight*. No dia seguinte, as células foram transfectadas com uma solução composta por meio DMEM, agente de transfecção (FuGENE® HD, Promega Corporation, Madison, WI, USA), plasmídeo de empacotamento lentiviral (psPAX2, Addgene, #12260), plasmídeo para construção do envelope lentiviral (pMD2.G, Addgene, #12259) e os respectivos plasmídeos de expressão para o gene *DUSP2* e vetor vazio (citados anteriormente). Após cerca de 15 h, o meio de transfecção foi substituído por

meio DMEM completo. O meio de cultivo contendo a suspensão lentiviral foi coletado 24 e 48 h após a transfecção, centrifugado, filtrado em filtros Millex HV 0,45 µm *low-protein binding* (Fisher Scientific Millipore) para a retirada de debris celulares e armazenado a -80°C.

3.8.3. Transdução das linhagens de ADP com partículas lentivirais

As linhagens Panc10.05 e K8484 foram semeadas em placas de 6 poços na concentração de 4×10^5 células por poço. No dia seguinte, as células foram transduzidas com a suspensão lentiviral contendo o vetor de expressão para *DUSP2* ou o vetor vazio, além de 8 µg/mL de polibreno. Após 48 h, o meio de transdução foi substituído por meio completo suplementado com o antibiótico de seleção puromicina na concentração de 2 µg/mL até completa seleção das células resistentes. A indução da expressão constitutiva de *DUSP2* foi confirmada por western blot.

3.9. Preparo e tratamento com as drogas

Os antibióticos de seleção blasticidina (#15205) e puromicina (#8833) e as drogas gemcitabina (#G6423), salubrinal (#SML0951) e shikonina (#S7576) foram todos adquiridos da empresa *Sigma Aldrich*® (Saint Louis, MO, EUA) e diluídos conforme recomendações do fabricante. A gemcitabina, a blasticidina e a puromicina foram diluídos em água de injeção e as drogas salubrinal e shikonina foram diluídas em DMSO. Foi utilizada a concentração máxima de 0,1% de DMSO em todas as diluições. Todos os controles de salubrinal e shikonina foram normalizados utilizando a mesma concentração de DMSO utilizada no tratamento de maior concentração. A droga Salubrinal foi usada na concentração de 5 µM por 3 h e shikonina nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10 µM por 24 h.

3.10. Ensaio de viabilidade celular

A sensibilidade ou resistência celular ao quimioterápico gemcitabina e à droga salubrinal ou aos antibióticos de seleção blasticidina e puromicina foi avaliada através do ensaio colorimétrico com MTT, de acordo com as recomendações do fabricante (*Sigma Aldrich*® Saint Louis, MO, EUA). O método detecta a quantidade de células metabolicamente ativas por meio da clivagem do sal amarelo tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que produz, no interior das

células, um corante formazan de coloração roxa, sendo posteriormente solubilizado e quantificado no espectrofotômetro. As células foram ressuspensas e semeadas na densidade de 2×10^3 a 3×10^3 células/poço em placas de 96 poços e 24 h depois, foram submetidas aos tratamentos. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 . Após os tempos de tratamento para cada ensaio, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ /poço do reagente MTT e as células foram incubadas por 4 h. Em seguida, o meio foi retirado e substituído por DMSO para solubilização do MTT e foi realizada a leitura de absorbância a 570 nm em leitora de microplacas *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BIO-RAD Laboratories, Inc, CA, EUA). Os valores representam a média \pm desvio padrão do experimento realizado em quadruplicata.

3.11. Proliferação celular (EdU)

O ensaio para detecção de proliferação celular foi realizado através da marcação de células com EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine - A10044 Invitrogen™ Thermo Fisher Scientifics, Inc., Waltham, MA, USA). As células foram semeadas em densidades de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços e mantidas em condições de cultura por 24 h. Após este período, no grupo correspondente ao tratamento, as células foram tratadas com gemcitabina por 48 h. Após o tratamento, foi adicionado o corante EdU na concentração final de $10 \mu\text{M}$ e incubado por 6 h. As células foram tripsinizadas e fixadas *overnight* em no agitador em $200 \mu\text{L}$ de tampão PEB (contendo PBS, EDTA e BSA) e $500 \mu\text{L}$ de tampão de formalina 10%. As células foram então centrifugadas a 350 g por 3 min, incubadas por 15 min em agitador. Então adicionou-se $500 \mu\text{L}$ de tampão PEBT (PEB e Triton) e as células foram lavadas com $500 \mu\text{L}$ de tampão contendo PBS e BSA. As células foram ressuspensas em $80 \mu\text{L}$ da reação Click-It (contendo $63 \mu\text{L}$ de H_2O , $7 \mu\text{L}$ de Tris 100 mM, $10 \mu\text{L}$ de CuSO_4 e $0,04 \mu\text{L}$ de Azide-Dye 1 mM por amostra), adicionou-se $20 \mu\text{L}$ de ácido ascórbico e foram incubadas no escuro por 30 min. Em seguida, as células foram incubadas por 5 min em tampão PEB contendo iodeto de propídio, lavadas em tampão PEB e analisadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média \pm desvio padrão do experimento realizado em quadruplicata.

3.12. 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 fluoresceinisothiocyanate* - BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) iodeto de propídio (IP). Para tanto, as células foram semeadas em densidades de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços e mantidas em condições de cultura por 24 h. Após este período, no grupo correspondente ao tratamento, as células foram tratadas com gemcitabina por 48 h. Após o tratamento, as células foram retiradas da placa, lavadas com PBS 1x gelado e centrifugadas a 350 g por 5 min, lavadas com tampão de ligação à Anexina V (BD Biosciences Pharmigen, USA) e ressuspensas em 40 μ L de um mix contendo tampão de ligação à Anexina, 1 μ L de Anexina V e 1 μ L de IP. As células foram analisadas por citometria de fluxo. Foram consideradas como célula em apoptose, as células positivas para Anexina e negativas para IP. Os valores representam a média \pm desvio padrão do experimento realizado em quadruplicata.

3.13. Ensaio de ativação de fosforilação (phosfo-kinase array)

O Kit para ensaio de ativação de fosforilação (*phosfo-kinase array*) *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit* (ARY003C) foi obtido da R&D Systems®. Este ensaio detecta simultaneamente 37 sítios de fosforilação de diferentes proteínas e 2 proteínas totais. Para o ensaio, foram utilizados 4 grupos: 1) A linhagem PANC10.05 transduzida com o vetor de expressão para *DUSP2* (nomeada como *DUSP2*); 2) A linhagem PANC10.05 transduzida com o respectivo vetor vazio (nomeada como EGFP); 3) A linhagem PANC10.05 transduzida com o vetor de expressão para *DUSP2* e tratada por 48h com 25 nM de gemcitabina; 4) A linhagem PANC10.05 transduzida com o vetor vazio e tratada por 48 h com 25 nM de gemcitabina. O ensaio foi realizado seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram submetidas à lise celular e extração proteica. As membranas de nitrocelulose foram lavadas e bloqueadas com os tampões específicos e em seguida incubadas *overnight* com 400 μ g de proteína de cada grupo experimental. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 h com o Coquetel de Detecção de Anticorpos. Para detecção, foram utilizados reagentes de detecção quimioluminescente e Streptavidina-HRP e feita a leitura de quimioluminescência. A lista completa com todas as proteínas e sítios de fosforilação detectados neste ensaio está no **Anexo D**.

3.14. Análises *in silico*

Os dados de expressão gênica de amostras de pacientes foram obtidos a partir da plataforma R2: *Genomics Analysis and Visualization* (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). A análise de expressão de DUSP2 e sua correlação com a expressão de outros genes foi realizada utilizando-se os conjuntos de dados GSE28735, GSE62452 e GSE32676, totalizando 113 amostras normais de pâncreas e 139 amostras de ADP. Para os dados de correlação gênica entre as DUSPs e para o enriquecimento de vias e de processos celulares, foram utilizados os dados de RNAseq de 174 amostras humanas de ADP do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A análise da expressão de DUSP2 em linhagens celulares de ADP foi realizada utilizando-se o banco de dados *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), por meio da plataforma *DepMap Portal* (<https://depmap.org/portal/>). As linhagens celulares utilizadas nestas análises estão descritas nos **Anexos E e F**. A análise de enriquecimento de vias e de processo celulares foi realizada pelo *KEEG Pathways*, *Panther* e pelo *Gene Ontology*. Esta análise foi realizada por meio da ferramenta online *EnrichR* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Para análise de interação proteica de DUSP2, foi utilizado o software STRING v10.5 (<https://string-db.org>), considerando os parâmetros de coexpressão, evidência experimental, mineração de dados (textmining), e homologia (Score de interação: 0.4).

3.15. Análise dos dados

3.15.1. Cálculo do valor IC50

Os valores de IC50 (dose média em que a droga causa a inviabilidade de 50% das células) da droga gemcitabina foram calculados no programa *Calculusyn* (Biosoft®, Ferguson, MO). Para o cálculo, foram utilizados os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular por meio da fração afetada após as diferentes concentrações da droga comparadas ao controle, nos tempos de 72 h.

3.15.2. Análise estatística da triagem de DUSPs

Para análise estatística da triagem de DUSPs, foi comparada a taxa de viabilidade celular após *knockout* de cada DUSP combinada ao tratamento de gemcitabina com o MOCK (controle da transfecção também tratado com gemcitabina) utilizando o teste *One-Way ANOVA* com o auxílio do programa GraphPad Prism® 8.

Foi adotado um valor de alfa de 0,05 como nível de significância estatística. Os dados estão representados pelos valores de média \pm desvio padrão.

3.15.3. Análise dos ensaios funcionais

Para os ensaios de viabilidade, proliferação celular e apoptose, foram utilizados os testes *t-Student*, *One-Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. Foi adotado um valor de alfa de 0,05 como nível de significância estatística. Os dados estão representados pelos valores de média \pm desvio padrão.

3.15.4. Análise do ensaio de ativação de fosforilação

Os dados que representam a fosforilação de cada sítio proteico analisado foram captados em forma de intensidade de quimioluminescência (pixels) e quantificados com o auxílio do plugin *Protein Array Analyzer* do software ImageJ (National Institutes of Health). Cada sítio de fosforilação estava em duplicata na membrana de nitrocelulose, e a média das quantificações foi normalizada pela média da quantificação da proteína total β -catenina. Para análise estatística, foi realizado o teste *Two-Way ANOVA* com o auxílio do programa GraphPad Prism® 8, comparando os valores entre os grupos vetor vazio (EGFP), indução de DUSP2 (DUSP2), vetor vazio tratado com gemcitabina (EGFP + GEM) e indução de DUSP2 tratado com gemcitabina (DUSP2 + GEM). Foi adotado um valor de alfa de 0,05 como nível de significância estatística. Os dados estão representados pelos valores de média \pm desvio padrão.

4. Resultados

4.1. Ensaio de viabilidade celular em linhagens de ADP tratadas com gemcitabina

Para determinar a sensibilidade à gemcitabina das linhagens PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2 e assim, estabelecer as doses de IC50 (dose média em que a droga causa a inviabilidade de 50% das células) para cada uma, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com o reagente MTT. As células foram tratadas com cinco diferentes concentrações de gemcitabina (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 50 μM e 100 μM), além do controle sem droga e avaliadas após 24, 48, 72 e 96 h de tratamento. Após o tratamento foi observado que a taxa de viabilidade celular foi reduzida em todas as linhagens conforme o aumento da concentração da droga e tempo de tratamento (**Figura 6**). Para as três linhagens foram calculados os valores de IC50 pelo programa *Calculusyn* (Biosoft®, Ferguson, MO), utilizando o tempo de ação da droga de 72 h, o qual se mostrou mais eficaz. Dessa forma, as doses utilizadas e que representam o IC50 para cada linhagem foram 16 μM para MIA PaCa-2 e 37 μM para AsPC-1. A linhagem PANC-1 apresentou um perfil mais resistente à droga, com uma taxa de viabilidade celular de 54%. Neste caso, o programa *Calculusyn* superestima a dose que resultaria em 50% de viabilidade celular, calculando um valor de 635 μM . No entanto, esta dose é muito alta e não representa um valor real de IC50 como nas outras linhagens. Portanto, para os experimentos posteriores foi escolhida a dose de 50 μM para a linhagem PANC-1, que alcança uma fração afetada de 46% das células.

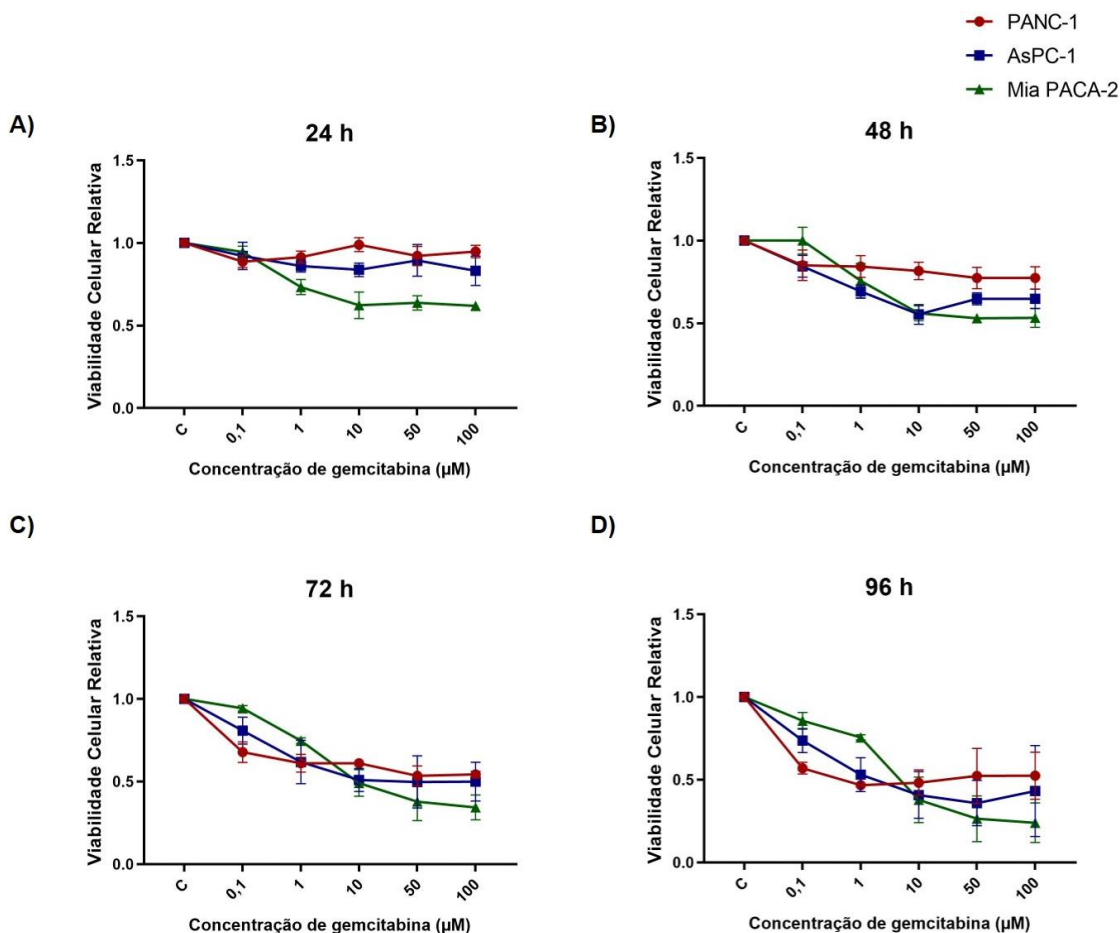


Figura 6 - Ensaio de viabilidade celular em linhagens de ADP tratadas com gemcitabina. Ensaio de viabilidade celular após tratamento com a droga gemcitabina utilizando o método colorimétrico MTT nas linhagens celulares de ADP: PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2 nas doses de 0,1 a 100 µM, além do controle sem droga, após **A)** 24, **B)** 48, **C)** 72 e **D)** 96 h de tratamento.

4.2. **Knockout gênico mediado por CRISPR/Cas9. Ensaio de screening para identificação de alvos da família DUSP**

Após os ensaios preliminares de padronização com o teste de viabilidade, a primeira etapa do projeto foi a realização de um ensaio de triagem fenotípica para a investigação global do possível papel dos genes da família de DUSPs na resposta à gemcitabina. Este *screening* teve o objetivo de identificar, dentre as DUSPs existentes, quais delas possui um potencial sensibilizante frente ao tratamento com gemcitabina, para então, elucidar as funções destas moléculas na resistência do ADP à quimioterapia. Para tanto, as linhagens celulares foram submetidas ao *knockout* gênico de DUSPs utilizando a metodologia de edição do genoma mediada por RNA “guia” (Cas9) - CRISPR/Cas9¹⁰⁵. Nesse caso, utilizou-se uma abordagem que realiza uma triagem baseada na análise fenotípica, onde foi observado de maneira global se

o *knockout* das DUSPs condiciona as células a serem mais ou menos sensíveis ao quimioterápico gemcitabina (utilizando um ensaio de viabilidade celular).

Seguindo as recomendações do fabricante (o fluxograma do processo de *screening* seguido de análise fenotípica está descrito no **Anexo G**), as linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 foram primeiramente transduzidas com partículas lentivirais para que o gene *Cas9* fosse permanentemente integrado ao genoma e com isso, o processo de *knockout* gênico fosse otimizado. Após a transdução utilizando os MOIs (*multiplicity of infection*) de 1, 2,5 e 5, as células foram submetidas à seleção com blastomicina (marcador de resistência), na concentração de 2,5 µg/mL. Esta dose foi estabelecida previamente por meio de ensaio de viabilidade celular realizado pelo grupo. Após seleção, a integração do gene *Cas9* ao genoma foi confirmada pela análise da expressão proteica por meio do ensaio western blot. Como demonstrado na **Figura 7A**, as transduções com todos os MOIs foram eficientes para a integração do gene *Cas9* nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1. Para os experimentos subsequentes foi utilizado o MOI 2,5 para ambas as linhagens.

4.2.1. Fosfatases DUSPs impactam na sensibilidade à gemcitabina em células de ADP

Após confirmação da integração da *Cas9* nas linhagens celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, as células foram transfectadas por 48 h com o complexo crRNA:tracRNA específico para cada uma das 25 DUSPs selecionadas, assim como os controles. Em seguida, as células submetidas ao *knockout* gênico foram tratadas com gemcitabina por 72 h nas doses correspondentes ao IC50 para análise de viabilidade celular. Conforme observado nas **Figuras 7B-D**, na linhagem PANC-1, que apresenta um perfil mais resistente à gemcitabina, observou-se que a resposta à gemcitabina foi mais frequentemente regulada, mostrando que o *knockout* de diferentes fosfatases modificou a resposta das células, potencializando ou reduzindo o efeito ao tratamento com a gemcitabina de maneira significativa ($p < 0,05$). Dentre as fosfatases avaliadas destacam-se as DUSPs 1, 2, 3, 5, 9 e 23 (associadas à resistência) e das DUSPs 4, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 22 e 27 (associadas à sensibilidade), sugerindo que as DUSPs podem de fato, exercer um papel importante na resposta à gemcitabina nas células de ADP (**Figura 7B**). Na linhagem MIA PaCa-2 (**Figura 7C**) foram identificadas quatro fosfatases que modularam significativamente a sensibilidade das células ao tratamento com a gemcitabina, a DUSP1, DUSP2, DUSP11 e DUSP27. Os resultados

da análise estatística do *screening* estão detalhados na **Tabela 3**.

Analisando os dados em conjunto, podemos constatar que as fosfatases DUSP1, DUSP2, DUSP11 e DUSP27 apresentaram um potencial de sensibilização à gemcitabina concordante em ambas as linhagens, o que sugere que a função dessas fosfatases seja de fato relevante para o processo de resposta à gemcitabina, independente da linhagem. O *knockout* de *DUSP1* e *DUSP2* inibiu o efeito da gemcitabina e o *knockout* de *DUSP11* e *DUSP27* potencializou o efeito da droga. A **Figura 7D** ilustra a análise de correlação do efeito citotóxico da gemcitabina combinado ao *knockout* das DUSPs em ambas as linhagens.

Tabela 3 - Valores referentes à citotoxicidade do *knockout* de cada gene da família DUSP em combinação com o tratamento da gemcitabina, encontrados no ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1. Os valores estão representados pela média e desvio padrão, além do valor de p calculado pelo teste estatístico *One-Way ANOVA* comparando o *knockout* de cada DUSP tratado com gemcitabina, com o controle MOCK.

Gene	MIA PaCa-2	Valor de p*	PANC-1	Valor de p*
<i>DUSP1</i>	- 0.19 ± 0.17	0,0069	- 0.37 ± 0.08	<0,0001
<i>DUSP2</i>	- 0.18 ± 0.03	0,0069	- 0.30 ± 0.04	0,0003
<i>DUSP3</i>	- 0.03 ± 0.03	0,9991	- 0.39 ± 0.11	<0,0001
<i>DUSP4</i>	- 0.12 ± 0.06	0,2254	0.19 ± 0.01	0,0533
<i>DUSP5</i>	- 0.08 ± 0.01	0,7495	- 0.26 ± 0.18	0,0022
<i>DUSP6</i>	- 0.14 ± 0.03	0,0968	0.30 ± 0.00	0,0003
<i>DUSP7</i>	- 0.09 ± 0.05	0,5981	0.23 ± 0.06	0,0095
<i>DUSP8</i>	0.03 ± 0.05	0,9991	0.20 ± 0.07	0,0355
<i>DUSP9</i>	- 0.10 ± 0.05	0,4514	- 0.24 ± 0.08	0,0059
<i>DUSP10</i>	- 0.13 ± 0.01	0,1502	0.13 ± 0.08	0,3938
<i>DUSP11</i>	0.09 ± 0.02	0,040	0.26 ± 0.03	0,0022
<i>DUSP12</i>	- 0.03 ± 0.03	0,9991	0.26 ± 0.02	0,0022
<i>DUSP13</i>	- 0.08 ± 0.09	0,5981	0.03 ± 0.02	0,9993
<i>DUSP14</i>	- 0.10 ± 0.03	0,4514	0.05 ± 0.02	0,9955
<i>DUSP15</i>	- 0.05 ± 0.05	0,9883	0.09 ± 0.07	0,8534
<i>DUSP16</i>	0.03 ± 0.05	0,9991	0.31 ± 0.02	0,0002
<i>DUSP18</i>	- 0.14 ± 0.13	0,0968	- 0.03 ± 0.09	0,9993
<i>DUSP19</i>	- 0.10 ± 0.06	0,4514	- 0.01 ± 0.00	0,9998
<i>DUSP21</i>	- 0.04 ± 0.05	0,9956	0.12 ± 0.08	0,5037
<i>DUSP22</i>	0.04 ± 0.10	0,9956	0.27 ± 0.09	0,0013
<i>DUSP23</i>	-0.06 ± 0.07	0,9612	- 0.25 ± 0.11	0,0036
<i>DUSP24</i>	- 0.07 ± 0.02	0,879	- 0.06 ± 0.00	0,9938
<i>DUSP26</i>	- 0.05 ± 0.01	0,9883	0.08 ± 0.07	0,9333
<i>DUSP27</i>	0.17 ± 0.02	0,0215	0.19 ± 0.07	0,0533
<i>DUSP28</i>	0.10 ± 0.01	0,4514	- 0.13 ± 0.12	0,3938

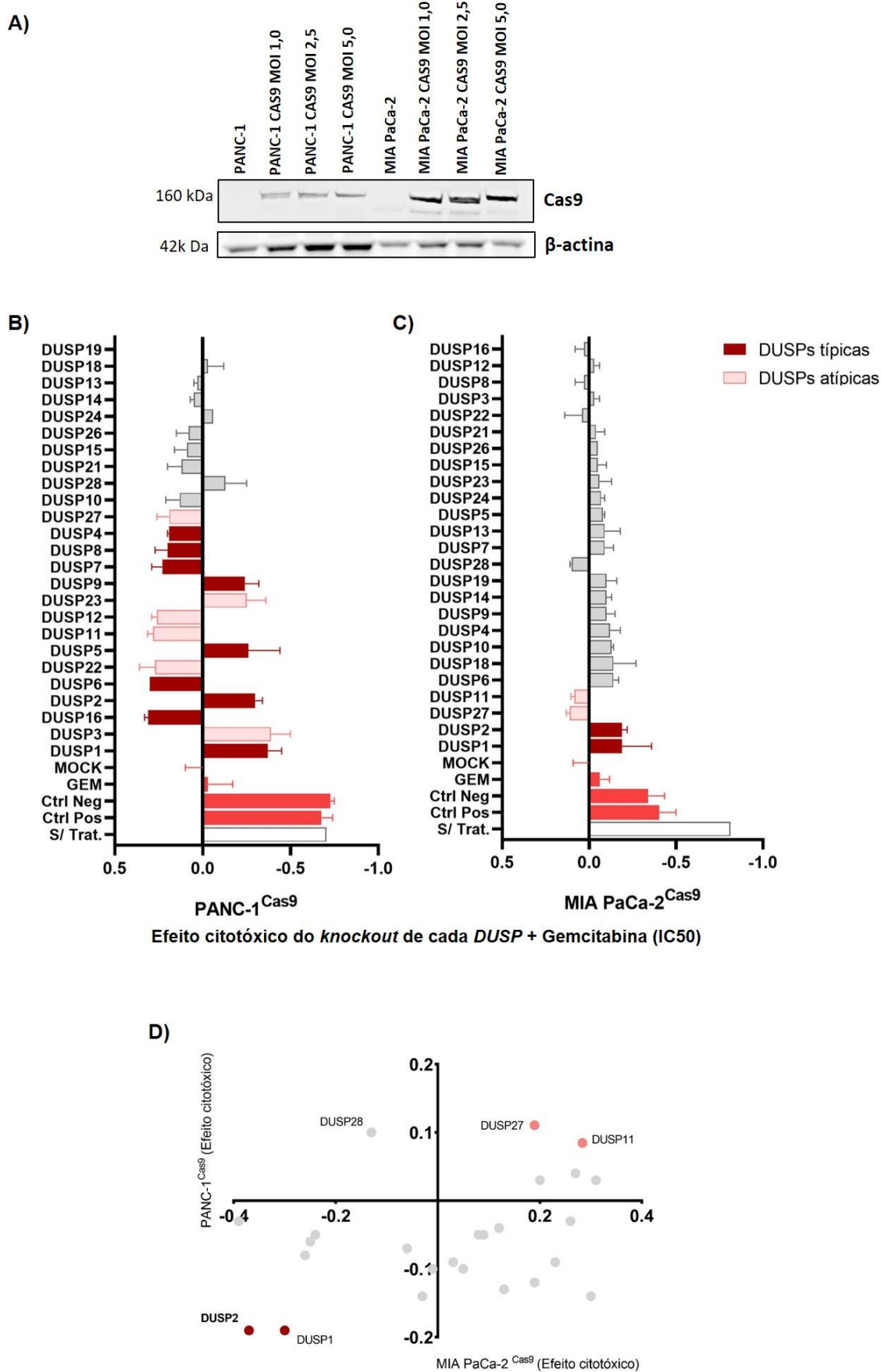


Figura 7 - Screening para identificação de alvos da família DUSP relacionados à resposta à gemcitabina em ADP. A) Expressão proteica da Cas9 e do controle endógeno β -actina por western

blotting nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 após transdução com lentivírus para o gene Cas9 nos MOIs de 1,0, 2,5 e 5,0. **B e C)** Ensaio de viabilidade celular utilizando o método MTT após o *knockout* gênico de diferentes DUSPs, para avaliar o potencial de sensibilização à gemcitabina de cada *knockout* gênico nas linhagens PANC-1 (**B**) e MIA PaCa-2 (**C**). O ensaio foi realizado após 72 h de tratamento com as doses de 50 μ M (PANC-1) e 16 μ M (MIA PaCa-2) e estão representados na forma de citotoxicidade. Destacam-se em vermelho (DUSPs típicas) e rosa (DUSPs atípicas), as combinações que foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle MOCK. **D)** Gráfico representando a análise de correlação do efeito citotóxico da gemcitabina no contexto de *knockout* de diversas DUSPs nas duas linhagens celulares (PANC-1 e MIA PaCa-2). Destacam-se em vermelho (DUSPs típicas) e rosa (DUSPs atípicas) as que foram correlatas nas duas linhagens celulares. S/ Trat.: células não tratadas. Ctrl Pos: controle positivo da transfecção; Ctrl Neg: controle negativo da transfecção; GEM: células tratadas apenas com gemcitabina; MOCK: controle da transfecção tratado com gemcitabina.

Diante dos resultados acima descritos analisou-se a relevância das fosfatases identificadas para detalhar a investigação e prosseguir com a validação funcional como potenciais alvos de modulação de resposta à gemcitabina. Dentre os alvos identificados, a inibição da fosfatase DUSP11 apresentou potencial significativo de sensibilização à gemcitabina e considerando sua natureza atípica, foi investigada em outro estudo (**Apêndice 1**). A DUSP27 é outra DUSP atípica que apresentou potencial de sensibilização à gemcitabina e sugere um papel relevante da mesma nesse contexto. Esta fosfatase exerce um papel nos tecidos adiposo, muscular esquelético e hepático¹⁰⁶. Contudo, sua exata função ainda é pouco conhecida e por esse motivo, sua investigação não foi prioridade neste trabalho.

Devido à função clássica das DUSPs típicas de inativação de MAPKs como ERK e JNK (que já foram relacionadas à indução da resistência a diversos quimioterápicos^{70; 71; 72; 73; 74}), as DUSP1 e DUSP2 foram os alvos de escolha nesse trabalho. A DUSP1, é uma DUSP típica que já foi relacionada com a quimiorresistência à gemcitabina em ADP e, apesar do papel ainda controverso, não é um alvo inédito a ser investigado no contexto da quimiorresistência⁷⁵. Por outro lado, a DUSP2, outra DUSP típica, possui expressão gênica alterada em diversos tumores^{100; 107; 108; 109}, além de ser alvo transcricional de importantes genes supressores tumorais como o *TP53* e o *E2F-1*^{89; 110; 111}, sugerindo que essa fosfatase possa exercer funções relevantes no controle do ciclo celular e apoptose. Diante do potencial de elucidação de um mecanismo inédito, decidiu-se avaliar a relevância biológica da DUSP2 para o processo de resposta à gemcitabina de células de ADP.

4.3. Validação do *screening* fenotípico em DUSP1 e DUSP2

Afim de confirmar os alvos encontrados no *screening* fenotípico, realizou-se a validação independente do *knockout* gênico de *DUSP1* e *DUSP2* utilizando três

crRNAs disponíveis para cada um dos alvos e subsequente avaliação da viabilidade celular. Como esperado, os resultados obtidos no *screening* foram confirmados e como ilustrado na **Figura 8**, os resultados indicam uma resposta fenotípica semelhante ao *screening*, confirmando que a inibição de ambas as fosfatases provocam um aumento na quimiorresistência das linhagens de ADP.

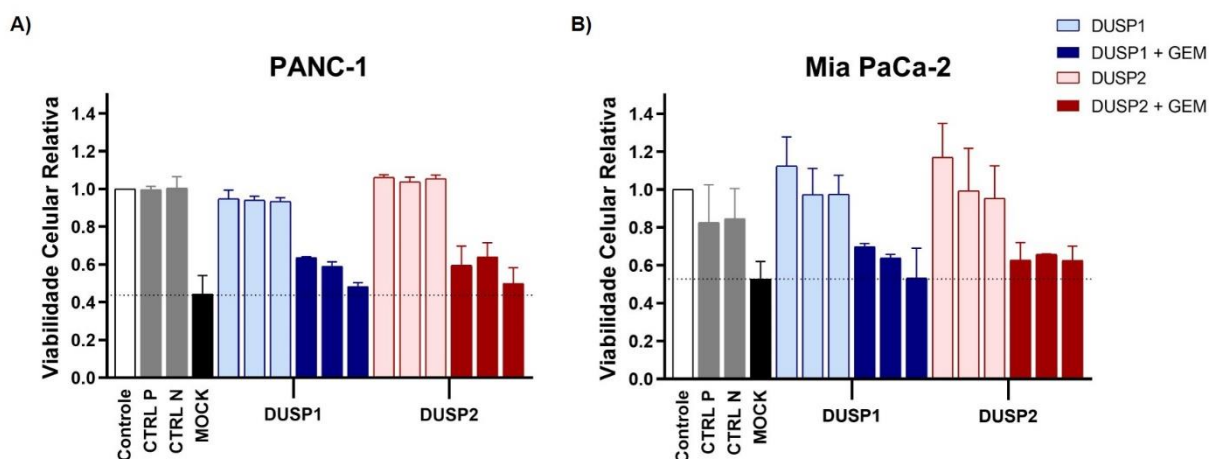


Figura 8 - Validação do screening fenotípico com a *DUSP1* e *DUSP2*. Ensaio de viabilidade celular utilizando o método MTT após o *knockout* gênico de *DUSP1* e *DUSP2*, para avaliar o potencial de sensibilização à gemcitabina nas linhagens PANC-1 (A) e MIA PaCa-2 (B). O ensaio foi realizado após 48 h de transfecção, seguidas de 72 h de tratamento com as doses de 50 µM (PANC-1) e 16 µM (MIA PaCa-2) de gemcitabina. Controle: células sem tratamento; CTRL P: controle positivo da transfecção; CTRL N: controle negativo da transfecção; MOCK: controle da transfecção tratado com gemcitabina.

4.4. Análise da expressão de *DUSP2* em ADP

4.4.1. Padrão de expressão gênica de *DUSP2* é reduzido em amostras de pacientes com ADP comparado ao tecido normal

Para verificar a relevância clínica de *DUSP2*, avaliou-se o padrão de expressão gênica dessa fosfatase em amostras de ADP provenientes de pacientes do Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP). Como evidenciado na **Figura 9A**, nota-se a heterogeneidade da expressão gênica entre as amostras e um padrão reduzido nas amostras de ADP quando comparado ao tecido paratumoral adjacente, embora sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

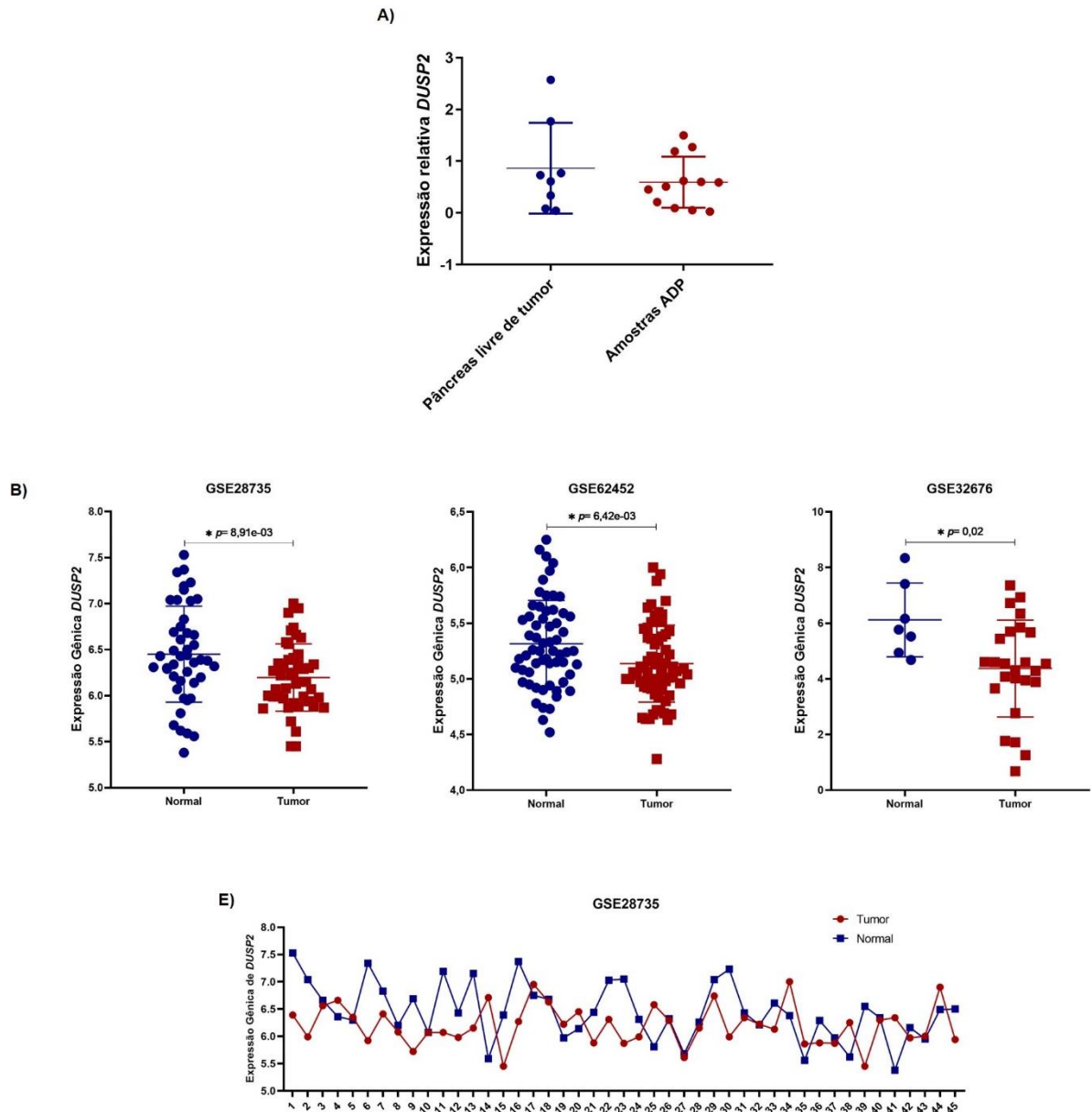


Figura 9 - Análise da expressão gênica de *DUSP2* em pacientes com ADP. A) Expressão gênica de *DUSP2* em amostras de pâncreas livre de tumor e em amostras de ADP de pacientes do HC-FMRP. As análises foram feitas por qRT-PCR. B, C e D) Análise *in silico* da expressão gênica de *DUSP2* em amostras de pâncreas normal, comparadas às amostras de ADP. Os dados foram obtidos a partir da plataforma R2 e foram utilizados os conjuntos de dados GSE28735 (B), GSE62452 (C) e GSE32676 (D). E) Expressão gênica de *DUSP2* em amostras de pacientes com ADP e sua contraparte normal obtidas na plataforma R2 utilizando o banco de dados GSE28735.

Para melhor compreensão do padrão de expressão gênica da *DUSP2*, realizou-se a análise de expressão de *DUSP2 in silico*, em outras três coortes independentes de pacientes com ADP: GSE28735 (Figura 9B), GSE62452 (Figura 9C) e GSE32676 (Figura 9D), utilizando a plataforma R2. Nas três coortes avaliadas a expressão de *DUSP2* foi significativamente ($p < 0,05$) menor nas amostras de tecido tumoral de ADP

quando comparadas às amostras normais de pâncreas. Nos dados da coorte GSE28735, foi realizada também a análise pareada da expressão de *DUSP2* entre as amostras tumorais e o tecido paratumoral adjacente de cada um dos 45 pacientes (**Figura 9E**). Foi observado que em 47% dos indivíduos, a expressão de *DUSP2* é menor no tecido tumoral do que no tecido pancreático normal. Em 24% dos indivíduos, a expressão de *DUSP2* é maior no tecido tumoral do que no tecido pancreático normal e em 29% não há diferença na expressão de *DUSP2* entre as contrapartes tumorais e normais. Em conjunto, estes dados mostram que o gene *DUSP2* frequentemente se apresenta pouco expresso em amostras de ADP quando comparado ao tecido pancreático normal.

4.4.2. Avaliação da expressão gênica e proteica de *DUSP2* em linhagens celulares de ADP

Prosseguindo com a validação funcional e avaliação da relevância biológica da *DUSP2*, buscou-se identificar o melhor modelo experimental para o estudo detalhado desta fosfatase em linhagens de ADP com diferentes alterações genéticas. Inicialmente avaliou-se o padrão de expressão gênica de *DUSP2* nas linhagens celulares de ADP: PANC-1, MIA PaCa-1, AsPC-1 e CAPAN-2. Como demonstrado na **Figura 10A**, de maneira geral, as linhagens apresentam uma baixa expressão de *DUSP2* com exceção da linhagem MIA PaCa-2, que apresentou maior expressão de *DUSP2*.

Para complementar a análise, foi avaliada a expressão proteica de *DUSP2* em diversas linhagens de ADP. Além das linhagens celulares humanas estudadas até o momento PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2, foi incluída a linhagem Panc10.05, que também possui mutações nos genes *KRAS* e *TP53*. Adicionalmente, foram incluídas as seguintes linhagens: BxPC-3 (possui o gene *KRAS* selvagem), Capan-2 e SW1990 (que possuem o gene *TP53* selvagem). Também foram avaliadas linhagens celulares estabelecidas a partir de camundongos geneticamente modificados e modelos para o estudo do ADP, sendo elas: a linhagem P4313 derivada de um camundongo KC (*PDX1^{cre/+}*, *KRAS^{G12D/+}*), as linhagens K8484 e DT8082, derivadas de camundongos KPC (*PDX1^{cre/+}*, *KRAS^{G12D/+}*, *TP53^{flx/flx}*) e a linhagem PKT82, derivada de um camundongo PKT (*PTF1A^{cre/+}*, *KRAS^{G12D/+}*, *TGFBR2^{flx/flx}*). Como observado na **Figura 10B**, as linhagens humanas Capan-2, Panc10.05, AsPC-1 e BxPC-3 possuem expressão proteica reduzida comparadas às linhagens Mia PaCa-2 e PANC-1, que

possuem padrão de expressão de DUSP2 elevado. Nas linhagens de camundongo, DT8082 mostrou maior nível de expressão proteica em relação à K8484. As linhagens estabelecidas a partir dos fibroblastos associados ao tumor (CAFs) dos camundongos correspondentes também demonstraram altos níveis de expressão de DUSP2.

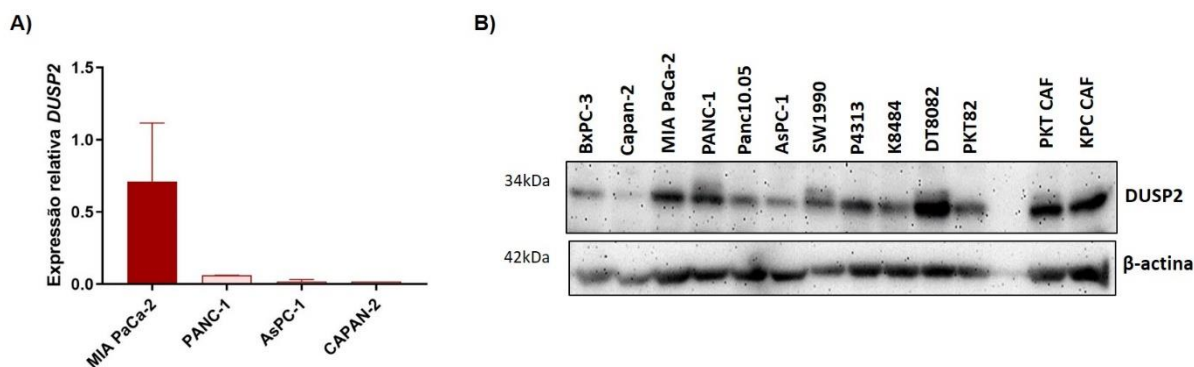


Figura 10 - Avaliação da expressão gênica e proteica de DUSP2 em linhagens celulares de ADP humanas e de camundongos. A) Expressão gênica de *DUSP2* nas linhagens celulares de ADP MIA PaCa-2, PANC-1, AsPC-1 e CAPAN-2. **B)** Expressão proteica de DUSP2 nas linhagens celulares humanas de ADP BxPC-3, Capan-2, MIA PaCa-2, PANC-1, Panc10.05, AsPC-1, SW1990, nas linhagens celulares de ADP de camundongo P4313, K8484, DT8082, PKT82 e nas linhagens de fibroblastos associados ao tumor de camundongos (CAFs) PKT CAF e KPC CAF. A proteína β-actina foi utilizada como controle endógeno.

4.5. DUSP2 apresenta padrão de expressão gênica significativamente correlacionado com DUSP1

É sabido que muitas proteínas da família DUSP possuem funções redundantes em inúmeros contextos celulares e, portanto, avaliar a correlação entre diferentes DUSPs se mostra claramente relevante. Para este fim, realizou-se uma análise de correlação entre o padrão de expressão dos genes da família DUSP *in silico*, utilizando os dados de RNAseq de 174 amostras humanas de ADP, disponíveis na plataforma *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), a partir da plataforma R2. Como ilustrado na **Figura 11A**, foram identificadas inúmeras correlações significativas ($p < 0,05$), o que indica uma alta correlação entre os genes da família DUSP. Dentre essas, destaca-se a correlação positiva ($R = 0,55$; $p = 2,6 \times 10^{-15}$) entre a expressão gênica de *DUSP1* e *DUSP2* (**Figuras 11A e 11B**). Corroborando esse dado, a correlação significativa ($R = 0,32$; $p = 8,3 \times 10^{-3}$) entre *DUSP1* e *DUSP2* também foi observada em análise realizada em 20 linhagens celulares de ADP do banco de dados *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), por meio da plataforma *DepMap Portal* (**Figura 11C e Anexo E**). Também foi observado correlação significativa ($R = 0,39$; $p = 6,7 \times 10^{-4}$ e $R = 0,57$

; $p = 2,77 \times 10^{-3}$) nas coortes com dados de amostras humanas de ADP GSE28735 e GSE32676 respectivamente (**Figuras 11D e 11E**), mostrando que a correlação entre *DUSP1* e *DUSP2* é de fato significativa

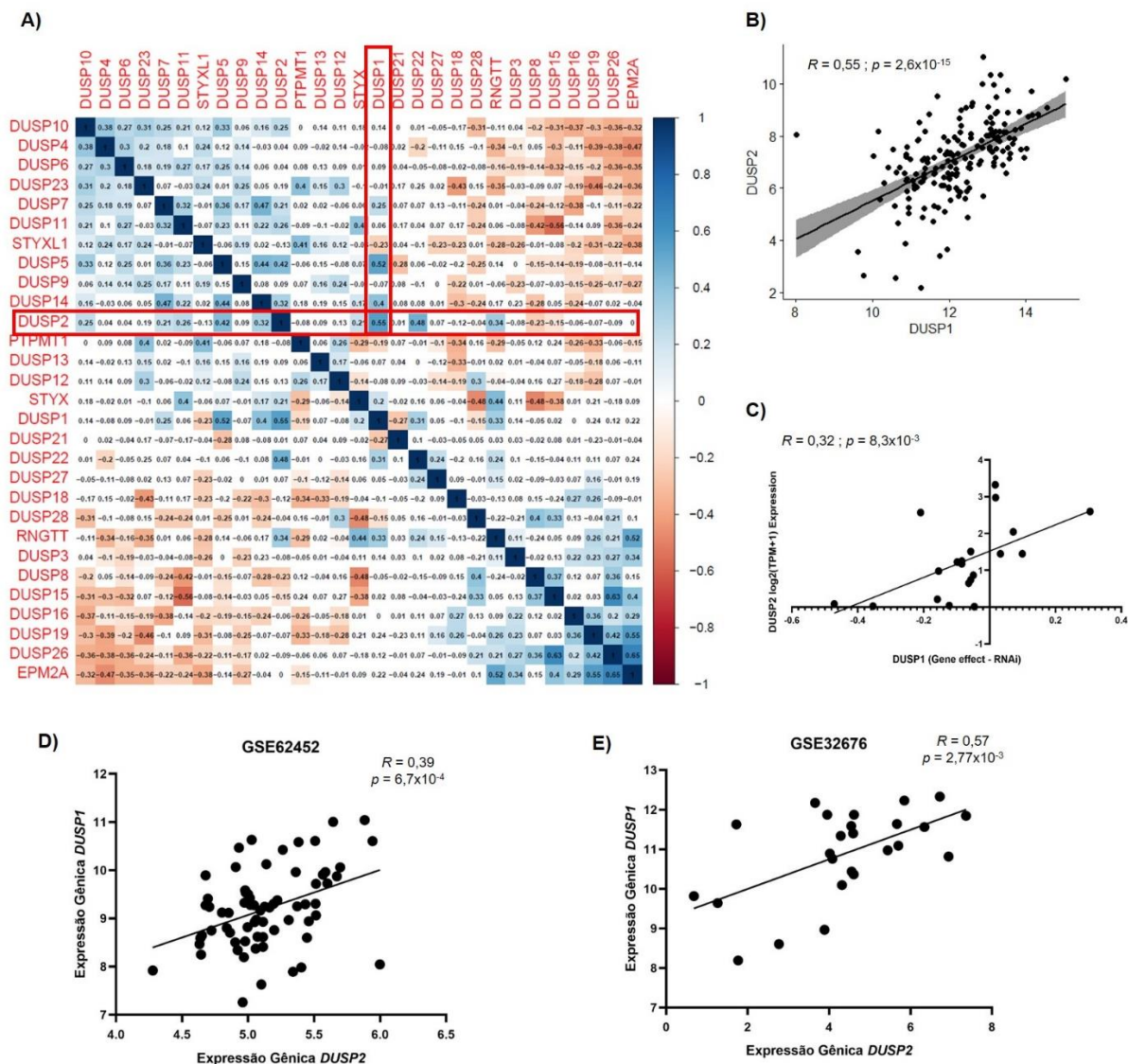


Figura 11 - Análise de correlação entre a expressão dos genes da família DUSP. **A)** Correlação da expressão gênica entre os genes da família DUSPs obtida a partir de dados de RNAseq de 174 amostras humanas de ADP do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) a partir da plataforma R2. O aumento da intensidade da coloração azul indica uma maior correlação positiva, enquanto o aumento da intensidade da coloração vermelha indica uma maior correlação negativa. **B)** Correlação positiva entre *DUSP1* e *DUSP2* em amostras de ADP do TCGA. **C)** Correlação positiva entre efeito do gene *DUSP1* e expressão gênica de *DUSP2* em 20 linhagens celulares de ADP da *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), por meio da plataforma *DepMap Portal*. **D e E)** Correlação positiva entre *DUSP1* e *DUSP2* em amostras de ADP dos bancos de dados GSE62452 (**D**) e GSE32676 (**E**) a partir da plataforma R2.

4.6. Estabilidade proteica de DUSP2 está associada à sensibilidade de células de ADP ao tratamento com gemcitabina

Para avaliar a relação da expressão proteica de DUSP2 com a resposta à gemcitabina em diferentes linhagens, foram selecionadas as linhagens celulares humanas MIA PaCa-2 e Panc10.05, que apresentaram maior e menor expressão de DUSP2, respectivamente. Além destas, avaliou-se as linhagens que demonstraram baixa expressão de DUSP2: SW1990, que não possui mutação no gene *TP53* e BxPC-3, que possui o gene *KRAS* selvagem. Dentre as linhagens de camundongo, foram selecionadas as linhagens provenientes de camundongos KC (P4313) e KPC com baixa (K8484) e alta expressão de DUSP2 (DT8082) e as linhagens derivadas de CAF dos camundongos KPC e PKT (**Figura 10**). Além da expressão de DUSP2, foi avaliada a expressão proteica de DUSP1 e o status de fosforilação de ERK1/2 (um dos principais alvos de DUSP1 e potencialmente de DUSP2).

A **Figura 12A**, demonstra uma clara redução de DUSP2 após o tratamento com gemcitabina nas linhagens humanas MIA PaCa-2 e SW1990, acompanhada do aumento da fosforilação de ERK1/2 e a diminuição de ERK total. A proteína DUSP1 também teve expressão reduzida após o tratamento, porém, a redução foi mais evidente nas linhagens Panc10.05 e BxPC-3, que não apresentaram modulação de DUSP2. Paralelamente, analisando o ensaio de viabilidade celular após o tratamento com diversas doses de gemcitabina (**Figura 12B**), podemos observar que as linhagens que mantêm a estabilidade proteica de DUSP2 após o tratamento, correspondem às linhagens mais sensíveis à gemcitabina (Panc10.05 e BxPC-3), enquanto as linhagens que perdem a expressão de DUSP2 (MIA PaCa-2 e SW1990) são mais resistentes ao tratamento. Por outro lado, as linhagens de camundongos (**Figura 12C**) não demonstraram modulação significativa dessas proteínas após o tratamento com a gemcitabina, embora apresentem diferentes padrões de resposta à droga. A linhagem P4313 (KC) é a mais sensível à gemcitabina (**Figura 12D**), enquanto a linhagem K8484, que possui expressão de DUSP2 menor que DT8082 (ambas são provenientes de camundongo KPC) (**Figura 10**), é a linhagem mais resistente à gemcitabina.

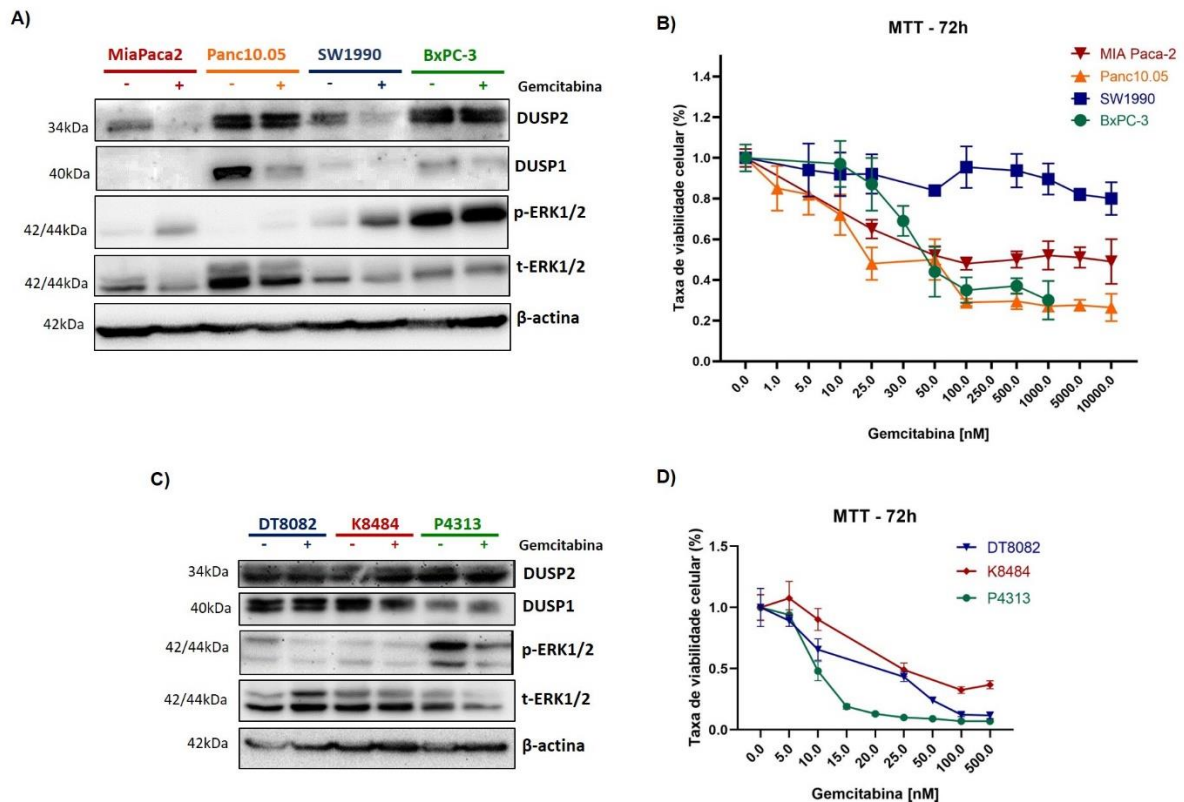


Figura 12 - Avaliação da resposta à gemcitabina em linhagens celulares de ADP humanas e de camundongos. Expressão proteica de DUSP2, DUSP1, ERK1/2 fosforilado e total e o controle endógeno β-actina, com e sem o tratamento por 72 h com a droga gemcitabina (com as doses correspondente a cerca de 50% de citotoxicidade) nas linhagens humanas MIA PaCa-2, Panc10.05, SW1990 e BxPC-3 (**A**) e de camundongo DT8082, K8484 e P4313 (**C**). **B** e **D**) Ensaio de viabilidade celular após 72h de tratamento com a droga gemcitabina utilizando o método colorimétrico MTT nas linhagens humanas MIA PaCa-2, Panc10.05, SW1990 e BxPC-3 (**B**) e nas linhagens de camundongo DT8082, K8484 e P4313. O experimento de viabilidade foi um experimento de triagem feito em quadruplicata biológica.

Nas linhagens derivadas de CAFs (**Figura 13A**), a gemcitabina também causou redução da expressão de DUSP2 e DUSP1 na linhagem PKT82 CAF, porém a fosforilação de ERK1/2 também foi afetada e reduziu após o tratamento. Já na linhagem KPC CAF, o tratamento aumentou discretamente a expressão de DUSP2, mas a DUSP1 e a fosforilação de ERK1/2 não foram alterados. O ensaio de viabilidade celular demonstrou o mesmo padrão dos resultados nas linhagens humanas: a linhagem PKT82 CAF, que apresentou redução da expressão de DUSP2 após o tratamento, apresentou um perfil mais resistente à droga do que a linhagem que manteve a estabilidade proteica de DUSP2 mesmo após o tratamento (**Figura 13B**).

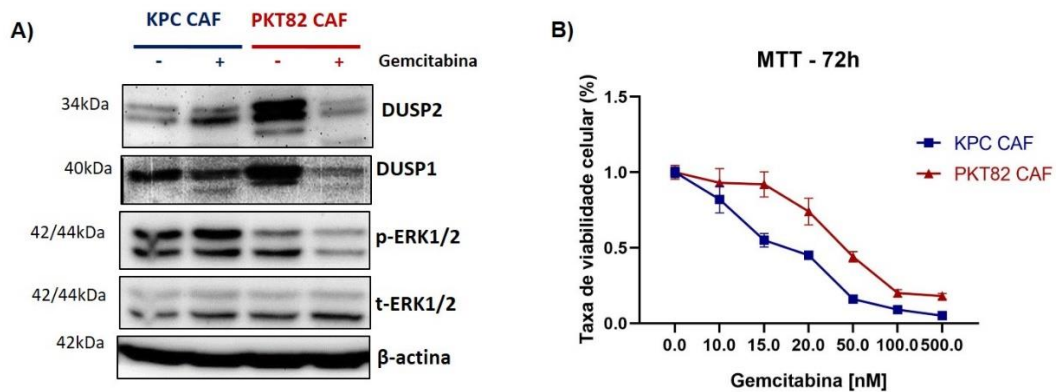


Figura 13 - Avaliação da resposta à gemcitabina em linhagens celulares de CAFs derivadas de camundongos com ADP. A) Expressão proteica de DUSP2, DUSP1, ERK1/2 fosforilado e total e o controle endógeno β -actina, com e sem o tratamento por 72 h com a droga gemcitabina (com as doses correspondente a cerca de 50% de citotoxicidade) nas linhagens de fibroblastos associados ao tumor de camundongos (CAF) estabelecidas a partir dos camundongos PKT e KPC. **B)** Ensaio de viabilidade celular após 72 h de tratamento com a droga gemcitabina utilizando o método colorimétrico MTT nas linhagens KPC CAF e PKT82 CAF.

4.7. Estabilidade proteica de DUSP2 também está associada à sensibilidade de células de ADP à privação de SBF

Para avaliar a especificidade da modulação da expressão de DUSP2 frente a indução de dano e estresse causados pelo tratamento com a gemcitabina, foi avaliada a expressão das fosfatases DUSP1 e DUSP2 nas linhagens de ADP humanas e de camundongo, após a privação de soro bovino fetal (SBF) (*starvation*). Para tanto, as células foram submetidas ao cultivo celular em condições de normalidade (10% de SBF (+)) ou de indução de estresse (0,1% de SBF (-)) por 24 h. Como observado na **Figura 14**, a modulação de DUSP2 é altamente heterogênea entre as diferentes linhagens. A linhagem humana SW1990 mostrou um aumento significativo da expressão de DUSP2, acompanhada do aumento de DUSP1 e consequente redução da fosforilação de ERK1/2 após a privação de SBF. Por outro lado, a linhagem de camundongo P4313 demonstrou redução da expressão de DUSP2 e de ERK1/2 após privação de SBF. Conjuntamente, os dados demonstram que fatores estressores como o tratamento com a gemcitabina e a privação de SBF alteram a expressão proteica de DUSP2, principalmente nas linhagens celulares humanas. Além disso, os dados mostram que as proteínas DUSP1 e DUSP2 são igualmente moduladas nas mesmas linhagens.

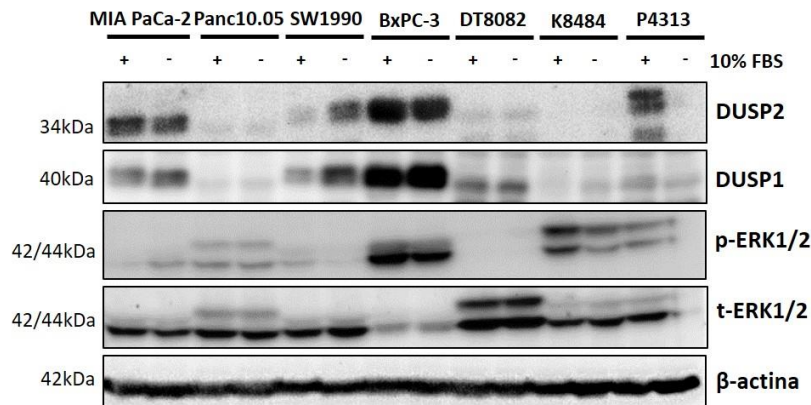


Figura 14 - Avaliação da expressão proteica em linhagens celulares de ADP em resposta à privação de SBF. Expressão proteica de DUSP2, DUSP1, ERK1/2 fosforilado e total e o controle endógeno β -actina na condição de normalidade (10% de SBF (+)) ou de estresse (0,1% de SBF (-)) por 24 h nas linhagens celulares de ADP humanas MIA PaCa-2, Panc10.05, SW1990 e BxPC-3 e nas linhagens celulares de ADP de camundongo DT8082, K8484 e P4313.

4.8. Inibição da atividade de DUSP1 impacta a expressão de DUSP2 após o tratamento com a gemcitabina

Para melhor compreender a função de DUSP2 e a relação entre DUSP2 e DUSP1 no contexto da resposta ao tratamento com a gemcitabina, foi avaliada a expressão proteica de DUSP2 após o tratamento com a droga BCI. O BCI é um inibidor alostérico de DUSP1 e DUSP6 e foi descrito em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa por apresentar efeitos citotóxicos em linhagens de ADP, assim como demonstrou efeito sinérgico em combinação com a gemcitabina ¹¹². Apesar de inibir a atividade das duas fosfatases, especificamente na linhagem MIA PaCa-2, é possível observar o efeito do BCI somente na inibição de DUSP1, pois a linhagem apresenta hipermetilação no promotor do gene *DUSP6*, resultando em uma expressão muito baixa deste gene ¹¹³. A linhagem MIA PaCa-2 foi avaliada após o tratamento com BCI, isolado ou combinado à gemcitabina. Na **Figura 15**, pode-se observar que o tratamento com o BCI inibe a expressão proteica de DUSP2 e que a combinação de BCI e gemcitabina potencializam a inibição da expressão proteica. A fosforilação de STAT3 aumenta com o tratamento de BCI e este aumento é mais expressivo quando combinado com a gemcitabina. Além disso, a combinação das drogas também diminuiu discretamente a fosforilação de ERK1/2 porém aumentou a razão entre as moléculas pró e anti-apoptóticas, Bax/Bcl-2.

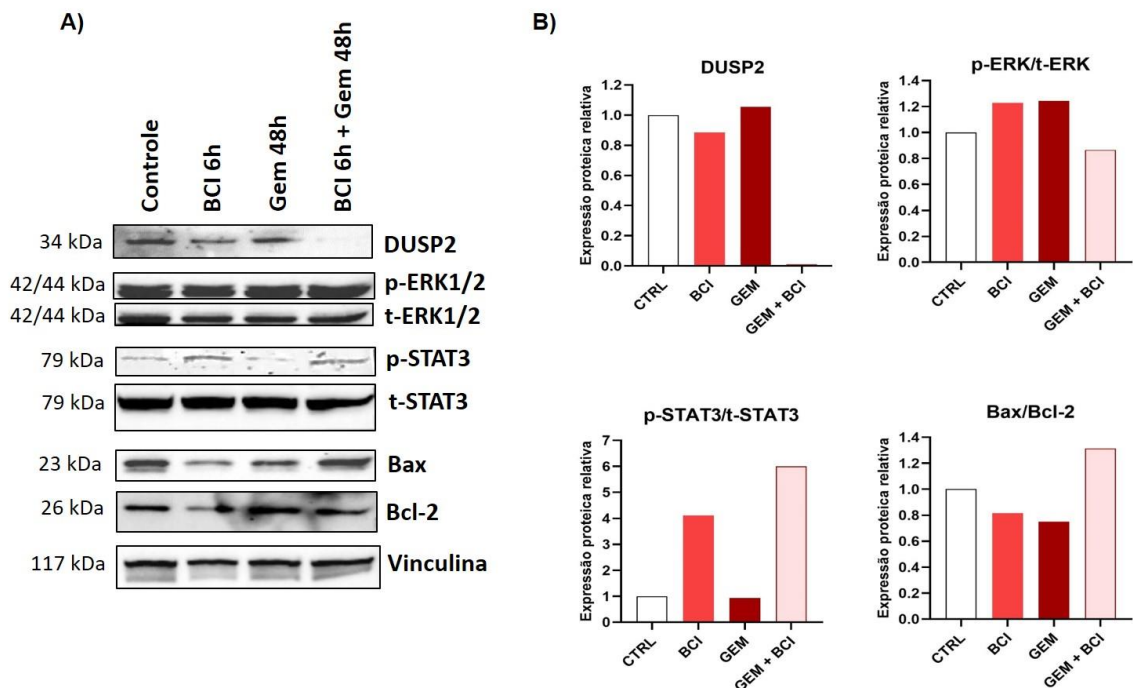


Figura 15 - Avaliação da expressão de DUSP2 após tratamento com BCI e gemcitabina. A) Expressão proteica por meio do ensaio de western blot de DUSP2, ERK1/2 fosforilado e total, STAT3 fosforilado e total, Bax, Bcl-2 e o controle endógeno Vinculina, na linhagem MIA PaCa-2 controle (tratadas com DMSO por 6 h), tratada com 1,9 μ M de BCI por 6 h, 10 μ M de gemcitabina por 48 h ou a combinação das duas drogas, sendo o BCI utilizado como pré-tratamento por 6 h, seguido do tratamento com a gemcitabina por 48 h. **B)** Quantificação das bandas de western blot relativas ao controle, representando a expressão proteica relativa de DUSP2, a razão da expressão de ERK1/2 fosforilado por ERK1/2 total, a razão da expressão de STAT3 fosforilado por STAT3 total e a razão da expressão de Bax pela expressão de Bcl-2.

4.9. Modulação farmacológica de DUSP2 recapitula modulação genética de DUSP2

Buscando elucidar a relevância de DUSP2 no processo de quimiorresistência, utilizou-se a droga salubrinal para inibir a expressão de DUSP2. Apesar de não ser especificamente desenvolvida para inibir DUSP2, a droga salubrinal foi descrita pela inibição de DUSP2 em outros tecidos¹⁰¹. Para averiguar a expressão de DUSP2 após o tratamento com salubrinal em ADP, a linhagem MIA PaCa-2, que dentre as linhagens é a que mais expressa DUSP2, foi tratada com 5 μ M de salubrinal por 3 h. Como observado na **Figura 16A**, a droga salubrinal de fato é capaz de inibir a expressão de DUSP2 em MIA PaCa-2 sem, no entanto, alterar a fosforilação de ERK1/2. Considerando que salubrinal inibe DUSP2 na linhagem MIA PaCa-2, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para investigar se a droga poderia impactar

a viabilidade celular ou a resistência à gemcitabina das linhagens de PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2. Para tanto, as células foram tratadas com 5 μM de salubrinal isolado ou em combinação com a gemcitabina nas doses correspondes ao IC50 de cada linhagem. Como ilustrado pelas **Figuras 16B-D**, o tratamento com o salubrinal inibe o efeito da gemcitabina e torna as linhagens de ADP mais resistentes ao tratamento, mesmo em doses superiores ao IC50.

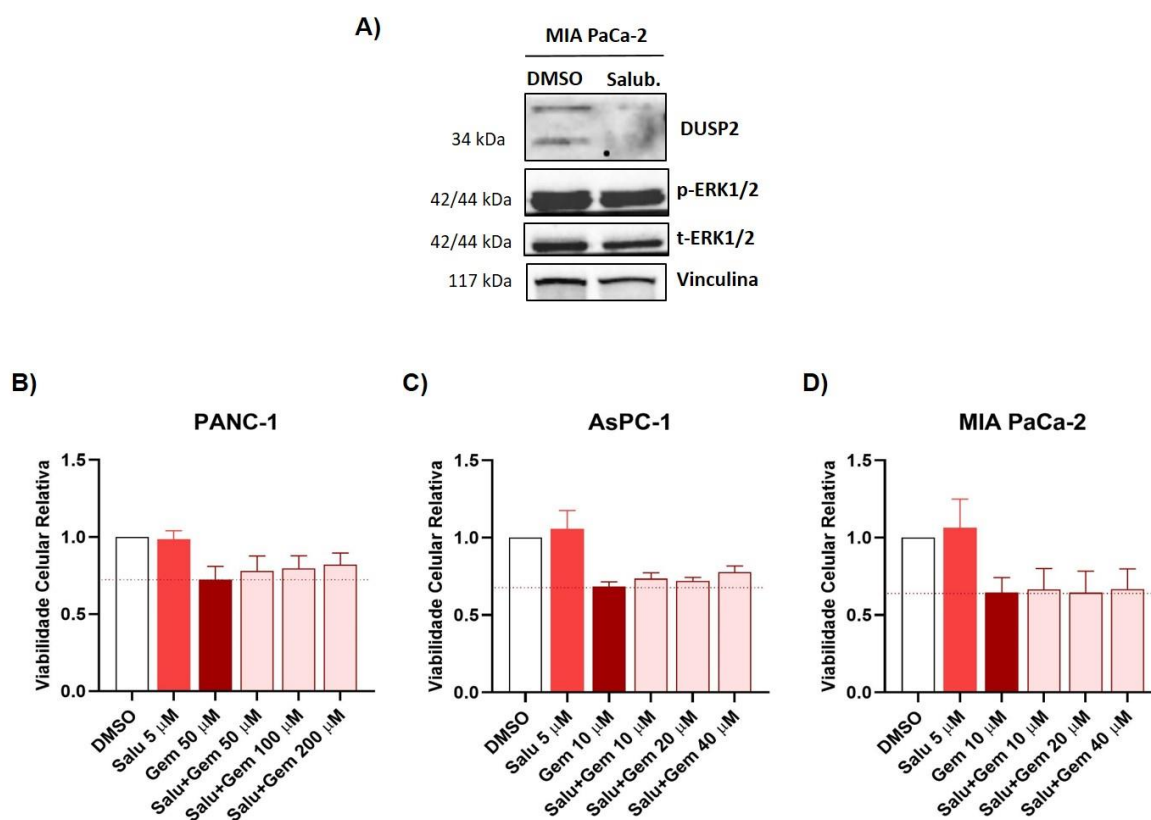


Figura 16 - Avaliação da expressão proteica de DUSP2 e da viabilidade celular após tratamento com a droga salubrinal. A) Expressão proteica por meio do ensaio de western blot de DUSP2, ERK1/2 fosforilado e total e o controle endógeno Vinculina, na linhagem MIA PaCa-2 controle (tratada com DMSO por 3 h) ou tratada com 5 μM de salubrinal por 3 h. **B - D)** Ensaio de viabilidade celular nas linhagens celulares de ADP PANC-1 (**B**), AsPC-1 (**C**) e MIA PaCa-2 (**D**) após tratamento com as drogas salubrinal (5 μM), gemcitabina (IC50 correspondente de cada linhagem) e a combinação das mesmas, sendo o salubrinal utilizado como pré-tratamento por 3 h, seguido do tratamento por 48 h com a gemcitabina na dose corresponde ao IC50 e em mais duas outras doses (duas e quatro vezes maiores que a dose de IC50), utilizando o método colorimétrico MTT.

Dando continuidade à investigação da relevância de DUSP2 no processo de quimiorresistência, utilizou-se a droga shikonina para verificar uma possível indução de DUSP2 após o tratamento. Apesar de também não possui especificidade para DUSP2, a droga shikonina foi descrita por induzir a expressão de DUSP2 em

linhagens celulares de câncer de mama ¹⁰⁰. Esta droga também já demonstrou reduzir proliferação e migração celular e aumentar apoptose em células de ADP e além disso, diminuiu a resistência à gemcitabina das linhagens PANC-1, AsPC-1 e BxPC-3 ¹¹⁴. Para testar a hipótese de que este efeito tenha relação com a modulação de DUSP2, as linhagens PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2 foram tratadas com 1 μ M, 2,5 μ M ou 5 μ M de shikonina por 24 h. Como esperado, a **Figura 17** mostra que a expressão de DUSP2 foi drasticamente aumentada na linhagem PANC-1 já na dose mais baixa de shikonina e discretamente aumentada na linhagem AsPC-1 em ambas as doses. Na linhagem MIA PaCa-2, que já apresenta alta expressão de DUSP2, a expressão não foi aumentada em nenhuma dose.

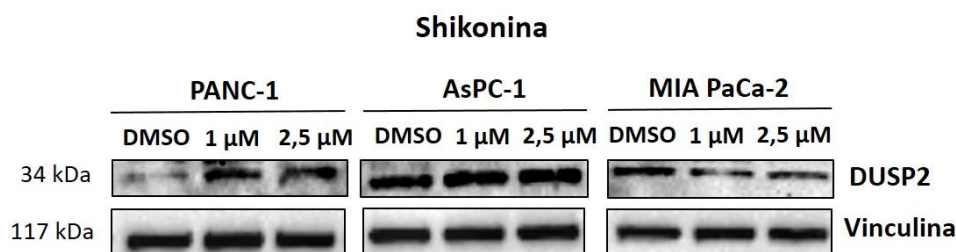


Figura 17 - Avaliação da expressão proteica de DUSP2 em células de ADP após tratamento com a droga shikonina. Expressão proteica por meio do ensaio de western blot de DUSP2 e o controle endógeno Vinculina, nas linhagens PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCa-2 tratadas com 1 e 2,5 μ M de shikonina, além do controle (tratamento com DMSO) por 24 h.

4.10. Indução de DUSP2 reduz proliferação e promove morte celular em linhagens celulares de ADP após tratamento com gemcitabina

Frente ao complexo e controverso mecanismo das DUSPs na quimiorresistência do ADP demonstrado até aqui, decidiu-se induzir a expressão de DUSP2 para comprovar seu papel e estabelecer a real contribuição de DUSP2 no processo de quimiorresistência à gemcitabina nas linhagens de ADP. Para tanto, duas linhagens com expressão reduzida de DUSP2, Panc10.05 e K8484, foram transduzidas com o vetor para expressão de DUSP2, e selecionadas com o antibiótico puromicina. Como mostrado na **Figura 18**, a indução de expressão de DUSP2 provocou também o aumento expressivo da atividade de DUSP1 assim como a redução da fosforilação de ERK1/2 e o aumento de ERK1/2 total. Estes resultados reforçam a correlação positiva na expressão proteica de DUSP1 e DUSP2, assim como a correlação negativa com a fosforilação de ERK1/2, indicando que DUSP2 pode de fato, controlar a ativação de ERK1/2 em linhagens de ADP.

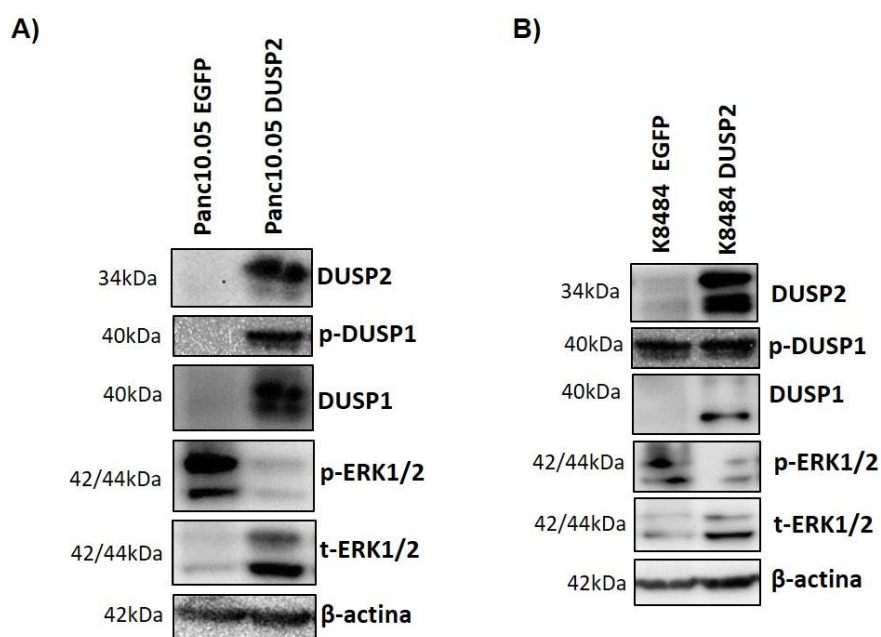


Figura 18 - Confirmação da indução da expressão de DUSP2 nas linhagens celulares de ADP. Western blot para avaliação da expressão proteica de DUSP2 nas linhagens Panc10.05 (A) e K8484 (B) após a transdução com o vetor lentiviral para expressão constitutiva de DUSP2 e o vetor vazio correspondente (EGFP). Além da proteína DUSP2, foram avaliadas as expressões das proteínas DUSP1 fosforilada e total, ERK1/2 fosforilado e total, além da proteína β -actina, que foi utilizada como controle endógeno.

Para avaliar o impacto da modulação de DUSP2 na resistência à gemcitabina, foram realizados ensaios de viabilidade e proliferação celular após tratamento com 25 nM de gemcitabina por 48 h. Como ilustrado nas **Figuras 19A e 20A**, a indução de DUSP2 tende a potencializar o efeito da gemcitabina na viabilidade celular em ambas as linhagens. Na linhagem Panc10.05 o ensaio de proliferação celular demonstrou que a indução de DUSP2 em combinação com o tratamento com a gemcitabina reduz significativamente a proliferação celular ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento somente com a gemcitabina (**Figura 19B**). Ao avaliar a morte celular por apoptose na linhagem Panc10.05 observa-se um aumento da taxa celular de apoptose de 62% após a indução da expressão de DUSP2 tratada com a gemcitabina, quando comparada à linhagem com vetor vazio tratada com gemcitabina (**Figura 21**). Assim como no ensaio de proliferação celular, a linhagem K8484 não apresentou alterações no efeito da gemcitabina após a modulação de DUSP2 (**Figuras 20B e 22**).

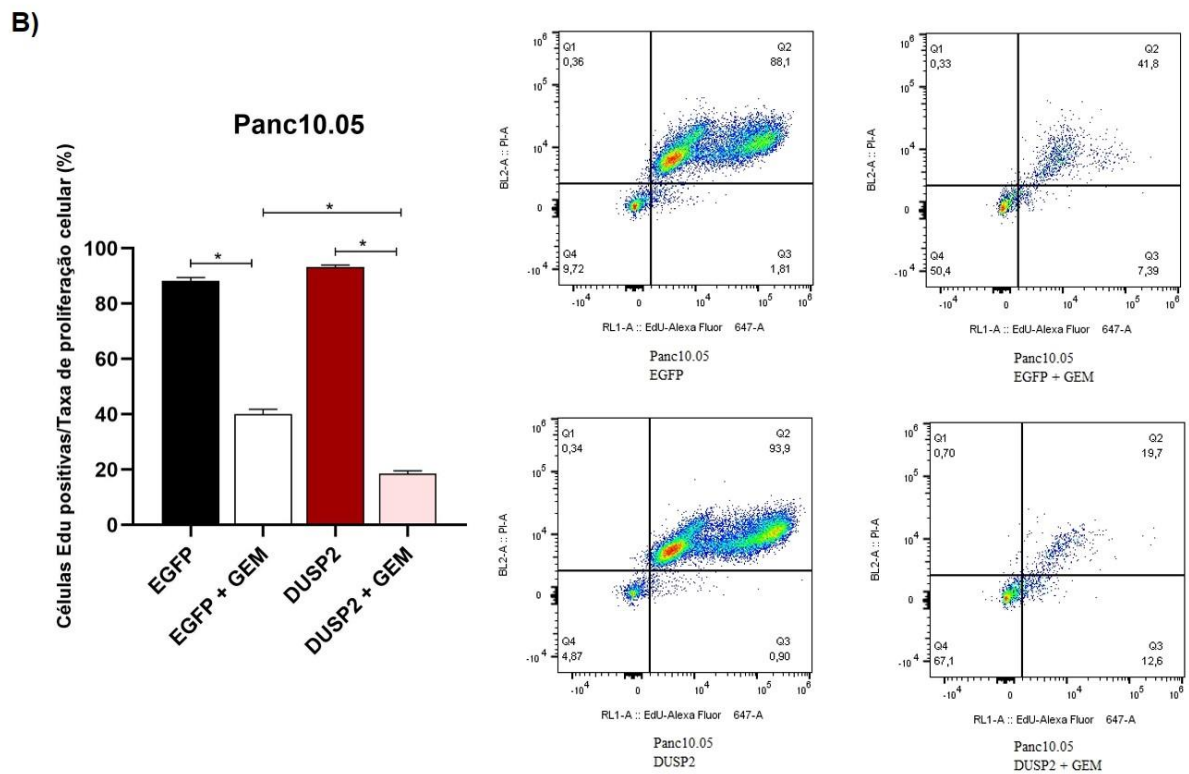
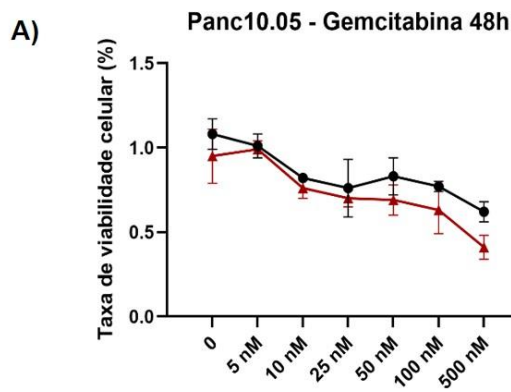


Figura 19 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na viabilidade e proliferação celular da linhagem de ADP Panc10.05. (A) A linhagem Panc10.05 foi tratada com a droga gemcitabina por 48 h e foram analisadas diferenças na viabilidade celular por meio do ensaio com MTT e na proliferação celular **(B)** por meio do ensaio de incorporação de EdU. Os gráficos estão representados em média e desvio padrão de um experimento realizado em quadruplicata. * $p < 0,05$.

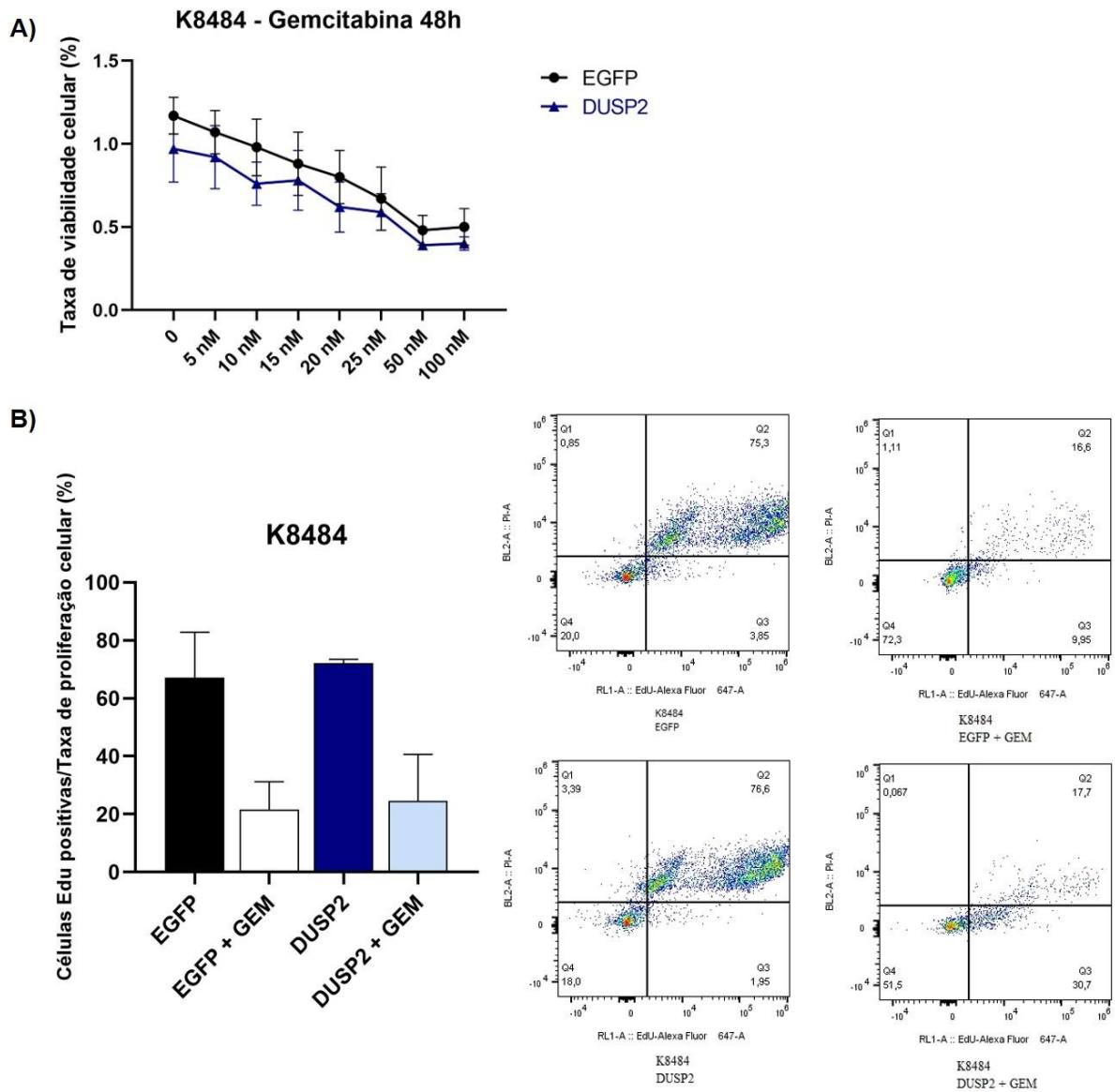


Figura 20 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na viabilidade e proliferação celular da linhagem de ADP K8484. (A) A linhagem K8484 foi tratada com a droga gemcitabina por 48 h e foram analisadas diferenças na viabilidade celular por meio do ensaio com MTT e na proliferação celular **(B)** por meio do ensaio de incorporação de EdU. Os gráficos estão representados em média e desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata.

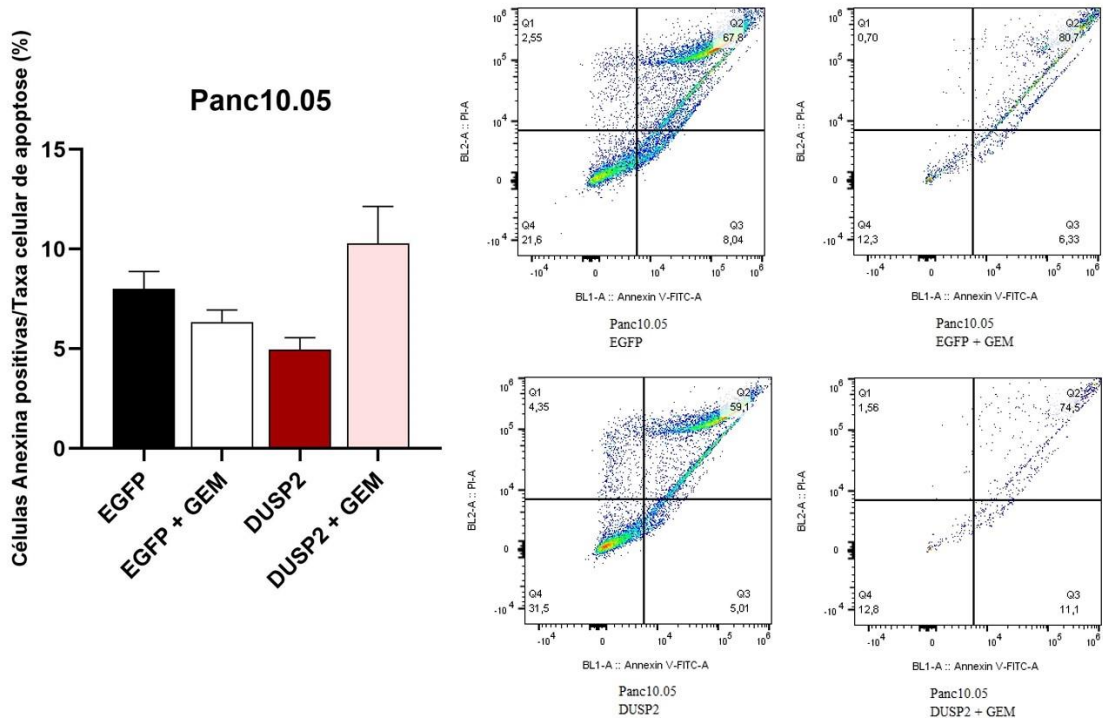


Figura 21 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na morte celular por apoptose na linhagem de ADP Panc10.05. A linhagem Panc10.05 foi tratada com 25 nM da droga gemcitabina por 48 h e foram analisadas diferenças na morte celular por apoptose por meio da marcação de Anexina V e Iodeto de Propídio, seguida de análise em citômetro de fluxo. Os gráficos estão representados em média e desvio padrão de um experimento realizado em quadruplicata.

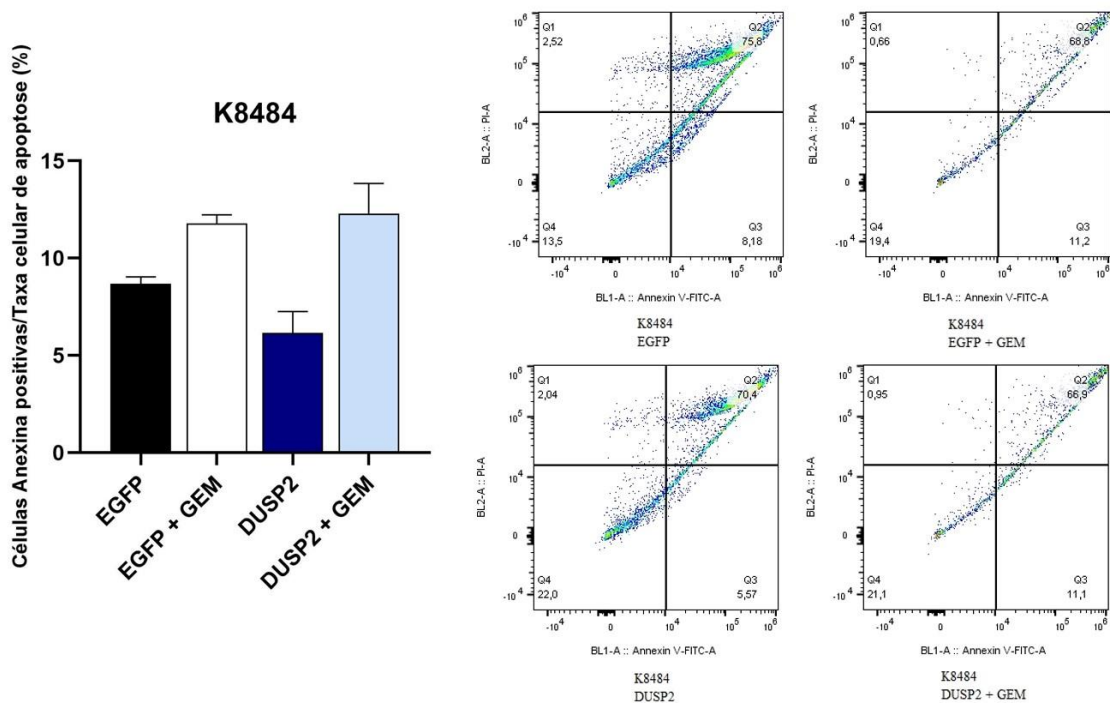


Figura 22 - Efeito do aumento da expressão de DUSP2 na morte celular por apoptose na linhagem de ADP K8484. A linhagem K8484 foi tratada com 25 nM da droga gemcitabina por 48 h e foram analisadas diferenças na morte celular por apoptose por meio da marcação de Anexina V e Iodeto de Propídio, seguida de análise em citômetro de fluxo. Os gráficos estão representados em média e desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata.

Em busca da validação dos resultados encontrados com a indução da expressão de DUSP2 em combinação com a gemcitabina nos ensaios funcionais de viabilidade, proliferação celular e apoptose, foi realizada uma análise *in silico* do efeito dos genes *DUSP2* e *DUSP1* na sensibilidade à gemcitabina em 11 linhagens de ADP da *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*, por meio da plataforma *DepMap Portal*. A análise demonstrou uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o efeito destes genes e o IC50 da gemcitabina tanto para *DUSP2* ($R=0,37$; $p= 0,04$) (**Figura 23A**), quanto para *DUSP1* ($R=0,52$; $p= 0,02$) (**Figura 23B**). A lista das linhagens utilizadas nesta análise está descrita no **Anexo F**.

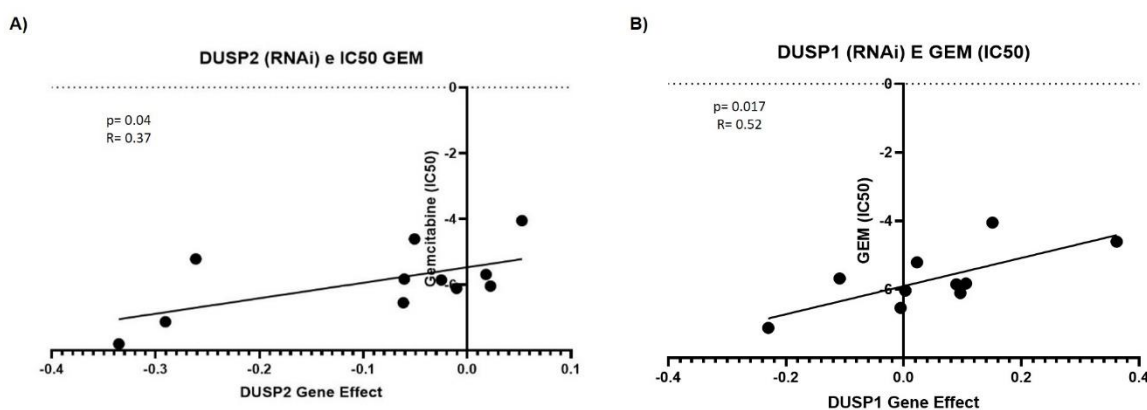


Figura 23 - Efeito *in silico* dos genes *DUSP2* e *DUSP1* na sensibilidade à gemcitabina em linhagens celulares de ADP. Análise de correlação entre efeito do gene *DUSP2* (A) ou *DUSP1* (B) e o IC50 da gemcitabina em 11 linhagens celulares de ADP da *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*, por meio da plataforma *DepMap Portal*.

4.11. Impacto da indução de DUSP2 e tratamento com a gemcitabina no fosfoproteoma de quinases

Com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais DUSP2 pode desempenhar um papel relevante na resposta à gemcitabina avaliou-se o impacto da ativação de DUSP2 na fosforilação de proteínas quinase após o tratamento com gemcitabina na linhagem Panc10.05. Foram analisados 37 sítios de fosforilação de diversas proteínas importantes nos processos de proliferação celular, morte celular e quimiorresistência, como ERK, p38, JNK, AKT, STAT3, entre outras (a lista completa das proteínas, bem como os sítios de fosforilação detectados está descrita na tabela do **Anexo D**).

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais para realização do ensaio: 1)Panc10.05 com vetor vazio e sem tratamento (Panc10.05 EGFP); 2)Panc10.05 com

vetor vazio e tratada com 25nM de gemcitabina por 48h (Panc10.05 EGFP + GEM); 3)Panc10.05 com indução de expressão de *DUSP2* e sem tratamento (Panc10.05 *DUSP2*) e 4)Panc10.05 com indução de expressão de *DUSP2* combinada com o tratamento de 25 nM de gemcitabina por 48 h (Panc10.05 *DUSP2* + GEM). A **Figura 24** e a **Tabela 4** resumam as principais quinases que tiveram o padrão de fosforilação alterados pela indução de *DUSP2* ($p < 0,05$).

De modo geral, a combinação da indução de *DUSP2* com o tratamento da gemcitabina (EGFP + GEM vs. *DUSP2* + GEM) foi o que mais frequentemente modulou a fosforilação proteica, alterando a fosforilação de 17 quinases diferentes. Dentre elas, as que tiveram modulação mais expressiva ($p < 0,001$) foram: p53, GSK-3 α/β , WNK1, ERK1/2, STAT5 α/β , Src, Lyn e PLC- γ 1. Quando comparamos o grupo Panc10.05 EGFP com o grupo Panc10.05 *DUSP2*, é possível notar que o aumento de *DUSP2* diminuiu a fosforilação de GSK-3 α/β , WNK1, ERK1/2, p38 α e CREB, enquanto p53 teve sua fosforilação aumentada. Com o tratamento da gemcitabina ocorre o inverso, todas as proteínas que alteraram significativamente a fosforilação com o aumento de *DUSP2*, tiveram a fosforilação aumentada no grupo Panc10.05 *DUSP2* + GEM, com exceção da proteína RSK1/2 (**Figura 24**).

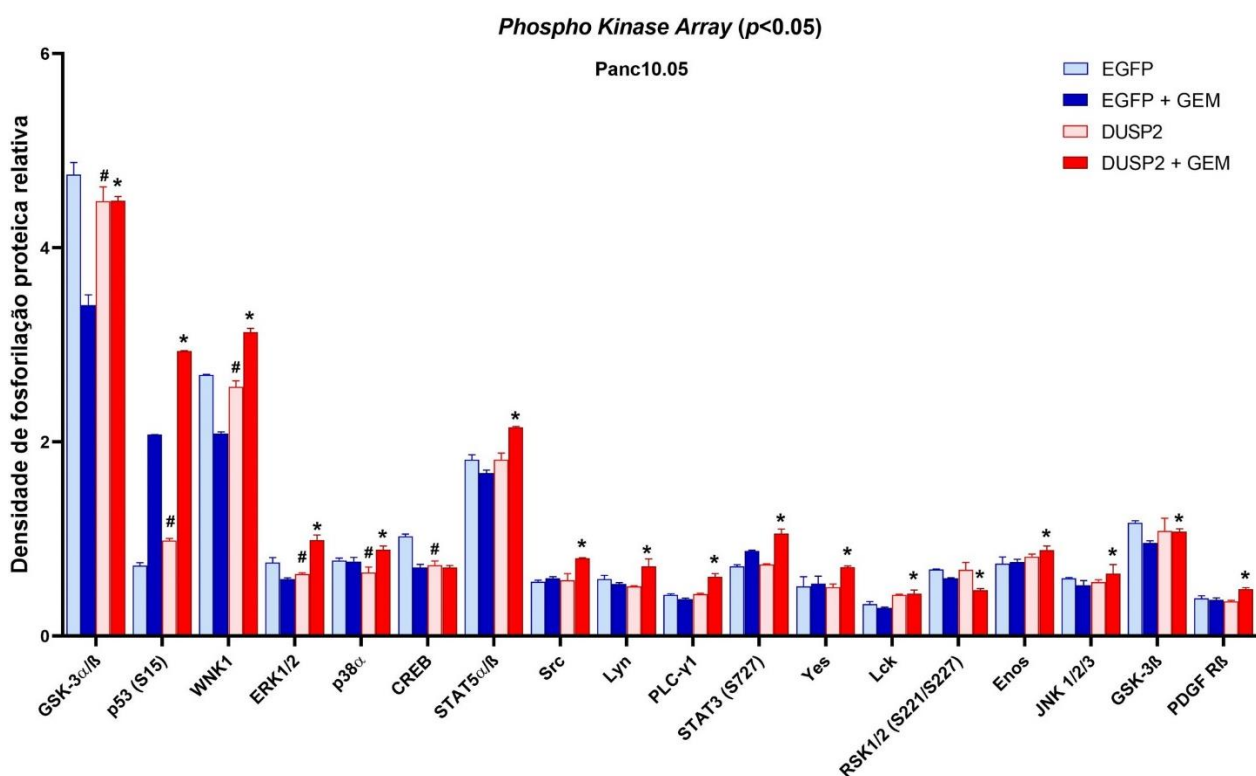


Figura 24 - Ensaio *Phospho Kinase Array* para avaliação da fosforilação de diversas proteínas quinases após indução da expressão de *DUSP2* e tratamento com a gemcitabina. O ensaio foi realizado na linhagem Panc10.05 transduzida com o vetor de expressão para o gene *DUSP2*, assim

como o vetor vazio (EGFP), combinados ou não com o tratamento de gemcitabina (25 nM) por 48 h. O gráfico representa as proteínas que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. A lista completa das proteínas identificadas no ensaio está disponível no **Anexo D**.

EGFP vs. DUSP2: $p < 0,05$; * EGFP + GEM vs. DUSP2 + GEM: $p < 0,05$.

Tabela 4 - Fosforilação de proteínas estatisticamente significativas entre os grupos no Ensaio *Phospho Kinase Array*. Os resultados foram obtidos por meio do teste estatístico Two-way ANOVA realizado no programa GraphPad Prism. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

EGFP vs. EGFP + GEM	DUSP2 vs. DUSP2 + GEM	EGFP vs. DUSP2	EGFP + GEM vs. DUSP2 + GEM
p53 (S15)***	p53 (S15)***	p53 (S15)***	p53 (S15)***
GSK-3 α/β ***	WNK1***	GSK-3 α/β ***	GSK-3 α/β ***
GSK-3 α/β ***	ERK1/2***	CREB***	WNK1***
WNK1***	p38 α ***	p38 α **	ERK1/2***
ERK1/2***	STAT3 (S727)***	WNK1*	STAT5 α/β ***
STAT3 (S727)***	STAT5 α/β ***	ERK1/2*	Src***
CREB***	Src***		Lyn***
STAT5 α/β **	Lyn***		PLC- γ 1***
p70 S6 quinase (T389)**	Yes***		STAT3 (S727)***
Chk-2*	PLC- γ 1***		Yes***
	p70 S6 quinase (T389)***		Lck**
	RSK1/2 (S221/S227)***		RSK1/2 (S221/S227)*
	RSK1/2/3 (S380/S386/S377)***		Enos*
	PDGF R β *		p38 α *
			JNK 1/2/3*
			GSK-3 β *
			PDGF R β *

4.12. Análise in silico de interação proteica de DUSP2

Para avaliar quais proteínas já foram descritas e preditas por interagir com DUSP2 e verificar se os dados vão de encontro com os encontrados no ensaio de *Phospho Kinase Array*, foi analisada a interação proteica de DUSP2 por meio do software STRING v10.5. Na **Figura 25A**, que mostra as proteínas com interação direta e mais significativa com DUSP2, podemos observar a interação com ERK1/2 (MAPK1 e

MAPK3), p38 α (MAPK14), p53 (TP53) e JNK1 (MAPK8), dados que também foram apontados no *Phospho Kinase Array* (**Figura 24**). Além disso, os dados de interações também mostram não só a interação, como a coexpressão de DUSP2 com DUSP1. Outras DUSPs aparecem com interação com DUSP2: DUSP4, DUSP6, DUSP8 e DUSP9. A **Figura 25B**, que mostra as proteínas com interação direta e também indireta com DUSP2, é demonstrada a interação indireta de DUSP2 com CREBBP, RPS6KA1, BCL2L1, TP53BP2, MDM2, MDM4, ATM, EP300 e JUN.

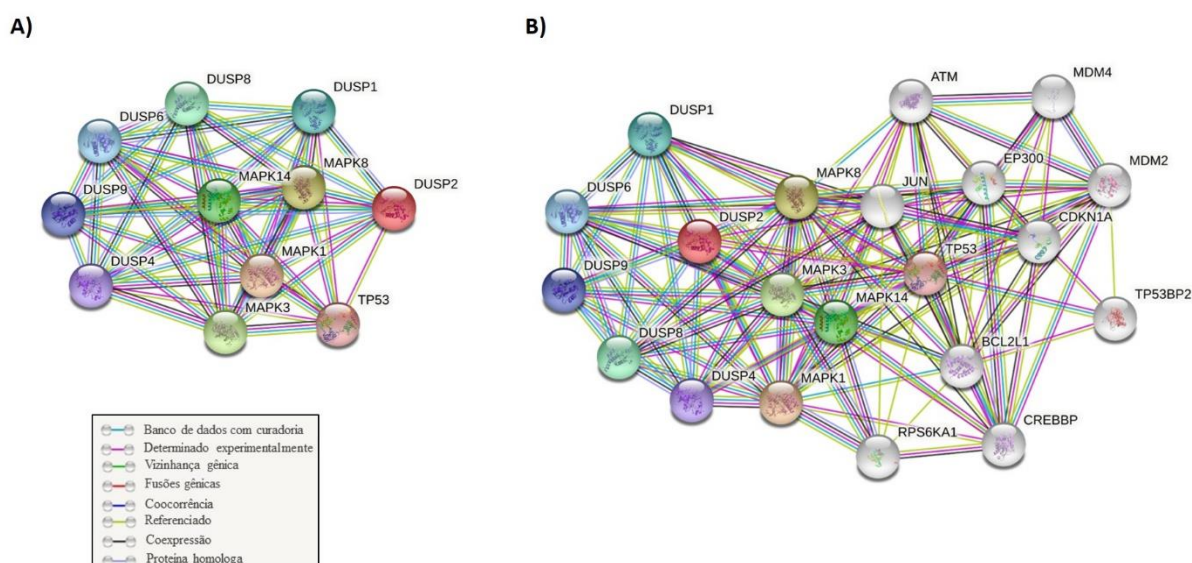
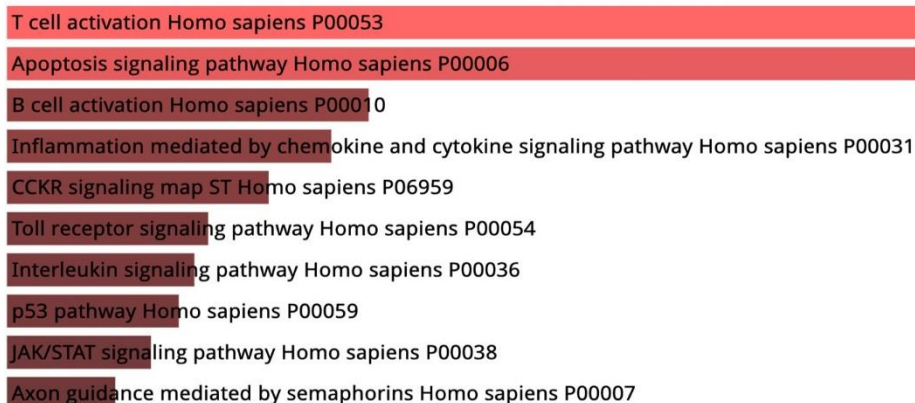


Figura 25 - Análise *in silico* de interação proteica de DUSP2. Foi analisada a partir do software STRING v10.5 (<https://string-db.org>) quais proteínas interagem com DUSP2 em maior (**A**) e menor (**B**) grau. Os nódulos coloridos indicam interações diretas com DUSP2 (**A e B**) e os nódulos em cinza (**B**), as interações indiretas. Foram considerados os parâmetros de coexpressão, evidência experimental, mineração de dados (textmining), e homologia (Score de interação: 0.4).

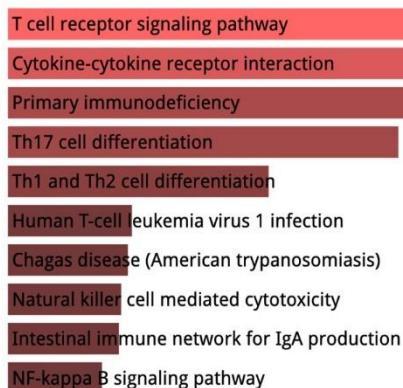
4.13. Análise de enriquecimento de DUSP2 mostra correlação com vias relacionadas à apoptose celular

Para validação dos resultados encontrados no *Phospho Kinase Array* e nos ensaios funcionais, foi feita uma análise de enriquecimento de vias e de processos celulares associados com o gene *DUSP2*. Para tanto, foram utilizados os genes correlacionados significativamente com a *DUSP2* na coorte de ADP do TCGA. O enriquecimento funcional para avaliação das principais vias foi realizado pelo *KEEG pathways* e *Panther* e destaca entre as principais, as vias de apoptose, p53, JAK/STAT e NF- κ B (**Figuras 26A e 26B**). A análise de enriquecimento de processos celulares pelo *Gene Ontology* (**Figura 26C**) destaca entre os mais relevantes os processos relacionados a resposta inflamatória e sinalização de citocinas.

A) Panther 2016



B) KEGG 2019 Human



C) GO Biological Process 2018

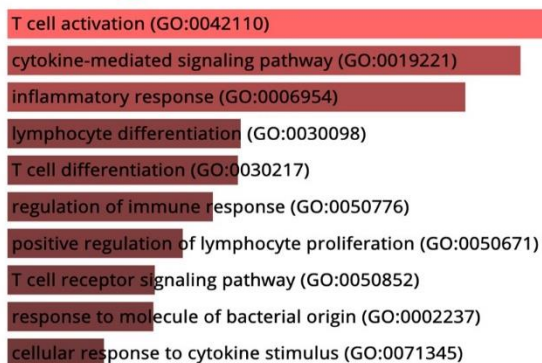


Figura 26 - Análise de enriquecimento de *DUSP2* mostra relação entre a fosfatase e vias relacionadas à apoptose celular. Enriquecimento de vias pelo *Panther* (A), *KEEG pathways* (B) e *Gene Ontology* (C) feito pela ferramenta online *EnrichR*. São exibidas vias enriquecidas para os genes que apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com o gene *DUSP2* na coorte de ADP do TCGA a partir de dados de RNAseq de 174 amostras humanas de ADP, obtidas por meio da plataforma online R2.

5. Discussão

O ADP é a neoplasia de pâncreas mais frequente e possui um dos piores prognósticos dentre os tumores sólidos ^{4; 13}. Apesar da extrema necessidade de diagnóstico precoce, prevenção e avanços no tratamento, poucas descobertas têm alterado a tomada de decisão clínica de tratamento ^{14; 29}. Para alcançarmos avanços significativos no tratamento do ADP, é de extrema importância entender a responsividade e resistência do ADP aos quimioterápicos disponíveis. A mutação no gene *KRAS* atinge mais de 90% dos tumores de ADP e causa a ativação de diversas vias de sinalização ^{47; 50}. Uma das principais, é a via RAF/MEK/ERK, composta por proteínas MAPK que quando ativas, resultam em processos celulares como proliferação celular, sobrevivência, motilidade, supressão da apoptose e alteração do ciclo celular ^{57; 58; 59}.

Dentre as proteínas que atuam no processo de regulação de MAPKs, destacam-se as DUSPs, que são PTPs que desfosforilam os resíduos de tirosina e serina/treonina das MAPKs, agindo como reguladoras negativas destas proteínas ⁸⁰. Algumas DUSPs já foram relacionadas à processos de quimiorresistência, inclusive em ADP ^{75; 87; 115}, porém muito pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de atuação desta família de fosfatases na quimiorresistência do ADP à gemcitabina.

O presente trabalho identificou que a inibição de diversas DUSPs altera a resposta de linhagens celulares de ADP ao tratamento com a gemcitabina. As DUSPs 1, 2, 3, 5, 9 e 23 foram associadas à quimiorresistência e as DUSPs 4, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 22 e 27 foram associadas à quimiossensibilidade, sugerindo que essas fosfatases desempenham um papel importante na resposta ao tratamento com a gemcitabina, mas que atuam de maneira distinta. A DUSP1 já havia sido descrita por afetar a resistência à gemcitabina de maneiras controversas em células de ADP ^{75; 116}, assim como a DUSP4 mostrou inibir o crescimento e invasão celular em ADP ¹¹⁷. Apesar do resultado encontrado no *screening* fenotípico na linhagem PANC-1 ter mostrado que a perda de *DUSP4* estaria diminuindo a resistência à gemcitabina, os contextos são diferentes, já que Hijiya e colaboradores investigou o efeito da modulação de *DUSP4* na progressão tumoral e não no contexto de quimiorresistência ¹¹⁷. Assim como revisado por Nunes-Xavier ¹¹⁸ DUSP1, DUSP4, DUSP6 e DUSP16 também foram descritas por atuarem na resistência à drogas em outros tumores sólidos, corroborando nossos achados. De modo geral, os dados sugerem que as fosfatases da família DUSPs podem de fato ser importantes na resposta à diversos quimioterápicos.

Apesar de semelhantes em sua estrutura e função, foi demonstrado no *screening* fenotípico que a perda de algumas fosfatases causou a quimiorresistência e a de outras, a quimiossensibilidade, sugerindo que as DUSPs podem exercer papéis diversos no contexto de resposta celular à gemcitabina. Corroborando com estes dados, é descrito na literatura que as DUSPs podem assumir funções distintas na tumorigênese. Como exemplo pode-se citar as fosfatases DUSP1, DUSP3, DUSP4, DUSP7, DUSP23 e DUSP26 que já foram descritas como oncogenes e DUSP2, DUSP6, DUSP9, DUSP14 e DUSP22, que foram descritas como supressores tumorais em diversos tipos de tumores como ADP, pulmão, ovário, próstata, esôfago, e mama (Revisado por ^{118; 119}).

Considerando os resultados do *screening* e a relevância biológica previamente descrita na literatura, decidiu-se validar funcionalmente o papel da fosfatase DUSP2. A DUSP2, também chamada de PAC-1, é uma DUSP típica e assim como outras DUSPs típicas, é responsável pela regulação da transdução do sinal intracelular por meio da desfosforilação de MAPKs, como ERK, p38 e JNK ^{120; 121; 122; 123; 124}. O gene *DUSP2* está localizado no cromossomo 2 (2p11.2-q11) e a atividade dessa fosfatase foi descrita primeiramente em células hematopoiéticas humanas ¹²⁵. Inicialmente, seu papel como regulador positivo de respostas inflamatórias foi muito explorado e mais recentemente foi associada à proliferação celular e processos tumorigênicos ^{114; 126}.

No presente estudo avaliou-se a expressão gênica de *DUSP2* em amostras provenientes de pacientes do Serviço de Gastroenterologia do HC-FMRP e em três coortes independentes de pacientes com ADP disponibilizadas em bancos de dados públicos. Inicialmente, observa-se o perfil heterogêneo de expressão gênica das amostras primárias, que também é claramente observado nas linhagens celulares de ADP, tanto em análise de expressão gênica quanto proteica. Entretanto, ao avaliarmos as três coortes fica evidente que o padrão de expressão de *DUSP2* é frequentemente baixo em tecidos tumorais comparado ao tecido pancreático normal, sugerindo que sua função seja relacionada à supressão tumoral.

Similarmente, o gene *DUSP2* foi descrito com expressão gênica reduzida em glioblastoma ¹⁰⁸, leucemia ¹⁰⁹, carcinoma urotelial, melanoma, câncer de rim, de próstata, de timo e ADP ¹⁰⁰. Por outro lado, *DUSP2* mostrou alta expressão gênica em carcinoma escamoso cervical ¹⁰⁰. A alteração no padrão de expressão de *DUSP2* também já foi associada ao prognóstico de câncer de cabeça e pescoço ¹²⁷. A expressão reduzida de *DUSP2* foi associada à uma menor taxa de sobrevida e pior

prognóstico em pacientes de câncer colorretal ¹²⁸ e carcinoma urotelial ^{129; 130}. Em carcinoma seroso de ovário, a alta expressão de *DUSP2* foi associada ao prognóstico ruim ¹³¹. Portanto, a expressão de *DUSP2* e sua relevância clínica mostra-se tumor dependente, reforçando que a *DUSP2* pode atuar de maneiras distintas no contexto tumoral.

Um ponto importante que deve ser destacado na atuação dessas fosfatases é a semelhança estrutural das DUSPs, o que implica na possibilidade de existir funções redundantes para a regulação de inúmeros alvos. Nesse caso, é plausível considerar uma rede de interação (*crosstalk*) entre estas proteínas, além de mecanismos finos de regulação por alças de *feedback* negativo.

Para investigar a possibilidade de interação entre as DUSPs, inicialmente realizou-se uma análise de correlação de expressão gênica entre os membros da família DUSP. Dentre os principais achados, destaca-se a uma correlação positiva significativa entre *DUSP1* e *DUSP2*, sugerindo que estas fosfatases podem atuar conjuntamente em suas funções biológicas. Além da análise de correlação gênica, a análise de interação proteica de *DUSP2* nos permitiu reforçar esta hipótese, visto que a análise indicou a interação entre estas duas fosfatases, bem como a coexpressão das mesmas. Nesta mesma análise, observou-se a interação, mas não coexpressão, de *DUSP2* com *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP8* e *DUSP9*, sugerindo que essas fosfatases podem de fato interagir. Por outro lado, deve-se ressaltar que os dados observados na análise de correlação entre a expressão gênica das demais DUSPs (com exceção da correlação entre *DUSP1* e *DUSP2*), não representa os dados da análise de interação proteica, sugerindo que apenas *DUSP1* e *DUSP2* podem compartilhar os mesmos mecanismos de controle de expressão gênica nas amostras avaliadas de ADP. Os dados obtidos no *screening* fenotípico, que mostraram que na linhagem PANC-1 a inibição de *DUSP4*, *DUSP6* e *DUSP8* sensibilizou a linhagem ao tratamento com a gemcitabina, enquanto a inibição de *DUSP2* e *DUSP9* induziu a resistência à gemcitabina, também vão de encontro com esta interação entre as DUSPs. Estes dados sugerem que algumas fosfatases, além de apresentarem correlação de expressão, também possuem funções relevantes no contexto de resposta à gemcitabina no ADP.

Para investigar mais detalhadamente a correlação de *DUSP1* e *DUSP2*, foi analisada a resposta de ambas as fosfatases à fatores estressores e/ou de dano celular em ADP. Ao avaliar o ensaio de viabilidade celular, tanto a inibição de *DUSP1*

quanto de *DUSP2* resultou na quimiorresistência à gemcitabina. Curiosamente, nas linhagens celulares humanas nas quais o tratamento com a gemcitabina inibiu mais expressivamente a *DUSP1*, a expressão de *DUSP2* não foi significativamente afetada. Por outro lado, em condição de privação de SBF, a expressão proteica dessas fosfatases foi similarmente modulada, sugerindo que elas podem desempenhar um papel importante na resposta celular à indução de dano e/ou estresse. Contudo, a participação e/ou interação de cada uma das DUSPs é distinta em cada contexto.

A modulação mais expressiva na condição de privação de SBF ocorreu na linhagem humana SW1990, que apresentou aumento da expressão de *DUSP1* e *DUSP2* e diminuição da fosforilação de ERK1/2 após 24 h de privação de SBF. Este aumento de *DUSP1* e *DUSP2* pode ter sido induzido pelo supressor tumoral p53, que diferente da maioria das outras linhagens, não encontra-se mutado nesta linhagem celular, visto que já foi demonstrado em células de câncer colorretal que, em resposta ao estresse oxidativo, p53 pode ativar a transcrição de *DUSP1*, assim como de *DUSP2*, induzindo a apoptose^{88; 89}. Similarmente, o fator de transcrição E2F-1 também é conhecido por induzir a transcrição tanto de *DUSP1*, como de *DUSP2* em câncer de mama na condição de estresse^{110; 132}. A correlação de *DUSP1* e *DUSP2* também foi avaliada modulando uma das fosfatases. A inibição farmacológica de *DUSP1* por meio da droga BCl com a consequente diminuição de *DUSP2*, assim como a inibição gênica de *DUSP2* e a concomitante inibição de *DUSP1*, corroboram e sustentam a hipótese de correlação entre estas proteínas. Em conjunto, estes dados indicam que *DUSP1* e *DUSP2* além de apresentarem correlação gênica e proteica, realmente possuem funções redundantes e correlatas no contexto de quimiorresistência em ADP. A correlação na modulação de *DUSP1* e *DUSP2* já tinha sido predita por outros autores, que por meio de modelos matemáticos e baseados na literatura, sugeriram que a indução da expressão de *DUSP2* em combinação com a inibição da expressão de *DUSP1* poderia contribuir para a sinalização apoptótica de JNK, que resultaria na quimiossensibilidade de linhagens celulares de câncer¹³³.

O presente estudo também contribuiu para a discussão do papel de *DUSP1* na quimiorresistência em ADP, que vem sendo descrito na literatura de maneiras controversas. Contrariamente aos nossos dados, Liu e colaboradores⁷⁵ descreveram o aumento de *DUSP1* após tratamento com a gemcitabina em ADP, aumentando a quimiorresistência. Os mesmos autores mostraram que a inibição de *DUSP1* por meio de shRNA contribuiu para o aumento da fosforilação de JNK e p38, MAPKs alvos de

DUSP1, diminuindo esta quimiorresistência. Recentemente, outro trabalho demonstrou que a droga dexametasona induziu a expressão de DUSP1 em células tronco de ADP (PANC-1 CSLC), inibindo a ativação de JNK2 e sensibilizando as células à gemcitabina e ao 5-FU, além de induzir a diferenciação das células e reduzir a formação de esferas ¹¹⁶. Sendo assim, o papel de DUSP1 na quimiorresistência em células de ADP se mostra complexo e dependente de diversos fatores, necessitando estudos mais detalhados.

Em relação à DUSP2, os resultados mostraram que o tratamento com a gemcitabina resulta na redução da expressão de DUSP2 em células de ADP e esta inibição é acompanhada da ativação de ERK1/2, um dos principais alvos de DUSP2. Curiosamente, a redução de DUSP2 pode estar associada à quimiorresistência, haja visto que as linhagens celulares que demonstraram inibição mais expressiva de DUSP2, são justamente as linhagens mais resistentes à gemcitabina, conforme evidenciado no ensaio de viabilidade celular. Estes resultados apoiam a hipótese inicial de que além de DUSP2 estar envolvida no processo de resposta à gemcitabina, possivelmente está agindo com função supressora tumoral.

Embora a literatura científica apresente poucas evidências sobre o papel de DUSP2 na quimiorresistência, estudos realizados em outros contextos celulares e outros tipos tumorais sugerem que DUSP2 está de fato envolvida em processos celulares relacionados à progressão tumoral e quimiorresistência, corroborando os nossos dados. Foi demonstrado, por exemplo, que o fator de transcrição HIF-1 (*Hypoxia inducible factor-1*), que é um importante marcador de hipóxia, pode inibir a transcrição de *DUSP2*. Com isso, a sinalização mediada pela ativação de ERK é prolongada e conseqüentemente, induz a quimiorresistência ¹⁰⁷. Este estudo mostrou ainda, que inúmeros genes envolvidos com mecanismos de resposta às drogas, angiogênese, sobrevivência, autofagia e apoptose, também podem ser regulados por DUSP2 ¹⁰⁷. Outra característica interessante já mencionada, é que o gene *DUSP2* é alvo transcricional das proteínas p53 e E2F-1, importantes supressores tumorais que orquestram a regulação de *checkpoints* do ciclo celular. Durante a sinalização apoptótica em resposta ao estresse oxidativo, estas proteínas se ligam à região promotora de *DUSP2*, ativando sua transcrição e bloqueando a cascata de MAPKs, suprimindo a proliferação celular e induzindo apoptose ^{89; 110; 111}. Apoiando a hipótese da relação de DUSP2 com a quimiorresistência em ADP, já foi descrito também que E2F-1 induz apoptose e diminui a quimiorresistência em células de ADP ¹¹¹.

O presente estudo também investigou a resposta da DUSP2 frente à gemcitabina em linhagens de CAFs provenientes de camundongos modelos de ADP. Estas linhagens demonstraram expressão elevada de DUSP2 quando comparadas às linhagens tumorais, dado que é confirmado por análises *in silico* que mostram um padrão de expressão de *DUSP2* significativamente maior ($p = 0,04$) em células estromais comparadas às epiteliais, assim como a expressão de DUSP2 significativamente maior ($p = 0,007$) em linhagens de fibroblastos associados ao ADP comparadas à linhagem imortalizada de fibroblasto normal de pâncreas (dados não mostrados, extraídos da plataforma R2).

Contudo, de forma similar ao que foi demonstrado nas linhagens de ADP humanas, a linhagem de PKT82 CAF, que se mostrou mais resistente à gemcitabina e é proveniente do modelo de camundongo PKT (conhecido por desenvolver ADP altamente agressivo ¹³⁴, também apresentou redução de expressão de DUSP2 com o tratamento da gemcitabina. O contrário foi mostrado na linhagem KPC CAF, que foi mais sensível à gemcitabina e manteve a estabilidade proteica de DUSP2 após o tratamento com a droga. Apesar dos dados não indicarem qual seria a relação da DUSP2 entre as células epiteliais de ADP e os CAFs, pode-se sugerir que DUSP2 está envolvida não só no processo de resposta à gemcitabina em células de ADP, mas também na resposta à gemcitabina dos CAFs de ADP.

Os CAFs vêm sendo descritos por demonstrarem relevância na progressão tumoral e resposta às terapias em ADP. Estudos mostraram que a perda do KRAS oncogênico causa a rápida redução da ativação dos fibroblastos estromais e desde as fases iniciais da tumorigênese (NIPs), o ADP apresenta áreas de fibrose ^{135; 136}. Além disso, já se sabe que existe uma comunicação entre as células tumorais e os CAFs em ADP por meio de vias de sinalização recíprocas, entre elas, vias ativadas por KRAS^{G12D} ¹³⁷. Utilizando análises de fosfoproteômica das interações entre células tumorais e CAFs de ADP, um estudo identificou que a citocina LIF (*Leukemia inhibitory factor*) atua como regulador parácrino no compartimento epitelial, ativando STAT3 e agindo na resistência à gemcitabina e outras drogas ^{138; 139}. Como o STAT3 é um dos possíveis alvos de DUSP2, estes estudos em conjunto com nossos dados sugerem que DUSP2 pode atuar na resposta à gemcitabina por meio da inativação de STAT3 nos CAFs de ADP.

Diante dos dados discutidos até aqui, o complexo mecanismo de quimiorresistência em que DUSP2 está envolvida compõe dois cenários. Por um lado,

o *screening* fenotípico, os padrões de expressão gênica e proteica e a avaliação de DUSP2 no contexto de tratamento com a gemcitabina, indicam que DUSP2 pode exercer funções na resposta à gemcitabina, agindo como supressora tumoral. Por outro lado, o tratamento com BCI, que é inibidor de DUSP1 e sensibiliza as células à gemcitabina, também diminuiu a expressão de DUSP2 na combinação das duas drogas, podendo ser resultante de um efeito rebote ou mecanismo de *feedback* entre as DUSPs. Portanto, buscamos investigar se a modulação de DUSP2 estaria contribuindo para o processo de resposta à gemcitabina em ADP.

Primeiramente decidiu-se realizar a inibição farmacológica de DUSP2 utilizando a droga salubrinal. Apesar de não ser específica para DUSP2, o salubrinal mostrou-se capaz de inibir a expressão de *DUSP2* conforme descrito por Hanamura e colaboradores em linhagens celulares de leucemia e de macrófagos ¹⁰¹. No presente estudo foi demonstrado que salubrinal além de inibir a expressão de DUSP2 em MIA PaCa-2 (linhagem que mais expressa DUSP2) pode inibir o efeito da gemcitabina, tornando as linhagens mais resistentes à droga. Quando pré-tratadas com o salubrinal, doses 2 ou até 4 vezes maiores do que o IC50 de gemcitabina não impactam na viabilidade celular, sugerindo que a inibição de DUSP2 de fato pode causar resistência à gemcitabina nessas linhagens. Similarmente, foi demonstrado por outros autores que o tratamento com salubrinal também pode induzir a resistência à cisplatina em células de câncer gástrico e à atividade citotóxica de brosimona I em células de câncer de colorretal ^{140; 141}. Por outro lado, salubrinal induziu a apoptose em linhagem celular de câncer de mama, ressaltando que a atuação da droga e de seus possíveis alvos, como a DUSP2, é contexto-dependente ¹⁴².

Buscando avaliar o efeito da indução farmacológica de DUSP2, decidiu-se avaliar a droga shikonina, derivada do extrato da raiz da erva chinesa *Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc* ¹⁴³ e anteriormente descrita por induzir a expressão de DUSP2 em células de câncer de mama ¹⁰⁰. Nossos resultados mostram que a shikonina de fato induz a expressão de DUSP2 nas linhagens de ADP. Curiosamente, a shikonina já havia sido previamente utilizada em um estudo com as mesmas linhagens e demonstrou efeitos antiproliferativos relevantes tanto *in vitro* e *in vivo*. Neste contexto, o trabalho não investigou a associação da shikonina com DUSP2, porém descreve como a atuação da droga provocou a inibição de NF-κB e atuou de modo sinérgico com a gemcitabina em linhagens de ADP. Considerando que nossos dados confirmam que a shikonina induz a expressão de DUSP2, conjuntamente estes

achados reforçam a participação de DUSP2 no processo de quimiorresistência em ADP ^{114; 144}.

Para melhor entendimento dos mecanismos pelos quais a DUSP2 contribui para a resposta à gemcitabina no ADP, as linhagens Panc10.05 e K8484 foram transduzidas com vetor lentiviral para expressão de DUSP2. A indução da expressão de DUSP2 reduziu significativamente a fosforilação de ERK1/2 em ambas as linhagens, confirmando que ERK1/2 é alvo de DUSP2 em células de ADP. Os resultados de viabilidade celular, proliferação celular e apoptose apontam que a indução de DUSP2 em combinação com a gemcitabina diminuiu a viabilidade e proliferação celular e induziu a apoptose na linhagem de ADP humana Panc10.05. A linhagem K8484 demonstrou apenas uma tendência à diminuição da viabilidade celular na combinação da indução de DUSP2 com a gemcitabina. Porém, a linhagem de camundongo não havia mostrado modulação de DUSP2 com o tratamento da gemcitabina, mostrando que nesta linhagem a fosfatase pode não ter a mesma participação na quimiorresistência. Para validação dos dados encontrados na linhagem Panc10.05, foi realizada uma análise *in silico* que mostrou que o efeito do gene *DUSP2* possui correlação positiva e significativa com a sensibilidade à gemcitabina em 11 linhagens de ADP. Estes dados sugerem que DUSP2 atua na sensibilização de linhagens de ADP à gemcitabina, atuando no controle da proliferação celular e apoptose, processos essenciais na quimiorresistência.

Recentemente, Wang e colaboradores ¹⁴⁵ também contribuíram para a elucidação das funções de DUSP2 no ADP, que corroboram com a hipótese do presente trabalho. Foi demonstrado que a baixa expressão de DUSP2 pode contribuir para a disseminação precoce do ADP por meio da invasão linfovascular. Este mecanismo está associado à secreção de vesículas extracelulares associadas à VEGF-C (*Vascular endothelial growth factor C*) pelas células de ADP, que é mediada por DUSP2. Os autores realizaram o silenciamento de *DUSP2*, que levou ao aumento da fosforilação de ERK1/2, aumento da migração e invasão celular *in vitro* e aumento do tamanho do tumor e da linfogênese em modelo xenográfico. Além disso, desenvolveram um camundongo KC com deleção de *DUSP2* (*KRAS*^{G12D}; *PDX1*^{cre}; *DUSP2*^{fl/fl}) que no sétimo mês de vida não só desenvolveu ADP, mas aumentou significativamente a formação de vasos linfáticos, similarmente ao que ocorre em camundongos KPC. Este estudo vai de encontro ao nosso, que sugere um papel supressor tumoral da DUSP2 em ADP.

Em busca de entender melhor o mecanismo pelo qual a DUSP2 contribui para a sensibilização das células de ADP à gemcitabina, foi realizado um ensaio de fosforilação de quinases (*Phospho Kinase Array*) na linhagem Panc10.05 com a indução da expressão de DUSP2 combinado ao tratamento com gemcitabina. A indução da DUSP2 por si só, diminuiu significativamente a fosforilação de GSK-3 α/β , WNK1, ERK1/2, p38 α e CREB; por outro lado a fosforilação de p53 foi significativamente elevada. Dentre os 37 sítios de fosforilação detectados no ensaio, 17 apresentaram modulação de fosforilação significativa na condição de indução de DUSP2 combinada ao tratamento com a gemcitabina, reforçando, mais uma vez, a importância da fosfatase DUSP2 no processo de quimiorresistência do ADP. As quinases que tiveram modulação mais expressiva ($p < 0,001$) nesta condição foram: p53, GSK-3 α/β , WNK1, ERK1/2, STAT5 α/β , Src, Lyn e PLC- γ 1. As principais proteínas que tiveram a fosforilação modulada com a indução de DUSP2, tiveram a diminuição da fosforilação. Curiosamente, a combinação da indução de DUSP2 com o tratamento com a gemcitabina diminuiu a fosforilação da maioria dos alvos. Visto que a DUSP2 é uma fosfatase que atua desfosforilando seus alvos, estes dados sugerem uma ação indireta de DUSP2 nos alvos identificados frente ao tratamento com a gemcitabina.

O ensaio *Phospho Kinase Array* indicou uma expressiva diminuição da fosforilação de CREB no sítio Ser133 com a indução de DUSP2, sugerindo que somente a indução de DUSP2 é capaz de alterar a ativação de CREB em ADP. CREB é um fator de transcrição (*cyclic AMP (cAMP)-response element-binding protein 1*), que quando fosforilado nos sítios Ser129 ou Ser133, induz a transcrição destes alvos, resultando em sinais de crescimento celular e inibição de apoptose^{146; 147}. Pouco se sabe ainda sobre a função de CREB na quimiorresistência¹⁴⁶, entretanto, foi relatado recentemente em células de ADP, que uma via a qual CREB faz parte, inibe a apoptose em células de ADP, resultando na quimiorresistência à gemcitabina por meio da ativação de CREB mediada por Akt, que atua no desbalanço das proteínas apoptóticas Bcl-2 e Bax¹⁴⁸. Estes dados indicam que de fato, DUSP2 pode atuar na inibição da fosforilação de CREB em ADP, que resulta na inibição de vias anti-apoptóticas. Entretanto, como a ativação de CREB não é modulada por DUSP2 na combinação com a gemcitabina, não se mostrou um alvo tão relevante no contexto de resposta à esta droga, assim como observado em várias outras quinases no ensaio *Phospho Kinase Array*.

Dentre estas, a proteína p53 foi umas das mais notáveis devido às suas já

conhecidas funções na tumorigênese e quimiorresistência, assim como pelo aumento da fosforilação no sítio Ser15 e, portanto, sua ativação tanto na condição de indução de DUSP2, quanto na combinação de indução de DUSP2 com gemcitabina. Como amplamente conhecido, o fator de transcrição p53 é o gene supressor tumoral o mais frequentemente mutado na maioria das neoplasias, incluindo o ADP, onde aparece mutado em mais de 70% dos casos ⁵. A proteína p53 controla importantes processos como ciclo celular e morte celular por apoptose ou senescência por meio de alvos como p21, Bcl-2 e Bax ¹⁴⁹. Foi descrito que p53 tem importante papel em linhagens de ADP na quimiossensibilidade às drogas gemcitabina, 5-FU, cisplatina, irinotecan, oxaliplatina, paclitaxel, entre outras ¹⁵⁰. O sítio de fosforilação Ser15 é um importante sítio que responde à danos de DNA, causando a indução e ativação de p53 e conseqüentemente, de seus alvos transcricionais ¹⁵¹. O expressivo aumento da fosforilação no sítio Ser15 de p53 na linhagem com indução da expressão de DUSP2, tanto na presença quanto na ausência de gemcitabina, reforça novamente a importância de DUSP2 no processo de resposta à gemcitabina das células de ADP e sugere que este processo pode ocorrer por meio da cascata de sinalização de morte celular por apoptose, mediado por p53.

Todos os sítios das quinases avaliados neste ensaio, quando fosforilados ativam a respectiva proteína, com exceção de GSK-3 α / β que quando tem os sítios Ser9 ou Ser21 fosforilados (sendo estes, os detectados neste ensaio), inibem a atividade da proteína, pois este sítio N-terminal quando fosforilado, atua como inibidor competitivo para outros substratos ¹⁵². Portanto, nossos resultados relataram que a indução de DUSP2 ativou GSK-3 α / β , enquanto a combinação de DUSP2 com gemcitabina, inativou a proteína, quando comparada ao vetor vazio tratado com gemcitabina, sugerindo que a DUSP2 pode interferir na regulação de GSK-3 α / β . A importância de GSK-3 α / β na tumorigênese e resistência em tumores dependentes de KRAS é bem relatada na literatura. Kazi e colaboradores ¹⁵³ realizaram um *screening* com 304 inibidores de quinases em linhagens de ADP e a droga SB-732881-H (inibidor de GSK-3 α / β) foi o que mais afetou o crescimento celular em MIA PaCa-2, por meio da indução de apoptose mediada pelos substratos β -catenina e c-myc. O papel da isoforma GSK-3 β na tumorigênese e quimiorresistência do ADP já foi bem explorado, assim como revisado por Ding e Billadeau ¹⁵⁴. A isoforma GSK-3 α , por sua vez, apesar de não ter sido tão explorada no contexto de quimiorresistência, vem ganhando destaque no estudo do ADP. Bang e colaboradores ¹⁵⁵ relataram que GSK-3 α , porém

não GSK-3 β , pode ser um mediador entre o KRAS mutado e NF- κ B (fator de transcrição conhecidamente envolvido na quimiorresistência do ADP), atuando tanto pela via canônica, quanto pela via não canônica de NF- κ B por meio da ativação e estabilização do complexo TAK1/TAB e de p52, respectivamente. Similarmente, outros autores mostraram que GSK-3 α , mas não GSK-3 β atua no aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose por meio da estabilização de Notch1 em células de ADP ¹⁵⁶. Vale mencionar que a droga shikonina, que mostramos em nossos resultados que induz a expressão de DUSP2 em ADP, também foi relatada por diminuir a atividade de NF- κ B induzida pela gemcitabina, nas mesmas linhagens ¹¹⁴. Todas estas evidências corroboram a hipótese de que DUSP2 pode estar induzindo a quimiossensibilidade à gemcitabina por meio da inibição de GSK-3.

Curiosamente, no presente ensaio, a fosforilação de WNK1 diminuiu com o aumento de DUSP2, o que seria um indicativo de quimiossensibilidade. Entretanto, a gemcitabina que diminuiu drasticamente a fosforilação de WNK1, quando combinada com o aumento de DUSP2, aumentou expressivamente a fosforilação de WNK1. A proteína WNK1, até o momento não possui papel descrito na tumorigênese do ADP, mas em outros tipos tumorais sua expressão foi associada à processos como proliferação celular, inibição de apoptose e angiogênese ^{157; 158}. Similarmente, as quinases STAT5 e Lyn demonstraram o aumento da fosforilação com a indução de DUSP2 combinada ao tratamento com a gemcitabina. Estas proteínas também já foram associadas à processos de quimiorresistência à gemcitabina em células de ADP, porém, geralmente relacionando a inibição dessas quinases com a quimiossensibilidade ^{159; 160; 161}. Estes dados não vão de acordo com o observado em nosso ensaio, que indicam que a inativação destas proteínas causadas pela indução de DUSP2 frente ao tratamento com a gemcitabina, estaria sensibilizando as células de ADP. Portanto, sugere-se novamente que DUSP2 pode estar atuando na sensibilização à gemcitabina em células de ADP por meio da inativação de outros alvos que por sua vez, podem modular a ativação de alvos como WNK1, STAT5 e Lyn.

Todos os dados encontrados no *Phospho Array* e discutidos até o momento, sugerem que a DUSP2 pode estar contribuindo para a resposta à gemcitabina por meio da modulação destes alvos de maior relevância (ERK1/2, p38, p53 e GSK-3). Curiosamente, foi relatado que outra DUSP pode estar atuando na quimiorresistência por meio de vias semelhantes. Lee e colaboradores ⁹⁴ reportaram que DUSP28 atua

na quimiorresistência de células de ADP à gemcitabina e mais tarde, os mesmos autores demonstraram que DUSP28 aumenta migração, invasão e viabilidade de células metastáticas de ADP por meio da ativação de ERK1/2, CREB e AKT ¹⁶².

A análise *in silico* de interações proteicas de DUSP2 com outras proteínas corrobora vários resultados do ensaio *Phospho Kinase Array*, mostrando interação proteica direta entre DUSP2 e ERK1/2, p38 α , p53 e JNK1. Esta análise, mostrou também que a proteína RSK1, que diminuiu a fosforilação na combinação de indução de DUSP2 com a gemcitabina, pode interagir indiretamente com DUSP2, sugerindo que esta diminuição da fosforilação observada no *Phospho Kinase Array* seja mediada pela inativação de outra(s) proteína(s) desfosforilada(s) por DUSP2. Interessantemente, as outras proteínas que a análise mostrou que interagem indiretamente com DUSP2, possuem funções no ciclo celular e apoptose, geralmente mediado por p53, sendo elas: *tumor protein p53 binding protein 2 (TP53BP2)*, uma proteína pró-apoptótica de ligação à p53 que já foi descrita por contribuir para o aumento da resistência à gemcitabina no ADP ¹⁶³; *Bcl-2 like protein 1 (BCL2L1)*, uma proteína anti-apoptótica membro da família Bcl-2 ¹⁶⁴; a proteína p21, codificada pelo gene *CDKN1A*, alvo direto de p53 que causa a inibição do ciclo celular ¹⁴⁹; *Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)*, proteína que fosforila p53 no resíduo Ser15 em resposta à dano no DNA ¹⁵¹; *CREB binding protein* ou CBP, co-fator de CREB (*CREBBP*) e proteína p300 (*EP300*), que ativam p53 em resposta à dano de DNA por meio da acetilação de sítios específicos de p53 ¹⁶⁵; c-Jun (JUN), alvo da família JNK que ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos ¹⁶⁶; MDM2 e MDM4 que inibem a atividade de p53 ^{149; 167}. A análise de enriquecimento de vias pelo *KEEG pathways* e *Panther* na coorte de ADP do TCGA, também identificou vias de apoptose, via do p53, JAK/STAT e NF- κ B associadas ao gene *DUSP2*. Estes dados em conjunto, sugerem que DUSP2 contribui para o controle da apoptose em células de ADP em resposta à gemcitabina.

Em resumo, nossos resultados mostram dados inéditos associando DUSP2 com a resposta à gemcitabina em células de ADP. Analisando em conjunto, os ensaios funcionais que mostram diminuição de viabilidade e proliferação celular e aumento de apoptose após a combinação da indução de DUSP2 com o tratamento com gemcitabina, todos os dados *in silico* e os dados do *Phospho Kinase Array*, podemos sugerir que DUSP2 atua na resposta de células de ADP à gemcitabina por meio da modulação (direta ou indireta) da ativação de proteínas como ERK1/2, p38, JNK, p53,

GSK-3 e CREB, levando à respostas celulares como aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular. Entretanto, novos estudos se fazem necessário para elucidar os exatos mecanismos moleculares atuantes neste complexo processo.

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- ✓ As fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) estão relacionadas com a resposta à gemcitabina em linhagens celulares de ADP;
- ✓ DUSP1 e DUSP2 estão associadas à quimiossensibilidade à gemcitabina em células de ADP e as fosfatases DUSP11 e DUSP27 estão associadas à quimiorresistência;
- ✓ DUSP1 e DUSP2 possuem correlação gênica e proteica, além de funções redundantes e correlatas no contexto da resposta à gemcitabina em células de ADP;
- ✓ O gene *DUSP2* encontra-se frequentemente menos expresso em amostras de pacientes de ADP, quando comparadas às amostras de tecido pancreático livre de tumor;
- ✓ A estabilidade da expressão proteica de DUSP2 está associada à sensibilidade de linhagens celulares de ADP ao tratamento com a gemcitabina e à privação de SBF;
- ✓ A indução de DUSP2 potencializa o efeito da gemcitabina, causando a redução da proliferação celular e aumento da taxa de apoptose;
- ✓ A indução de DUSP2 combinada ao tratamento com a gemcitabina impacta na fosforilação de proteínas quinases como p53, GSK-3 α/β , WNK1, ERK1/2, p38 α e CREB;
- ✓ O gene *DUSP2* está relacionado à resposta inflamatória, vias de sinalização de citocinas e vias de apoptose.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho contribuíram para a compreensão do papel da fosfatase DUSP2 na resposta ao tratamento com a gemcitabina em ADP. Em conjunto, os dados mostram que a DUSP2 contribui para a ação da gemcitabina em células de ADP, reduzindo a proliferação celular e potencializando a indução de apoptose, por meio da modulação da fosforilação de proteínas quinases como p53, ERK1/2, p38, JNK, GSK-3 e CREB. No entanto, o estudo necessita de validações experimentais e investigação detalhada dos alvos de DUSP2 para confirmação desses dados.

Adicionalmente, as análises de enriquecimento de vias e processos celulares com o gene *DUSP2* em amostras de ADP, mostraram que DUSP2 possui relevante papel na resposta inflamatória e sinalização de citocinas. A relação de DUSP2 com vias como JAK/STAT e JNK mostrada neste trabalho e evidenciada em outros estudos, bem como a função de DUSP2 na resposta inflamatória, que vem ganhando destaque na literatura e reforçam a relevância da fosfatase neste contexto ^{122; 168; 169}. Contudo, pouco se sabe sobre o papel de DUSP2 na resposta inflamatória associada ao ADP, o que abre perspectivas valiosas para a investigação do papel de DUSP2 na resposta inflamatória e no perfil de resposta imunológica no ADP.

8. Bibliografia

- 1 EDLUND, H. Pancreatic organogenesis: developmental mechanisms and implications for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 7, p. 524-532, 2002-07-01 2002. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n7/full/nrg841.html> >.
- 2 RÖDER, P. et al. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, 2016-03-01 2016. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <http://www.nature.com/emm/journal/v48/n3/full/emm20166a.html#bib1> >.
- 3 HEZEL, A. F. et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes Dev**, v. 20, n. 10, p. 1218-49, May 15 2006. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1415606> >.
- 4 MODOLELL, I.; GUARNER, L.; MALAGELADA, J. R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. **Ann Oncol**, v. 10 Suppl 4, p. 82-4, 1999. ISSN 0923-7534 (Print)0923-7534. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 5 KLEEFF, J. et al. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16022, 04/21/online 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.22> >.
- 6 METZ, D.; JENSEN, R. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1469–1492, November 2008 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.047> >.
- 7 SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. INCA - CÂNCER - Tipo - Pâncreas. 2017. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas> >.
- 8 BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593> >.
- 9 SOCIETY, A. C. *Cancer Facts & Figures Atlanta: American Cancer Society*, 2021.
- 10 BARDEESY, N.; DEPINHO, R. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897-909, 2002-12-01 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n12/full/nrc949.html> >.
- 11 GARRIDO-LAGUNA, I.; HIDALGO, M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 319-334, 2015-03-31 2015. ISSN 1759-4774. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v12/n6/full/nrclinonc.2015.53.html> >.
- 12 KING, E.; NEHORAY, B. M. Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes: Providing Care to At-Risk Families. **Clin J Oncol Nurs**, v. 23, n. 6, p. 579-582, 12 2019. ISSN 1538-067X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31730603> >.
- 13 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin**, v. 70, n. 1, p. 7-30, 01 2020. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31912902> >.
- 14 HUANG, J. et al. Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 160, n. 3, p. 744-754, Feb 2021. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33058868> >.
- 15 YU, F. et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. **Cell**,

- v. 131, n. 6, p. 1109-23, Dec 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083101> >.
- 16 MIDHA, S.; CHAWLA, S.; GARG, P. K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. **Cancer Lett**, v. 381, n. 1, p. 269-77, 10 2016. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27461582> >.
- 17 SHI, C.; HRUBAN, R. H.; KLEIN, A. P. Familial pancreatic cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 3, p. 365-74, Mar 2009. ISSN 0003-9985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1043/1543-2165-133.3.365> >.
- 18 BINEBAUM, Y.; NA'ARA, S.; GIL, Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. v. 23, p. 55–68, November 2015 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.002> >.
- 19 HOWLADER, N. et al. Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 20, p. 1584-98, Oct 20 2010. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djq366> >.
- 20 SYNGAL, S. et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. **Am J Gastroenterol**, v. 110, n. 2, p. 223-62; quiz 263, Feb 2015. ISSN 1572-0241. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645574> >.
- 21 SCARPA, A.; REAL, F. X.; LUCHINI, C. Genetic unrelatedness of co-occurring pancreatic adenocarcinomas and IPMNs challenges current views of clinical management. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1561-1563, 09 2018. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29661802> >.
- 22 HRUBAN, R. H.; MAITRA, A.; GOGGINS, M. Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 1, n. 4, p. 306-16, 2008. ISSN 1936-2625 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 23 ROONEY, S. L.; SHI, J. Intraductal Tubulopapillary Neoplasm of the Pancreas: An Update From a Pathologist's Perspective. **Arch Pathol Lab Med**, v. 140, n. 10, p. 1068-73, Oct 2016. ISSN 0003-9985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2016-0207-RA> >.
- 24 KOORSTRA, J. B. M. et al. Pancreatic Carcinogenesis. In: (Ed.). **Pancreatology**, v.8, 2008. p.110-25. ISBN 1424-3903 (Print)1424-3911 (Electronic).
- 25 CHU, G. C. et al. Stromal biology of pancreatic cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 887-907, 2007. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.21209/abstract> >.
- 26 HE, X. Y.; YUAN, Y. Z. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 32, p. 11241-8, Aug 28 2014. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11241> >.
- 27 BAILEY, P. et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 47-52, Mar 03 2016. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature16965> >.
- 28 VINCENT, A. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 607-20, Aug 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620466> >.

- 29 COLLISSON, E. A. et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 4, p. 207-220, 04 2019. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30718832> >.
- 30 COLLISSON, E. A. et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. **Nat Med**, v. 17, n. 4, p. 500-3, Apr 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460848> >.
- 31 MOFFITT, R. A. et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Nat Genet**, v. 47, n. 10, p. 1168-78, Oct 2015. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343385> >.
- 32 SIVAKUMAR, S. et al. Master Regulators of Oncogenic KRAS Response in Pancreatic Cancer: An Integrative Network Biology Analysis. **PLoS Med**, v. 14, n. 1, p. e1002223, 01 2017. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28141826> >.
- 33 AUNG, K. L. et al. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. **Clin Cancer Res**, v. 24, n. 6, p. 1344-1354, 03 2018. ISSN 1557-3265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29288237> >.
- 34 AHRENDT, S.; PITT, H. Surgical Management of Pancreatic Cancer | Cancer Network. **Oncology**, v. 16, n. 6, p. 725-734, 2002-06-01 2002. Disponível em: < <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/surgical-management-pancreatic-cancer-0> >.
- 35 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/abstract> >
- 36 ZENG, S. et al. Chemoresistance in Pancreatic Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 18, Sep 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31514451> >.
- 37 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 (Print)0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1997.15.6.2403> >.
- 38 NEOPTOLEMOS, J. P. et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 304, n. 10, p. 1073-81, Sep 2010. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823433> >.
- 39 NEOPTOLEMOS, J. P. et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, n. 10073, p. 1011-1024, 03 2017. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129987> >.
- 40 CONROY, T. et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. **N Engl J Med**, v. 379, n. 25, p. 2395-2406, 12 2018. ISSN 1533-4406.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30575490> >.

- 41 TEMPERO, M. **APACT: Phase III, multicenter, international, open-label, randomized trial of adjuvant nab-paclitaxel plus gemcitabine vs gemcitabine for surgically resected pancreatic adenocarcinoma**, 2019.
- 42 MIZRAHI, J. D. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 395, n. 10242, p. 2008-2020, 06 2020. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32593337> >.
- 43 MOORE, M. J. et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 15, p. 1960-6, May 20 2007. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2006.07.9525> >.
- 44 CONROY, T. et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. **N Engl J Med**, v. 364, n. 19, p. 1817-25, May 12 2011. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1011923> >.
- 45 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 31 2013. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1304369> >.
- 46 CATALANO, M. et al. Clinical Outcomes and Safety of Patients Treated with NAb-Paclitaxel Plus Gemcitabine in Metastatic Pancreatic Cancer: The NAPA Study. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 20, n. 11, p. 887-895, 2020. ISSN 1873-5576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32957885> >.
- 47 DUNNE, R. F.; HEZEL, A. F. Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. v. 29, n. 4, p. 595-608, August 2015 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.04.003> >.
- 48 GOLAN, T. et al. Maintenance Olaparib for Germline. **N Engl J Med**, v. 381, n. 4, p. 317-327, 07 2019. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31157963> >.
- 49 SAKAMOTO, H. et al. The Evolutionary Origins of Recurrent Pancreatic Cancer. **Cancer Discov**, v. 10, n. 6, p. 792-805, Jun 2020. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32193223> >.
- 50 ALMOGUERA, C. et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**, v. 53, n. 4, p. 549-54, May 20 1988. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 51 ROZENBLUM, E. et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. **Cancer Res**, v. 57, n. 9, p. 1731-4, May 01 1997. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 52 WITKIEWICZ, A. K. et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. **Nat Commun**, v. 6, p. 6744, Apr 09 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7744> >.
- 53 MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 459-65, Jun 2003. ISSN 1474-175X (Print)1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1097> >.

- 54 BRYANT, K. L. et al. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 2, p. 91-100, Feb 2014. ISSN 0968-0004 (Print)0968-0004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004> >.
- 55 ZEITOUNI, D. et al. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 4, Apr 2016. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096871> >.
- 56 PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761-74, Oct 13 2011. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3106> >.
- 57 CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 1, p. 50-83, Mar 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372320> >.
- 58 WOOD, K. W. et al. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. **Cell**, v. 68, n. 6, p. 1041-50, Mar 20 1992. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 59 CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K. L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cell Signal**, v. 15, n. 5, p. 463-9, May 2003. ISSN 0898-6568 (Print)0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 60 WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. **Sci STKE**, v. 1999, n. 1, p. Pe1, Sep 28 1999. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/stke.1999.1.pe1> >.
- 61 MARSHALL, C. J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. **Curr Opin Genet Dev**, v. 4, n. 1, p. 82-9, Feb 1994. ISSN 0959-437X (Print)0959-437x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 62 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 1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8170-7> >.
- 63 THEODOSIOU, A.; ASHWORTH, A. MAP kinase phosphatases. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. Reviews3009, Jun 26 2002. ISSN 1474-7596. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 64 GYSIN, S. et al. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 359-72, Mar 2011. ISSN 1947-6019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1947601911412376> >.
- 65 WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537-49, Aug 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629069> >.
- 66 LIU, Q. H. et al. Role of the ERK1/2 pathway in tumor chemoresistance and tumor therapy. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 2, p. 192-7, Jan 15 2015. ISSN 0960-894x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.076> >.

- 67 TUNG, S. L. et al. miRNA-34c-5p inhibits amphiregulin-induced ovarian cancer stemness and drug resistance via downregulation of the AREG-EGFR-ERK pathway. **Oncogenesis**, v. 6, n. 5, p. e326, May 01 2017. ISSN 2157-9024 (Print)2157-9024. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2017.25> >.
- 68 ZHENG, H. C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, Jul 06 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.19048> >.
- 69 ZENG, H. et al. Connective tissue growth factor promotes temozolomide resistance in glioblastoma through TGF-beta1-dependent activation of Smad/ERK signaling. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 6, p. e2885, Jun 15 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.248> >.
- 70 ZHENG, C. et al. ERK1/2 activity contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. **J Int Med Res**, v. 41, n. 2, p. 300-6, Apr 2013. ISSN 0300-0605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0300060512474128> >.
- 71 TANG, Y. et al. Knockdown of clusterin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine chemotherapy by ERK1/2 inactivation. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 31, p. 73, Sep 11 2012. ISSN 0392-9078. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-31-73> >.
- 72 WEY, J. S. et al. Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. **Br J Cancer**, v. 93, n. 2, p. 233-41, Jul 25 2005. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602663> >.
- 73 CHAI, X. et al. Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133+ Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling. **Sci Rep**, v. 5, p. 14404, Sep 22 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep14404> >.
- 74 YIN, H. et al. HMGB1-mediated autophagy attenuates gemcitabine-induced apoptosis in bladder cancer cells involving JNK and ERK activation. **Oncotarget**, May 11 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17796> >.
- 75 LIU, F. et al. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84982, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084982> >.
- 76 ZHAO, Y. et al. Mitogen-activated protein kinases and chemoresistance in pancreatic cancer cells. **J Surg Res**, v. 136, n. 2, p. 325-35, Dec 2006. ISSN 0022-4804 (Print)0022-4804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2006.06.031> >.
- 77 BU, H. Q. et al. Oridonin enhances antitumor activity of gemcitabine in pancreatic cancer through MAPK-p38 signaling pathway. **Int J Oncol**, v. 41, n. 3, p. 949-58, Sep 2012. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1519> >.
- 78 DROSTEN, M.; BARBACID, M. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. **Cancer Cell**, v. 37, n. 4, p. 543-550, 04 2020. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32289276> >.
- 79 CAMPS, M.; NICHOLS, A.; ARKINSTALL, S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. **Faseb j**, v. 14, n. 1, p. 6-16, Jan 2000. ISSN

0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- 80 ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, Jun 11 2004. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018> >.
- 81 ANDERSEN, J. N. et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. **Faseb j**, v. 18, n. 1, p. 8-30, Jan 2004. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-1212rev> >.
- 82 ALONSO, A. et al. The Extended Family of Protein Tyrosine Phosphatases. **Methods Mol Biol**, v. 1447, p. 1-23, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27514797> >.
- 83 COMMITTEE, H. G. N. Dual specificity phosphatases (DUSP) Gene Family | HUGO Gene Nomenclature Committee. 2021. Disponível em: < <https://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/711> >.
- 84 OWENS, D. M.; KEYSE, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3203-13, May 14 2007. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210412> >.
- 85 LOW, H. B.; ZHANG, Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. **Immune Netw**, v. 16, n. 2, p. 85-98, Apr 2016. ISSN 1598-2629 (Print)1598-2629. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4110/in.2016.16.2.85> >.
- 86 RIOS, P. et al. Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 14, p. 2251-73, May 10 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5709> >.
- 87 KIDGER, A. M.; KEYSE, S. M. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). **Semin Cell Dev Biol**, v. 50, p. 125-32, Feb 2016. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791049> >.
- 88 LIU, Y. X. et al. DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 4, p. 624-33, Apr 2008. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403641> >.
- 89 YIN, Y. et al. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. **Nature**, v. 422, n. 6931, p. 527-31, Apr 3 2003. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature01519> >.
- 90 SHEN, W. H. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: a novel transcription target of p53 in apoptosis. **Cancer Res**, v. 66, n. 12, p. 6033-9, Jun 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-3878> >.
- 91 UEDA, K.; ARAKAWA, H.; NAKAMURA, Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. **Oncogene**, v. 22, n. 36, p. 5586-91, Aug 28 2003. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206845> >.

- 92 KEYSE, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 2, p. 253-61, Jun 2008. ISSN 0167-7659 (Print)0167-7659. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-008-9123-1> >.
- 93 YIP-SCHNEIDER, M. T.; LIN, A.; MARSHALL, M. S. Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 4, p. 992-7, Feb 02 2001. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4243> >.
- 94 LEE, J. et al. Blockade of dual-specificity phosphatase 28 decreases chemoresistance and migration in human pancreatic cancer cells. **Sci Rep**, v. 5, p. 12296, Jul 27 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep12296> >.
- 95 LIAO, Q. et al. Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1830-45, Jun 2003. ISSN 0016-5085 (Print)0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 96 HE, G. et al. miR-92a/DUSP10/JNK signalling axis promotes human pancreatic cancer cells proliferation. **Biomed Pharmacother**, v. 68, n. 1, p. 25-30, Feb 2014. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2013.11.004> >.
- 97 FURUKAWA, T. et al. Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer. **Cytogenet Cell Genet**, v. 82, n. 3-4, p. 156-9, 1998. ISSN 0301-0171 (Print)0301-0171. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 98 FURUKAWA, T. et al. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. **Am J Pathol**, v. 162, n. 6, p. 1807-15, Jun 2003. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64315-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64315-5) >.
- 99 SHI, Y. et al. NSC-87877 inhibits DUSP26 function in neuroblastoma resulting in p53-mediated apoptosis. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1841, Aug 06 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.207> >.
- 100 LIN, K. H. et al. RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 2672, Feb 8 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21065-x> >.
- 101 HAMAMURA, K. et al. Salubrinal acts as a Dusp2 inhibitor and suppresses inflammation in anti-collagen antibody-induced arthritis. **Cell Signal**, v. 27, n. 4, p. 828-35, Apr 2015. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.01.010> >.
- 102 ARNOLDUSSEN, Y. J.; SAATCIOGLU, F. Dual specificity phosphatases in prostate cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v. 309, n. 1-2, p. 1-7, Oct 2009. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501628> >.
- 103 LIVAK, K. J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl**, v. 4, n. 6, p. 357-62, Jun 1995. ISSN 1054-9803 (Print)1054-9803. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 104 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 07 1976. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: <

<http://dx.doi.org/> >.

- 105 DHARMACON™. Dharmacon™ Edit-R™ CRISPR-Cas9 Gene Editing Products. 2021. Disponível em: < <http://dharmacon.gelifesciences.com/gene-editing/crispr-cas9/#all> >.
- 106 FRIEDBERG, I. et al. Identification and characterization of DUSP27, a novel dual-specific protein phosphatase. **FEBS Lett**, v. 581, n. 13, p. 2527-33, May 29 2007. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.059> >.
- 107 LIN, S. C. et al. Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells. **J Clin Invest**, v. 121, n. 5, p. 1905-16, May 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci44362> >.
- 108 MILLS, B. N.; ALBERT, G. P.; HALTERMAN, M. W. Expression Profiling of the MAP Kinase Phosphatase Family Reveals a Role for DUSP1 in the Glioblastoma Stem Cell Niche. **Cancer Microenviron**, v. 10, n. 1-3, p. 57-68, Dec 2017. ISSN 1875-2292 (Print)1875-2284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12307-017-0197-6> >.
- 109 KIM, S. C. et al. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3893-9, Jun 1 1999. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 110 WU, J. et al. PAC1 is a direct transcription target of E2F-1 in apoptotic signaling. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6526-35, Oct 4 2007. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210484> >.
- 111 ELLIOTT, M. J. et al. E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells. **Tumour Biol**, v. 23, n. 2, p. 76-86, Mar-Apr 2002. ISSN 1010-4283 (Print)1010-4283. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000059708> >.
- 112 ANDRADE, P. V. **DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose**. 2019. 109 (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.
- 113 XU, S. et al. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. **J Hum Genet**, v. 50, n. 4, p. 159-167, 2005. ISSN 1434-5161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824892> >.
- 114 WANG, Y. et al. Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF-κB signaling pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 3, p. 322-33, Apr 2014. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24522113> >.
- 115 LEE, J. et al. DUSP28 links regulation of Mucin 5B and Mucin 16 to migration and survival of AsPC-1 human pancreatic cancer cells. **Tumour Biol**, v. 37, n. 9, p. 12193-12202, Sep 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230679> >.

- 116 SUZUKI, S. et al. Therapeutic targeting of pancreatic cancer stem cells by dexamethasone modulation of the MKP-1-JNK axis. **J Biol Chem**, v. 295, n. 52, p. 18328-18342, Dec 2020. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33115754> >.
- 117 HIJIYA, N. et al. Genomic Loss of DUSP4 Contributes to the Progression of Intraepithelial Neoplasm of Pancreas to Invasive Carcinoma. **Cancer Res**, v. 76, n. 9, p. 2612-25, 05 2016. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26941286> >.
- 118 NUNES-XAVIER, C. et al. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 1, p. 109-32, Jan 2011. ISSN 1875-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288197> >.
- 119 RUCKERT, M. T. et al. Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cell Mol Life Sci**, v. 76, n. 13, p. 2571-2592, Jul 2019. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30982078> >.
- 120 YI, H. et al. Genomic organization and chromosomal localization of the DUSP2 gene, encoding a MAP kinase phosphatase, to human 2p11.2-q11. **Genomics**, v. 28, n. 1, p. 92-6, Jul 1 1995. ISSN 0888-7543 (Print)0888-7543. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1995.1110> >.
- 121 ZHANG, Q. et al. New insights into the catalytic activation of the MAPK phosphatase PAC-1 induced by its substrate MAPK ERK2 binding. **J Mol Biol**, v. 354, n. 4, p. 777-88, Dec 9 2005. ISSN 0022-2836 (Print)0022-2836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.006> >.
- 122 JEFFREY, K. L. et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. **Nat Immunol**, v. 7, n. 3, p. 274-83, Mar 2006. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni1310> >.
- 123 JEFFREY, K. L. et al. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 391-403, May 2007. ISSN 1474-1776 (Print)1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2289> >.
- 124 WEI, W. et al. Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. **Genes Immun**, v. 14, n. 1, p. 1-6, Jan 2013. ISSN 1466-4879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/gene.2012.54> >.
- 125 ROHAN, P. J. et al. PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1763-6, Mar 19 1993. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 126 WEI, L. et al. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 64, n. 4, p. 259-78, Aug 2016. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725045> >.
- 127 LO NIGRO, C. et al. methylation is a candidate biomarker of outcome in head and neck cancer. **Ann Transl Med**, v. 6, n. 13, p. 271, Jul 2018. ISSN 2305-5839. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30094257> >.
- 128 DONG, W. et al. Differential expression of DUSP2 in left- and right-sided colon cancer

- is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **Oncol Lett**, v. 15, n. 4, p. 4207-4214, Apr 2018. ISSN 1792-1074 (Print)1792-1074. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.7881> >.
- 129 WANG, J. et al. Identification and analysis of long non-coding RNA related miRNA sponge regulatory network in bladder urothelial carcinoma. **Cancer Cell Int**, v. 19, p. 327, 2019. ISSN 1475-2867. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31827401> >.
- 130 YIN, H. et al. Loss of DUSP2 predicts a poor prognosis in patients with bladder cancer. **Hum Pathol**, v. 85, p. 152-161, 03 2019. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30458195> >.
- 131 GIVANT-HORWITZ, V. et al. The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol**, v. 93, n. 2, p. 517-23, May 2004. ISSN 0090-8258 (Print)0090-8258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.03.009> >.
- 132 WANG, J. et al. Dual specificity phosphatase 1/CL100 is a direct transcriptional target of E2F-1 in the apoptotic response to oxidative stress. **Cancer Res**, v. 67, n. 14, p. 6737-44, Jul 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17638884> >.
- 133 FEY, D. et al. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. **Front Physiol**, v. 3, p. 355, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060802> >.
- 134 IJICHI, H. et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. **Genes Dev**, v. 20, n. 22, p. 3147-60, Nov 15 2006. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1475506> >.
- 135 HELMS, E.; ONATE, M. K.; SHERMAN, M. H. Fibroblast Heterogeneity in the Pancreatic Tumor Microenvironment. **Cancer Discov**, v. 10, n. 5, p. 648-656, May 2020. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32014869> >.
- 136 COLLINS, M. A. et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 639-53, Feb 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232209> >.
- 137 TAPE, C. J. et al. Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1818, Jun 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27315484> >.
- 138 SHI, Y. et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 131-135, 05 2019. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30996350> >.
- 139 SALMIHEIMO, A. et al. Tumour-associated macrophages activate migration and STAT3 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells in co-cultures. **Pancreatology**, v. 17, n. 4, p. 635-641, 2017 Jul - Aug 2017. ISSN 1424-3911. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28476581> >.

- 140 WANG, S. F. et al. Activated Integrated Stress Response Induced by Salubrinal Promotes Cisplatin Resistance in Human Gastric Cancer Cells via Enhanced xCT Expression and Glutathione Biosynthesis. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Oct 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30380689> >.
- 141 ZHAO, Y.; ZHOU, Y.; WANG, M. Brosimone I, an isoprenoid-substituted flavonoid, induces cell cycle G. **Food Funct**, v. 10, n. 5, p. 2729-2738, May 2019. ISSN 2042-650X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31038133> >.
- 142 SENGUPTA, S. et al. Estrogen-Induced Apoptosis in Breast Cancers Is Phenocopied by Blocking Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha (eIF2 α) Protein. **Mol Cancer Res**, v. 17, n. 4, p. 918-928, 04 2019. ISSN 1557-3125. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30655322> >.
- 143 CHEN, X. et al. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. **Phytother Res**, v. 16, n. 3, p. 199-209, May 2002. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164262> >.
- 144 JAMES, A. D. et al. Cutting off the fuel supply to calcium pumps in pancreatic cancer cells: role of pyruvate kinase-M2 (PKM2). **Br J Cancer**, v. 122, n. 2, p. 266-278, 01 2020. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31819190> >.
- 145 WANG, C. A. et al. DUSP2 regulates extracellular vesicle-VEGF-C secretion and pancreatic cancer early dissemination. **J Extracell Vesicles**, v. 9, n. 1, p. 1746529, 2020. ISSN 2001-3078. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32341770> >.
- 146 STEVEN, A. et al. What turns CREB on? And off? And why does it matter? **Cell Mol Life Sci**, v. 77, n. 20, p. 4049-4067, Oct 2020. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32347317> >.
- 147 JOHANNESSEN, M.; DELGHANDI, M. P.; MOENS, U. What turns CREB on? **Cell Signal**, v. 16, n. 11, p. 1211-27, Nov 2004. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337521> >.
- 148 WANG, H. et al. The COL11A1/Akt/CREB signaling axis enables mitochondrial-mediated apoptotic evasion to promote chemoresistance in pancreatic cancer cells through modulating BAX/BCL-2 function. **J Cancer**, v. 12, n. 5, p. 1406-1420, 2021. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33531986> >.
- 149 BYKOV, V. J. N. et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 2, p. 89-102, 02 2018. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29242642> >.
- 150 SL, A. et al. Introduction of WT-TP53 Into Pancreatic Cancer Cells Alters Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs, Targeted Therapeutics and Nutraceuticals. **Advances in biological regulation**, v. 69, 2018 Aug 2018. ISSN 2212-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29980405> >.
- 151 LOUGHERY, J. et al. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 12, p. 7666-80, Jul 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928858> >.

- 152 FRAME, S.; COHEN, P.; BIONDI, R. M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. **Mol Cell**, v. 7, n. 6, p. 1321-7, Jun 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430833> >.
- 153 KAZI, A. et al. GSK3 suppression upregulates β -catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumors. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 5154, 12 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514931> >.
- 154 DING, L.; BILLADEAU, D. D. Glycogen synthase kinase-3 β : a novel therapeutic target for pancreatic cancer. **Expert Opin Ther Targets**, v. 24, n. 5, p. 417-426, 05 2020. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32178549> >.
- 155 BANG, D. et al. GSK-3 α promotes oncogenic KRAS function in pancreatic cancer via TAK1-TAB stabilization and regulation of noncanonical NF- κ B. **Cancer Discov**, v. 3, n. 6, p. 690-703, Jun 2013. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547054> >.
- 156 KUNNIMALAIYAAN, S.; GAMBLIN, T. C.; KUNNIMALAIYAAN, M. Glycogen synthase kinase-3 inhibitor AR-A014418 suppresses pancreatic cancer cell growth via inhibition of GSK-3-mediated Notch1 expression. **HPB (Oxford)**, v. 17, n. 9, p. 770-6, Sep 2015. ISSN 1477-2574. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147011> >.
- 157 SIE, Z. L. et al. WNK1 Kinase Stimulates Angiogenesis to Promote Tumor Growth and Metastasis. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 3, Mar 2020. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32131390> >.
- 158 WU, K. et al. [Effects of WNK1 on Human Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells via MAPK7 Phosphorylation and Its Relative Mechanism]. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 28, n. 2, p. 365-370, Apr 2020. ISSN 1009-2137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32319364> >.
- 159 HUMBERT, M. et al. Masitinib combined with standard gemcitabine chemotherapy: in vitro and in vivo studies in human pancreatic tumour cell lines and ectopic mouse model. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9430, Mar 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209107> >.
- 160 MOSER, C. et al. STAT5b as molecular target in pancreatic cancer--inhibition of tumor growth, angiogenesis, and metastases. **Neoplasia**, v. 14, n. 10, p. 915-25, Oct 2012. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097626> >.
- 161 JE, D. W. et al. The inhibition of SRC family kinase suppresses pancreatic cancer cell proliferation, migration, and invasion. **Pancreas**, v. 43, n. 5, p. 768-76, Jul 2014. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24763074> >.
- 162 LEE, J.; KIM, J. H. Scattered DUSP28 is a novel biomarker responsible for aggravating malignancy via the autocrine and paracrine signaling in metastatic pancreatic cancer. **Cancer Lett**, v. 456, p. 1-12, 08 2019. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30902562> >.
- 163 SONG, B. et al. Downregulation of ASPP2 in pancreatic cancer cells contributes to increased resistance to gemcitabine through autophagy activation. **Mol Cancer**, v. 14, p. 177, Oct 2015. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438046> >.

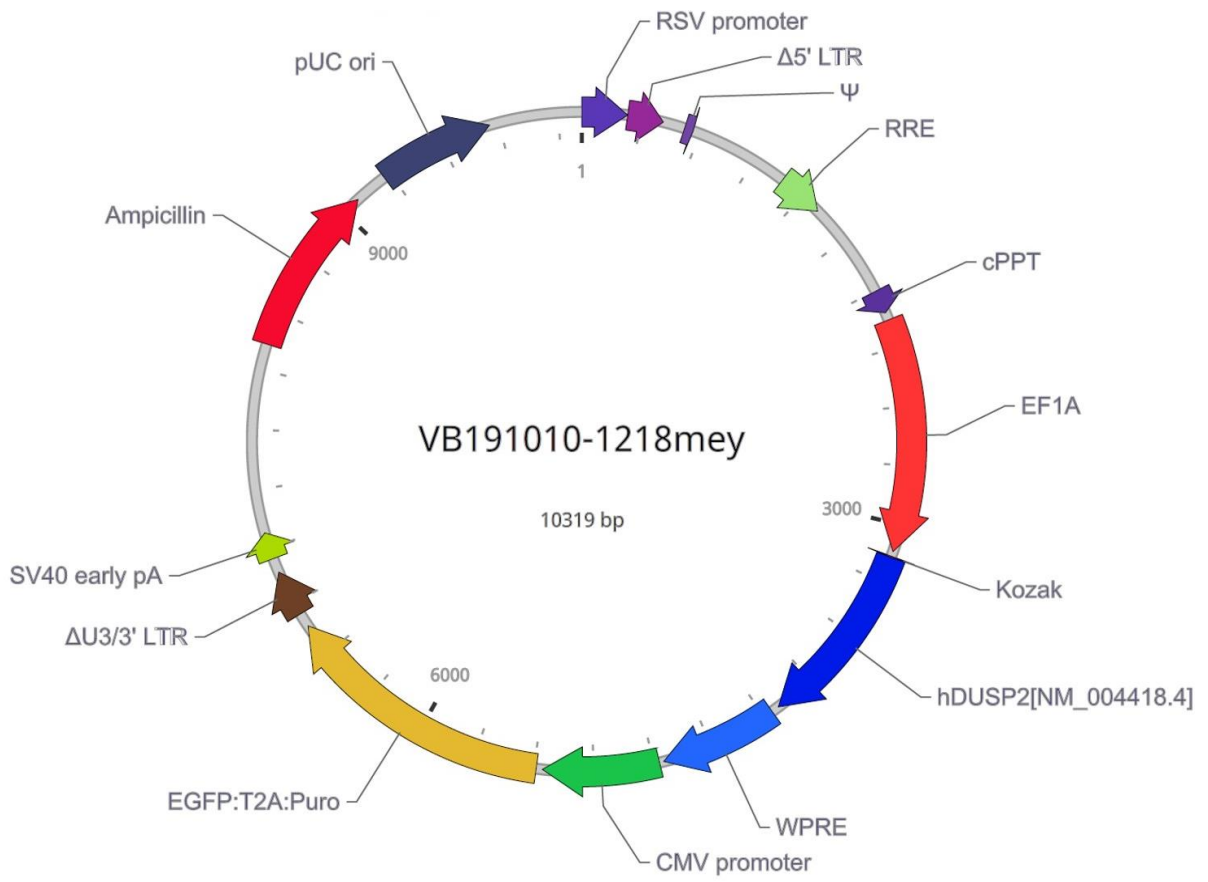
- 164 WARREN, C. F. A.; WONG-BROWN, M. W.; BOWDEN, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. **Cell Death Dis**, v. 10, n. 3, p. 177, 02 2019. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30792387> >.
- 165 IYER, N. G.; OZDAG, H.; CALDAS, C. p300/CBP and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4225-31, May 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15156177> >.
- 166 DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6245-51, Oct 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931691> >.
- 167 HU, W.; FENG, Z.; LEVINE, A. J. The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. **Genes Cancer**, v. 3, n. 3-4, p. 199-208, Mar 2012. ISSN 1947-6027. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150753> >.
- 168 DAN LU et al. The phosphatase PAC1 acts as a T cell suppressor and attenuates host antitumor immunity. **Nat Immunol**, v. 21, n. 3, p. 287-297, 03 2020. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31932812> >.
- 169 LU, D. et al. The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates TH17 differentiation. **Nat Immunol**, v. 16, n. 12, p. 1263-73, Dec 2015. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3278> >.

9. Anexos

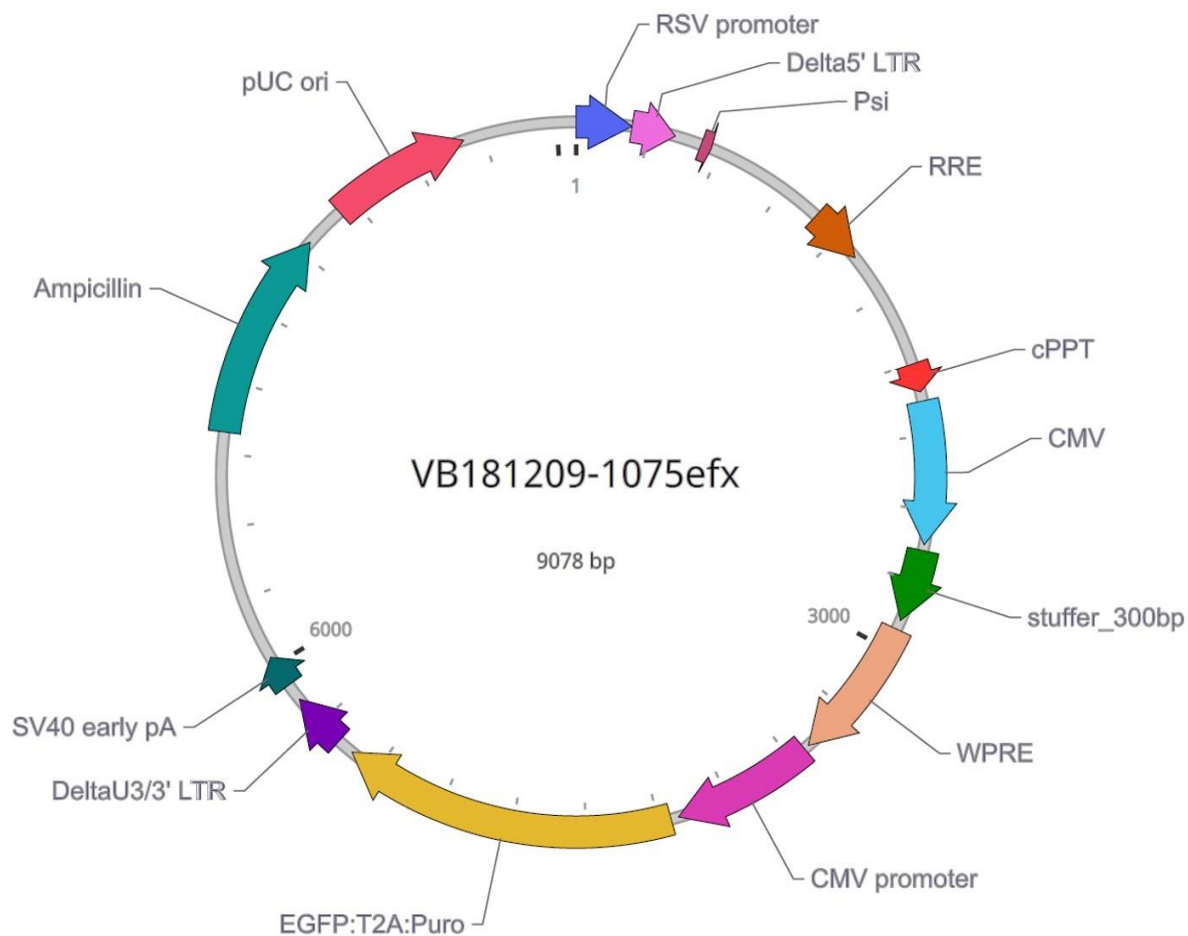
ANEXO A - Biblioteca de crRNA para *knockout* gênico por meio de CRISPR/Cas9 de 25 diferentes DUSPs adquirida da empresa *Dharmacon*[™] (G-CUSTOM-214951 - LP_18677 crRNA Cherry-pick Library 0.5 nmol) em formato de placas de 96 poços sendo para cada gene, sintetizadas três partículas de crRNAs.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DUSP1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP2 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP2 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP2 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP3 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP3 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP3 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP4 Edit-R Human synthetic crRNA	
B		DUSP4 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP4 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP5 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP5 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP5 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP6 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP6 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP6 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP7 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP7 Edit-R Human synthetic crRNA	
C		DUSP7 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP8 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP8 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP8 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP9 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP9 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP9 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP10 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP10 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP10 Edit-R Human synthetic crRNA	
D		DUSP11 Edit-R Human synthetic	DUSP11 Edit-R Human synthetic	DUSP11 Edit-R Human synthetic	DUSP12 Edit-R Human synthetic	DUSP12 Edit-R Human synthetic	DUSP12 Edit-R Human synthetic	DUSP13 Edit-R Human synthetic	DUSP13 Edit-R Human synthetic	DUSP13 Edit-R Human synthetic	DUSP14 Edit-R Human synthetic	
E		DUSP14 Edit-R Human synthetic	DUSP14 Edit-R Human synthetic	DUSP15 Edit-R Human synthetic	DUSP15 Edit-R Human synthetic	DUSP15 Edit-R Human synthetic	DUSP16 Edit-R Human synthetic	DUSP16 Edit-R Human synthetic	DUSP16 Edit-R Human synthetic	DUSP18 Edit-R Human synthetic	DUSP18 Edit-R Human synthetic	
F		DUSP18 Edit-R Human synthetic	DUSP19 Edit-R Human synthetic	DUSP19 Edit-R Human synthetic	DUSP19 Edit-R Human synthetic	DUSP21 Edit-R Human synthetic	DUSP21 Edit-R Human synthetic	DUSP21 Edit-R Human synthetic	DUSP22 Edit-R Human synthetic	DUSP22 Edit-R Human synthetic	DUSP22 Edit-R Human synthetic	
G		DUSP23 Edit-R Human synthetic	DUSP23 Edit-R Human synthetic	DUSP23 Edit-R Human synthetic	STYXL1 Edit-R Human synthetic crRNA	STYXL1 Edit-R Human synthetic crRNA	STYXL1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP26 Edit-R Human synthetic	DUSP26 Edit-R Human synthetic	DUSP26 Edit-R Human synthetic	DUPD1 Edit-R Human synthetic crRNA	
H		DUPD1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUPD1 Edit-R Human synthetic crRNA	DUSP28 Edit-R Human synthetic	DUSP28 Edit-R Human synthetic	DUSP28 Edit-R Human synthetic	Edit-R Human DNMT3B crRNA	Edit-R Human DNMT3B crRNA	Edit-R crRNA Non-targeting Control #1	Edit-R crRNA Non-targeting Control #1		

ANEXO B - Mapa do Vetor pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hDUSP2[NM_004418.4] (ID: VB191010-1218mey), para indução de DUSP2.



ANEXO C - Mapa do Vetor pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 (ID: VB181209-1075efx), vetor vazio correspondente ao vetor para indução de DUSP2.



ANEXO D - Proteínas e respectivos sítios de fosforilação identificados no ensaio Phospho Kinase Array.

Target/Control	Phosphorylation Site
Reference Spot	—
Akt 1/2/3	T308
Akt 1/2/3	S473
Reference Spot	—
CREB	S133
EGF R	Y1086
eNOS	S1177
ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187
Chk-2	T68
c-Jun	S63
Fgr	Y412
GSK-3 α / β	S21/S9
GSK-3 β	S9
HSP27	S78/S82
p53	S15
p53	S46
p53	S392
JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/Y223
Lck	Y394
Lyn	Y397
MSK1/2	S376/S360
p70 S6 Kinase	T389
p70 S6 Kinase	T421/S424
PRAS40	T246

Target/Control	Phosphorylation Site
p38 α	T180/Y182
PDGF R β	Y751
PLC- γ 1	Y783
Src	Y419
PYK2	Y402
RSK1/2	S221/S227
RSK1/2/3	S380/S386/S377
STAT2	Y689
STAT5a/b	Y694/Y699
WNK1	T60
Yes	Y426
STAT1	Y701
STAT3	Y705
STAT3	S727
Reference Spot	—
β -Catenin	—
PBS (Negative Control)	—
STAT6	Y641
HSP60	—
PBS (Negative Control)	—

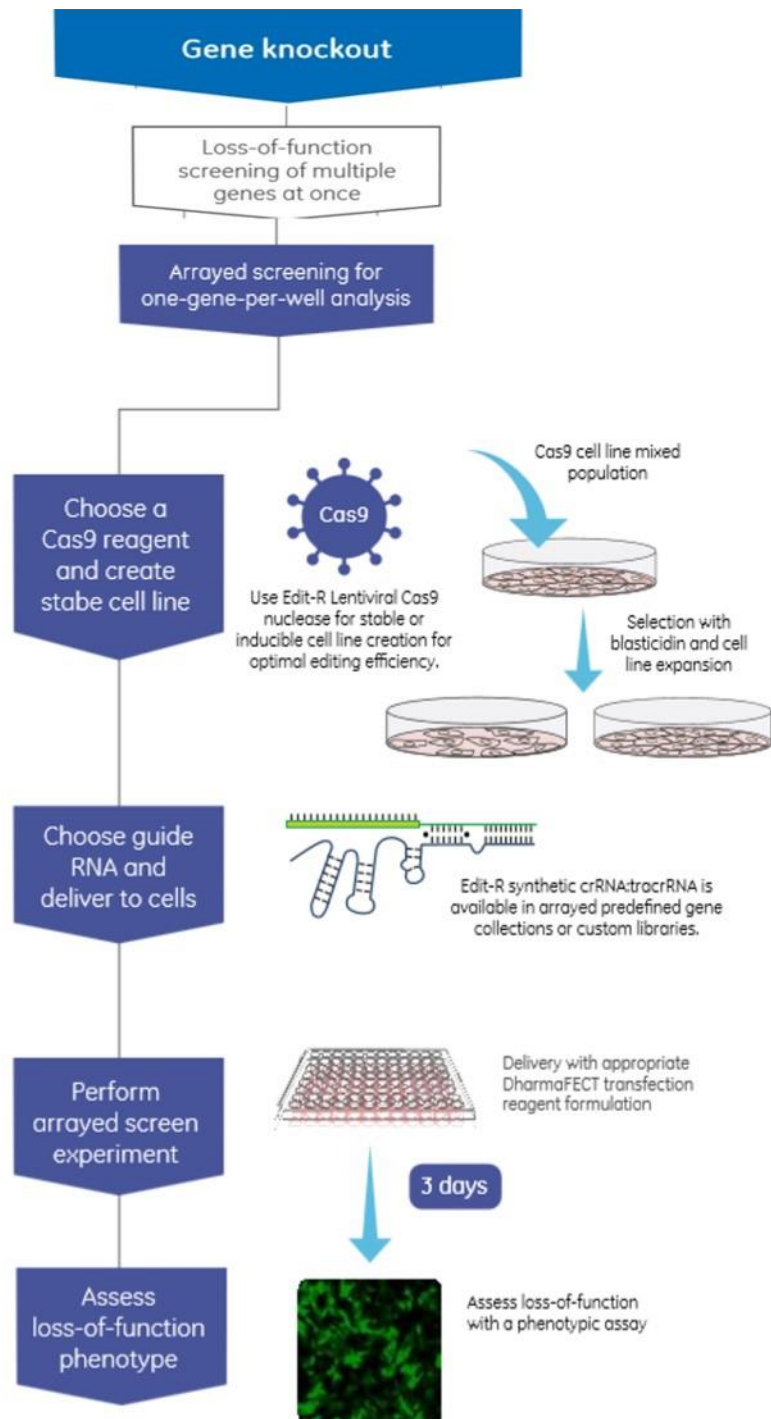
ANEXO E - Tabela referente às linhagens celulares de ADP utilizadas na análise de correlação entre os genes *DUSP1* e *DUSP2*, feita com os dados do *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*, por meio da plataforma *DepMap Portal*.

Nome da linhagem	Tipo da linhagem	Status <i>TP53</i>	Status <i>KRAS</i>
BxPC-3	primária	mutado	selvagem
CFPAC1	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
DANG	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
HUPT3	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12R}
HUPT4	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
KP4	metastática	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12D}
MIA PaCa-2	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12C}
Panc02.13	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12R}
Panc04.03	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
Panc05.04	primária	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12D}
PANC-1	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
Panc10.05	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
PATU8902	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
PATU8988T	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
PK1	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
SNU410	metastática	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12V}
SU8686	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
SUIT2	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
SW1990	primária	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12D}
TCCPAN2	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12R}

Anexo F - Tabela referente às linhagens celulares de ADP utilizadas na análise de entre efeito do gene *DUSP2* ou *DUSP1* e o IC50 da gemcitabina, feita com os dados do *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), por meio da plataforma *DepMap Portal*.

Nome da linhagem	Tipo da linhagem	Status <i>TP53</i>	Status <i>KRAS</i>
BxPC-3	primária	mutado	selvagem
CFPAC1	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
HPAC	primária	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12D}
HUPT4	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
KP1N	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
KP4	metastática	selvagem	<i>KRAS</i> ^{G12D}
MIA PaCa-2	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12C}
Panc03.27	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
Panc10.05	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}
PATU8902	primária	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12V}
SUIT-2	metastática	mutado	<i>KRAS</i> ^{G12D}

Anexo G - Fluxograma do screening fenotípico realizado com as diferentes DUSPs, onde a partir do knockout de cada uma, foi feita uma triagem baseada na resposta fenotípica após o tratamento com gemcitabina, verificando uma possível sensibilização ao quimioterápico.



10. Apêndice

APÊNDICE A - Manuscrito referente à parte desde trabalho submetido na revista Cellular Oncology.

Title: CRISPR screen identifies atypical phosphatase DUSP11 as a critical modulator of gemcitabine response in pancreatic adenocarcinoma

Running title: DUSP11 oncogene role on gemcitabine response in pancreatic adenocarcinoma

Authors: Verena Silva Santos*¹; Gabriela Maciel Vieira*¹, Pamela Viani de Andrade¹, Luis Fernando Nagano¹, Mariana Tannús Ruckert¹, Vanessa Silva Silveira^{1#}

Affiliations:

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

* **These authors contributed equally to this study and both are considered first authors.**

Corresponding author: Vanessa Silveira - Email: vsilveira@fmrp.usp.br

ORCID: 0000-0001-5633-9490

Abstract

Purpose: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents one of the deadliest cancers among all solid tumors. First-line treatment relies on gemcitabine and despite treatment improvements, refractoriness remains a universal challenge. Attempts to decipher how feedback-loops control signaling pathways towards drug resistance have gain attention in recent years.

Methods: A CRISPR/Cas9-based phenotypic screen was performed to identify targets from the dual-specificity phosphatases (DUSP) family acting in gemcitabine response modulation of pancreatic cancer cell lines. DUSP11 was identified as a potential target, therefore, single-cell DUSP11^{-/-} clones were generated using the CRISPR/Cas system. Cell viability, survival and apoptosis assays were performed to assess DUSP11 knockout phenotypic impacts. Gene expression was assessed by qRT-PCR and protein expression was performed through immunoblot analysis. Transcriptome *in silico* analysis was performed using TCGA and Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) datasets.

Results: We identified the atypical RNA phosphatase DUSP11 as one of the top targets in gemcitabine response. DUSP11 knockout impaired cell viability, survival and induced apoptosis under gemcitabine treatment. Transcriptome enrichment analysis of PDAC human samples identified NF-κB signaling pathway highly correlated with *DUSP11* upregulation. Accordingly, sustained NF-κB phosphorylation blockage was observed after DUSP11 inhibition either alone or combined with gemcitabine treatment. Lastly, we attempted to identify which molecules would be targeted by DUSP11 to mediate NF-κB regulation and observed a significant increase in vault RNAs expression in DUSP11^{-/-} cells indicating that these non-coding RNAs could mediate DUSP11 function.

Conclusion: This study provides new insights on DUSP11 role in RNA biology and gemcitabine response in pancreatic cancer cells.

Key words: DUSP11, atypical phosphatase, gemcitabine response, pancreatic cancer.

Declarations.

Not applicable.

Funding.

This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2015/10694-5 and 2016/23013-9.

Competing Interests.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Short Communication

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common type of pancreatic cancer, is an aggressive and lethal disease with a 5-year survival rate of less than 10% (1). Unlike some types of cancer, PDAC is increasing in both incidence and mortality, which could become the second leading cause of cancer death by 2030 (2). This dismal prognosis of PDAC is multifactorial, attributed to its late diagnosis, early metastasis, and resistance to nearly all therapy approaches, including chemotherapy (either in monotherapy or combined schemes such as FOLFIRINOX (3) and immunotherapy (4-6)). Despite highly refractory rates, the deoxycytidine analog, gemcitabine, remains the standard treatment for PDAC. Intrinsic and extrinsic pathways for gemcitabine resistance have been largely investigated in PDAC (7-9) and illustrates how genetic alterations promoting the activation of molecular pathways such as PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK, can lead to gemcitabine chemoresistance (10-12). However, the molecular mechanisms underlying gemcitabine effects on these pathways still need to be investigated.

Controlling the activation of signaling pathways is a complex process involving feedback loops and signaling crosstalk, mainly mediated by post-translational modifications such as phosphorylation and dephosphorylation (13). One of the major players controlling dephosphorylation is represented by a large family of structurally diverse phosphatases, which include the dual-specificity phosphatases (DUSPs) (14). These phosphatases present different binding substrates, such as pTyr, pSer, and pThr, in addition to signaling lipids, such as phosphoinositides, complex carbohydrates, and even RNA (14).

DUSPs have emerged as important targets in malignant cell transformation due to their substrate specificity, subcellular, and spatiotemporal localization. These can precisely finetune the signal transduction of critical events such as cell proliferation, growth, survival, metabolism, differentiation, cell death, and drug response (13). In the PDAC context, a review from our group has recently summarized the most relevant findings related to the DUSPs function (15). However, their paradoxical role in tumorigenesis, exhibiting either tumor suppressor or oncogenic features, remains to be elucidated.

Considering this scenario, the present study was conducted to identify potential targets among DUSP genes playing a role in gemcitabine response in pancreatic cancer cells. Our study identifies, for the first time, the role of atypical phosphatase DUSP11 as a critical modulator of gemcitabine response.

2. Methods

2.1 Cell culture

Pancreatic cancer cell lines MIA PaCa-2 and PANC-1 (ATCC® CRM-CRL-1420 and ATCC® CRL-1469, respectively) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Merck, KGaA Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, Invitrogen) (pH 7.2–7.4), 100 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Cell line authentication was performed by Short Tandem Repeats (STR) DNA Profiling Analysis and all cell cultures have been periodically tested to avoid mycoplasma contamination.

2.2 Cell viability assay

Cell viability was assessed by 4-day MTT assay as previously described (16). Briefly, cells were seeded in 96-well plates (2x10³ cells/well) and treated with ranging concentrations of Gemcitabine (Sigma Aldrich, Inc.) (0.1 μ M to 100 μ M). Absorbance was measured at 570 nm using the iMark Microplate Absorbance Reader spectrophotometer (BioRad Laboratories). The concentration of Gemcitabine needed to inhibit cell proliferation by 50% (IC₅₀) was calculated using the CalcuSyn software.

2.3 CRISPR/Cas9 screen for Gemcitabine response

Stably expressing Cas9 cell lines were generated by transducing MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines with lentiviral particles carrying pLv5-Cas9-Blast (Sigma Aldrich, Inc.), followed by blasticidin selection (2.5 μ g/mL). In both cell lines Cas9 protein expression was confirmed by immunoblot analysis. Next, to investigate whether DUSPs genes are related to gemcitabine resistance in PDAC cell lines, we used

a custom library (Cherry pick Edit-R library, GE Dharmacon) of crRNAs targeting 25 genes from the DUSP family to knockout each gene followed by a gemcitabine treatment and cell viability assay. Briefly, MIA PaCa-2^{Cas9} and PANC-1^{Cas9} cells were seeded in 96-well plates (3×10^3 cells/well) and then transfected with crRNA:tracrRNA complexes targeting each DUSP gene with DharmaFECT Transfection Reagent according to the manufacturer's protocol. After 48 hours of transfection, the cell lines were treated for 72 hours with the IC₅₀ gemcitabine doses for each cell line (16 μ M and 50 μ M for MIA PaCa-2 and PANC-1, respectively). Subsequently, cell viability was assessed by an MTT assay as previously described (16). Screens were performed in two independent experiments with four technical replicates each.

2.4 Single-cell DUSP11-knockout clone generation.

To establish stable DUSP11 knockout MIA PaCa-2^{Cas9} cells were transfected with two independent crRNAs targeting different exons in DUSP11 genomic locus. Cells transfected with non-specific complex control crRNA:tracrRNA was defined as wild type (WT) cells. Single-cell knockout clones were generated by limiting dilution and the knockout efficiency was confirmed by immunoblot analysis.

2.5 Lentiviral Production and Transduction

Lentiviruses were produced in 293T cells by standard protocols with the packaging plasmids (CMV Δ 8.91 and VSV-G) and pLV-EGFP/Puro-U6>hDUSP11 (VectorBuilder, USA) plasmid carrying either a scramble shRNA or shRNA targeting *DUSP11* sequence. Transduction protocols were performed as previously described (17).

2.6 Apoptosis

To address apoptosis, 2×10^5 cells were plated in a six-well plate and treated with either Gemcitabine (IC₅₀=16 μ M) or vehicle for 72 hours. Isolated cells from culture were washed and labeled with FITC Annexin V-APC (BD Biosciences) and propidium iodide, according to manufacturer's instructions. Fluorescence was accessed in the BD FACSCalibur (BD Biosciences) and analysis was performed in FlowJo Software (FlowJo©, LLC, 2013-2017).

2.7 Colony formation assays

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 250 cells per well and treated with either Gemcitabine (IC₃₀=2.95 μ M) or vehicle for 72 hours. After 9 days visible colonies were fixed with absolute methanol and stained with 1% Giemsa.

2.8 Wound-healing assay

Cells were cultured in 12-well plates until a confluent monolayer was obtained. Then, the layer was mechanically scratched using a 200 μ l pipette tip to create the wound (Time 0). Cells were washed with PBS and treated with either Gemcitabine or vehicle (IC₅₀=16 μ M) for 24 hours. The cells were photographed, and Image J software was used to calculate the cell free area. The rate of cell migration was calculated according to the distance in nanometers migrated over time.

2.9 Matrigel invasion assay

To evaluate cell invasion capacity, inserts with 8 μ m pores were covered by 100 μ l matrigel® (Corning) in 24-well plates. Then, 3×10^5 cells per insert were resuspended in 500 μ l of DMEM medium (SBF-free) with Gemcitabine (16 μ M) and applied on top of the matrigel layer. In the lower chamber, 500 μ l of DMEM medium supplemented with 10% SBF was added, serving as a chemoattractant. After 24 hours of incubation, invading cells were fixed with absolute methanol and stained with a 1% Giemsa solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The number of invading cells was counted in randomly selected microscopic fields (40x magnification) and photographed.

2.10 Immunoblot analysis

Immunoblotting was performed using standard procedures. Briefly, cells were submitted to lysis buffer

(RIPA, Sigma Chemical Co., 10% protease, and 10% phosphatase) and then proteins were resolved by electrophoresis in 10% SDS polyacrylamide gels. Proteins were then transferred to a membrane, blocked with blocking solution (5% skimmed milk) and incubated overnight in primary antibodies (4°C with shaking). Next, membranes were washed and incubated for 1 hour with secondary antibodies (room temperature with shaking). Chemiluminescence was detected using Clarity Western ECL Blotting Substrate and visualized at ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories). Primary antibodies used were Cas9 (7A9-3A3 #14697, dilution 1:1000), DUSP11 (PIR1 - sc-393220, dilution 1:500), p-NF-kappa p65 (#3033, dilution 1:1000), NF-kappaB p65 (#4764S, dilution 1:1000), GAPDH (sc-32233, dilution 1:1000), β -actin (C4) (sc-47778, dilution 1:1000) and Vinculin (sc-7649, dilution 1:1000). Secondary antibodies were anti-mouse and anti-rabbit (Agilent Technologies).

2.11 Quantitative RT-PCR

Total cellular RNA was extracted using Trizol® reagent (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was obtained with the iScript Reverse Transcription Supermix (BIO-RAD Laboratories, Inc.), according to manufacturer's instructions. TaqMan® probes (Applied Biosystems) were used for *DUSP11* (Hs01061375_m1) and internal controls *GAPDH* (Hs02786624_g1) and *β -actin* (Hs01060665_g1). Vault RNAs expression was accessed by SYBR Green Supermix (BIO-RAD Laboratories, Inc.) with 5.8S RNA as internal control (primer sequences were based on Chen et al. (18)). PCR reactions were performed in triplicate using Step One System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (19).

2.12 Transcriptome in silico analysis

Gene expression of mRNA transcriptional profiles in silico analysis was performed using TCGA PAAD dataset with PDAC samples (n=179) compared to normal pancreatic tissues (n=171) obtained from Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal (20). Expression level analysis of DUSP11 correlated with TNM stage was performed in Xena Platform (21). Correlation plot DUSP11 expression with GEM sensitivity in 5 PDAC cell lines data was generated from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) and Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) through Depmap Portal. TCGA PAAD dataset was used to conduct Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for Gene Ontology (GO) biological processes to identify biological process correlated to high DUSP11 expression (Normalized Enrichment Scores=1.98; FDR=0; P=0).

2.13 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni's test or Student's t-test, when appropriate. For survival analysis, the Kaplan–Meier method and log-rank test were applied using GEPIA Platform (22). A $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. Data analysis was carried out using the GraphPad Prism version 8.0 statistical software package. Two independent experiments in triplicates were performed.

3. Results and Discussion

To identify genes whose depletion modulates sensitivity to gemcitabine, we conducted a CRISPR/Cas9-based *in vitro* phenotypic screening in pancreatic cancer cell lines MIA PaCa-2 and PANC-1. First, to ensure an efficient loss-of-function screen, MIA PaCa-2 and PANC-1 cells were stably transduced with exogenous endonuclease Cas9 (Supplementary Fig. S1a). Next, to exclude any interference of exogenous Cas9 in gemcitabine response experiments, we performed a short-term viability assay. As observed in Supplementary Fig. S1b, both cell lines expressing Cas9 did not change their profile upon gemcitabine treatment compared to control wild type cells. Then, we performed the CRISPR screening using a custom library targeting 25 genes of the DUSP family, followed by a phenotypic analysis to address PDAC cells viability under 72 hours of gemcitabine treatment (Fig. 1a).

Among the phosphatases tested, we identified a few possible targets which significantly modulate the gemcitabine response, either promoting or reducing resistance. Considering those genes associated with gemcitabine sensitivity, we identified *DUSP11* as a potential candidate as the knockout of this gene dramatically increased the responsiveness of both cell lines to gemcitabine (Fig. 1b).

To evaluate whether *DUSP11* could have any clinical relevance as a target, we mined the RNA-seq data from the TCGA PAAD cohort and identified a significant upregulation in *DUSP11* expression in pancreatic cancer samples (n=179) compared to healthy pancreatic tissues (n=171) ($P<0.01$, Supplementary Fig. S2). Furthermore, patients with higher pathological stages according to TNM (Tumor Node Metastasis) classification (TNM II and TNM IV) were more likely to have higher expression levels of *DUSP11* ($P<0.02$, Fig. 1c), which is also related to worse overall survival (Log-rank $P=0.03$) (Fig. 1d). Additionally, when we evaluated *DUSP11* expression profile among other cancer types, we observed a significant difference between tumor samples and respective healthy tissues in 5 different tumor cohorts (Supplementary Fig. S2). These data suggest that *DUSP11* may play a role in cancer biology and impact pancreatic cells' sensitivity to gemcitabine. Whether and in which contexts *DUSP11* activity could be related to tumor biology remains mostly unknown.

3.1 Depletion of *DUSP11* sensitizes cells to gemcitabine treatment

Next, we attempted to validate *DUSP11* as an essential gene modulating gemcitabine response. We first took advantage of the data generated from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) and Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) and showed that *DUSP11* mRNA expression was negatively correlated with the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of gemcitabine in 5 pancreatic cancer cell lines ($R=0.89$; $P=0.03$; Fig. 2a, Table S2), suggesting that *DUSP11* is indeed associated with gemcitabine response. For further validation, we generated single-cell *DUSP11*-knockout clones in MIA PaCa-2 cells by CRISPR/Cas9 machinery using *DUSP11*-targeting crRNAs to completely abolish *DUSP11* protein (Supplementary Fig. S3).

To gain insights into the effects of *DUSP11* knockout on PDAC cells, we examined whether *DUSP11*^{-/-} cells would exhibit drug sensitivity and impact colony formation upon gemcitabine treatment. As observed in Fig. 2b, *DUSP11*^{-/-} cells exhibited increased gemcitabine sensitivity and significantly reduced IC_{50} value compared to MIA PaCa-2 wild type cells ($IC_{50}=16\mu\text{M}$ and $IC_{50}=6.45\mu\text{M}$, respectively; $P=0.04$). *DUSP11* knockout also impaired colony formation ($P<0.01$) and once combined to gemcitabine treatment ($IC_{30}=2.95\mu\text{M}$ for 72 hours) significantly reduced cell survival compared to MIA PaCa-2 wild type treated cells ($P<0.01$; Fig. 2c). Apoptosis analysis has also been performed and showed a substantial 3-fold increase in *DUSP11*^{-/-} cell death percentage combined to gemcitabine treatment as compared to gemcitabine alone ($P<0.0001$) (Fig. 2d). Interestingly, in untreated cells, *DUSP11* knockout did not have any apparent effect, again suggesting a drug-response specificity. In accordance with this hypothesis, otherwise important tumorigenic processes such as invasion and cell migration were not affected by *DUSP11* knockout (Supplementary Fig. S4 a-b). Altogether, these results support *DUSP11* phosphatase as a potential target to gemcitabine response in PDAC cells.

3.2 *DUSP11* is associated with NF- κ B signaling pathway signature in PDAC

DUSP11 is an atypical phosphatase with selectivity for binding to phosphorylated RNAs over phosphoprotein substrates (23). This highly conserved RNA phosphatase removes γ - and β -phosphates from 5'-triphosphorylated RNAs such as primary RNA transcripts, vault RNAs, and Alu RNAs (24, 25). To gain further insights into the biological signatures that could be associated to *DUSP11* expression in PDAC, we performed a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) with samples from TCGA PAAD dataset which revealed NF- κ B signaling pathway among the most significantly enriched in samples with *DUSP11* upregulation (Fig. 3a). NF- κ B is one of the major altered pathways in PDAC controlling several critical tumorigenic processes, including drug response (26, 27). In this context, NF- κ B has been largely explored and otherwise proposed as a drug target to overcome gemcitabine resistance (28). To explore whether *DUSP11* could be modulating NF- κ B activation, we submitted MIA PaCa-2 cells to *DUSP11* knockdown and treated with gemcitabine for up to 48 hours ($IC_{50}=16\mu\text{M}$). As observed in Fig. 3b,

DUSP11 inhibition alone completely blocked NF- κ B phosphorylation. The same phenotype was maintained upon gemcitabine treatment. Additionally, CCLE analysis in 20 pancreatic cancer cell lines (Table S3) also showed a strong Pearson correlation between *DUSP11* mRNA expression and NF- κ B protein expression (Fig. 3c). Altogether, these findings revealed that DUSP11 can modulate the NF- κ B pathway to control drug response.

As aforementioned, the NF- κ B pathway is widely known to regulate gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer cells, which can occur through multiple mechanisms (28). Given that DUSP11 is an atypical phosphatase targeting 5'-triphosphorylated RNAs (23), we hypothesized that NF- κ B signaling modulation by DUSP11 would probably occur as an indirect effect. It has been previously shown that one of the possible targets of DUSP11 are small non-coding RNA components of giant ribonucleoprotein particles (RNPs) known as vault RNAs (vtRNA) (29). In the DUSP11-mediated process, vtRNAs are converted from 5'-triphosphorylated to monophosphorylated state, which can alter their stability and consequently, their abundance (25). These non-coding RNAs occur in humans as four vtRNA paralogs (vtRNA1-1, vtRNA1-2, vtRNA1-3, vtRNA2-1) and have been related to several mechanisms, including anticancer drug resistance (30). To investigate whether DUSP11 could be modulating vtRNAs in the PDAC context, we analyzed the vtRNAs transcripts abundance in MIA PaCa-2 DUSP11^{-/-} cells. We observed that all vtRNAs transcripts had been significantly increased compared to wild type cells, particularly vtRNA2-1, which had a 4-fold increase in transcript abundance (Fig. 3d). Supporting this data, CCLE analysis of pancreatic cancer cell lines also showed a negative Pearson correlation between *DUSP11* expression and vtRNA2-1 absolute abundance ($R = -0.40$; $P < 0.01$) reinforcing this interaction (Fig. 3e, Table S4). This data raises the question of whether DUSP11 could be modulating gemcitabine resistance through a vtRNA mediating mechanism.

Potential mechanisms of vault RNAs function have been proposed, however, vtRNA-mediated drug resistance remains largely unknown. Interestingly, vtRNA 2-1 (also named nc-886) expression has been suggested to interact with PKR (an interferon-inducible and double-stranded RNA (dsRNA)-dependent kinase) to inhibit its phosphorylation and consequently impair downstream targets (31). One of the downstream pathways regulated by PKR is the NF- κ B pathway, in which activation relies on PKR activity (32). Curiously, when analyzing the CCLE database of 20 pancreatic cancer cell lines (Table S5), we observed a negative correlation between vtRNA2-1 absolute abundance and PKR protein expression (Fig. 3f, Pearson $R = -0.62$; $P = 0.003$) suggesting that vtRNA2-1 can indeed control PKR expression. Interestingly, *DUSP11* transcripts levels also have a strong correlation with *EIF2AK2* (PKR coding gene) in both TCGA data and pancreatic cancer cell lines from CCLE (Supplementary Fig. S5 a-b; Table S6). Although these data assess RNA and not protein expression, they suggest that DUSP11 can impact PKR in human PDAC. In the context herein investigated, however, we currently do not know the precise features of DUSP11-vtRNA2-1 interaction that would determine NF- κ B modulation. We envisage whether vtRNA2-1 would either bind directly to NF- κ B or an upstream target such as PKR, but this feature remains to be investigated.

In conclusion, our data reports, for the first time, the role of the atypical RNA phosphatase DUSP11 in pancreatic cancer cells and sheds new light on novel mechanisms that may play an important role in gemcitabine response. This study brings new promising avenues for a better understanding of DUSP11 in both RNA biology and cancer-related field.

4. References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74(11):2913-21.
3. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1817-25.
4. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, et al. Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother.* 2010;33(8):828-33.
5. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-65.
6. Le DT, Picozzi VJ, Ko AH, Wainberg ZA, Kindler H, Wang-Gillam A, et al. Results from a Phase IIb, Randomized, Multicenter Study of GVAX Pancreas and CRS-207 Compared with Chemotherapy in Adults with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (ECLIPSE Study). *Clin Cancer Res.* 2019;25(18):5493-502.
7. Liang C, Shi S, Meng Q, Liang D, Ji S, Zhang B, et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Exp Mol Med.* 2017;49(12):e406.
8. Ju HQ, Gocho T, Aguilar M, Wu M, Zhuang ZN, Fu J, et al. Mechanisms of Overcoming Intrinsic Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through the Redox Modulation. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(3):788-98.
9. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 2009;324(5933):1457-61.
10. Li W, Zhu Y, Zhang K, Yu X, Lin H, Wu W, et al. PROM2 promotes gemcitabine chemoresistance via activating the Akt signaling pathway in pancreatic cancer. *Exp Mol Med.* 2020;52(3):409-22.
11. Lou C, Lu H, Ma Z, Liu C, Zhang Y. Ginkgolide B enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines via inhibiting PAFR/NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:563-72.
12. Li Y, Xi Z, Chen X, Cai S, Liang C, Wang Z, et al. Natural compound Oblongifolin C confers gemcitabine resistance in pancreatic cancer by downregulating Src/MAPK/ERK pathways. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):538.
13. Bermudez O, Pagès G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(2):C189-202.
14. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004;117(6):699-711.
15. Ruckert MT, de Andrade PV, Santos VS, Silveira VS. Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(13):2571-92.
16. Huanwen, W., et al., Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines, in *Mol Cancer.* 2009. p. 125.
17. Folkerts, H., et al., Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wild-type acute myeloid leukemia, in *Cell Death Dis.* 2017. p. e2927-.

18. Chen J, OuYang H, An X, Liu S. Vault RNAs partially induces drug resistance of human tumor cells MCF-7 by binding to the RNA/DNA-binding protein PSF and inducing oncogene GAGE6. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191325.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
20. Consortium G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013;45(6):580-5.
21. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repečka K, McDade F, Kamath A, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):675-8.
22. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W98-W102.
23. Yuan Y, Li DM, Sun H. PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA-ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*. 1998;273(32):20347-53.
24. Deshpande T, Takagi T, Hao L, Buratowski S, Charbonneau H. Human PIR1 of the protein-tyrosine phosphatase superfamily has RNA 5'-triphosphatase and diphosphatase activities. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16590-4.
25. Burke JM, Sullivan CS. DUSP11 - An RNA phosphatase that regulates host and viral non-coding RNAs in mammalian cells. *RNA Biol*. 2017;14(11):1457-65.
26. Li Q, Yang G, Feng M, Zheng S, Cao Z, Qiu J, et al. NF- κ B in pancreatic cancer: Its key role in chemoresistance. *Cancer Lett*. 2018;421:127-34.
27. Skrypek N, Duchêne B, Hebbar M, Leteurtre E, van Seuninghen I, Jonckheere N. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene*. 2013;32(13):1714-23.
28. Pramanik KC, Makena MR, Bhowmick K, Pandey MK. Advancement of NF- κ B Signaling Pathway: A Novel Target in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
29. Kedersha NL, Rome LH. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol*. 1986;103(3):699-709.
30. Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem*. 1998;273(15):8971-4.
31. Kunkeaw N, Jeon SH, Lee K, Johnson BH, Tanasanvimon S, Javle M, et al. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2013;32(32):3722-31.
32. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem*. 2010;336(1-2):25-37.

Figure Legends

Figure 1. **a)** Schematic view of gemcitabine (GEM) resistance screening using CRISPR/Cas9; **b)** Scatter plot showing the top candidates among tested DUSPs on GEM cytotoxic effect in MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines. Data highlights DUSP11 knockout performance promoting increased cytotoxicity. Results represents the mean of two independent experiments with four biological replicates each; **c)** *In silico* analysis shows expression level of *DUSP11* was closely correlated with TNM stage (TNM II and TNM IV presented the higher *DUSP11* expression levels; $P < 0.02$); **d)** Kaplan–Meier survival curve analysis showing the correlation between the *DUSP11* upregulation and overall survival rates (Log-rank $P = 0.032$). Statistical significance: ** $P \leq 0.01$.

Figure 2. **a)** Correlation plot shows *DUSP11* expression correlation with GEM sensitivity in 5 PDAC cell lines ($R = -0.897$; $P = 0.03$); **b)** DUSP11 knockout impaired cell viability and significantly reduced GEM IC_{50} value from $16\mu\text{M}$ (wild type cells) to $6.45\mu\text{M}$ in both crRNAs; **c)** Representative graph and images of cell colonies in WT and *DUSP11*^{-/-} cells treated with GEM at IC_{30} ($2.95\mu\text{M}$) or vehicle; **d)** *DUSP11*-depleted cells exhibited sensitivity to GEM after GEM treatment at IC_{50} . All *in vitro* experiments were performed in two independent experiments with three replicates each and results are expressed as mean \pm SD. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, n.s: not significant.

Figure 3. **a)** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for Gene Ontology (GO) biological processes reveals NF- κ B signalling pathway as one of the top enriched biological process correlated to high *DUSP11* expression (Normalized enrichment score=1.98; FDR=0; $P=0$); **b)** Correlation plot illustrates *DUSP11* expression positively correlated with NF- κ B relative protein expression in CCLE Proteomics dataset ($R = 0.77$; $P < 0.001$); **c)** Immunoblotting analysis reveals that *DUSP11* inhibition completely blocked NF- κ B phosphorylation and the phenotype was sustained under GEM treatment; **d)** Vault RNAs (vtRNAs) expression show how the 4 vtRNAs paralogs are significantly upregulated in *DUSP11*^{-/-} cells compared to wild type cells. Correlation plots show vtRNA absolute copy number correlation with *DUSP11* expression (**e**) and *PKR* protein expression (**f**) in PDAC cell lines. Detailed information on cell lines are described in Supplementary Tables S4 and S5.

Figure 1.

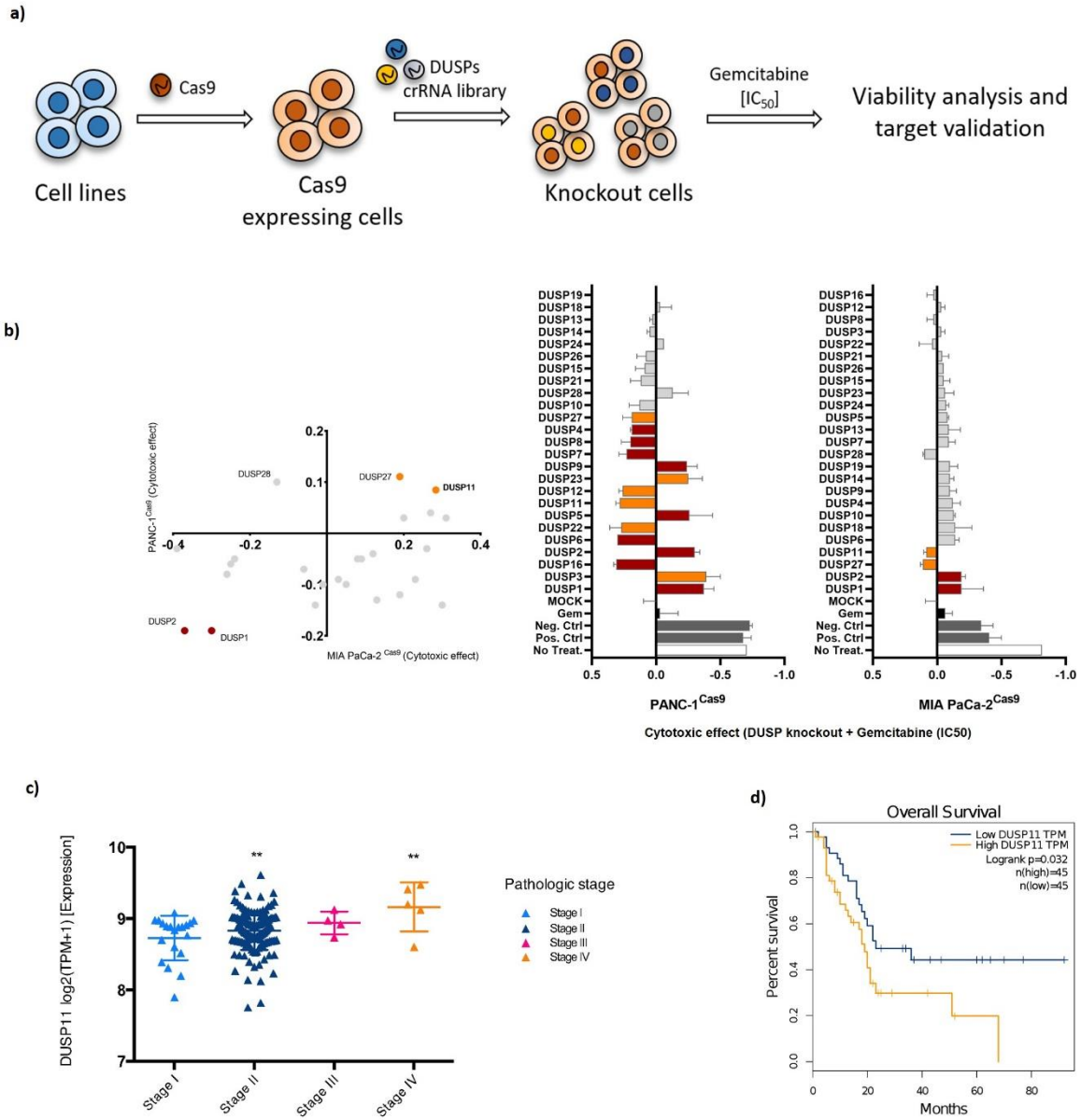


Figure 2.

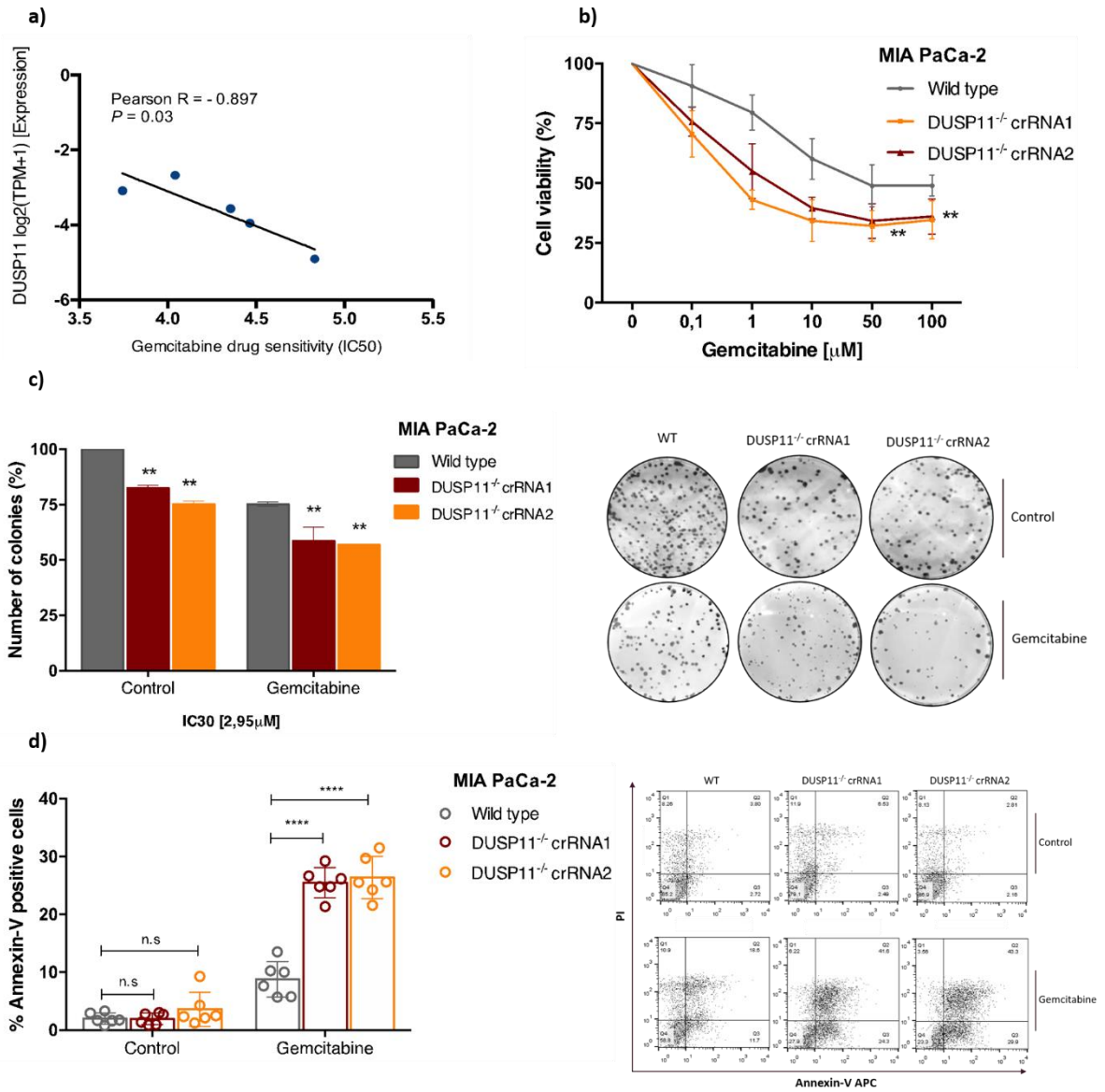


Figure 3.

