

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

VERENA SILVA SANTOS

**Fosfatase atípica DUSP11 regula a morte celular induzida pela gemcitabina por meio
da ativação da via NF- κ B em células de carcinoma pancreático**

Ribeirão Preto -SP

2022

VERENA SILVA SANTOS

Fosfatase atípica DUSP11 regula a morte celular induzida pela gemcitabina por meio da ativação da via NF- κ B em células de carcinoma pancreático

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

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

Ribeirão Preto - SP

2022

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.

Santos, Verena Silva

“Fosfatase atípica DUSP11 regula a morte celular induzida pela gemcitabina por meio da ativação da via NF- κ B em células de carcinoma pancreático.

Ribeirão Preto, 2022.

f. : 90il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

1. PALAVRAS-CHAVE: Adenocarcinoma ductal pancreático, gemcitabina, DUSP11, vaultRNA, quimiorresistência.

Apoio e Suporte Financeiro

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

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

VERENA SILVA SANTOS

Fosfatase atípica DUSP11 regula a morte celular induzida pela gemcitabina por meio da ativação da via NF- κ B em células de carcinoma pancreático

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

Área de concentração: Genética

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa D'Ávila.

AGRADECIMENTOS

Tudo o que acontece em minha vida, primeiro agradeço a Deus. Seja por coisas boas ou por momentos não tão bons. Tudo eu devo à Ele! E, com certeza, este é mais um momento para eu agradecer. Por ter sido minha força quando mais precisei, por ter me dado sabedoria para enfrentar todo processo e por me permitir finalizar este Doutorado.

Também agradeço a Ele por ter colocado as melhores pessoas em minha vida. A começar por Vanessa, minha orientadora. Eu entrei na pós-graduação com uma mente, com um jeito, precisando muito aprender. E ainda preciso! E Vanessa teve toda paciência em me passar muitas coisas. Com seu jeito humano, que a diferencia de muitos orientadores que já vi, ela pode me proporcionar muitos ensinamentos. Confiou em mim quando precisou e foi, por muitas vezes, alguém com quem pude contar e confiar.

Além dela, não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, à Rosane, Veridiana e à Beth, que pertencem ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por cederem o espaço do Laboratório para que eu pudesse desenvolver parte do meu trabalho e deram todo apoio e carinho quando precisei. À Rosane, principalmente, que não mediu esforços para que eu concluísse meus experimentos, mesmo com poucos recursos financeiros. Agradeço também a todos os alunos que fazem e fizeram parte desse grupo de pesquisa. A amizade, o compartilhamento de conhecimento e a ajuda de vocês foram essenciais!

À Pamela, Mariana, Gabriela, Ilze e Bruno: o LabOEx com certeza não teria a mesma graça sem vocês. Trabalhar com quem a gente gosta torna tudo mais fácil e agradeço a vocês pela amizade, parceria e boas risadas durante todo percurso.

Ao Márcio, nosso técnico do LabOEx, por todas as conversas, desabafos, risadas e apoio que me deste. E à Rosana, pelo carinho e atenção.

Além desses que foram minha família em Ribeirão Preto, preciso agradecer à minha primeira família. À minha mãe, Vera, que é minha motivação para eu ir atrás dos

meus objetivos. Ao meu pai, que mesmo distante, me fez perseverar no que eu queria. A meu esposo, Diego, que me deu toda força para eu ingressar na pós-graduação e foi meu grande parceiro durante esses seis anos à distância. E agora formamos uma família com a chegada da nossa pequena Liz. Aos meus sogros, cunhada, tios, tias, primos...nem dá para citar o nome de todos, pois são muitas pessoas para agradecer.

Esta jornada sem amigos também não seria fácil. Por isso, vos agradeço pela amizade e compreensão diante da minha ausência e por me ouvirem sempre que precisei. Agradeço também aos amigos e colegas que foram afago em Ribeirão Preto. Em especial, à Letícia, com quem morei desde que cheguei na cidade e firmamos uma amizade que perdura mesmo à distância. Também agradeço ao Max, Romário, Thiago e Fábio, pessoas especiais com quem pude contar e dividir a vida durante a pós-graduação. À Karina, por todo carinho, conhecimento e ajuda que me deste. À Manuela, Alcides, Luciana, Ricardo, Jéssica, Vitor, Marina, Mariana, Graziela, Larwsk, Luiz Gabriel, Luis Nagano e Milena – pessoas que me abraçaram quando retornei ao GPOMP, e deixaram minha vida mais leve, principalmente por causa do nosso grupo de vôlei.

A todas as funcionárias dos Laboratórios de Pediatria do Hospital das Clínicas (FMRP-USP).

À Susie Nalon, secretária do Departamento de Genética (FMRP – USP).

Às Agências de Fomento FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito, muito obrigada!

RESUMO

SANTOS, V. S. “Fosfatase atípica DUSP11 regula a morte celular induzida pela gemcitabina por meio da ativação da via NF- κ B em células de carcinoma pancreático.” 2022, 90 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 neoplasia maligna mais frequente do pâncreas e representa uma das formas mais letais de câncer, com uma sobrevida global de 5 anos inferior a 10%. Dentre os fatores que influenciam na baixa taxa de sobrevida, inclui o grau de resistência tumoral aos tratamentos disponíveis. O fármaco mais utilizado no tratamento do ADP é a gemcitabina. No entanto, a resistência celular dificulta a eficiência do tratamento. A ativação de vias de sinalização pode ser crucial na quimiorresistência das células à gemcitabina. O controle de ativação dessas vias pode ser orquestrado por mecanismos de *feedback* negativo, com a atividade de proteínas fosfatases, como as proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs). O papel das DUSPs na quimiorresistência do ADP ainda permanece pouco explorado e, a fim de melhor compreender, nosso grupo de pesquisa identificou, utilizando um *screening in vitro* mediado por CRISPR, a fosfatase atípica DUSP11 como um potencial alvo candidato, cuja inibição criou uma vulnerabilidade das células de ADP à gemcitabina. No entanto, o mecanismo molecular mediado pela DUSP11 na resposta à gemcitabina precisa ser elucidado. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo envolvido na modulação da resposta à gemcitabina pela proteína fosfatase DUSP11. Inicialmente foi avaliado a relevância clínica da expressão gênica de *DUSP11* e o efeito da modulação em ensaios funcionais. A análise *in silico* de RNA-seq de amostras de ADP foi utilizada para investigar o mecanismo molecular modulado de acordo a expressão de *DUSP11*, seguido de validação funcional *in vitro* do mecanismo identificado. Os resultados mostraram que *DUSP11* é mais expresso em amostras tumorais tanto de ADP quanto de outros tipos de neoplasias. Além disso, a modulação gênica de *DUSP11* reduziu a viabilidade celular e promoveu um aumento nas taxas de apoptose frente à gemcitabina. Na análise do transcriptoma, a via do NF- κ B foi correlacionada com a expressão de *DUSP11*. *In vitro*, a fosforilação de NF- κ B foi induzida pela gemcitabina, mas foi bloqueada após inibição de DUSP11. Por fim, tentamos identificar quais moléculas seriam direcionadas por DUSP11 para regular a ativação de NF- κ B. Identificamos um aumento significativo na expressão dos RNAs não codificadores, vault RNAs, especialmente do vaultRNA 2-1, em células com inibição de DUSP11. Esse vtRNA regula a ativação da proteína quinase PKR, que tem como alvo *downstream* a via do NF- κ B. Observamos uma redução da atividade de PKR em células com inibição de DUSP11, mesmo diante do tratamento com gemcitabina. Em conclusão, nossos achados mostram DUSP11 como um potencial alvo na resposta celular à gemcitabina em ADP, por modular a via do NF- κ B, mediado pela ação do vaultRNA 2-1.

Palavras-chave: Adenocarcinoma ductal pancreático, gemcitabina, DUSP11, vaultRNA, quimiorresistência.

ABSTRACT

SANTOS, V. S. " **Atypical phosphatase DUSP11 regulates gemcitabine-induced cell death through activation of the NF- κ B pathway in pancreatic carcinoma cells.**" 2022. 90 p. Doctoral Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most frequent malignant neoplasm of the pancreas and represents one of the most lethal forms of cancer, with an overall 5-year survival rate of less than 10%. Among the factors that influence the low survival rate, it includes the degree of tumor resistance to available treatments. The drug most used in the treatment of PDAC is gemcitabine. However, cellular resistance hinders the efficiency of the treatment. Activation of signaling pathways may be crucial in the chemoresistance of cells to gemcitabine. The activation control of these pathways can be orchestrated by negative feedback mechanisms, with the activity of protein phosphatases, such as dual-specificity phosphatases (DUSPs). The role of DUSPs in PDAC chemoresistance remains poorly explored and, in order to better understand, our research group identified, using a CRISPR-mediated *in vitro* screening, the atypical phosphatase DUSP11 as a potential candidate target, whose inhibition created a vulnerability from PDAC cells to gemcitabine. However, the molecular mechanism mediated by DUSP11 in the response to gemcitabine needs to be elucidated. Therefore, the aim of this work was to investigate the mechanism involved in the modulation of the response to gemcitabine by the DUSP11 protein phosphatase. Initially, the clinical relevance of *DUSP11* gene expression and the effect of modulation in functional assays were evaluated. *In silico* analysis of RNA-seq from PDAC samples was used to investigate the molecular mechanism modulated according to *DUSP11* expression, followed by *in vitro* functional validation of the identified mechanism. The results showed that *DUSP11* is more expressed in tumor samples of both PDAC and other types of neoplasms. In addition, *DUSP11* gene modulation reduced cell viability and promoted an increase in apoptosis rates against gemcitabine. In transcriptome analysis, the NF- κ B pathway was correlated with *DUSP11* expression. *In vitro*, NF- κ B phosphorylation was induced by gemcitabine, but was blocked after DUSP11 inhibition. Finally, we tried to identify which molecules would be targeted by DUSP11 to regulate NF- κ B activation. We identified a significant increase in the expression of non-coding RNAs, vault RNAs, especially vaultRNA 2-1, in DUSP11-inhibited cells. This vtRNA regulates the activation of the PKR protein kinase, which targets the NF- κ B pathway downstream. We observed a reduction in PKR activity in cells with DUSP11 inhibition, even with gemcitabine treatment. In conclusion, our findings show DUSP11 as a potential target in the cellular response to gemcitabine in PDAC, by modulating the NF- κ B pathway, mediated by the action of vaultRNA 2-1.

Keywords: Pancreatic ductal adenocarcinoma, gemcitabine, DUSP11, vaultRNA, chemoresistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma ductal pancreático conforme acúmulo de alterações genéticas.	20
Figura 2. Classificação das proteínas fosfatases à base de cisteína.	25
Figura 3. Modelo estrutural das proteínas DUSPs.	26
Figura 4. Modelo do papel de DUSP11 e efeito no status de fosforilação nos RNAs.	28
Figura 5. Fluxograma de atividades realizadas no estudo.	32
Figura 6. Análise do perfil transcricional de <i>DUSP11</i> em diferentes tumores.	40
Figura 7. Análise de expressão gênica de <i>DUSP11</i> em amostras de ADP.	41
Figura 8. A expressão de <i>DUSP11</i> pode sugerir um pior prognóstico.	42
Figura 9. Perfil de expressão proteica de DUSP11 em linhagens celulares.	43
Figura 10. Análise de viabilidade celular com gemcitabina em linhagens celulares.	44
Figura 11. Análise de correlação entre o efeito de DUSP11 e a resposta à gemcitabina.	44
Figura 12. Análise de viabilidade celular com gemcitabina em modelo nocaute para DUSP11.	45
Figura 13. Viabilidade celular com gemcitabina em modelo de cultura celular 3D.	46
Figura 14. Análise da modulação de DUSP11 sobre a morte celular por apoptose.	47
Figura 15. Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA).	48
Figura 16. Análise proteica de ativação da via do NF-κB.	49
Figura 17. Localização subcelular de DUSP11.	50
Figura 18. Expressão dos vaultRNAs na linhagem MIA PaCa-2.	51
Figura 19. Correlação de DUSP11 com o vtRNA2-1 (nc886).	52
Figura 20. Expressão do nc886 diante do tratamento com gemcitabina.	53
Figura 21. Silenciamento do nc886 na linhagem MIA PaCa-2 DUSP11 KD e ensaio e viabilidade celular.	53
Figura 22. Ensaio de atividade enzimática para avaliar a proteína PKR.	54
Figura 23. Esquema do modelo proposto para a morte celular induzida por gemcitabina mediada por DUSP11.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas e suas características.	33
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados para análise de expressão gênica.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
APC	Alofocianina
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
CO ₂	Dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultivo celular)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
PI	Iodeto de propídio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
miRNA	microRNA
NIP	Neoplasia intraductal pancreática
NRAS/KRAS/HRAS	Proteínas homólogas codificadas pelo oncogene RAS
PBS	Tampão fosfato salino
PTPs	proteínas tirosino fosfatases
RIPA	Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SBF	Soro bovino fetal
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBST	Tampão Tris-salino acrescido de Tween 20

SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
cm ²	Centrímetros quadrados
kDa	Kilodalton
mL	Mililitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
<i>p</i>	Probabilidade de significância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático.....	18
1.3. Classificação molecular.....	20
1.4. Padrões atuais e avanços no tratamento do ADP.....	21
1.5. Regulação de vias de sinalização e o papel das proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs).....	24
1.6. Atividade da Proteína Fosfatase de Dupla Especificidade 11 (DUSP11).....	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Delineamento experimental.....	32
3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo.....	32
3.3. Amostras de pacientes.....	33
3.4. Estabelecimento de modelo esferoide 3D.....	33
3.5. Ensaio de viabilidade celular.....	34
3.6. Produção de partículas lentivirais.....	34
3.7. Transdução lentiviral.....	34
3.8. Transfecção com siRNA.....	35
3.9. Ensaio de apoptose.....	35
3.10. Análise de imunofluorescência.....	35
3.11. Western blot.....	36
3.12. Análise de expressão gênica.....	36
3.13. Ensaio de atividade enzimática de PKR.....	37
3.14. Análises <i>in silico</i>	37
3.15. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Análise da expressão gênica de <i>DUSP11</i> em amostras de ADP	40
4.1.1. <i>DUSP11</i> é mais expresso em amostras tumorais comparado ao tecido normal.....	40
4.2. Análise da expressão proteica de <i>DUSP11</i> em linhagens celulares e de viabilidade celular com a gemcitabina	42
4.2.1. Linhagens com menores níveis proteicos de <i>DUSP11</i> respondem melhor ao tratamento.....	42

4.3.	Análise da modulação de DUSP11 sobre o tratamento em ADP	45
4.3.1.	Células com menores níveis de expressão de DUSP11 respondem melhor ao tratamento com gemcitabina	45
4.4.	Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (<i>Gene Set Enrichment Analysis - GSEA</i>)	47
4.4.1.	A via de sinalização NF- κ B é regulada diante da expressão de DUSP11	47
4.5.	DUSP11 regula a expressão de non-coding RNAs	49
4.5.1.	A expressão do non-coding RNA VaultRNA é modulada pela atividade de DUSP11	49
4.6.	Ensaio de atividade enzimática	54
4.6.1.	Atividade da proteína quinase PKR é reduzida após inibição de DUSP11	54
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÕES	64
7.	REFERÊNCIAS	66
8.	ANEXOS	78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é a neoplasia maligna mais prevalente do pâncreas, correspondendo a mais de 90% de todos os cânceres pancreáticos ¹. Até o momento, o ADP é a quarta causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer no mundo e, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o ADP representa cerca de 2% dos cânceres diagnosticados no Brasil, sendo responsável por 4% das mortes por câncer no País (www.inca.gov.br). Projeções indicam que a incidência e mortalidade de ADP aumente ainda mais no futuro, tornando-se a segunda principal causa de morte por câncer até 2030 ².

Uma razão particular desta projeção é a carência de alternativas terapêuticas mais eficazes para o tratamento do ADP. Mas, do ponto de vista etiológico, desafios de saúde pública como a obesidade e diabetes tipo 2, podem implicar nas maiores taxas de ADP ^{3,4}. A pancreatite crônica e hábitos de estilo de vida como abuso de álcool, tabagismo, hipertensão, dieta rica em colesterol e açúcar também contribuem no desenvolvimento do ADP, bem como em outros tipos de câncer ⁵. Algumas síndromes genéticas, como a síndrome de Peutz-Jeghers e a síndrome de Lynch, também aumentam o risco de desenvolvimento do ADP ⁶.

O ADP ocorre geralmente na cabeça do pâncreas e a maioria dos pacientes são assintomáticos, principalmente nos estágios iniciais da doença. Dentre os principais sintomas destacam: dor abdominal, náuseas, vômitos, quadros de anorexia e perda de peso. A falta de sintomas específicos e as limitações para detecção, conduzem os pacientes à um diagnóstico tardio e um prognóstico com taxa de sobrevivência em 5 anos inferior a 10% ⁷. O processo de desenvolvimento tumoral do ADP, a partir do evento mutacional com a formação de lesões precursoras até o estágio final da doença – disseminação metastática ao óbito do paciente, é estimado que dure de 10 a 30 anos ⁸. O conjunto de processos moleculares e os respectivos eventos celulares envolvidos com a progressão do ADP já são bem conhecidos dentre das principais características biológicas desta neoplasia, como abordados na seção seguinte.

1.2. Características biológicas e genéticas do ADP

O pâncreas é composto por células exócrinas (acinares), epiteliais (ducto) e endócrinas (ilhota de Langerhans)⁹. Os ácinos e os ductos correspondem a cerca de 80% da massa tecidual do órgão, produzem enzimas digestivas, e, no caso das células acinares, são também

conhecidas por seu alto grau de plasticidade - considerada como impulsionadora da homeostase e regeneração do pâncreas^{9,10}. As células endócrinas produzem e secretam os hormônios na corrente sanguínea como o glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, que atuam na homeostase da glicose^{9,11}.

Dentre as lesões que originam o câncer de pâncreas estão quatro lesões precursoras distintas: neoplasia mucinosa cística (NMC), neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI), neoplasia intraepitelial pancreática (NIP) e neoplasias papilares intraductais tubulares (NPITs). Tais lesões apresentam graus variados de displasia e o acúmulo gradual de alterações genéticas é o principal responsável por desencadear a progressão de lesões em estágio inicial benigno para o desenvolvimento de neoplasias malignas¹². A neoplasia intraepitelial pancreática (NIP) é a mais frequente na origem do ADP e, com base em análises histológicas, é classificada em três estágios de desenvolvimento tumoral (NIP-estágios 1-3)¹³.

O ADP surge da transformação das células ductais em neoplásicas, embora estudos tenham sugerido que outras células diferenciadas do pâncreas possam também originar este tipo de câncer¹⁴⁻¹⁶. Em um processo chamado metaplasia acinar-ductal, por exemplo, as células acinares passam por uma alteração reversível de diferenciação celular para um fenótipo mais epitelial (semelhantes às células ductais), em resposta à estímulos como dano tecidual, inflamação ou estresse^{15,16}. Durante esse processo, as células acinares ficam mais susceptíveis a mutações em proto-oncogenes, como por exemplo, no proto-oncogene *KRAS*, o que eventualmente pode transformá-las em neoplasias intraepiteliais pancreáticas (NIPs). As variantes *KRAS* ocorrem como passo inicial para desencadear o adenocarcinoma ductal pancreático (NIPs de baixo grau) e são identificados em cerca de 90% dos indivíduos com ADP¹⁷. Conforme as lesões NIP-1 adquirem novas alterações genéticas, ocorre a progressão para os estágios mais avançados e com maior grau de displasia. Outras mutações envolvendo a perda de função do gene supressor tumoral *CDKN2A* são frequentes em lesões NIP-2 (90%) e a inativação das proteínas p53 e SMAD4 também contribuem para a progressão do ADP e são encontradas em lesões NIP-3. Além destas, alterações em outros genes supressores tumorais e genes de reparo, como o *BRCA2*, podem estar envolvidas com a progressão e disseminação tumoral (**Figura 1**)¹⁸⁻²⁰.

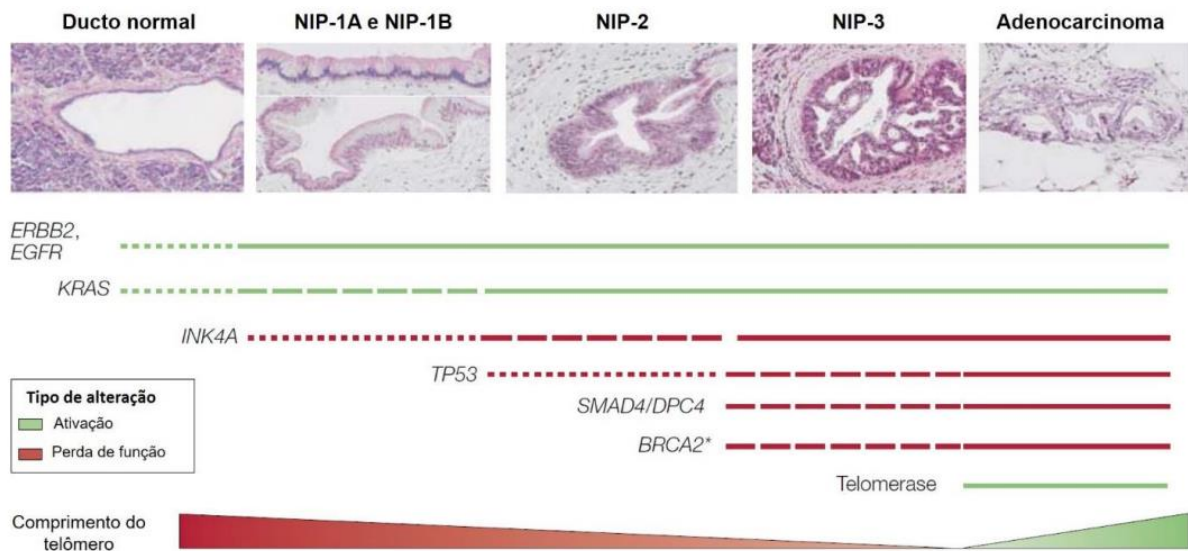


Figura 1. Modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma ductal pancreático conforme acúmulo de alterações genéticas. As alterações levam à uma ativação (linhas verdes) ou perda de função (linhas vermelhas) dos genes. NIP: neoplasia intraepitelial pancreática. Adaptado de Bardeesy e DePinho, 2002 .

É importante destacar que o perfil transcricional do ADP não é somente governado por alterações genéticas. Mecanismos epigenéticos como metilação de DNA e pós-traducional de histonas, além da regulação de RNAs não-codificadores, por exemplo, também são mecanismos de regulação da expressão gênica que ocorrem independente das alterações genéticas, implicando na progressão tumoral e formação de metástases ^{21,22}.

1.3. Classificação molecular

O adenocarcinoma pancreático é altamente heterogêneo e alguns estudos foram realizados na tentativa de definir subtipos distintos, com o objetivo de estratificar os pacientes para aplicação de estratégias terapêuticas ^{20,23-26}. As classificações utilizando transcriptomas foram extraídas por métodos de agrupamento não supervisionado e diferem no número de subtipos identificados. O primeiro grupo que classificou molecularmente o ADP foi Collisson e colaboradores, em 2011, ²⁴, na qual utilizaram amostras de ADP humanas, linhagens celulares humanas e murinas e chegou na ordenação dos subgrupos “clássico”; “quase-mesenchimal” e o “exócrino-like”. Logo em 2015, Moffitt e colaboradores ²⁵, também utilizando amostras de ADP sem tratamento, metastático e o que chamaram de “*bulk*” tumoral, classificaram o ADP subdividindo nos grupos “clássico” e “basal-like” e o estroma em “normal” ou “ativado”. Em 2016, Bailey e colaboradores ²³ estabeleceram uma classificação a partir de amostras

tumorais, na qual classificaram os grupos como “escamoso”, “progenitor pancreático”, “imunogênico” e o “ADEX (células aberrantes diferenciadas endócrinas e exócrinas)”. Mesmo sendo classificações distintas, elas apresentam semelhanças entre si e compartilham de subtipos comuns, sendo eles um subtipo clássico/canônico – caracterizado pela expressão de genes epiteliais, e um subtipo mesenquimal/basal – marcado por um padrão de expressão gênica mais mesenquimal e de pior prognóstico ²⁷. Algumas análises mostraram que essa estratificação tem potencial para a medicina genômica e possivelmente na adequação de tratamentos ²⁸. No entanto, apesar dos avanços relacionados à classificação molecular do ADP e sua aplicação clínica, os estudos estão em fases iniciais, sendo necessário, então, novas pesquisas para melhor entendimento e aplicação da classificação no prognóstico e tratamento dos pacientes.

1.4. Padrões atuais e avanços no tratamento do ADP

A eficácia e resultado do tratamento em pacientes com ADP são determinados pelo estadiamento do tumor ao diagnóstico. O estadiamento do ADP é baseado nos resultados de tomografia computadorizada e na classificação tumor-nódulo-metástase (TNM) ²⁹. Em resumo, os estágios I e II são considerados ressecáveis. Tumores em estágio II-III são ressecáveis limítrofes ou localmente avançados, o que envolve uma maior probabilidade de ressecção incompleta. Os tumores em estágio IV são considerados metastáticos, sendo assim, não ressecáveis ³⁰. O estadiamento preciso do tumor permite a adequação do tratamento aos pacientes com base no avanço da doença.

A ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia é a melhor alternativa terapêutica possivelmente curativa, mas apenas cerca de 20% dos pacientes apresentam ADP ressecável, enquanto os outros 80% apresentam um estágio tumoral avançado não ressecável ou, em sua maioria, com focos de metástase ³¹. Dessa forma, a quimioterapia é frequentemente a primeira escolha terapêutica e, embora proporcione um aumento na taxa de sobrevivência, os resultados ainda modestos, e a maioria dos pacientes eventualmente evoluem para quadros de resistência e/ou quadros graves de toxicidade ³².

O agente quimioterápico mais amplamente utilizado é a Gemcitabina (difluorodesoxicidina, dFdC), um análogo de nucleosídeo que, após ser ativado via fosforilação no citoplasma, é translocado para o núcleo e incorpora-se ao DNA, impedindo sua síntese ³³. O medicamento foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* - Estados Unidos

(FDA), em 1996, para tratamento do ADP ³⁴ e vários outros carcinomas ³⁵. Porém, o tratamento com gemcitabina aumenta a sobrevida dos pacientes com ADP por cerca de 6 meses, mostrando que novas alternativas são urgentemente necessárias ³⁶.

Esquemas alternativos de poliquimioterapia têm sido frequentemente testados buscando o aperfeiçoamento do tratamento e o aumento da taxa de sobrevida dos pacientes com ADP. A combinação de Gemcitabina com paclitaxel ligado à albumina (Nab-paclitaxel), melhorou o tempo de sobrevida comparado ao regime monoterápico com Gemcitabina e permanece uma das alternativas de conduta clínico ³⁷. Por outro lado, o regime FOLFIRINOX (5-Fluoracil, Leucovorina, Irinotecan e Oxaliplatina) também se apresenta mais eficaz no tratamento do ADP quando comparado com a Gemcitabina. Apesar de oferecer uma melhor taxa de sobrevida, o FOLFIRINOX é frequentemente associado à efeitos adversos graves e, normalmente descontinuado nestes casos ³⁸.

Para doença metastática, o tratamento varia e é avaliado com base no status de desempenho do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG PS), uma escala que mede como a doença afeta em habilidades de vida diária do paciente ³⁹. Pacientes classificados com ECOG PS de 0 (totalmente ativo) ou 1 (restrito em atividade física, mas capaz de realizar trabalhos de natureza leve), geralmente recebem FOLFIRINOX ou Gemcitabina com Nab-Paclitaxel como tratamento. Para pacientes com ECOG PS de 2 (capaz de cuidar de si, mas incapaz de realizar qualquer atividade laboral ou com alguma comorbidade) não é aplicado um regime mais agressivo, sendo a Gemcitabina recomendada em monoterapia ou em combinação com a Capecitabina ou Erlotinib, por exemplo. Para pacientes mais graves, classificados com ECOG PS de 3 (autocuidado limitado e confinado a uma cama ou cadeira) ou 4 (completamente incapacitado), a terapia paliativa aplicada pode variar caso a caso, sendo mais aplicado a Gemcitabina em regime monoterápico ^{40,41}.

Uma melhor compreensão da patologia do ADP pode permitir a investigação de novas modalidades de tratamento. Em alguns tipos de câncer, a exemplo do melanoma e câncer de pulmão, a aplicação de imunoterapia, especificamente a inibição do checkpoint imunológico, mostrou ter uma eficácia promissora ⁴²⁻⁴⁴. No entanto, até o momento, os resultados em ADP ainda não foram positivos ⁴⁵. Isso pode ser devido ao microambiente altamente imunossupressor e desmoplásico, bem como por outras características biológicas e imunológicas do ADP ⁴⁶. Ainda assim, novas modalidades utilizando um alvo molecular

direcionado e um agente citotóxico estão sob investigação e podem levar a melhores resultados ⁴⁷. Dentre os poucos exemplos, para pacientes com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o inibidor de PARP, Olaparib, foi eficaz especificamente em pacientes que não progrediram com a aplicação de quimioterapia ⁴⁸. Pacientes com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) também podem responder ao inibidor de checkpoint imunológico Pembrolizumab, como foi relatado no estudo de fase II KEYNOTE-158 ⁴⁹. Mas vale notar que cerca de 1% dos pacientes com ADP são MSI-H, e são casos de baixo grau, passíveis de ressecção cirúrgica ⁵⁰.

Abordagens de medicina de precisão para o ADP também estão sendo investigadas e podem ser promissoras, particularmente para pacientes com fusões nos genes *NTRK1-3* e *ROS1* ⁵¹. Como mostrou o estudo clínico STARTRK-2, pacientes com ADP e com fusão dos genes *TPR-NTRK* ou *SCL4-ROS1* apresentaram doença estável ao receberem o tratamento com Entrectinibe, um inibidor de ROS1 ^{52,53}. Também está sob investigação uma estratégia que usa exossomos carregados com pequenos RNAs de interferência contra o gene *KRAS*^{G12D}, a mutação mais comum de *KRAS* no ADP, o que vem apresentando resultados pré-clínicos encorajadores ⁵⁴.

O tratamento do ADP ainda é um desafio clínico e, mesmo diante da baixa eficácia do tratamento, causada principalmente pelos altos índices de resistência e pela falta de terapias mais eficazes, a gemcitabina permanece sendo a principal estratégia para o tratamento dos pacientes por causar menores taxas de efeitos adversos ⁵⁵. Uma característica do ADP é seu alto grau de resistência contra as terapias ⁵⁶⁻⁵⁸. Assim, driblar esse fator é essencial para uma melhor resposta de tratamento e melhorar o prognóstico dessa neoplasia. O sucesso terapêutico da quimioterapia envolvendo gemcitabina, por exemplo, é fortemente limitado por fatores intrínsecos e pela quimiorresistência, mecanismos esses que precisam ser melhor compreendidos ⁵⁹. A resistência inerente e adquirida à gemcitabina é multifatorial e relacionada ao seu transporte, ativação e metabolismo que são regulados por várias vias como resultado da interação entre as células cancerígenas, o microambiente tumoral e a droga ^{60,61}. As vias intrínsecas e extrínsecas de resistência foram amplamente investigadas no ADP ⁶²⁻⁶⁴ e ilustram como o cenário mutacional do ADP - promovendo a ativação de vias moleculares como PI3K/Akt, NF-κB e MAPK - podem levar à quimiorresistência à gemcitabina ⁶⁵⁻⁶⁷.

O controle de ativação dessas vias é normalmente mediado por mecanismos de *feedback* negativo orquestrado por proteínas fosfatases, a exemplo das proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs – *dual-specificity phosphatase*). Nesse contexto, conhecer a atividade dessas proteínas sobre a modulação de vias de sinalização essenciais para o desenvolvimento tumoral pode colaborar para o entendimento dos fatores que permeiam a resistência do ADP ao tratamento com gemcitabina.

1.5. Regulação de vias de sinalização e o papel das proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs)

A ativação de vias de sinalização é um processo complexo que envolve loops de *feedback* e interação entre vias de sinalização, mediado principalmente por modificações pós-traducionais, como fosforilação – feita pelas proteínas tirosina quinases (PTK), e desfosforilação – com atuação das proteínas tirosina fosfatases (PTP) ⁶⁸. Já foram descritas mais de 100 diferentes proteínas fosfatases, que, de acordo a sequência de aminoácidos de seus domínios catalíticos, são agrupadas em três famílias: fosfatases à base de cisteína, que são subdivididas em classes I, II e III; fosfatases à base de aspartato; e fosfatases à base de histidina ⁶⁹.

As fosfatases à base de cisteína representam a maioria dentre as famílias, sendo as PTPs da classe I considerado o grupo mais extenso (**Figura 2**). Dentro desta classe, ainda há uma subclassificação em seis grupos menores, na qual o grupo das proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) contemplam 64 membros. Essas fosfatases apresentam diferentes substratos de ligação, como tirosina, serina e treonina além de lipídios sinalizadores, como fosfoinosítídeos, carboidratos complexos e até RNA ⁷⁰.

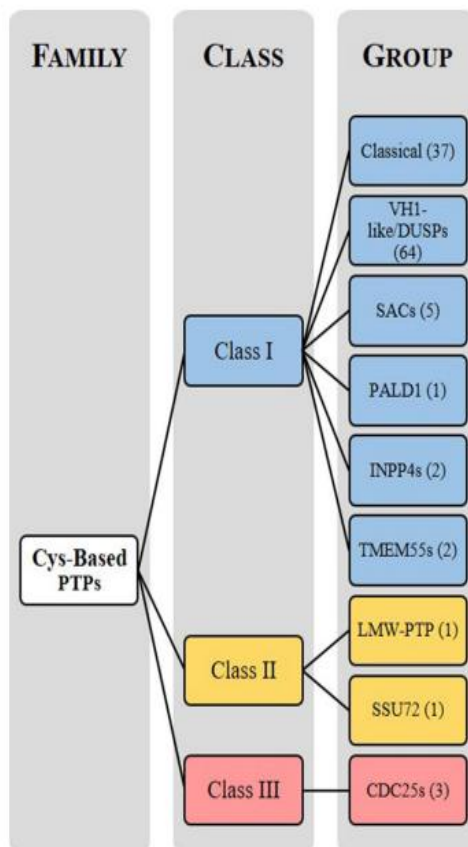


Figura 2. Classificação das proteínas fosfatases à base de cisteína. Essa família é subdividida em três classes e subgrupos. Os números entre parênteses representam o número de proteínas em cada grupo. Figura retirada de Ruckert et al, 2019.

As proteínas DUSPs podem estruturalmente conter um domínio conservado não catalítico N-terminal e uma extremidade catalítica COOH-terminal. Algumas dessas proteínas fosfatases de dupla especificidade possuem uma região N-terminal com clusters de aminoácidos denominados de domínio de ligação MAP quinase (MKB), que interage com o domínio comum das MAP quinases (MAPKs) - ERK, JNK e p38 - para mediar a interação enzima-substrato ⁷⁰, sendo assim nomeadas com DUSPs típicas. Ainda podem ser agrupadas em DUSPs atípicas, aquelas que não possuem no domínio N-terminal a presença do domínio MKB (**Figura 3**). Apesar de não possuírem esse domínio característico, essas DUSPs podem ter como alvo as MAPKs, bem como proteínas *upstream* a elas. Além dos subgrupos principais - típicos e atípicos, existem outros que classificam as DUSPs, como os subgrupos *slingshot protein phosphatases*, *protein tyrosine phosphatase 4A*, *CDC14 phosphatases* e *PTEN protein phosphatases*. Funcionalmente, as DUSPs podem desfosforilar os resíduos específicos de seus substratos, atuando assim como potenciais reguladores negativos ⁷¹.

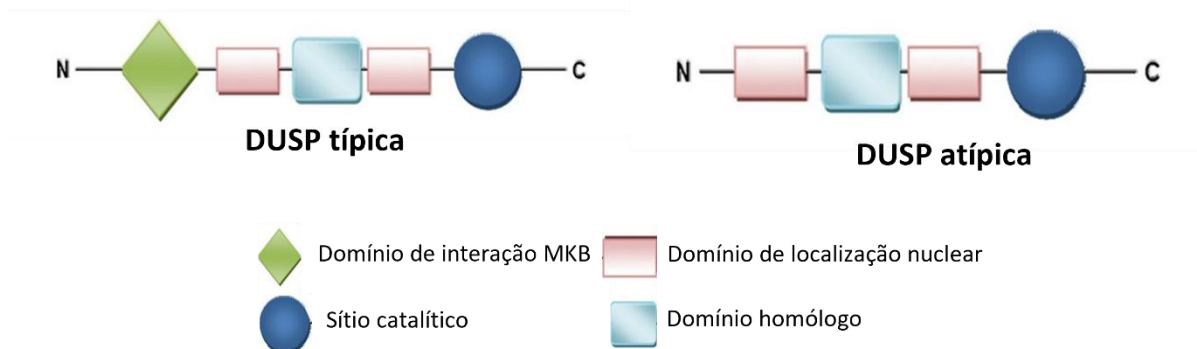


Figura 3. Modelo estrutural das proteínas DUSPs. As DUSPs típicas e atípicas se diferenciam pela presença do domínio MKB de ligação às MAP quinases, representado na imagem pela estrutura em verde. Adaptado de Kondoh e Nishida, 2007.

As DUSPs surgiram como alvos importantes na transformação de células malignas devido à sua especificidade de substrato, localização subcelular e espaço-temporal. Essas fosfatases podem ajustar com precisão a transdução de sinal de eventos críticos, como proliferação celular, crescimento, sobrevivência, metabolismo, diferenciação, morte celular e resposta a drogas ⁶⁸. No contexto do ADP, uma revisão do nosso grupo resumiu recentemente os achados mais relevantes relacionados à função das DUSPs ⁷². No entanto, seu papel paradoxo na tumorigênese, exibindo características supressoras de tumor ou oncogênicas, ainda precisa ser elucidado. Nosso grupo também investigou, utilizando um *screening in vitro* mediado por CRISPR, quais fosfatases poderiam modular e/ou promover vulnerabilidade das células de ADP à gemcitabina, na qual identificamos a fosfatase atípica DUSP11 como um potencial candidato, cuja inibição cria vulnerabilidade das células de ADP à gemcitabina (Anexo 1A-B)(Dados disponíveis em: <https://doi.org/10.11606/T.17.2021.tde-04082021-130011>).

1.6. Atividade da Proteína Fosfatase de Dupla Especificidade 11 (DUSP11)

A proteína DUSP11 faz parte do subgrupo de DUSPs atípicas, composto por 16 membros ⁶⁹. As DUSPs atípicas são assim chamadas por não compartilharem do domínio MKB de ligação às MAP quinases. Com isso, os substratos, funções celulares e papéis fisiológicos das DUSPs atípicas são pouco conhecidos e são provavelmente diversos.

DUSP11 foi primeiro descrita em 1998 por Yuan e colaboradores, na qual descreveram sua associação de alta afinidade com RNA *in vitro*. Isso explica seu nome alternativo conhecido como PIR1 (fosfatase que interage com o complexo RNA-ribonucleoproteína - *phosphatase*

interacting with RNA and ribonucleoprotein 1)⁷³. DUSP11 compartilha extensa homologia de sequência com uma fosfatase de RNA bem estudada, a Baculovírus fosfatase (BVP), do que com outras proteínas fosfatases e, até o momento, é a única DUSP atípica que possui como substrato específico RNAs fosforilados⁷³. Foi demonstrado que DUSP11 remove o γ - e β -fosfatos de RNA 5'-trifosforilado *in vitro*, com uma seletividade de ligação a RNAs fosforilados superior à ligação a substratos fosfoproteicos, implicando que a desfosforilação dos substratos de RNA pode ser fisiologicamente relevante⁷⁴. Os transcritos gerados pelas RNAs polimerases contêm inicialmente um 5' trifosfato, que dificultam o acesso a exonucleases^{75,76}. Portanto, o controle dessa fosforilação é importante para manter os níveis dos RNAs. As extremidades 5' trifosforiladas de mRNAs, que são transcritos pela RNA polimerase II, são substituídas pela estrutura "cap"⁷⁷. No entanto, como essa trifosforilação dos transcritos de RNAP I e RNAP III são regulados permanece pouco compreendido.

Do ponto de vista molecular, a modulação de DUSP11 tende a não alterar o processamento do RNA mensageiro. No entanto, já foi observado uma alteração nos transcritos pela RNA polimerase III, como os miRNAs, Alu RNAs e vault RNAs após a inibição de DUSP11 *in vitro*⁷⁸. Apesar dessa afinidade por essa classe de transcritos, DUSP11 tende a não atuar nos miRNAs, pois, muitos deles são 5'-monofosforilados como resultado do processamento pela Drosha e Dicer em mamíferos. Mas sim, maior ligação com os vault RNAs e Alu RNAs, que são 5'-trifosforilados para proteção contra a ação de exonucleases e controle da estabilidade^{78,79} (**Figura 4**).

Aspectos da biologia de DUSP11 permanecem pouco conhecidos, incluindo com quais complexos DUSP11 se associa, seus substratos e seu papel, principalmente sobre doenças. Assim, no contexto da biologia tumoral, a atividade de DUSP11 necessita de melhor compreensão. Evidências indicaram DUSP11 como participante da progressão tumoral^{80,81}, mas suas funções e mecanismos no câncer, especialmente no câncer de pâncreas e relacionado à tratamento, ainda não foram bem estudadas. Como supracitado, dados anteriores obtidos pelo grupo identificaram que a inibição de DUSP11 sensibiliza linhagens celulares de ADP frente ao tratamento com gemcitabina, mostrando que a DUSP11 pode atuar como potencial alvo terapêutico (Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.17.2018.tde-29092022-092407>). No entanto, o mecanismo molecular que controla a atividade dessa fosfatase na resposta à gemcitabina ainda precisa ser elucidado. Desse modo, a hipótese deste

trabalho é que DUSP11 modula a quimiorresistência à gemcitabina, por meio da regulação de RNAs não-codificantes.

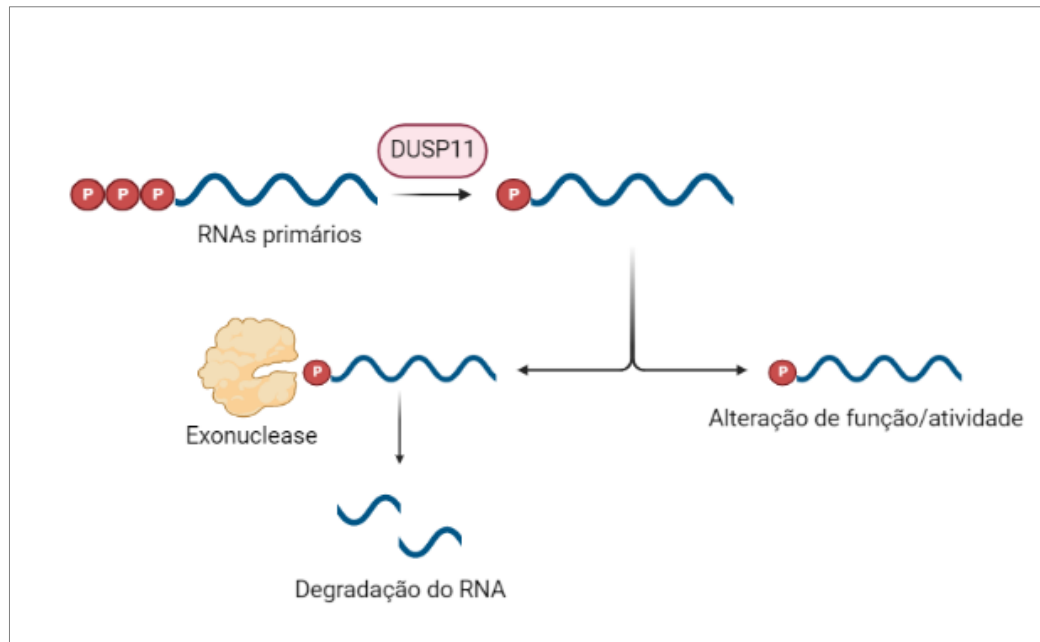


Figura 4. Modelo do papel de DUSP11 e efeito no status de fosforilação nos RNAs. DUSP11 desfosforila RNAs 5'trifosforilados, o que resulta em um RNA monofosforilado. Essa alteração pode impactar na função/atividade desses RNAs, bem como torná-los susceptíveis à ação de exonucleases, o que leva à degradação molecular. Adaptado de Burke et al, 2017.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Elucidar o mecanismo envolvido na modulação da resposta à gemcitabina pela proteína fosfatase DUSP11.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a relevância clínica da expressão gênica de *DUSP11* em amostras tumorais;
- Analisar o impacto da modulação do alvo na eficácia do tratamento com a gemcitabina;
- Identificar quais processos biológicos estão correlacionados à expressão de DUSP11;
- Identificar o RNA não-codificador modulado mediante expressão de DUSP11;
- Validar o mecanismo relacionado à expressão de DUSP11 em resposta à gemcitabina.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LabOEx) do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O delineamento experimental foi executado de acordo com o fluxograma descrito na **Figura 5**.

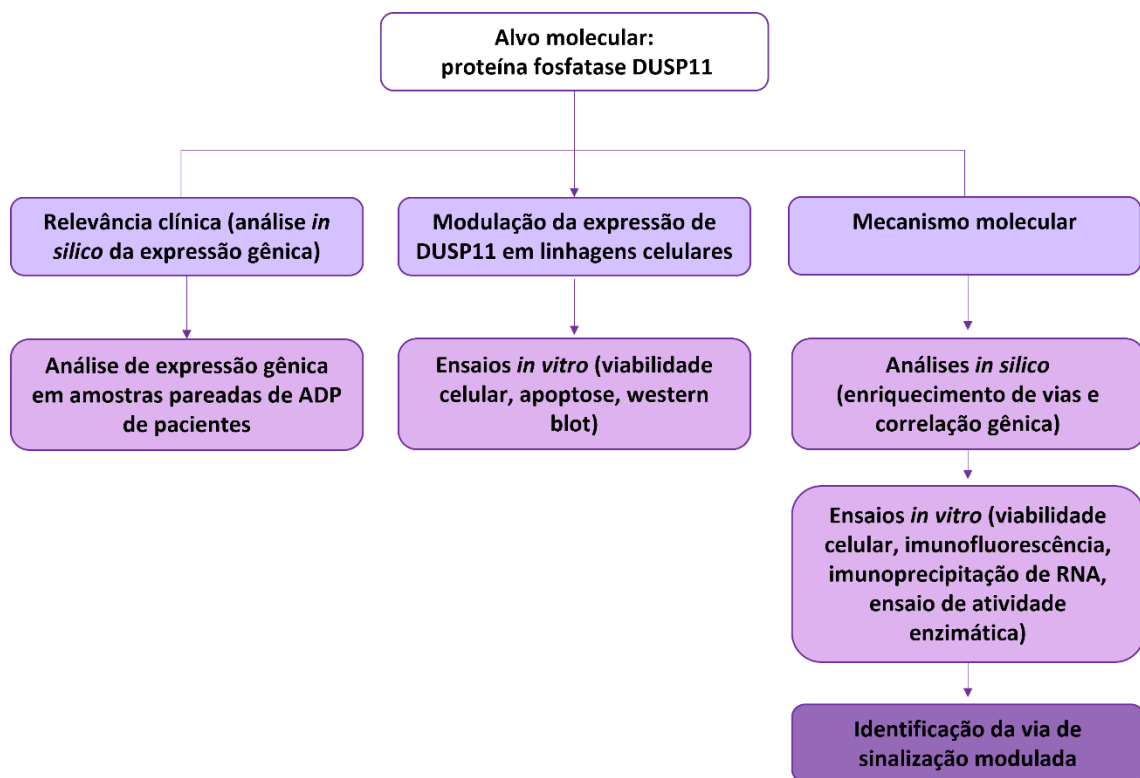


Figura 5. Fluxograma de atividades realizadas no estudo.

3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas sete linhagens celulares humanas, adquiridas e certificadas conforme ATCC (PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, HEK293T, Hela, MCF-7 e T24) (**Tabela 1**). Foram cultivadas em meios DMEM, RPMI ou McCoy (Merck, KGaA Darmstadt, Alemanha), suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco Laboratories, Invitrogen) (pH 7,2–7,4), 100 mg/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. A autenticação das linhagens celulares foi realizada por análise do perfil de STR (*Short Tandem Repeat*), no 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. Todas as culturas de células foram testadas periodicamente para evitar contaminação por micoplasma.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas e suas características.

Linhagem celular	Espécie	Tecido
MIA PaCa-2	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma pancreático
PANC-1	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma pancreático
AsPC-1	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma pancreático
HEK293T	<i>Homo sapiens</i>	Rim
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma cervical
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma mamário
T24	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de bexiga

3.3. Amostras de pacientes

Foram utilizadas no estudo 10 amostras pareadas (tecido tumoral e tecido pancreático adjacente) de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ductal pancreático entre 2015 e 2019, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC/FMRP-USP). Todas as amostras foram obtidas com o consentimento prévio dos pacientes e foram microdissecadas antes da análise molecular. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HC/FMRP-USP (CAAE: 09823218.9.0000.5440 – Anexo 2).

3.4. Estabelecimento de modelo esferoide 3D

As linhagens celulares de câncer pancreático humano foram cultivadas em condições não aderentes a uma densidade de 10^4 células/poço em uma placa de 96 poços suplementada com 10% de methocult (StemCell Technologies Inc.). Uma vez que os esferóides foram formados, foi realizado o tratamento com gemcitabina, com doses variando de 1 a 100 μ M, por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Para análise microscópica, foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse Ts2 (Nikon Instruments Inc.) acoplado a uma câmera (ampliação de 10x).

3.5. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, conforme descrito anteriormente⁸². Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^3 células/poço) e tratadas com concentrações variadas de gemcitabina (Sigma Aldrich, Inc.) (1 μ M a 100 μ M). A absorbância foi medida a 570 nm utilizando o espectrofotômetro iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories). A concentração de gemcitabina necessária para inibir a proliferação celular em 50% (IC50) foi calculada com o auxílio do software CalcuSyn.

3.6. Produção de partículas lentivirais

Os lentivírus foram produzidos em células HEK293T por protocolo padrão com os plasmídeos de empacotamento (CMV Δ 8.91 e VSV-G) e plasmídeo pLV-EGFP/Puro-U6>hDUSP11 (Anexo 3 A-C) (VectorBuilder, EUA) carregando uma sequência de shRNA scramble ou shRNA visando a sequência *DUSP11*. Em suma, foram semeadas 10^6 células em garrafas de 75 cm² e incubadas *overnight*. No dia seguinte, as células foram transfectadas com uma solução composta por meio de cultivo DMEM, agente de transfecção FuGENE, plasmídeos de empacotamento e construção lentiviral e os respectivos plasmídeos contendo a sequência scramble ou para o gene *DUSP11*. Após 24 horas, o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM completo. A suspensão lentiviral foi coletada após 24 horas, centrifugada, filtrada com filtros de 0,45 μ m para retirada de debris celulares e armazenada a -80°C.

3.7. Transdução lentiviral

A linhagem celular MIA PaCa-2 foi semeada em placa de 6 poços. No dia seguinte, as células foram transduzidas com as suspensões lentivirais específicas, acrescido de 8 μ g/mL de polibreno. Após 48 horas, o meio de transdução foi substituído por meio completo e este, após 24 horas, foi suplementado com puomicina para seleção das células transduzidas. O silenciamento proteico de *DUSP11* foi confirmado por western blot.

3.8. Transfecção com siRNA

O silenciamento do nc886 foi realizado com siRNA Silencer Select (ThermoFisher Scientific), Fugene HD (Promega) e OPTI-Men (Gibco). As quantidades dos reagentes foram de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram transfectadas com o siRNA alvo do nc886 e com o siRNA controle negativo. O silenciamento foi validado por qRT-PCR e o ensaio de viabilidade celular foi realizado com tratamento com gemcitabina por 48 horas e analisado via MTT.

3.9. Ensaio de apoptose

Para avaliar a apoptose, 2×10^5 células foram semeadas em placa de 6 poços e tratadas com gemcitabina ($IC_{50} = 16 \mu M$) ou veículo por 72 horas. As células isoladas da cultura foram lavadas e marcadas com Anexina V-APC (BD Biosciences) e iodeto de propídio, de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi acessada no citômetro BD FACSCalibur (BD Biosciences) e a análise foi realizada no FlowJo Software (FlowJo®, LLC, 2013-2017).

3.10. Análise de imunofluorescência

A análise de imunofluorescência foi realizada para investigar a localização de DUSP11 na linhagem celular MIA PaCa-2. As células foram cultivadas por 24 horas em lâminas dentro de placas de 24 poços (Thermo Scientific) a uma densidade de 8×10^5 células/poço, fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) por 15 min, permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100/ PBS por 10 min a temperatura ambiente. As células foram incubadas com glicina 100 mM por 5 min para bloquear a ligação inespecífica dos anticorpos. Após bloqueio por 2 horas com BSA a 2% em PBS, as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo primário (PIR1 - sc-393220, diluição 1:100) e posteriormente por 2 horas, à temperatura ambiente no escuro, com anticorpo secundário adequado anti-mouse Alexa 488 (diluição 1:400), acrescido de rodamina faloidina para analisar filamentos de actina (diluição 1:50) (Thermo Scientific). As lâminas foram então lavadas novamente com PBS, secas ao ar e montadas com ProLong® Gold Antifade Reagent contendo DAPI para contra-coloração dos núcleos celulares (Thermo Scientific). Os conjugados de fluorescência foram fotografados em Microscopia Confocal

Leica SP5 disponível no Laboratório de Microscopia Confocal Multiusuário - LMMC (Fapesp 2004/08868-0), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.11. Western blot

A imunotransferência foi realizada usando procedimentos padrão. Resumidamente, as células foram submetidas ao tampão de lise RIPA (Sigma Chemical Co., 10% de protease e 10% de fosfatase) e, para extração de fração subcelular, foi utilizado o kit CelLytic NuCLEAR (Sigma Chemical Co.). Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida 10% ou 12% SDS. As proteínas foram então transferidas para uma membrana, bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado a 5%) e incubadas *overnight* com anticorpos primários (4°C com agitação). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas por 1 hora com anticorpos secundários (temperatura ambiente com agitação). A quimioluminescência foi detectada utilizando o Clarity Western ECL Blotting Substrate e visualizada no ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories). Os anticorpos primários utilizados foram DUSP11 (PIR1 - sc-393220, diluição 1:500), p-NF-kappaB p65 (#3033, diluição 1:1000), NF-kappaB p65 (#4764S, diluição 1:1000), GAPDH (sc-32233, diluição 1:1000), fibrilarina (#C13C3, diluição 1:1000), Bax (sc-7480 diluição 1:250) e Bcl-2 (sc-7382 diluição 1:250) e os anticorpos secundários foram anti-mouse e anti-rabbit (Agilent Technologies).

3.12. Análise de expressão gênica

O RNA celular total foi extraído usando o reagente Trizol® (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi obtido com o iScript Reverse Transcription Supermix (BIO-RAD Laboratories, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. A expressão de *DUSP11* e dos vaultRNAs foi acessada por SYBR Green Supermix (BIO-RAD Laboratories, Inc.), com *GAPDH* e *5.8S rRNA* como controles internos (sequências de primers foram baseadas em Chen et al. e Lee et al. ^{83,84}) (**Tabela 2**). As reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, usando o Sistema Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A expressão relativa foi calculada baseada no método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁸⁵.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados para análise de expressão gênica. As sequências dos vaultRNAs e do 5.8S rRNA foram baseadas em Chen et al. e Lee et al.

Alvos	Sequência forward (5'-3')	Sequência reverse (5'-3')
<i>DUSP11</i>	TTCTTGGGACCCACATGAGC	AGTCTTTCCACCTTTCGGGG
<i>GAPDH</i>	AAGACGGGCGGAGAGAAACC	CGACCAAATCCGTTGACTCCG
VaultRNA 1-1	GGCTGGCTTTAGCTCAGCGG	AAAAGGACTGGAGAGCGCC
VaultRNA 1-2	GGCTGGCTTTAGCTCAGCGG	AAAAGAGCTGGAAAGCACC
VaultRNA 1-3	GGCTGGCTTTAGCTCAGCGG	AAGAGGGCTGGAGAGCGCC
VaultRNA 2-1	CGGGTCGGAGTTAGCTCAAGCGG	AAGGGTCAGTAAGCACCCGCG
5.8S rRNA	CGACTCTTAGCGGTGGATCA	GCAAGTGC GTTCGAAGTGT

3.13. Ensaio de atividade enzimática da PKR

A atividade da proteína PKR foi medida por meio do EIF2AK2 ADP-Glo Kinase Assay Kit (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O kit mede o ADP formado a partir de uma reação de quinase. O ADP é convertido em ATP, que é convertido em luz pela luciferase. A leitura luminescente foi realizada no leitor de microplacas multimodo SpectraMax i3x e os dados são mostrados como unidades de luz relativa (RLU) que se correlacionam diretamente com a quantidade de ADP produzida.

3.14. Análises *in silico*

A análise Pan-cancer, em cinco diferentes tipos de câncer, do perfil transcricional de *DUSP11* foi realizada acessando dados de RNA-seq dos portais *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e do *Genotype-Tissue Expression Project* (GTEx)⁸⁶, disponibilizados na plataforma GEPIA⁸⁷. A expressão gênica de perfis de transcrição de RNAm *in silico* foi realizada utilizando coortes independentes (GSE28735, GSE62452 e GSE15471) disponibilizadas em plataformas públicas e que foram analisadas por meio da plataforma GEOR2. Utilizamos os valores da mediana como parâmetro de corte para distinguir pacientes com alta ou baixa expressão de *DUSP11*. A análise do nível de expressão de *DUSP11*, correlacionado com o estágio TNM (tumor-nódulo-metástase), foi realizada na plataforma USCS *Xena*⁸⁸. Os gráficos de Kaplan-Meier representando as taxas de sobrevivência de pacientes com ADP foram gerados a partir do conjunto de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) usando a plataforma *LinkedOmics*⁸⁹. As análises de

correlação envolvendo a expressão de *DUSP11* em linhagens celulares de ADP foram realizadas utilizando os dados do *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) e *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC) através do *Portal DepMap Portal* (<https://depmap.org/portal/>). As linhagens celulares utilizadas nestas análises estão descritas nos Anexos 4 e 5. O conjunto de dados TCGA PAAD (*Pancreatic Adenocarcinoma*) foi usado para conduzir a Análise de Enriquecimento de Conjuntos de Genes (GSEA) para processos biológicos de Ontologia de Genes (*Gene Ontology* - GO) para identificar processos biológicos correlacionados com alta expressão de *DUSP11* (Pontuações de Enriquecimento Normalizadas = 1,98; FDR = 0; P = 0).

3.15. Análise estatística

A análise estatística dos ensaios funcionais foi realizada utilizando teste t de Student (ensaios de expressão gênica em amostras de pacientes e análise da imunoprecipitação de RNA) ou Two-Way ANOVA (demais ensaios funcionais), seguida do teste de Bonferroni, quando apropriado. A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote de software estatístico GraphPad Prism versão 9.0. Pelo menos dois experimentos independentes em triplicata foram realizados e $\alpha \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise da expressão gênica de *DUSP11* em amostras de ADP

4.1.1. *DUSP11* é mais expresso em amostras tumorais comparado ao tecido normal

Para verificar a relevância clínica de *DUSP11* como potencial alvo terapêutico, a primeira etapa deste trabalho foi avaliar os dados de RNA-seq do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e do *Genotype-Tissue Expression Project* (GTEx) ⁸⁶, disponibilizados na plataforma GEPIA ⁸⁷, para realizar uma análise global (análise pan-cancer) em vários tipos de tumores e amostras de tecidos normais. Conforme observado na **Figura 6**, *DUSP11* encontra-se mais expresso em amostras de ADP e entre vários outros tipos de tumor, comparado aos respectivos tecidos normais ($p \leq 0,01$).

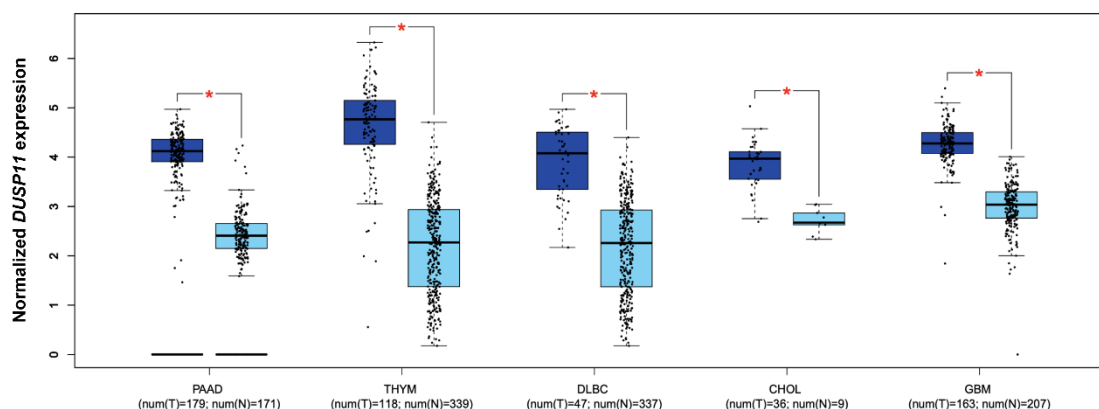


Figura 6. Análise do perfil transcricional de *DUSP11* em diferentes tumores. O perfil de expressão de *DUSP11* foi avaliado entre amostras de ADP e outros tipos de câncer. Os resultados mostram uma diferença significativa entre as amostras de tumor e os respectivos tecidos normais em 5 coortes de tumores diferentes em uma análise de expressão gênica *in silico* realizada no GEPIA nos conjuntos de dados do TCGA e GTEx. PAAD: Câncer de pâncreas; THYM: Timoma; DLBC: Linfoma Difuso de Grandes Células B de Neoplasia Linfoide; CHOL: Colangiocarcinoma; GBM: Glioblastoma multiforme.

O mesmo padrão de expressão gênica foi confirmado *in silico* em outras três coortes independentes de tumores de ADP e amostras de tecido pancreático normal correspondentes (GSE62452, GSE15471 e GSE28735) ($p < 0,0001$) (**Figura 7A**), utilizando a plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*). A regulação positiva de *DUSP11* também foi confirmada entre 10 amostras pareadas 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 7B** ($p \leq 0,05$). As amostras tumorais apresentam uma maior expressão de *DUSP11* quando comparado às amostras de tecido pancreático adjacente.

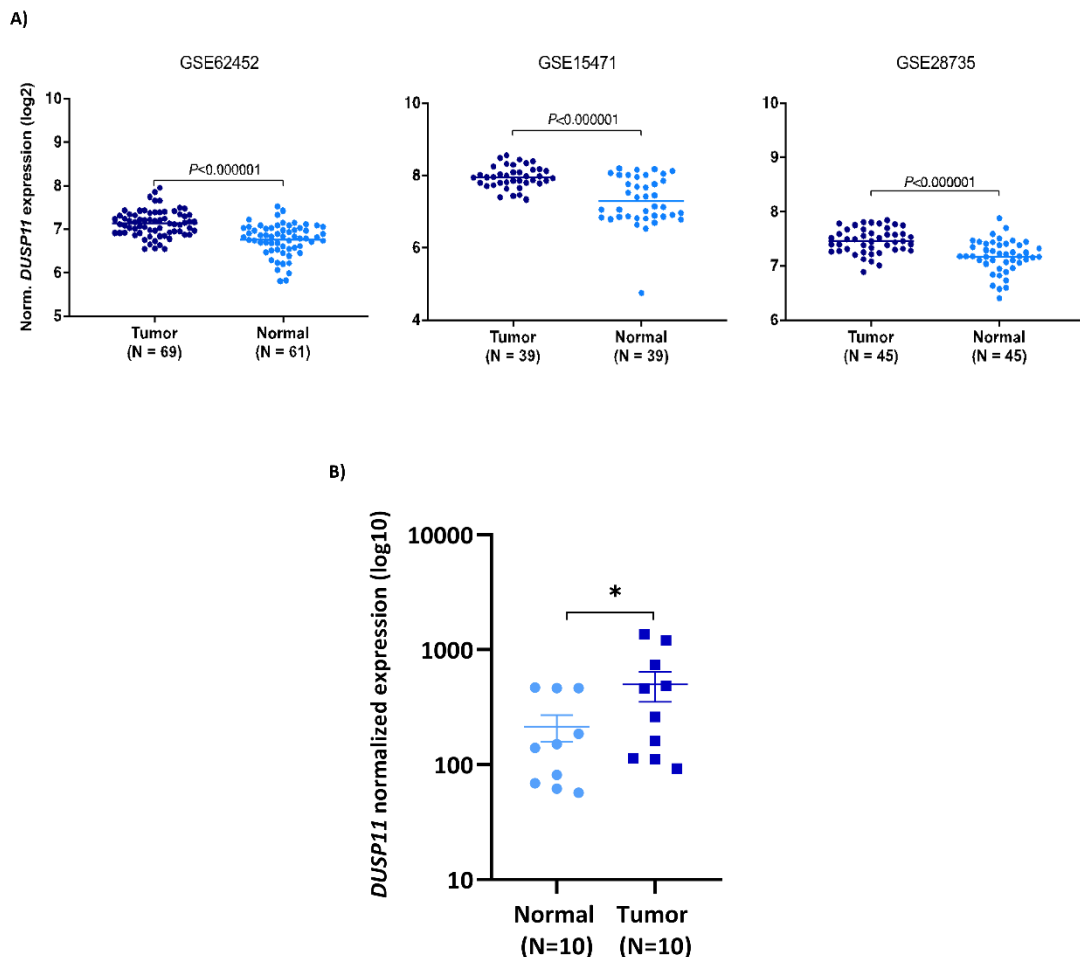


Figura 7. Análise de expressão gênica de *DUSP11* em amostras de ADP. A) Expressão do gene *DUSP11* gerada nos conjuntos de dados GSE62452, GSE15471 e GSE28735 de ADP e amostras de tecido pancreático normal correspondentes ($P < 0,0001$). **B)** Expressão de *DUSP11* em amostras pareadas normais e de ADP de pacientes do HC-FMRP ($P < 0,05$).

Ao confirmar que *DUSP11* é mais expresso no ADP, também foi avaliado o padrão de expressão em estágios patológicos, de acordo com a classificação TNM (Tumor-Nódulo-Metástase). Utilizando os dados de amostras de ADP do TCGA, disponíveis na plataforma *UCSC Xena*⁸⁸, observa-se que os estágios TNM II e TNM IV são mais propensos a ter níveis maiores de expressão de *DUSP1*, comparado ao estágio TNM I ($p \leq 0,01$) (**Figura 8A**). Além disso, uma maior expressão de *DUSP11* também está relacionado à uma pior sobrevida global, como demonstra a análise da curva de sobrevida na **Figura 8B** (Log-rank $p = 0,0078$), realizada por meio da plataforma *LinkedOmics*⁸⁹. Esses dados mostram que a expressão de *DUSP11* está associada à um prognóstico não favorável em pacientes com ADP. Embora esses dados avaliem a expressão de RNA e não de proteínas, os dados sugerem que *DUSP11* pode desempenhar um papel na biologia do câncer e no ADP humano.

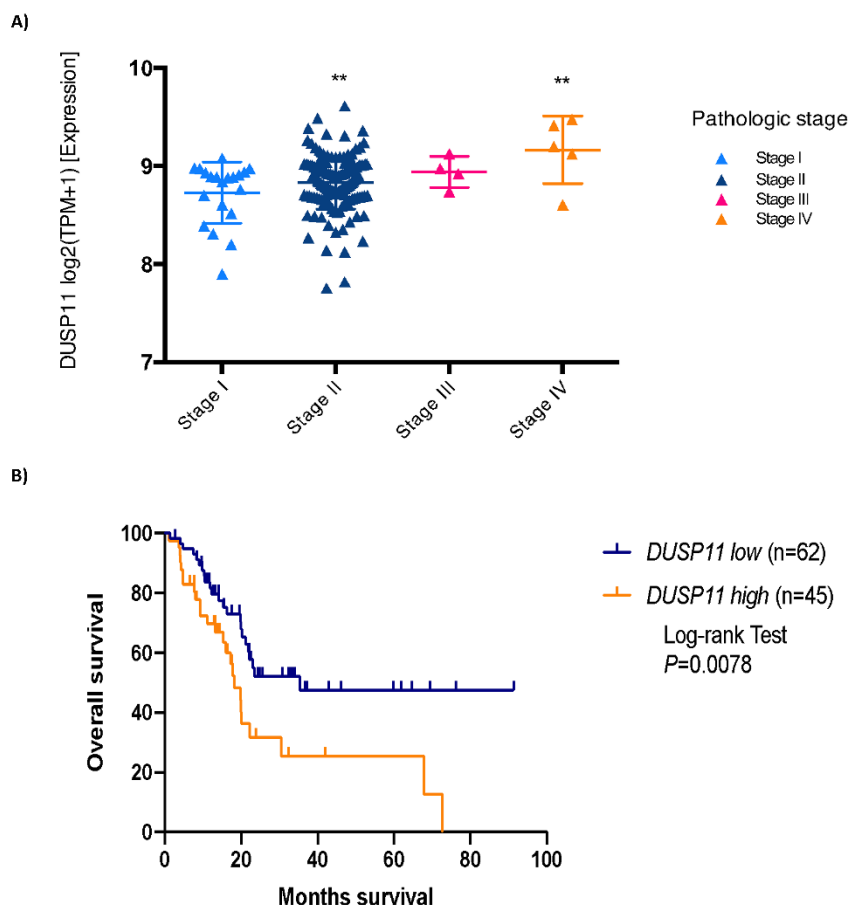


Figura 8. A expressão de *DUSP11* pode sugerir um pior prognóstico. A) A análise *in silico* mostra que o nível de expressão de *DUSP11* estava intimamente correlacionado com o estágio TNM (TNM II e TNM IV apresentaram os maiores níveis de expressão de *DUSP11*; ($P \leq 0,01$). **E)** Análise da curva de sobrevida de Kaplan–Meier mostrando a correlação entre a regulação positiva de *DUSP11* e as taxas de sobrevida global (Log-rank $P=0,0078$).

4.2. Análise da expressão proteica de *DUSP11* em linhagens celulares e de viabilidade celular com a gemcitabina

4.2.1. Linhagens com menores níveis proteicos de *DUSP11* respondem melhor ao tratamento

Dada a relevância clínica de *DUSP11*, a próxima etapa foi avaliar se a expressão proteica estaria associada a uma resposta *in vitro* à gemcitabina. Para isso, primeiro avaliamos a expressão da fosfatase em um subconjunto de sete linhagens celulares distintas, compreendendo três linhagens celulares de ADP (PANC-1, MIA PaCa-2 e AsPC-1), rim embrionário humano (HEK293T), câncer cervical (HeLa), câncer de mama (MCF-7) e câncer de bexiga (T24). Conforme observado na **Figura 9A-B**, as linhagens celulares HEK293 e T24 apresentaram uma menor expressão de *DUSP11*, enquanto as demais, incluindo as de ADP, apresentam maiores níveis da proteína.

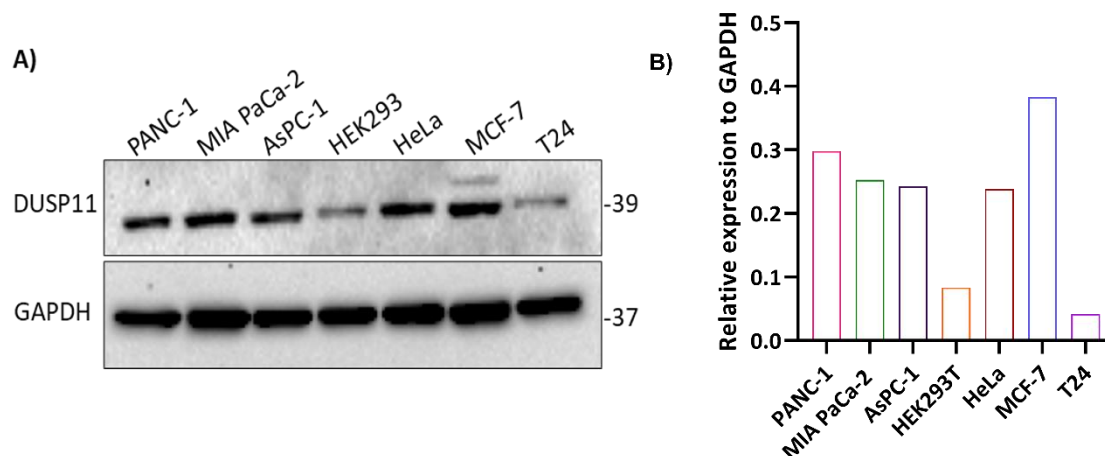


Figura 9. Perfil de expressão proteica de DUSP11 em linhagens celulares. A) Screening para avaliar expressão e B) quantificação da proteína DUSP11 em linhagens celulares PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, HEK293T, HeLa, MCF-7 e T24.

Após avaliar os níveis proteicos de DUSP11, foi realizada uma análise de viabilidade celular com gemcitabina nas mesmas linhagens acima estudadas, para identificar se haveria alguma associação entre a expressão de DUSP11 com a resposta ao tratamento. Como observa-se na **Figura 10**, após 48 horas de tratamento com gemcitabina, as linhagens HEK293 e T24, que apresentam menor expressão de DUSP11, foram mais responsivas ao tratamento em comparação com as outras linhagens celulares, indicando que esta proteína fosfatase pode influenciar na resposta à droga.

Em seguida, tentamos validar *DUSP11* como um gene essencial que modula a resposta ao fármaco. A partir de dados gerados pela *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) e *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC), usando o *Depmap Portal*, mostramos que o efeito do gene *DUSP11* se correlaciona negativamente com o nível de sensibilidade à gemcitabina em 27 linhagens celulares de ADP ($R = -0,46$; $P = 0,01$; **Figura 11**, Anexo 4), o que corrobora com nossos dados e sugere de *DUSP11* está associada à resposta à gemcitabina.

A)

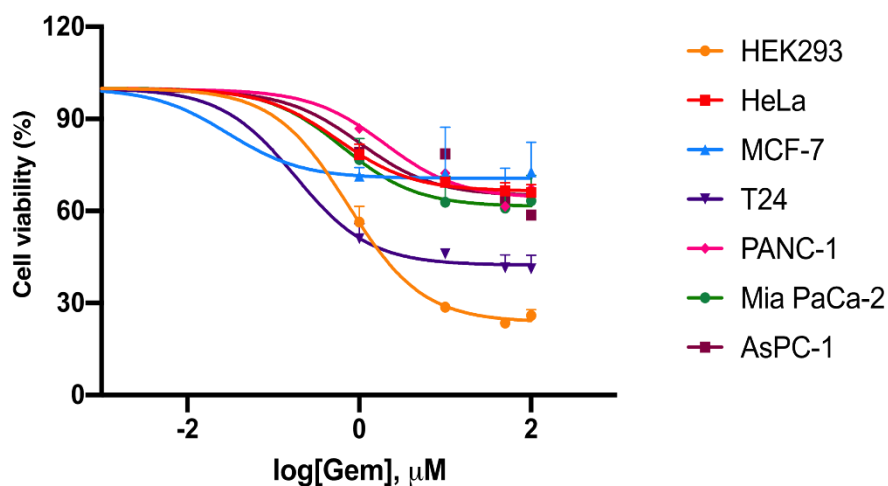


Figura 10. Análise de viabilidade celular com gemcitabina em linhagens celulares. A) Viabilidade celular em diferentes linhagens celulares tratadas com gemcitabina com doses de 1 a $100 \mu\text{M}$ por 48 horas. Dados da dose representados em forma de log.

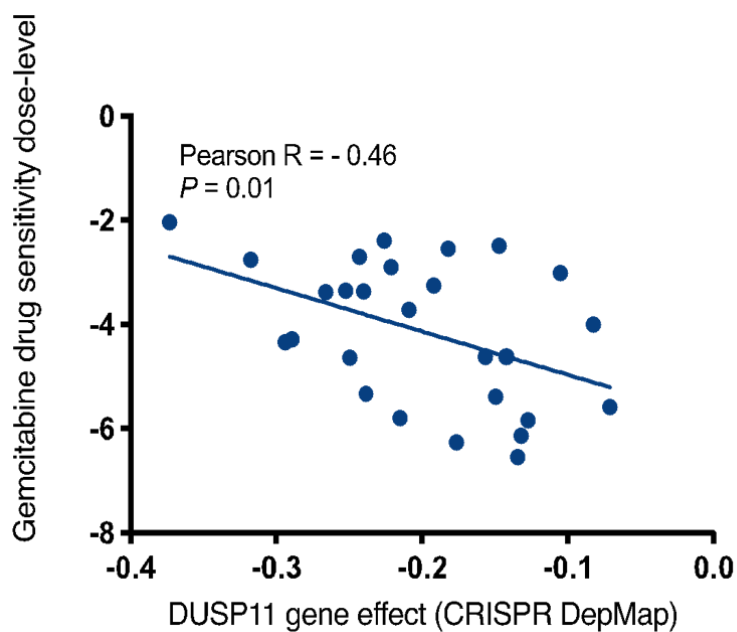


Figura 11. Análise de correlação entre o efeito de *DUSP11* e a resposta à gemcitabina. O gráfico mostra a correlação da expressão de *DUSP11* com a sensibilidade à gemcitabina em 27 linhagens celulares de ADP ($R = -0,46$; $P = 0,01$).

4.3. Análise da modulação de DUSP11 sobre o tratamento em ADP

4.3.1. Células com menores níveis de expressão de DUSP11 respondem melhor ao tratamento com gemcitabina

Ao observar que DUSP11 pode estar relacionada com a resposta à gemcitabina, o próximo objetivo deste estudo foi aprofundar o estudo desse papel em linhagens de ADP. Para tanto, primeiro desenvolvemos linhagens nocaute para *DUSP11* (*DUSP11*^{-/-}), por meio da técnica de CRISPR-Cas9. Para isso, foi utilizada a linhagem celular MIA PaCa-2. Com este modelo (MIA PaCa-2 *DUSP11*^{-/-}), foi realizado o ensaio de viabilidade celular por 72 horas, na qual observa-se que células com menor expressão de DUSP11 exibiram maior sensibilidade à gemcitabina e valor de IC₅₀ significativamente reduzido em comparação com células de tipo selvagem (*wild type*) (IC₅₀ = 6,45μM e IC₅₀ = 16μM, respectivamente; p=0,04) (**Figura 12**).

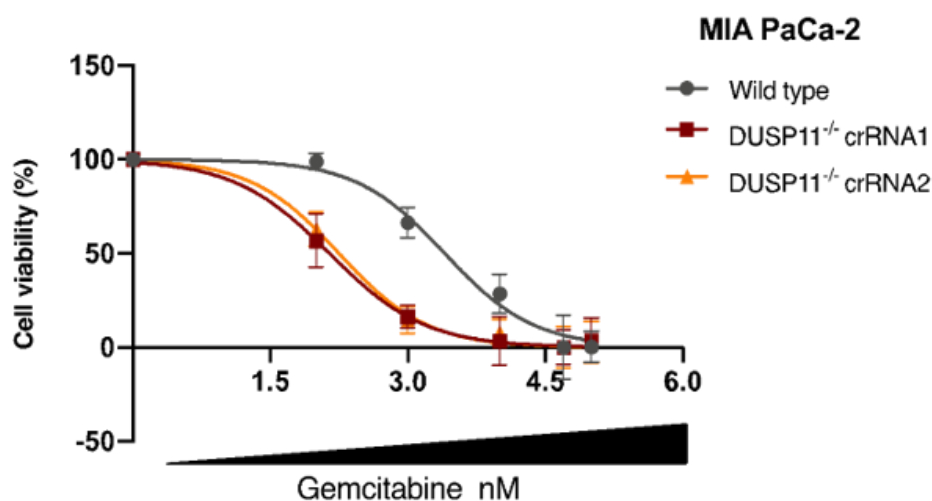


Figura 12. Análise de viabilidade celular com gemcitabina em modelo nocaute para DUSP11. O nocaute de DUSP11 impactou na viabilidade celular dentro de 72 horas e reduziu significativamente o valor de IC₅₀ de 16μM (células do tipo selvagem) para 6,45μM em ambos os crRNAs.

Ao avaliar este resultado, questionamos se a modulação de DUSP11 poderia impactar no tratamento em modelo de cultura 3D. Para essa análise, desenvolvemos a linhagem celular MIA PaCa-2 com o silenciamento de DUSP11, obtida pelo método baseado em RNAi. O modelo 3D utilizado foi o de formação de esferóides, o qual foram tratados com doses de 1 a 100μM de gemcitabina por 72 horas. O resultado mostra que houve o aumento da sensibilidade à gemcitabina em células MIA PaCa-2 shDUSP11 #2 em comparação ao *Scramble*, sendo significativo na dose de 100μM (p≤0,01) (**Figura 13**).

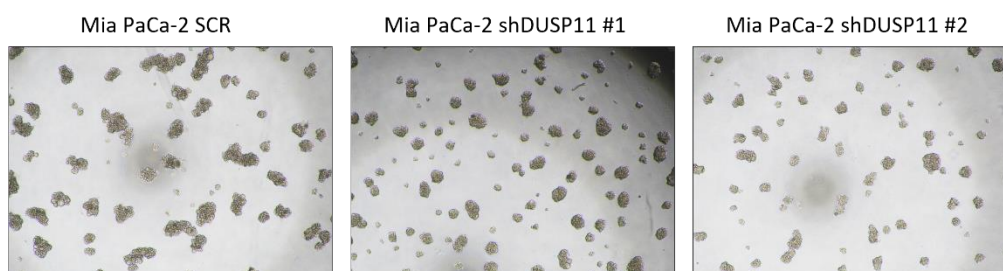
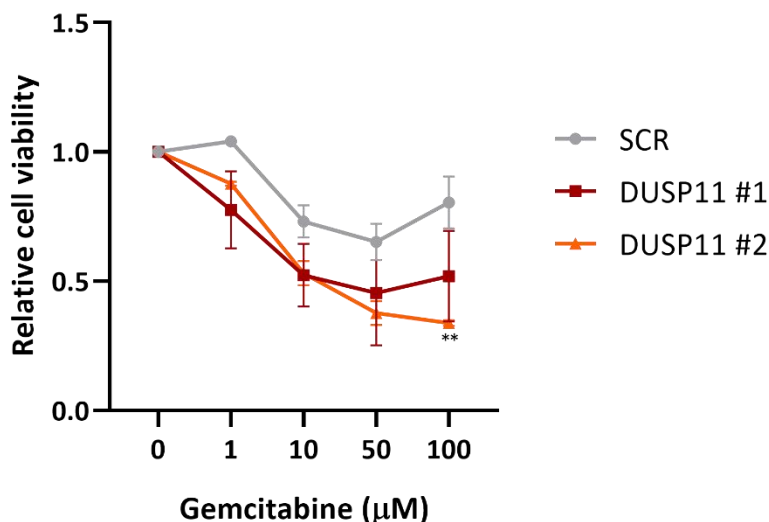


Figura 13. Viabilidade celular com gemcitabina em modelo de cultura celular 3D. Viabilidade celular em células modelo 3D com silenciamento de DUSP11. Os esferóides foram tratados com gemcitabina por 72 horas nas doses de 1 a 100µM, sendo significativo na dose de 100µM ($P < 0,01$). A análise fotográfica microscópica foi realizada após 24 horas de formação dos esferóides, antes do tratamento. Ampliação de 10x.

Visto de DUSP11 impacta na viabilidade celular, a próxima etapa foi avaliar o efeito sobre a morte celular por apoptose. Neste ensaio, o modelo de nocaute MIA PaCa-2 DUSP11^{-/-} foi tratado com a dose de IC₅₀ de gemcitabina por 72 horas. O resultado mostra um aumento substancial de 3 vezes na porcentagem de morte celular em células DUSP11^{-/-} após o tratamento com gemcitabina em comparação com as células parentais (**Figura 14A**). Curiosamente, em células não tratadas, o nocaute de DUSP11 não teve efeito aparente, sugerindo novamente uma especificidade de resposta à droga. Em conjunto com esses dados, foi avaliado a modulação de marcadores apoptóticos, na qual o modelo celular MIA PaCa-2 com o silenciamento de DUSP11 foi tratado com gemcitabina (IC₅₀) por 48 horas para análise proteica. O silenciamento de DUSP11 promove a ativação da proteína pró-apoptótica Bax, em condições de ausência e presença de tratamento com a droga (**Figura 14B**), o que confirma claramente os dados de interferência de DUSP11 na morte celular. Ao todo, esses resultados

suportam a fosfatase DUSP11 como um potencial alvo de resposta ao tratamento em células de ADP.

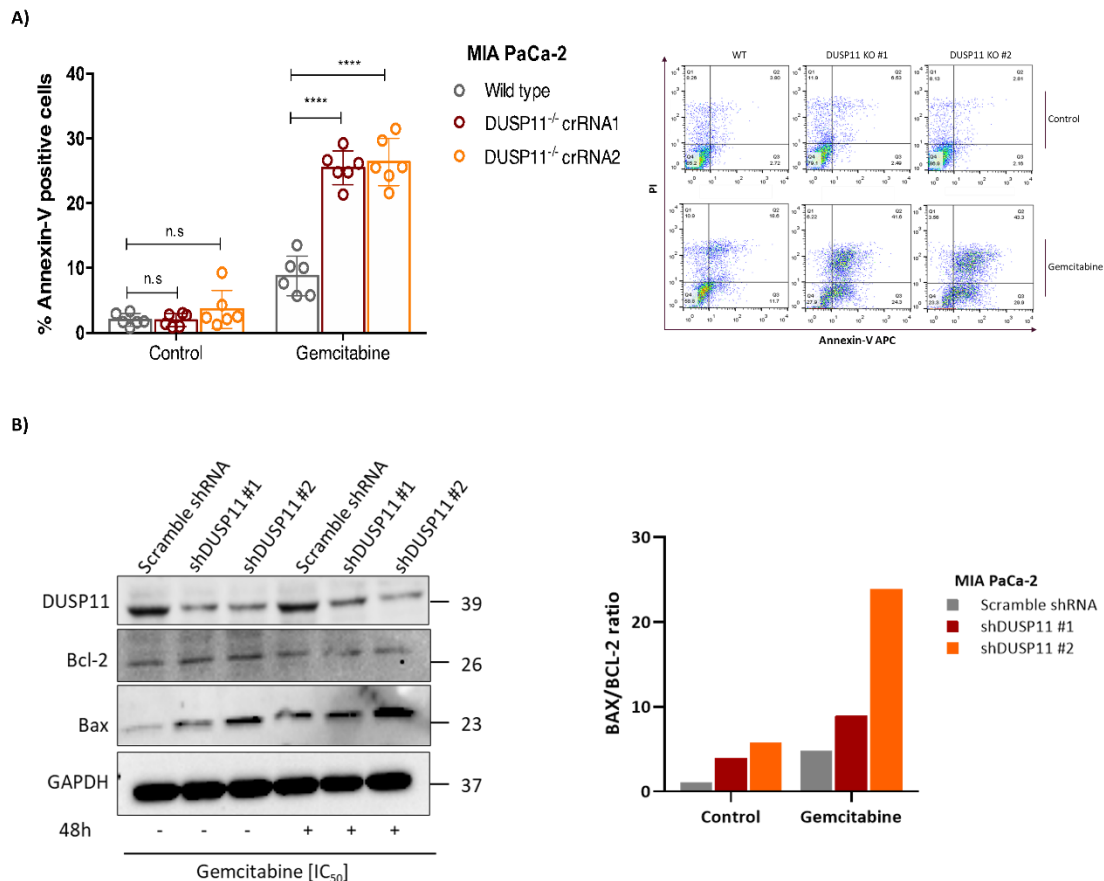


Figura 14. Análise da modulação de DUSP11 sobre a morte celular por apoptose. A) Apoptose em células nocaute de DUSP11 exibiram maior sensibilidade o tratamento, após 72 horas. **B)** Análise proteica dos marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax em células com o silenciamento por shRNA, após tratamento com gemcitabina 48 horas. A proteína pró-apoptótica Bax é mais expressa em modelos de células com menor expressão de DUSP11. Os experimentos *in vitro* foram realizados em dois experimentos independentes com três repetições cada e os resultados são expressos como média \pm SD. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$, n.s: não significativo.

4.4. Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (*Gene Set Enrichment Analysis - GSEA*)

4.4.1. A via de sinalização NF- κ B é regulada diante da expressão de DUSP11

É evidente que a fosfatase DUSP11 impacta na resposta ao tratamento com gemcitabina em células de ADP. Diante disso, se fez necessário investigar qual mecanismo molecular estaria sendo modulado nos dados fenotípicos observados. Assim, para obter mais informações sobre as assinaturas biológicas que poderiam estar associadas à expressão de *DUSP11* em ADP, realizamos uma Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA) com amostras do conjunto de dados TCGA PAAD, que revelou a via de sinalização NF- κ B entre

as mais significativamente enriquecidas em amostras com regulação positiva de *DUSP11* (Figura 15 – Anexo 5).

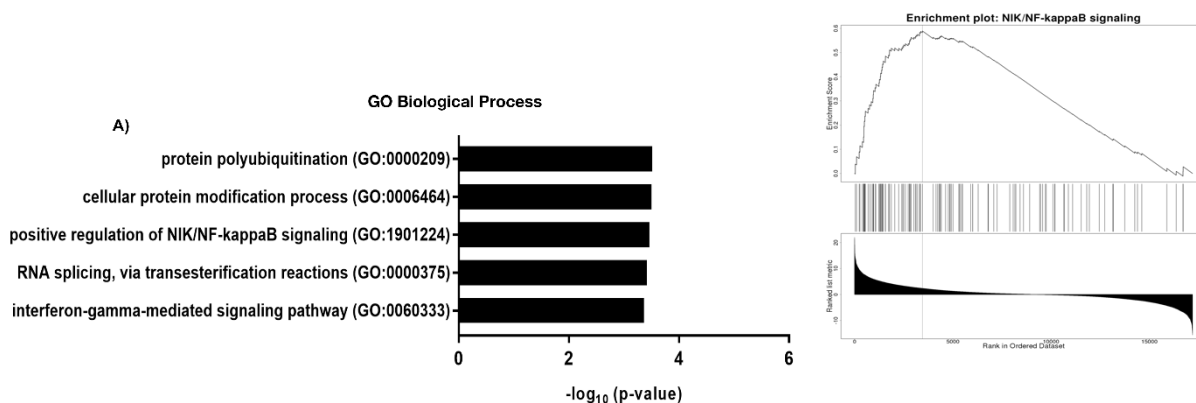


Figura 15. Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA). Análise de enriquecimento de vias (GSEA) para processos biológicos de Ontologia Genética (GO) revela a via de sinalização NF- κ B como um dos principais processos biológicos enriquecidos correlacionados à alta expressão de *DUSP11* (pontuação de enriquecimento normalizada = 1,98; FDR = 0; P = 0).

O NF- κ B é uma das principais vias alteradas no ADP, que controla vários processos tumorigênico críticos, incluindo a resposta a drogas⁹⁰⁻⁹². Neste contexto, o NF- κ B tem sido amplamente explorado e proposto como um alvo de drogas para superar a resistência à gemcitabina⁹². Para explorar se *DUSP11* poderia modular a ativação de NF- κ B, submetemos células MIA PaCa-2 com o silenciamento de *DUSP11* a tratamento com o fármaco por 6 horas ($IC_{50} = 16\mu\text{M}$). Conforme observado na **Figura 16**, a inibição de *DUSP11* bloqueou a fosforilação de NF- κ B após o tratamento com gemcitabina, o que sugere que os dados fenotípicos observados foram devido à modulação da via do NF- κ B.

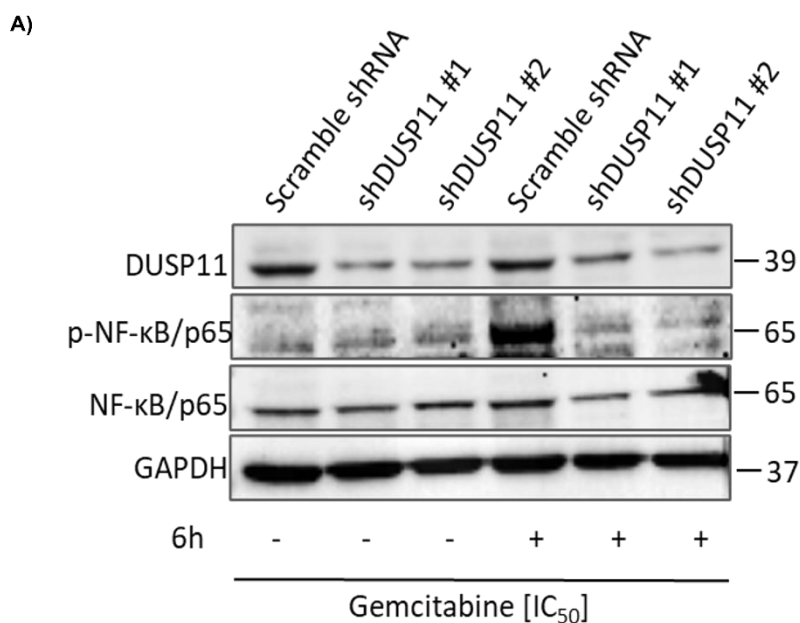


Figura 16. Análise proteica de ativação da via do NF-κB. A análise proteica por western blot revela que a inibição de DUSP11 reduz a fosforilação e consequente ativação de NF-κB, e o fenótipo foi mantido sob tratamento com gemcitabina.

4.5. DUSP11 regula a expressão de non-coding RNAs

4.5.1. A expressão do non-coding RNA VaultRNA é modulada pela atividade de DUSP11

Diante dos dados obtidos, podemos observar que a via de sinalização do NF-κB é alvo da atividade da proteína fosfatase DUSP11. No entanto, a literatura indica DUSP11 como uma DUSP atípica, devido a ausência do domínio de ligação (MKB) às MAP quinases em seu sítio N-terminal⁷⁰, com seletividade para ligação a RNAs fosforilados transcritos pela RNA polimerase III⁷³. Essa RNA fosfatase altamente conservada remove γ - e β -fosfatos de RNAs 5'-trifosforilados, como transcritos de RNA primários, vault RNAs e Alu RNAs^{74,78}. Com isso, hipotetizamos que a via do NF-κB estaria sendo modulada indiretamente por DUSP11, mediada por um dos seus RNAs alvos. Para validar esta hipótese, a primeira coisa analisada foi a localização subcelular de DUSP11 para melhor entender onde estaria atuando e direcionar os próximos ensaios. Por meio de western blot e imunofluorescência, confirmamos que DUSP11 é prevalente no citoplasma da linhagem celular MIA PaCa-2 (**Figura 17A-B**).

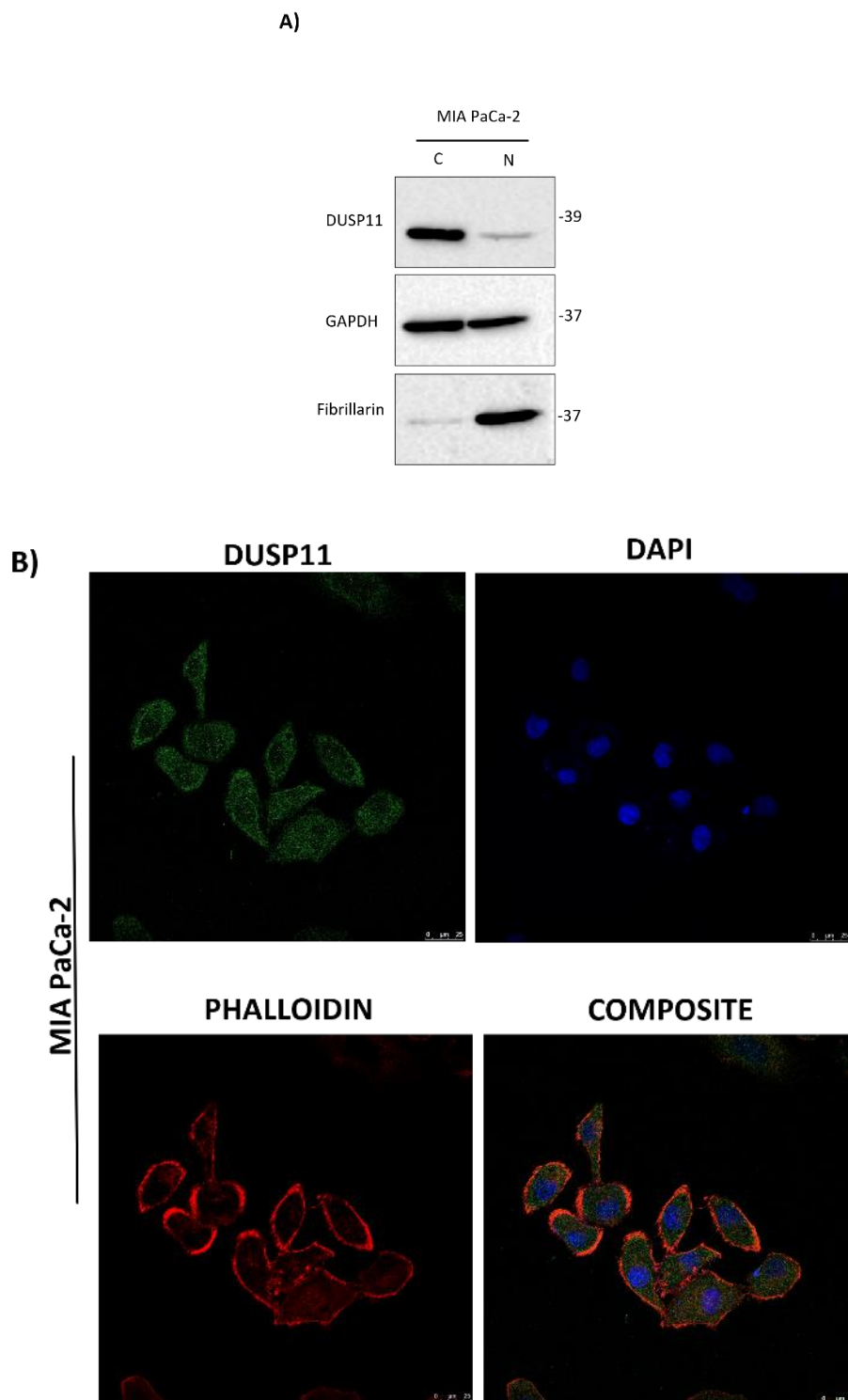


Figura 17. Localização subcelular de DUSP11. A) Western blot e **B)** imunofluorescência mostram que DUSP11 está localizada principalmente no citoplasma da linhagem celular MIA PaCa-2.

Dada a localização celular de DUSP11, investigamos, então, como poderia ser a atividade desta proteína fosfatase atípica sobre a via do NF- κ B. Estudos mostram que uma

alternativa de ativação do NF- κ B seja mediado pela proteína quinase PKR (uma quinase dependente de RNA de fita dupla) ⁹³. Esta proteína pode ser inativada por RNAs, a exemplo do vaultRNA 2-1, e, conseqüentemente, prejudicar alvos *downstream*, como o NF- κ B ⁹⁴.

Foi demonstrado anteriormente que um dos possíveis alvos de DUSP11 são pequenos componentes de RNA não codificantes de partículas gigantes de ribonucleoproteína (RNPs), conhecidas como vault RNAs (vtRNA) ⁹⁵. No processo mediado por DUSP11, vtRNAs são convertidos do estado 5'-trifosforilado para monofosforilado, o que pode alterar sua estabilidade e, conseqüentemente, sua abundância ⁷⁸. Esses RNAs não codificantes ocorrem em humanos como quatro parálogos de vtRNA (vtRNA1-1, vtRNA1-2, vtRNA1-3, vtRNA2-1) e têm sido relacionados a vários mecanismos, incluindo resistência a drogas anticancerígenas ^{96,97}. Para investigar se DUSP11 poderia estar modulando vtRNAs no contexto do ADP, analisamos a abundância de transcritos de vtRNAs em células MIA PaCa-2 DUSP11^{-/-}. Observamos que todos os transcritos de vtRNAs foram significativamente aumentados em comparação com células do tipo selvagem, particularmente o vtRNA2-1 (recentemente denominado RNA não codificante nc886), que teve um aumento de 4 vezes na abundância de transcritos ($p < 0,001$; **Figura 18**).

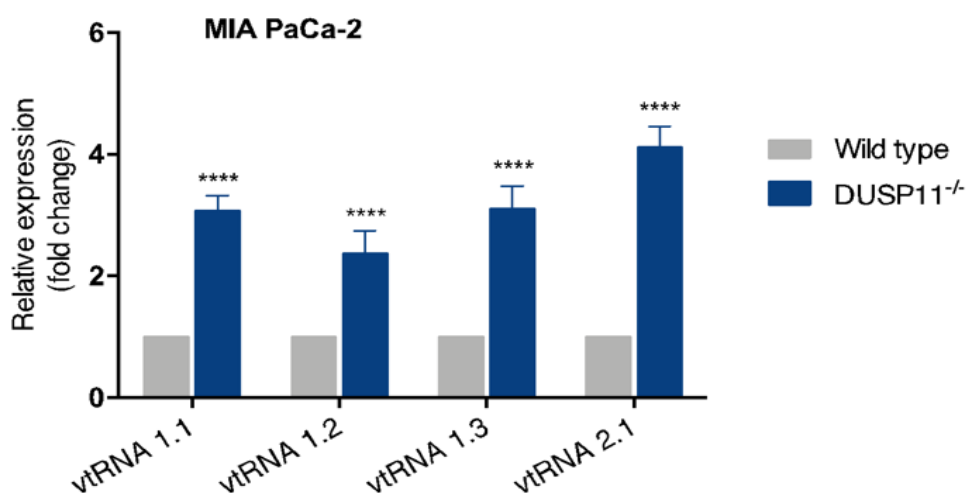


Figura 18. Expressão dos vaultRNAs na linhagem MIA PaCa-2. A expressão dos vaultRNAs (vtRNAs) mostra como os 4 parálogos de vtRNAs são significativamente regulados positivamente em células DUSP11^{-/-} em comparação com células de tipo selvagem. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Visto que o vtRNA 2-1 pode ser um potencial alvo que medeia a atividade de DUSP11 e a fim de expandir essa análise, dados do *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) de linhagens

celulares de câncer pancreático foram utilizados para correlacionar a expressão de *DUSP11* e a abundância absoluta do vtRNA 2-1. O resultado mostra uma correlação negativa de Pearson entre *DUSP11* e o vtRNA2-1 ($R = -0,40$; $p < 0,01$) (**Figura 19A**, Anexo 6). Apoiando esse dado, foi realizada uma imunoprecipitação de RNA na linhagem celular MIA PaCa-2, seguido de análise de expressão gênica, para validar a interação da proteína com o RNA. Como observa-se na **Figura 19B**, ao precipitar *DUSP11*, temos a expressão do vtRNA2-1, o que confirma a ligação entre essas duas moléculas ($p < 0,01$).

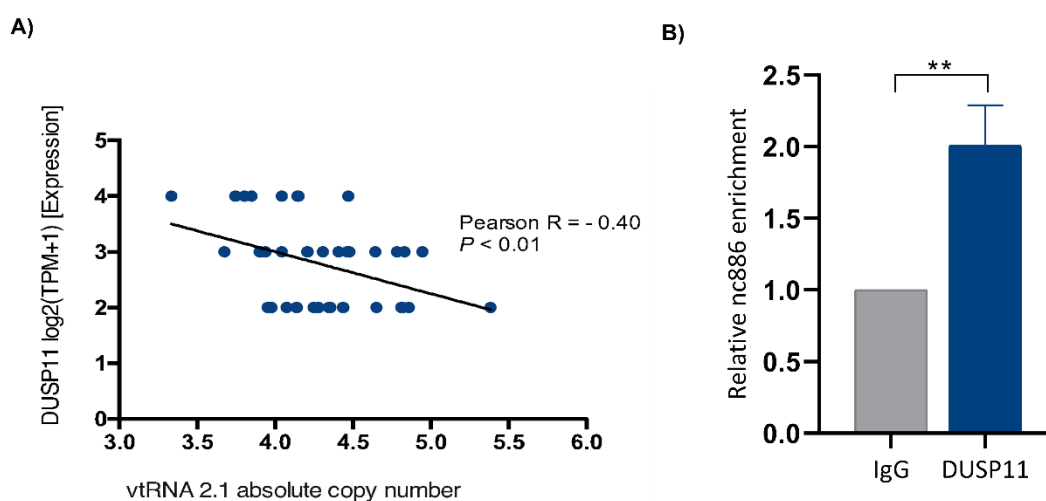


Figura 19. Correlação de *DUSP11* com o vtRNA2-1 (nc886). **A)** Os gráficos de correlação mostram a correlação do número absoluto de cópias de vtRNA2-1/nc886 com a expressão de *DUSP11* em linhagens celulares de ADP. **B)** Imunoprecipitação de RNA revela que nc886 interage diretamente com *DUSP11*. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$.

Mecanismos potenciais da função do vtRNA2-1 (que é aqui abordado também como nc886) foram propostos⁹⁶. No entanto, a resistência a drogas mediada pelo nc886 permanece em grande parte desconhecida. Para entender como o nc886 pode influenciar no tratamento com gemcitabina, utilizamos a linhagem celular MIA PaCa-2 com o silenciamento de *DUSP11* para avaliar o nível transcricional do RNA. O modelo celular foi tratado com a dose de IC_{50} por 6 horas, na qual podemos que o tratamento com gemcitabina quase aboliu a expressão de nc886 em células do tipo selvagem, mas as células com a inibição de *DUSP11* foram capazes de manter a expressão do nc886 (**Figura 20**), sugerindo que esse RNA não codificante é importante para promover a sensibilidade para o tratamento.

Para validar essa hipótese, realizamos o ensaio de restauração, silenciando, por meio de siRNA, o nc886 na linhagem MIA PaCa-2 com silenciamento *DUSP11*, que mostra níveis de expressão aumentados desse RNA não codificante. O silenciamento foi eficaz dentro de 24

horas de tratamento (**Figura 21A**). Para tanto, realizamos o ensaio de viabilidade celular, tratando as células com gemcitabina por 48 horas, após o tempo ideal de transfecção. Como visto na **Figura 21B**, os baixos níveis de expressão do nc886 permitem uma menor resposta à gemcitabina, ao contrário de quando ela é expressa, principalmente na dose de 10 μ M ($p < 0,01$). Ao todo, esses resultados suportam nossa hipótese do papel potencial da resistência a drogas mediada por nc886.

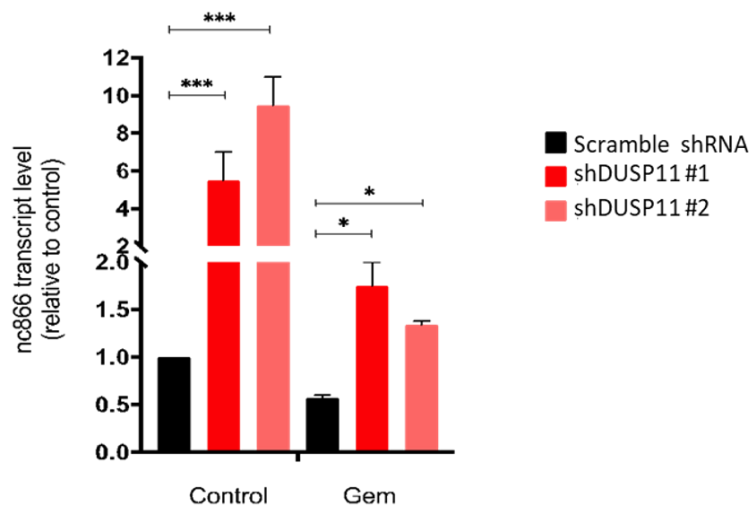


Figura 20. Expressão do nc886 diante do tratamento com gemcitabina. Os níveis transcricionais de nc886 são mantidos após o tratamento com gemcitabina em células com inibição de DUSP11. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

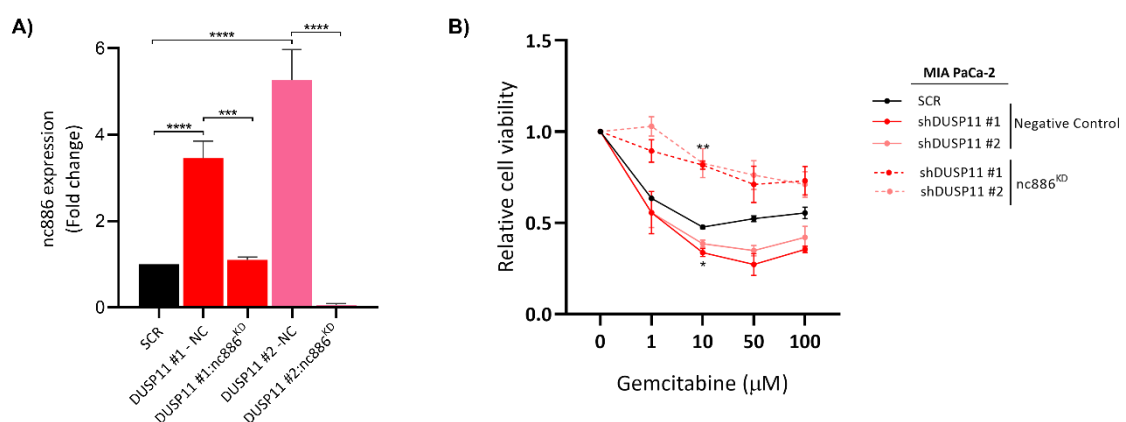


Figura 21. Silenciamento do nc886 na linhagem MIA PaCa-2 DUSP11 KD e ensaio de viabilidade celular. **A)** nc886 silenciado em células MIA PaCa-2 DUSP11 KD, via siRNA, por 24 horas de transfecção. **B)** A viabilidade celular mostra que as células com silenciamento de nc886 se tornam mais resistentes ao tratamento com gemcitabina em 48 horas. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

4.6. Ensaio de atividade enzimática

4.6.1. Atividade da proteína quinase PKR é reduzida após inibição de DUSP11

Considerando a função de fosfatase de DUSP11 sobre RNAs, e confirmado que a expressão do vtRNA2-1 (nc886) é modulada mediante atividade de DUSP11, hipotetizamos que a via de sinalização do NF- κ B provavelmente ocorreria como um efeito indireto mediado por esse RNA. Como citado anteriormente, o nc886 foi sugerido por interagir com a proteína PKR para inibir sua fosforilação e consequente ativação dos seus alvos ⁹⁴.

Uma das vias regulada pela PKR é a via do NF- κ B, na qual a ativação depende da atividade da PKR ⁹³. Com isso, investigamos se a expressão de DUSP11 teria alguma interferência sobre a ativação da PKR. Para esta análise, foi realizado um ensaio de atividade enzimática na linhagem MIA PaCa-2 DUSP11 KD tratada com gemcitabina por 24 horas. Curiosamente observamos que na ausência de DUSP11, há redução da atividade de PKR. Ao tratar com gemcitabina, a atividade aumenta (**Figura 22**). Ao todo, esses dados sugerem que o DUSP11 pode impactar na atividade de PKR através da modulação nc886. No entanto, mais experimentos são necessários para validar esse provável mecanismo que medeia a resistência à gemcitabina.

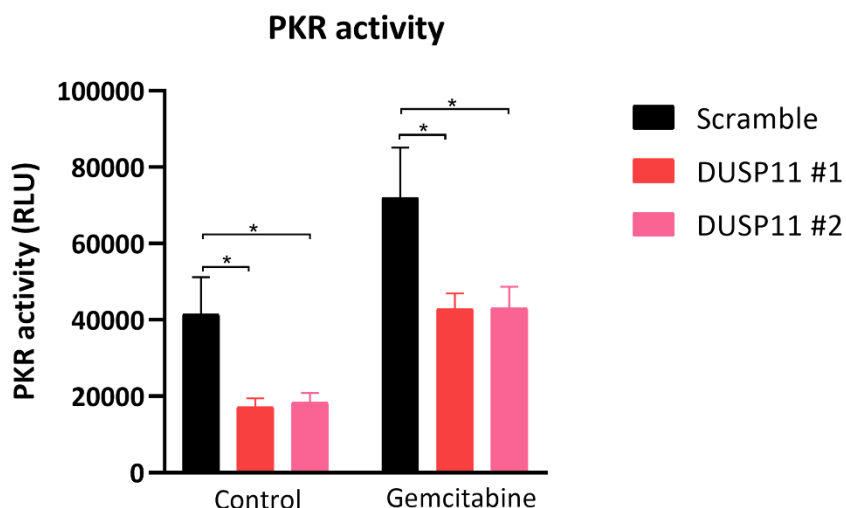


Figura 22. Ensaio de atividade enzimática para avaliar a proteína PKR. A atividade enzimática da PKR é reduzida pelo silenciamento de DUSP11 e permanece mesmo com o tratamento com gemcitabina (IC_{50}), após 24 horas. * $P \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O adenocarcinoma ducal pancreático (ADP) é a neoplasia mais frequente que acomete o pâncreas, e apresenta um dos piores prognósticos dentre os tumores sólidos ⁷. As altas taxas de incidência e mortalidade associada ao ADP têm estimulado pesquisadores a intensificar os estudos na busca por melhor entendimento deste câncer e por melhores protocolos de tratamento ^{47,98}.

A gemcitabina é atualmente o tratamento de primeira linha para o ADP. No entanto, permanece pouco eficaz devido ao rápido desenvolvimento de resistência a essa droga pelas células tumorais ⁵⁹. Diferentes mecanismos subjacentes estão relacionados a este processo, incluindo o cenário mutacional do ADP, bem como a desregulação de vias de sinalização. Vias que regulam a proliferação, diferenciação, apoptose e invasão, como as vias Akt, EGFR, Notch, MAPK e NF- κ B parecem, direta ou indiretamente, afetarem a quimiossensibilidade do tumor pancreático ⁹⁹. O controle de ativação de vias de sinalização é mediado, principalmente, por modificações como a fosforilação e desfosforilação. Essas modificações são essenciais para os processos celulares normais e, quando ocorre alguma condição anormal, pode ser crucial na alteração de muitas proteínas estruturais, funcionais e reguladoras em um cenário de doença ¹⁰⁰.

O mecanismo de desfosforilação é controlado pelas proteínas tirosino fosfatases, incluindo a grande família de proteínas fosfatases de dupla especificidade, as DUSPs. Elas podem regular processos críticos em resposta a drogas no câncer, como a DUSP1, DUSP4, DUSP6, DUSP16 que já foram descritas em funções relacionadas à quimiorresistência em outros tumores sólidos ¹⁰¹⁻¹⁰⁵, inclusive no ADP ^{106,107}, o que corrobora a relevância do tema. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de atuação dessas DUSPs relacionados à quimiorresistência das células de ADP sobre a gemcitabina.

Neste presente trabalho, investigamos o mecanismo molecular de ação de DUSP11, uma proteína fosfatase atípica que mostrou estar relacionada na sensibilidade à gemcitabina, podendo ser um alvo candidato para vulnerabilidade a drogas. DUSP11 (também conhecida como PIR1) é uma fosfatase atípica que pode estar localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo, de acordo com o modelo celular ⁷⁸. Até o momento, a maioria dos estudos descrevem DUSP11 atuando na sinalização da resposta imunológica, principalmente relacionada a vírus ¹⁰⁸⁻¹¹¹. No entanto, pouco se sabe sobre seu papel em outras doenças, como o câncer.

Visando a relevância clínica de *DUSP11*, utilizamos os dados de RNA-seq publicamente disponíveis que mostraram que o gene *DUSP11* se apresenta mais expresso em vários tipos de tumor em comparação com os respectivos tecidos tumorais, incluindo o adenocarcinoma pancreático. Avaliando a expressão de *DUSP11* em amostras de ADP oriundas de pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP/RP, observamos um padrão semelhante ao observado em dados *in silico*, na qual sua expressão é maior em amostras tumorais. Particularmente no ADP, o status transcricional de *DUSP11* está diretamente associado com baixas taxas de sobrevida, sugerindo um papel importante dessa fosfatase na evolução do ADP. Em conjunto, esses resultados indicam que *DUSP11* atue como um potencial oncogene no desenvolvimento tumoral. Alguns trabalhos mostraram resultados semelhantes aos nossos. Dados descritos por Xu e colaboradores⁸¹, por exemplo, mostram que a expressão proteica de *DUSP11* pode ser utilizada como potencial biomarcador para colangiocarcinoma intra-hepático, indicando mau prognóstico. Além disso, Cai e colaboradores⁸⁰ também relataram uma maior expressão gênica de *DUSP11* em amostras de câncer de pulmão e linhagens celulares. Embora nossas análises de expressão gênica apresentem significância estatística, a análise proteica de *DUSP11* em amostras de pacientes deve ser conduzida para responder com maior rigor quanto ao seu nível de expressão tumoral.

Dada a significância clínica da expressão gênica de *DUSP11* em tumores, o próximo passo deste trabalho foi avaliar se o nível de expressão apresenta correlação com a sensibilidade à gemcitabina. Por meio de análise proteica em diferentes linhagens celulares e análise de viabilidade celular, nossos dados mostram que quanto menor o nível de *DUSP11*, melhor as células respondem ao tratamento com a gemcitabina. Para validar esse dado no ADP, utilizando o sistema CRISPR-Cas9, observamos que células da linhagem celular MIA PaCa-2 *DUSP11*^{-/-} apresentaram uma redução da viabilidade celular e um aumento na taxa de morte por apoptose - com modulação das proteínas Bax/Bcl-2 - quando tratadas com a gemcitabina. Esses dados indicam um potencial papel de *DUSP11* quanto a resposta terapêutica no adenocarcinoma pancreático. No entanto, os dados foram gerados com um modelo celular. Conseqüentemente, ampliar o estudo com outras linhagens celulares de ADP se faz necessário.

É evidente o efeito fenotípico de *DUSP11* com relação à gemcitabina. Por isso, é necessário investigar por qual mecanismo *DUSP11* estaria mediando essa sensibilização. Por

meio da análise de enriquecimento com amostras do conjunto de dados do TCGA PAAD, observamos que a via de sinalização do NF- κ B estaria relacionada com a expressão gênica de *DUSP11*. Esse resultado é capaz de nortear o mecanismo molecular de ação da fosfatase estudada, trazendo melhor compreensão do seu papel no ADP.

Isso nos levou a especular se a resistência à gemcitabina, mediada pela via NF- κ B, poderia envolver *DUSP11*. De fato, observamos que a fosforilação de NF- κ B é induzida pela gemcitabina, mas foi reduzida com a inibição de *DUSP11*, o que sugere *DUSP11* como mediadora da ativação da via do NF- κ B. Diversos estudos mostram que a gemcitabina ativa NF- κ B e que esse fator é associado à quimiorresistência no ADP ^{90,92,112,113}, por controlar o crescimento tumoral, metástase, inflamação e angiogênese. Além disso, a via do NF- κ B pode reprimir proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de gemcitabina, como o transportador de nucleosídeo humano 1 (hENT1) e o transportador de nucleosídeo concentrado humano 1 e 3 (hCNT1 e hCNT3), o que sugere fortemente o uso de inibidores de NF- κ B para melhorar a quimiossensibilidade de compostos citotóxicos ⁹⁰⁻⁹². Apesar do papel relevante desempenhado pelo NF- κ B na resposta à gemcitabina, superar a resistência ainda é um desafio e elucidar novas moléculas que impulsionam essa resistência é urgentemente necessário. Como *DUSP11* tem como alvo preferencial os RNAs, nos perguntamos se haveria um RNA mediando a resposta de NF- κ B no tratamento com gemcitabina, induzida por *DUSP11*.

Dentre os RNAs que são alvos da atividade de *DUSP11*, têm os vault RNAs. Em humanos, quatro vault RNAs são codificados no cromossomo 5q31 em dois loci diferentes. O *locus* VTRNA-1 contém a informação genética dos vault RNAs 1-1, 1-2 e 1-3, sendo que o *locus* VTRNA-2 contém o código para o vault RNA 2-1, também conhecido como nc886 ^{95,114,115}. Foram identificados pela primeira vez como componentes das partículas Vault ⁹⁵, maiores complexos conhecidos de ribonucleoproteínas em eucariotos ¹¹⁶. Essas partículas já foram descritas por desempenharem papéis fundamentais nas células eucarióticas, como em mecanismos de incluem: transporte nuclear-citoplasmático, sinalização celular, resistência à apoptose e resistência a drogas em células cancerígenas ^{97,117,118}. No entanto, cerca de 95% dos vault RNAs não estão associados à essas partículas. As funções moleculares dos vault RNAs permanecem pouco compreendidas, mas já foram investigados em processos celulares, como apoptose, autofagia, proliferação e resistência a drogas ⁹⁶.

Por meio da análise da expressão, nossos dados revelaram que os vault RNAs são regulados positivamente em células MIA PaCa-2 que apresentam inibição de DUSP11, em comparação com células do tipo selvagem. Esse resultado mostra que a expressão de DUSP11 modula a classe dos vault RNAs, trazendo melhor entendimento acerca do mecanismo molecular que permeia a resposta à gemcitabina. Corroborando com os nossos dados, Burke e colaboradores⁷⁸ utilizaram uma plataforma de sequenciamento de RNA capaz de quantificar RNAs altamente estruturados e diferenças no status de fosforilação (TGIRT-seq), e observaram níveis transcricionais aumentados e maior fosforilação dos vault RNAs em células A549 e HEK293T nocaute para DUSP11. Além disso, ao reconstituírem a expressão de DUSP11, houve uma redução nos níveis dos vault RNAs. Eles mostraram que a fosforilação desses pequenos RNAs são essenciais no controle da sua expressão. Embora nossas análises indiquem uma modulação da expressão dos vault RNAs diante de DUSP11, não avaliamos o nível de fosforilação desses RNAs em células pancreáticas, o que poderá ser conduzido em novos estudos.

Os vault RNAs vêm sendo descritos relacionados a alguns processos celulares e alguns dados na literatura já relataram o envolvimento de vault RNAs no processo de resposta a drogas. Por exemplo, o vtRNA 1-1 foi descrito pela resistência à mitoxantrona em osteossarcoma. Gopinath et al.,^{119,120} mostraram que uma maior expressão do vtRNA 1-1 na linhagem de osteossarcoma, U2OS, promoveu a quimiorresistência pelo fato desse vtRNA se ligar à mitoxantrona e impedir que atinja seu sítio alvo. Além disso, o vtRNA 1-1 também foi associado por contribuir na quimiorresistência à doxorubicina na linhagem celular MCF-7, de câncer de mama⁸³. RNAs não codificantes foram descritos por Lin e colaboradores¹²¹ envolvidos na resistência do ADP à gemcitabina e a outras drogas, incluindo RNAs não codificantes longos (lncRNAs), microRNAs (miRNAs) e RNAs circulares (circRNAs), o que sustenta nossa hipótese de que a classe dos vaultRNAs também tenha um papel crucial no tratamento do ADP. Ainda carecem de estudos sobre os vault RNAs no câncer de pâncreas, principalmente relacionado na resposta a drogas. Mas, neste estudo, observamos um potencial papel do vault RNA 2-1.

Dentre os quatro parálogos de vaultRNA que foram modulados na MIA PaCa-2, destaca-se o vtRNA2-1 (também conhecido como nc886). Relatos iniciais revelaram que esse RNA é abundante em tecidos normais e pouco expresso em células cancerígenas de diferentes

origens teciduais como mama, melanoma, colo do útero, pulmão e próstata ^{84,122}, o que contribui com nossos achados em células de ADP diante da expressão de DUSP11. Além disso, um fator que também regula a expressão dos vault RNAs é a metilação. No caso, a hipermetilação do vault RNA 2-1 está correlacionada com mau prognóstico em alguns tipos de câncer, podendo atuar como supressor tumoral e como marcador prognóstico ¹²²⁻¹²⁶.

Buscando entender a ligação do nc886 com a proteína DUSP11, observamos, por meio de imunoprecipitação de RNA, que tem uma interação entre as duas moléculas, o que corrobora com a hipótese de que DUSP11 tem como alvo alguns RNAs ^{73,78}. Além disso, avaliamos se a gemcitabina pode interferir nos níveis transcricionais dos vault RNAs. Quando submetido ao tratamento, o nc886 foi significativamente reduzido. Mas, em células MIA PaCa-2 DUSP11^{-/-}, a expressão do nc886 foi claramente sustentada. Esses dados apoiam a ligação de DUSP11 com RNAs, e de que o nc886 poderia estar mediando a resistência induzida por DUSP11 à gemcitabina.

Nossos dados revelam que, ao inibir DUSP11, há uma modulação na ativação do NF-κB e em um dos seus alvos moleculares, o nc886. No entanto, qual seria o link entre o nc886 e o NF-κB? Uma das funções conhecidas do nc886 é inibir a fosforilação da proteína quinase R (PKR) e, conseqüentemente, inibir alvos *downstream*, como a via NF-κB, cuja ativação pode ser promovida pela atividade da PKR. Assim, sugerimos que a PKR, um dos reguladores negativos do NF-κB, poderia mediar essa cascata de sinalização. Curiosamente, essa hipótese é consistente com a função conhecida de nc886 como regulador negativo de PKR ^{84,94}.

A PKR é uma proteína central para a resposta celular a diferentes sinais de estresse, como patógenos, citocinas e irradiação. Ela ativa diferentes vias de sinalização como JNK, NF-κB, PP2A, p38 e inibe o eIF2α por fosforilação ¹²⁷. Em células normais, a PKR ativa o supressor tumor PP2A, que bloqueia o ciclo celular, a proliferação e leva a célula à morte ⁸⁴. Em células de câncer, a PKR ativa não induz a fosforilação de eIF2α e PP2A, de modo que a apoptose não é desencadeada. Por outro lado, ela promove a ativação da via NF-κB e a sobrevivência celular ^{93,128,129}. Dessa forma, baixos níveis de expressão do nc886 encontrados em linhagens celulares e amostras de pacientes com câncer resultam na ativação de PKR e conseqüente aumento da proliferação celular e resistência a drogas ⁹⁴.

Deve-se notar que a inibição de DUSP11 pode claramente impactar na resposta a gemcitabina, que parece ser mediada pela sinalização nc886/PKR. Assim, avaliamos e

observamos que ao inibir o DUSP11, há uma redução na atividade enzimática da PKR. Alguns estudos relataram que o nc886 pode mediar a função da PKR como um item chave para a citotoxicidade da doxorubicina (um composto reativo ao DNA, como a gemcitabina) em vários modelos de linhagens celulares de câncer humano, apoiando assim nossa hipótese ¹³⁰. Curiosamente, o vtRNA1-1, outro parálogo de vtRNA encontrado em humanos, tem sido associado com a apoptose extrínseca e intrínseca através da cascata de sinalização NF-κB em células cancerígenas (como linfoma, mama e câncer cervical) e promoveu a resistência à doxorubicina no câncer de mama ^{83,131}. Em um contexto diferente, na qual células B são infectadas pelo vírus Epstein-Barr, o vault RNA 1-1 inibe as vias apoptóticas e permite a proliferação celular pela ativação da via NF-κB e regulação positiva da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL ¹³¹. Mesmo em um condição distinta, o nc886 parece atuar como supressor tumoral em contraste com os efeitos oncogênicos do vault RNA 1-1 ^{122,124,125,132,133}.

Ao todo, essas descobertas suportam o papel dos vtRNAs nas funções mediadas por NF-κB induzidas pela gemcitabina, conforme proposto no modelo ilustrado na **Figura 23**. No contexto aqui investigado, no entanto, atualmente não conhecemos as características precisas de interação DUSP11-nc886 que determinaria a modulação de NF-κB em células de câncer de pâncreas. Em resumo, nossos dados relatam, pela primeira vez, o papel da RNA fosfatase atípica DUSP11 em células de câncer pancreático e lança nova luz sobre novos mecanismos que podem desempenhar um papel importante na resposta da gemcitabina. Este estudo traz novos caminhos promissores para uma melhor compreensão de DUSP11, tanto na biologia do RNA quanto nos campos relacionados ao câncer.

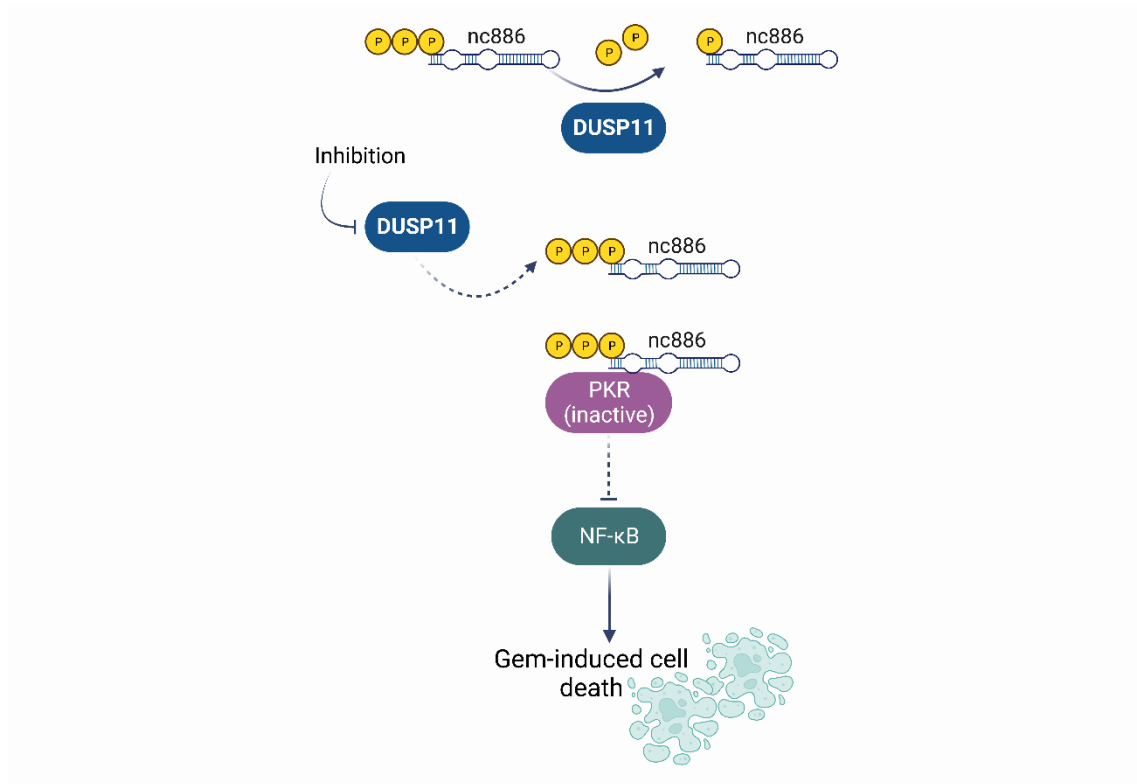


Figura 23. Esquema do modelo proposto para a morte celular induzida por gemcitabina mediada por DUSP11. DUSP11 modula a expressão de nc886. Ao inibir DUSP11, há um acúmulo de nc886 no citoplasma, que irá interagir e inibir a atividade enzimática da proteína PKR. A PKR sendo inativada, impede a atividade de seu alvo downstream NF-κB, contribuindo assim para que as células sejam mais suscetíveis ao tratamento com gemcitabina em células de câncer pancreático.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- O gene *DUSP11* é mais expresso em amostras tumorais de câncer de pâncreas e em outros tumores sólidos, quando comparado às amostras livres de tumor;
- *DUSP11* desempenha um papel sensibilizante ao tratamento em células de ADP;
- *DUSP11* modula a expressão dos marcadores apoptóticos Bax e Bcl-2;
- A expressão de *DUSP11* está correlacionada à uma regulação positiva da via de sinalização NF-κB;
- A inibição de *DUSP11* promove a inativação de NF-κB após tratamento com gemcitabina;
- A expressão proteica de *DUSP11* reduz os níveis de expressão dos vaultRNAs, especialmente do vtRNA 2-1;
- O mecanismo de regulação da sensibilidade, mediado por *DUSP11*, envolve aumento da expressão do vtRNA2-1 (nc886) e redução da atividade proteica de PKR.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- 1 Kleeff, J. *et al.* Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16022 (2016). <https://doi.org:10.1038/nrdp.2016.22>
- 2 Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* **74**, 2913-2921 (2014). <https://doi.org:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- 3 Font-Burgada, J., Sun, B. & Karin, M. Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. *Cell Metab* **23**, 48-62 (2016). <https://doi.org:10.1016/j.cmet.2015.12.015>
- 4 Rahn, S. *et al.* Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett* **415**, 129-150 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.canlet.2017.12.004>
- 5 Zhang, S. *et al.* Effects of alcohol drinking and smoking on pancreatic ductal adenocarcinoma mortality: A retrospective cohort study consisting of 1783 patients. *Sci Rep* **7**, 9572 (2017). <https://doi.org:10.1038/s41598-017-08794-1>
- 6 Syngal, S. *et al.* ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* **110**, 223-262; quiz 263 (2015). <https://doi.org:10.1038/ajg.2014.435>
- 7 Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* **71**, 7-33 (2021). <https://doi.org:10.3322/caac.21654>
- 8 He, X. Y. & Yuan, Y. Z. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. *World J Gastroenterol* **20**, 11241-11248 (2014). <https://doi.org:10.3748/wjg.v20.i32.11241>
- 9 Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897-909 (2002). <https://doi.org:10.1038/nrc949>
- 10 Puri, S., Folias, A. E. & Hebrok, M. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell* **16**, 18-31 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.stem.2014.11.001>
- 11 Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y. & Han, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* **48**, e219 (2016). <https://doi.org:10.1038/emm.2016.6>
- 12 Scarpa, A., Real, F. X. & Luchini, C. Genetic unrelatedness of co-occurring pancreatic adenocarcinomas and IPMNs challenges current views of clinical management. *Gut* **67**, 1561-1563 (2018). <https://doi.org:10.1136/gutjnl-2018-316151>
- 13 Hruban, R. H., Maitra, A. & Goggins, M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* **1**, 306-316 (2008).

- 14 Grippo, P. J., Nowlin, P. S., Demeure, M. J., Longnecker, D. S. & Sandgren, E. P. Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Res* **63**, 2016-2019 (2003).
- 15 Gidekel Friedlander, S. Y. *et al.* Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* **16**, 379-389 (2009). <https://doi.org:10.1016/j.ccr.2009.09.027>
- 16 Kopp, J. L. *et al.* Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737-750 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.ccr.2012.10.025>
- 17 Kanda, M. *et al.* Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* **142**, 730-733.e739 (2012). <https://doi.org:10.1053/j.gastro.2011.12.042>
- 18 Koorstra, J. B., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J. & Maitra, A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* **8**, 110-125 (2008). <https://doi.org:10.1159/000123838>
- 19 Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114-1117 (2010). <https://doi.org:10.1038/nature09515>
- 20 Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495-501 (2015). <https://doi.org:10.1038/nature14169>
- 21 Iguchi, E., Safgren, S. L., Marks, D. L., Olson, R. L. & Fernandez-Zapico, M. E. Pancreatic Cancer, A Mis-interpreter of the Epigenetic Language. *Yale J Biol Med* **89**, 575-590 (2016).
- 22 Roe, J. S. *et al.* Enhancer Reprogramming Promotes Pancreatic Cancer Metastasis. *Cell* **170**, 875-888.e820 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2017.07.007>
- 23 Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47-52 (2016). <https://doi.org:10.1038/nature16965>
- 24 Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500-503 (2011). <https://doi.org:10.1038/nm.2344>
- 25 Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* **47**, 1168-1178 (2015). <https://doi.org:10.1038/ng.3398>
- 26 Hayashi, A. *et al.* A unifying paradigm for transcriptional heterogeneity and squamous features in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cancer* **1**, 59-74 (2020). <https://doi.org:10.1038/s43018-019-0010-1>

- 27 Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K. & Biankin, A. V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 207-220 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41575-019-0109-y>
- 28 Aung, K. L. *et al.* Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin Cancer Res* **24**, 1344-1354 (2018). <https://doi.org:10.1158/1078-0432.CCR-17-2994>
- 29 Katz, M. H., Hwang, R., Fleming, J. B. & Evans, D. B. Tumor-node-metastasis staging of pancreatic adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin* **58**, 111-125 (2008). <https://doi.org:10.3322/CA.2007.0012>
- 30 Tempero, M. A. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **19**, 439-457 (2021). <https://doi.org:10.6004/jnccn.2021.0017>
- 31 Distler, M. *et al.* Evaluation of survival in patients after pancreatic head resection for ductal adenocarcinoma. *BMC Surg* **13**, 12 (2013). <https://doi.org:10.1186/1471-2482-13-12>
- 32 Sultana, A. *et al.* Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **25**, 2607-2615 (2007). <https://doi.org:10.1200/JCO.2006.09.2551>
- 33 Mackey, J. R. *et al.* Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* **58**, 4349-4357 (1998).
- 34 Binenbaum, Y., Na'ara, S. & Gil, Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat* **23**, 55-68 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.drug.2015.10.002>
- 35 Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* **17** Suppl 5, v7-12 (2006). <https://doi.org:10.1093/annonc/mdj941>
- 36 Ueno, H. *et al.* A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer* **101**, 908-915 (2009). <https://doi.org:10.1038/sj.bjc.6605256>
- 37 Von Hoff, D. D. *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* **369**, 1691-1703 (2013). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa1304369>
- 38 Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* **379**, 2395-2406 (2018). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa1809775>

- 39 Oken, M. M. *et al.* Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* **5**, 649-655 (1982).
- 40 Sohal, D. P., Mangu, P. B. & Laheru, D. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract* **13**, 261-264 (2017). <https://doi.org:10.1200/JOP.2016.017368>
- 41 Principe, D. R. *et al.* The Current Treatment Paradigm for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Barriers to Therapeutic Efficacy. *Front Oncol* **11**, 688377 (2021). <https://doi.org:10.3389/fonc.2021.688377>
- 42 Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**, 2455-2465 (2012). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa1200694>
- 43 Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 1627-1639 (2015). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa1507643>
- 44 Hu, Z., Ott, P. A. & Wu, C. J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol* **18**, 168-182 (2018). <https://doi.org:10.1038/nri.2017.131>
- 45 Royal, R. E. *et al.* Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* **33**, 828-833 (2010). <https://doi.org:10.1097/CJI.0b013e3181eec14c>
- 46 Dougan, S. K. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J* **23**, 321-325 (2017). <https://doi.org:10.1097/PPO.0000000000000288>
- 47 Amanam, I. & Chung, V. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* **10** (2018). <https://doi.org:10.3390/cancers10020036>
- 48 Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline. *N Engl J Med* **381**, 317-327 (2019). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa1903387>
- 49 Marabelle, A. *et al.* Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* **38**, 1-10 (2020). <https://doi.org:10.1200/JCO.19.02105>
- 50 Hu, Z. I. *et al.* Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clin Cancer Res* **24**, 1326-1336 (2018). <https://doi.org:10.1158/1078-0432.CCR-17-3099>
- 51 Principe, D. R., Korc, M., Kamath, S. D., Munshi, H. G. & Rana, A. Trials and tribulations of pancreatic cancer immunotherapy. *Cancer Lett* **504**, 1-14 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.canlet.2021.01.031>

- 52 Nevala-Plagemann, C., Hidalgo, M. & Garrido-Laguna, I. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 108-123 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41571-019-0281-6>
- 53 Drilon, A. *et al.* Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* **7**, 400-409 (2017). <https://doi.org:10.1158/2159-8290.CD-16-1237>
- 54 Kamerkar, S. *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* **546**, 498-503 (2017). <https://doi.org:10.1038/nature22341>
- 55 Mikamori, M. *et al.* MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep* **7**, 42339 (2017). <https://doi.org:10.1038/srep42339>
- 56 Amrutkar, M. & Gladhaug, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)* **9** (2017). <https://doi.org:10.3390/cancers9110157>
- 57 Morrison, A. H., Byrne, K. T. & Vonderheide, R. H. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer* **4**, 418-428 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.trecan.2018.04.001>
- 58 Grasso, C., Jansen, G. & Giovannetti, E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. *Crit Rev Oncol Hematol* **114**, 139-152 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.critrevonc.2017.03.026>
- 59 Manji, G. A., Olive, K. P., Saenger, Y. M. & Oberstein, P. Current and Emerging Therapies in Metastatic Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **23**, 1670-1678 (2017). <https://doi.org:10.1158/1078-0432.CCR-16-2319>
- 60 Bergman, A. M., Pinedo, H. M. & Peters, G. J. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* **5**, 19-33 (2002). [https://doi.org:10.1016/s1368-7646\(02\)00002-x](https://doi.org:10.1016/s1368-7646(02)00002-x)
- 61 Zeng, S. *et al.* Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* **20** (2019). <https://doi.org:10.3390/ijms20184504>
- 62 Liang, C. *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* **49**, e406 (2017). <https://doi.org:10.1038/emm.2017.255>
- 63 Ju, H. Q. *et al.* Mechanisms of Overcoming Intrinsic Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through the Redox Modulation. *Mol Cancer Ther* **14**, 788-798 (2015). <https://doi.org:10.1158/1535-7163.MCT-14-0420>
- 64 Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**, 1457-1461 (2009). <https://doi.org:10.1126/science.1171362>

- 65 Li, W. *et al.* PROM2 promotes gemcitabine chemoresistance via activating the Akt signaling pathway in pancreatic cancer. *Exp Mol Med* **52**, 409-422 (2020). <https://doi.org:10.1038/s12276-020-0390-4>
- 66 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* **109**, 563-572 (2019). <https://doi.org:10.1016/j.biopha.2018.10.084>
- 67 Li, Y. *et al.* Natural compound Oblongifolin C confers gemcitabine resistance in pancreatic cancer by downregulating Src/MAPK/ERK pathways. *Cell Death Dis* **9**, 538 (2018). <https://doi.org:10.1038/s41419-018-0574-1>
- 68 Bermudez, O., Pagès, G. & Gimond, C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C189-202 (2010). <https://doi.org:10.1152/ajpcell.00347.2009>
- 69 Alonso, A. & Pulido, R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J* **283**, 2197-2201 (2016). <https://doi.org:10.1111/febs.13748>
- 70 Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711 (2004). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2004.05.018>
- 71 Patterson, K. I., Brummer, T., O'Brien, P. M. & Daly, R. J. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* **418**, 475-489 (2009). <https://doi.org:10.1042/bj20082234>
- 72 Ruckert, M. T., de Andrade, P. V., Santos, V. S. & Silveira, V. S. Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci* **76**, 2571-2592 (2019). <https://doi.org:10.1007/s00018-019-03095-4>
- 73 Yuan, Y., Li, D. M. & Sun, H. PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* **273**, 20347-20353 (1998). <https://doi.org:10.1074/jbc.273.32.20347>
- 74 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* **274**, 16590-16594 (1999). <https://doi.org:10.1074/jbc.274.23.16590>
- 75 Mathy, N. *et al.* 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* **129**, 681-692 (2007). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2007.02.051>
- 76 Stevens, A. Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5' leads to 3' mode of hydrolysis. *J Biol Chem* **255**, 3080-3085 (1980).
- 77 Bentley, D. L. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet* **15**, 163-175 (2014). <https://doi.org:10.1038/nrg3662>

- 78 Burke, J. M. & Sullivan, C. S. DUSP11 - An RNA phosphatase that regulates host and viral non-coding RNAs in mammalian cells. *RNA Biol* **14**, 1457-1465 (2017). <https://doi.org:10.1080/15476286.2017.1306169>
- 79 Burke, J. M., Kincaid, R. P., Nottingham, R. M., Lambowitz, A. M. & Sullivan, C. S. DUSP11 activity on triphosphorylated transcripts promotes Argonaute association with noncanonical viral microRNAs and regulates steady-state levels of cellular noncoding RNAs. *Genes Dev* **30**, 2076-2092 (2016). <https://doi.org:10.1101/gad.282616.116>
- 80 Cai, Y., Wu, Q., Liu, Y. & Wang, J. AZIN1-AS1, A Novel Oncogenic LncRNA, Promotes the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer by Regulating MiR-513b-5p and DUSP11. *Onco Targets Ther* **13**, 9667-9678 (2020). <https://doi.org:10.2147/OTT.S261497>
- 81 Xu, L. *et al.* Dual-Specificity Phosphatase 11 Is a Prognostic Biomarker of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Front Oncol* **11**, 757498 (2021). <https://doi.org:10.3389/fonc.2021.757498>
- 82 Huanwen, W. *et al.* Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol Cancer* **8**, 125 (2009). <https://doi.org:10.1186/1476-4598-8-125>
- 83 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* **13**, e0191325 (2018). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0191325>
- 84 Lee, K. *et al.* Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA* **17**, 1076-1089 (2011). <https://doi.org:10.1261/rna.2701111>
- 85 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001). <https://doi.org:10.1006/meth.2001.1262>
- 86 Carithers, L. J. *et al.* A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank* **13**, 311-319 (2015). <https://doi.org:10.1089/bio.2015.0032>
- 87 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* **45**, W98-W102 (2017). <https://doi.org:10.1093/nar/gkx247>
- 88 Goldman, M. J. *et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* **38**, 675-678 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41587-020-0546-8>

- 89 Vasaikar, S. V., Straub, P., Wang, J. & Zhang, B. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. *Nucleic Acids Res* **46**, D956-D963 (2018). <https://doi.org:10.1093/nar/gkx1090>
- 90 Li, Q. *et al.* NF- κ B in pancreatic cancer: Its key role in chemoresistance. *Cancer Lett* **421**, 127-134 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.canlet.2018.02.011>
- 91 Skrypek, N. *et al.* The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* **32**, 1714-1723 (2013). <https://doi.org:10.1038/onc.2012.179>
- 92 Pramanik, K. C., Makena, M. R., Bhowmick, K. & Pandey, M. K. Advancement of NF- κ B Signaling Pathway: A Novel Target in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* **19** (2018). <https://doi.org:10.3390/ijms19123890>
- 93 Prasad, S., Ravindran, J. & Aggarwal, B. B. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* **336**, 25-37 (2010). <https://doi.org:10.1007/s11010-009-0267-2>
- 94 Kunkeaw, N. *et al.* Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene* **32**, 3722-3731 (2013). <https://doi.org:10.1038/onc.2012.382>
- 95 Kedersha, N. L. & Rome, L. H. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* **103**, 699-709 (1986). <https://doi.org:10.1083/jcb.103.3.699>
- 96 Hahne, J. C., Lampis, A. & Valeri, N. Vault RNAs: hidden gems in RNA and protein regulation. *Cell Mol Life Sci* **78**, 1487-1499 (2021). <https://doi.org:10.1007/s00018-020-03675-9>
- 97 Kickhoefer, V. A. *et al.* Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem* **273**, 8971-8974 (1998). <https://doi.org:10.1074/jbc.273.15.8971>
- 98 Leroux, C. & Konstantinidou, G. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer: Overview of Current Treatments and New Opportunities for Personalized Oncology. *Cancers (Basel)* **13** (2021). <https://doi.org:10.3390/cancers13040799>
- 99 Wang, Z. *et al.* Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 27-33 (2011). <https://doi.org:10.1038/nrgastro.2010.188>
- 100 Singh, V. *et al.* Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J* **36**, 1-6 (2017). <https://doi.org:10.1007/s10930-017-9696-z>
- 101 Manzano, R. G. *et al.* CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene* **21**, 4435-4447 (2002). <https://doi.org:10.1038/sj.onc.1205542>

- 102 Pervin, S., Singh, R., Freije, W. A. & Chaudhuri, G. MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer. *Cancer Res* **63**, 8853-8860 (2003).
- 103 Serini, S. *et al.* Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis* **13**, 1172-1183 (2008). <https://doi.org:10.1007/s10495-008-0246-1>
- 104 Cui, Y. *et al.* Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer Res* **66**, 5950-5959 (2006). <https://doi.org:10.1158/0008-5472.CAN-05-3243>
- 105 Chan, D. W. *et al.* Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* **29**, 1742-1750 (2008). <https://doi.org:10.1093/carcin/bgn167>
- 106 Liu, F., Gore, A. J., Wilson, J. L. & Korc, M. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS One* **9**, e84982 (2014). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0084982>
- 107 Lee, J., Yun, J. H., Jeong, D. G. & Kim, J. H. DUSP28 links regulation of Mucin 5B and Mucin 16 to migration and survival of AsPC-1 human pancreatic cancer cells. *Tumour Biol* **37**, 12193-12202 (2016). <https://doi.org:10.1007/s13277-016-5079-x>
- 108 Choi, J. H. *et al.* DUSP11-mediated control of 5'-triphosphate RNA regulates RIG-I sensitivity. *Genes Dev* **34**, 1697-1712 (2020). <https://doi.org:10.1101/gad.340604.120>
- 109 Choi, J. H. & Sullivan, C. S. DUSP11 and triphosphate RNA balance during virus infection. *PLoS Pathog* **17**, e1009145 (2021). <https://doi.org:10.1371/journal.ppat.1009145>
- 110 Yang, C. Y. *et al.* DUSP11 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation by Targeting TAK1. *J Immunol* **205**, 1644-1652 (2020). <https://doi.org:10.4049/jimmunol.2000334>
- 111 Zhao, Y., Ye, X., Dunker, W., Song, Y. & Karijolich, J. RIG-I like receptor sensing of host RNAs facilitates the cell-intrinsic immune response to KSHV infection. *Nat Commun* **9**, 4841 (2018). <https://doi.org:10.1038/s41467-018-07314-7>
- 112 Arlt, A. *et al.* Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* **22**, 3243-3251 (2003). <https://doi.org:10.1038/sj.onc.1206390>
- 113 Jia, Y. & Xie, J. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes Dis* **2**, 299-306 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.gendis.2015.07.003>

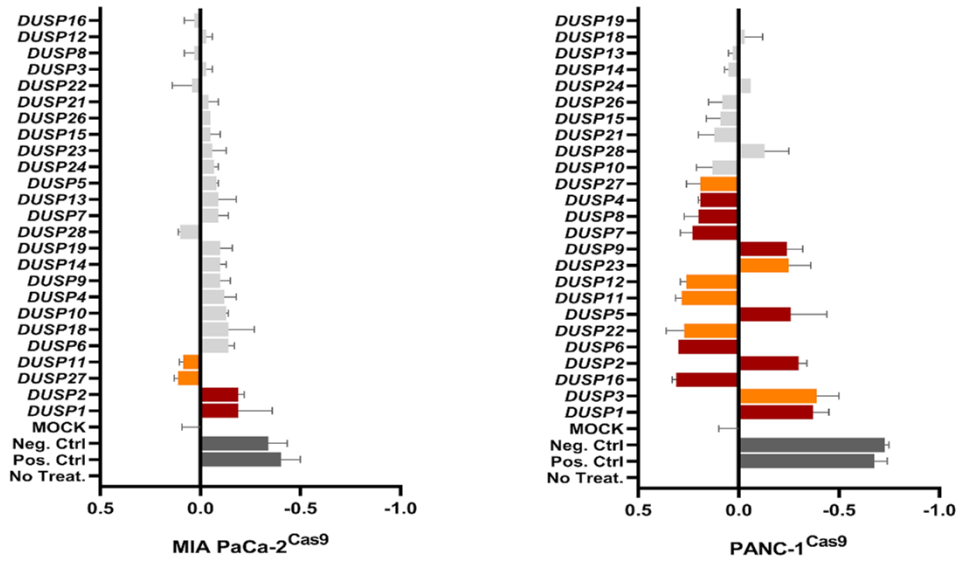
- 114 Kedersha, N. L., Heuser, J. E., Chugani, D. C. & Rome, L. H. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol* **112**, 225-235 (1991). <https://doi.org:10.1083/jcb.112.2.225>
- 115 Boivin, V., Faucher-Giguère, L., Scott, M. & Abou-Elela, S. The cellular landscape of mid-size noncoding RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **10**, e1530 (2019). <https://doi.org:10.1002/wrna.1530>
- 116 Kong, L. B., Siva, A. C., Rome, L. H. & Stewart, P. L. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure* **7**, 371-379 (1999). [https://doi.org:10.1016/s0969-2126\(99\)80050-1](https://doi.org:10.1016/s0969-2126(99)80050-1)
- 117 Chung, J. H., Ginn-Pease, M. E. & Eng, C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res* **65**, 4108-4116 (2005). <https://doi.org:10.1158/0008-5472.CAN-05-0124>
- 118 Kim, E. *et al.* Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling. *FEBS J* **273**, 793-804 (2006). <https://doi.org:10.1111/j.1742-4658.2006.05112.x>
- 119 Gopinath, S. C., Wadhwa, R. & Kumar, P. K. Expression of noncoding vault RNA in human malignant cells and its importance in mitoxantrone resistance. *Mol Cancer Res* **8**, 1536-1546 (2010). <https://doi.org:10.1158/1541-7786.MCR-10-0242>
- 120 Gopinath, S. C., Matsugami, A., Katahira, M. & Kumar, P. K. Human vault-associated non-coding RNAs bind to mitoxantrone, a chemotherapeutic compound. *Nucleic Acids Res* **33**, 4874-4881 (2005). <https://doi.org:10.1093/nar/gki809>
- 121 Lin, Z., Lu, S., Xie, X., Yi, X. & Huang, H. Noncoding RNAs in drug-resistant pancreatic cancer: A review. *Biomed Pharmacother* **131**, 110768 (2020). <https://doi.org:10.1016/j.biopha.2020.110768>
- 122 Treppendahl, M. B. *et al.* Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. *Blood* **119**, 206-216 (2012). <https://doi.org:10.1182/blood-2011-06-362541>
- 123 Cao, J. *et al.* DNA methylation-mediated repression of miR-886-3p predicts poor outcome of human small cell lung cancer. *Cancer Res* **73**, 3326-3335 (2013). <https://doi.org:10.1158/0008-5472.CAN-12-3055>
- 124 Lee, H. S. *et al.* Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget* **5**, 3472-3481 (2014). <https://doi.org:10.18632/oncotarget.1927>
- 125 Lee, K. S. *et al.* nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer. *Oncotarget* **5**, 3944-3955 (2014). <https://doi.org:10.18632/oncotarget.2047>

- 126 Fort, R. S. *et al.* Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC Cancer* **18**, 127 (2018). <https://doi.org:10.1186/s12885-018-4049-7>
- 127 García, M. A. *et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1032-1060 (2006). <https://doi.org:10.1128/MMBR.00027-06>
- 128 Kim, S. H., Gunnery, S., Choe, J. K. & Mathews, M. B. Neoplastic progression in melanoma and colon cancer is associated with increased expression and activity of the interferon-inducible protein kinase, PKR. *Oncogene* **21**, 8741-8748 (2002). <https://doi.org:10.1038/sj.onc.1205987>
- 129 Terada, T., Maeta, H., Endo, K. & Ohta, T. Protein expression of double-stranded RNA-activated protein kinase in thyroid carcinomas: correlations with histologic types, pathologic parameters, and Ki-67 labeling. *Hum Pathol* **31**, 817-821 (2000). <https://doi.org:10.1053/hupa.2000.8443>
- 130 Kunkeaw, N. *et al.* Mechanism mediated by a noncoding RNA, nc886, in the cytotoxicity of a DNA-reactive compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 8289-8294 (2019). <https://doi.org:10.1073/pnas.1814510116>
- 131 Amort, M. *et al.* Expression of the vault RNA protects cells from undergoing apoptosis. *Nat Commun* **6**, 7030 (2015). <https://doi.org:10.1038/ncomms8030>
- 132 Helbo, A. S. *et al.* Hypermethylation of the VTRNA1-3 Promoter is Associated with Poor Outcome in Lower Risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *Genes (Basel)* **6**, 977-990 (2015). <https://doi.org:10.3390/genes6040977>
- 133 Lee, Y. S. A Novel Type of Non-coding RNA, nc886, Implicated in Tumor Sensing and Suppression. *Genomics Inform* **13**, 26-30 (2015). <https://doi.org:10.5808/GI.2015.13.2.26>

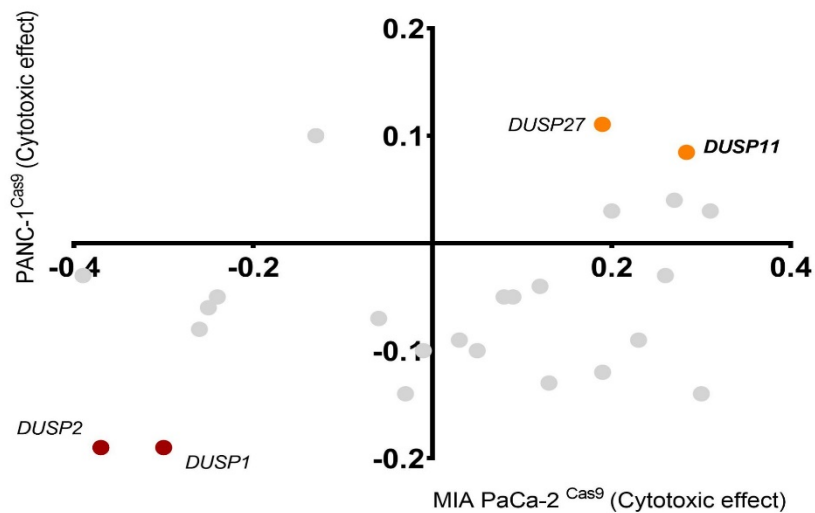
Anexos

8. ANEXOS

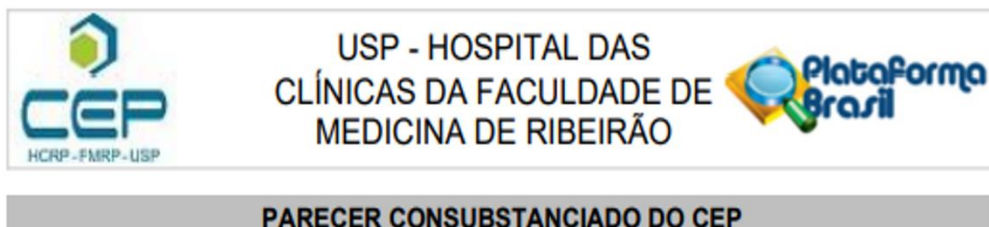
Anexo 1A – Gráfico mostra os principais candidatos entre as DUSPs testadas no efeito citotóxico à gemcitabina em linhagens celulares MIA PaCa-2 e PANC-1.



Anexo 1B – Os dados destacam o desempenho do nocaute de *DUSP11* promovendo aumento da citotoxicidade.



Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética.



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da modulação da expressão de fosfatase de dupla especificidade na sensibilização à gemcitabina.

Pesquisador: VERENA SILVA SANTOS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 09823218.9.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.219.647

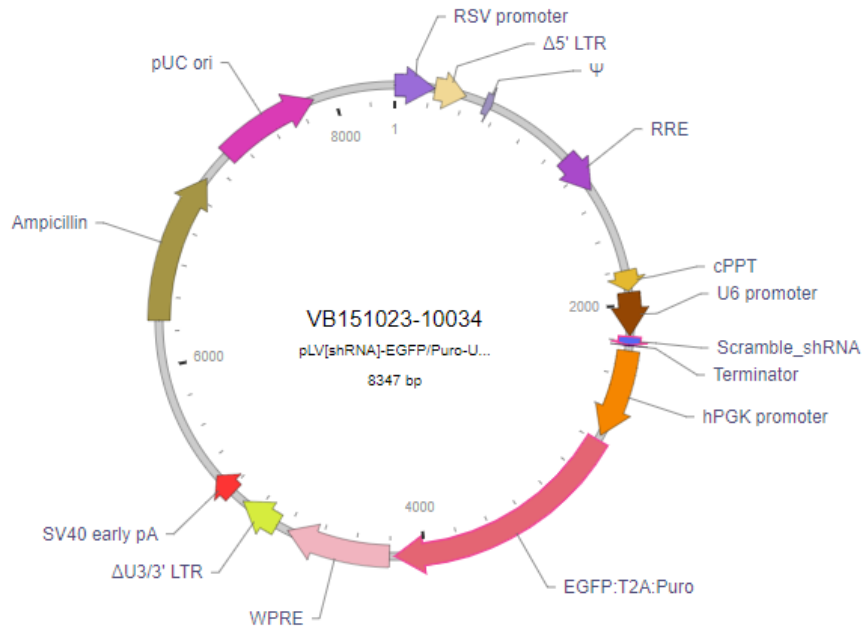
Situação do Parecer:

Aprovado

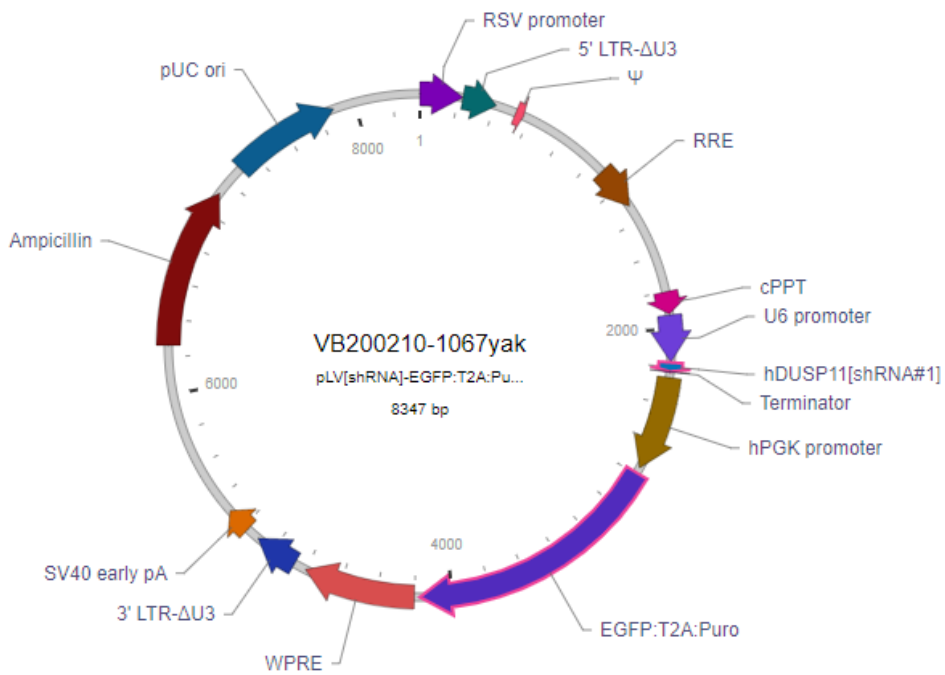
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

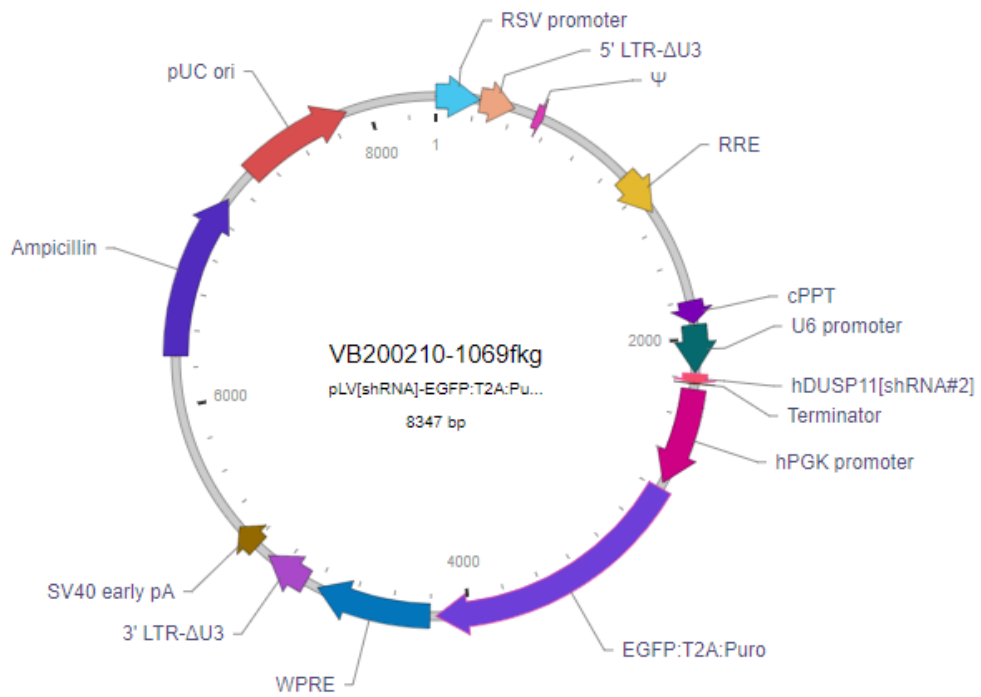
Anexo 3A – Mapa do vetor pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA (ID: VB151023-10034), vetor vazio relacionado ao vetor de silenciamento de *DUSP11*.



Anexo 3B – Mapa do vetor pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hDUSP11[shRNA#1] (ID: VB200210-1067yak), vetor de silenciamento de *DUSP11*.



Anexo 3C – Mapa do vetor pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hDUSP11[shRNA#2] (ID: VB200210-1069fkg), vetor de silenciamento de *DUSP11*.



Anexo 4 – Análise de correlação de Pearson entre expressão de *DUSP11* e sensibilidade à Gem em 27 linhagens celulares de ADP. Dados obtidos do CCLE e GDSC através do Portal Depmap.

DepMap ID	DUSP11 Gene Effect (CERES) CRISPR (DepMap 21Q2 Public+Score, CERES)	gemcitabine (BRD:BRD-K15108141-001-06-6) 10µM log2 fold change (µM) Drug sensitivity dose-level (PRISM Repurposing Secondary Screen) 19Q4	filter	Cell Line Name	Primary Disease	Lineage
ACH-000022	-0.221159327	-2.893931624	pancreas	PATU8988S	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000023	-0.215251248	-5.791034158	pancreas	PATU8988T	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000042	-0.142329484	-4.618858831	pancreas	PANC0203	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000060	-0.082588506	-4.005392373	pancreas	PANC1005	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000108	-0.182298487	-2.55053857	pancreas	KP3	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000118	-0.134538351	-6.550219764	pancreas	HUPT3	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000138	-0.071431607	-5.592890694	pancreas	CFPAC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000139	-0.132229935	-6.131625313	pancreas	PANC0327	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000155	-0.293985112	-4.337235934	pancreas	SW1990	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000164	-0.19219049	-3.256845291	pancreas	PANC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000178	-0.225963612	-2.391871379	pancreas	HS766T	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000222	-0.147294156	-2.480164001	pancreas	ASPC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000243	-0.176356006	-6.266518812	pancreas	DANG	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000265	-0.266436026	-3.385030064	pancreas	KP4	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000266	-0.25233246	-3.345631976	pancreas	SNU213	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000281	-0.10513373	-3.012484304	pancreas	KP2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000307	-0.238629921	-5.339577768	pancreas	PK1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000320	-0.149357805	-5.390978949	pancreas	PSN1	Pancreatic Cancer	Pancreas

ACH-000332	-0.289456426	-4.286048139	pancreas	YAPC	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000417	-0.209302494	-3.714593879	pancreas	PANC0813	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000468	-0.317377296	-2.758912149	pancreas	PK45H	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000502	-0.127508794	-5.844468517	pancreas	TCCPAN2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000517	-0.242919734	-2.699849049	pancreas	SNU410	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000535	-0.373279657	-2.046348692	pancreas	BXPC3	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000599	-0.240202866	-3.372740942	pancreas	PATU8902	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000601	-0.249678702	-4.639130425	pancreas	MIAPACA2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000685	-0.156712825	-4.616520907	pancreas	L33	Pancreatic Cancer	Pancreas

Anexo 5 – Dados relacionados à análise de Enriquecimento de Vias utilizando dados de RNA-Seq de câncer de pâncreas disponíveis no conjunto TCGA-PAAD.

Term	Overlap	P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
apical junction assembly (GO:0043297)	18/35	3.9638157424085255E-6	2.981.366.459.627.320	37.0831406469151	PRKCI;PDCD6IP;WDR1;F11R;RHOC;CLDN1;GRHL2;RHOA;PARD6B;DLG1;PARD6A;CLDN3;POF1B;CTNNA1;PKN2;STRN;ECT2;VCL
protein localization to membrane (GO:0072657)	51/160	4.337583183763939E-6	1.8478260869565217	22.817313586527934	ABCA12;F11R;EFR3A;ARL5B;ZFYVE27;TMEM88;BSG;SH3PXD2B;ITGB7;ARL5A;RAB8B;SH3GLB1;ATP1B3;TTC7A;CACNB2;NPC1;PACS2;PICK1;RAB38;NUP54;EZR;SPTBN4;ROCK1;ROCK2;STXBP1;ZDHHC22;LIN7C;LIN7B;TSPAN33;GOLGA7B;DPP6;FCHO2;TSPAN5;PIP5K1A;INPP5K;SPTBN1;S100A10;PACSIN1;WNT4;PPIL2;SMURF1;KCNB1;KCNB2;RFTN1;AP3D1;EFR3B;RAB11B;RAB10;DLG1;ABHD17A;CPE
extracellular matrix organization (GO:0030198)	67/229	4.481267802900822E-6	1.6960951838491236	20.888437580157067	ITGB1;SPARC;ITGB5;ITGB4;NCAN;COL12A1;LAMC2;CTSV;LAMC1;F11R;CTSS;LOXL2;COMP;CTSK;BSG;SH3PXD2B;CAPN2;CYP1B1;COL10A1;ITGAV;ITGB7;ITGB6;POSTN;MMP7;MMP2;ITGA2;SERPINF2;ADAM10;DCN;ADAM19;GREM1;MMP11;KIF9;MMP14;VCAN;MMP13;LOX;COL4A1;ADAM12;COL8A2;COL8A1;COL6A3;ADAM8;ITGA6;CD44;MATN3;COL11A1;LAMA3;THBS1;KLK7;SERPINH1;HAS3;HAS2;VCAM1;LAMB3;LUM;FN1;COL1A1;MFAP5;COL3A1;COL1A2;COL5A1;COL7A1;COL5A2;ITGA11;KLKB1;FBN1
positive regulation of protein kinase activity (GO:0045860)	53/172	8.596116449856414E-5	1.7863161442534548	20.83594882748821	DDX3X;KIF14;CLU;RPTOR;STK11;SLK;CDK20;MAP3K8;EPHA4;MAP2K2;CMC4;RIPK3;MINK1;MMD2;OXSR1;DKK1;ATG13;SRCIN1;RHOA;EREG;TRAF6;RALB;CAB39;IQGAP1;STK4;LRP8;CAMKK1;STK3;CAMKK2;PPP2CA;PAK1;RAP1A;PDCD10;SNX9;CLSPN;MAP2K7;ECT2;MAP4K5;PAK2;MAP2K5;MAP4K3;MAP4K4;MAP3K2;MAP3K1;XRCC5;SBK2;TPX2;CENPE;TAOK3;STK26;UNC119;TAB2;CALM2
cytoskeleton-dependent cytokinesis (GO:0061640)	27/70	1.83505059397185E-5	2.236024844720497	24.385759182552302	RTKN2;DCTN3;BRCA2;CENPA;ALKBH4;SEPT7;SPAST;RACGAP1;NUSAP1;SNX9;ECT2;CEP55;SPTBN1;SEPT10;SEPT11;PDCD6IP;IST1;KIF23;RHOC;SEPT5;RHOA;SEPT2;ANLN;UNC119;MITD1;STAMPB;KIF20A

protein complex subunit organization (GO:0071822)	20/45	1.951393715626594E-5	2.576489533011272	27.940435740359884	NDC1;LUM;COL11A1;COL12A1;SERPINF2;NDC80;LOXL2;COL1A1;GREM1;COL3A1;COL1A2;COL5A1;LOX;TPR;NUF2;COL5A2;SERPINH1;CYP1B1;NUP54;NUP98
regulation of extracellular exosome assembly (GO:1903551)	6/6	2.6251133850557655E-5	5.797101449275363	61.14667464088425	SDCBP;TSG101;PDCD6IP;SDC4;SDC1;STAM
mitotic cytokinesis (GO:0000281)	23/59	6.167708147753185E-5	2.2598870056497176	21.90643649037137	SEPT10;SEPT11;PDCD6IP;RTKN2;KIF23;BRCA2;RHOC;SEPT5;CENPA;SEPT2;ANLN;SEPT7;SPAST;RACGAP1;NUSAP1;UNC119;SNX9;MITD1;STAMBP;KIF20A;ECT2;CEP55;SPTBN1
endodermal cell differentiation (GO:0035987)	15/32	1.0119522029638692E-4	2.717391304347826	24.99581258831291	ITGB5;LAMB3;COL11A1;MMP2;LAMA3;COL12A1;FN1;HMG2;RTF1;INHBA;CDC73;MMP14;COL7A1;COL8A1;ITGAV
protein localization to cell periphery (GO:1990778)	37/117	1.0199478714953848E-4	1.8332713984887898	16.848843678307095	SPTBN4;ROCK1;ROCK2;STXBP1;ZDHHC22;ABCA12;F11R;LIN7C;LIN7B;TSPAN33;GOLGA7B;EFR3A;DPP6;ZFYVE27;TMEM88;BSG;FCHO2;TSPAN5;PIP5K1A;INPP5K;SPTBN1;S100A10;PACSIN1;WNT4;RAB8B;PPIL2;SMURF1;KCNB1;KCNB2;ATP1B3;TTC7A;EFR3B;RAB10;CACNB2;DLG1;PACS2;EZR
regulation of mitotic cell cycle (GO:0007346)	48/165	1.1104399447028818E-4	1.686429512516469	15.355925735710905	GPSM2;FOXC1;HNRNPU;PDXP;IQGAP1;STK4;STK3;SDCBP;BRINP2;PAK1;SLK;PIM1;RCC1;MAP3K8;NEK2;MAP2K7;MAP4K5;PAK2;MAP2K5;MAP4K3;TMEM88;MAP4K4;MAP3K2;PARP3;MAP2K2;SMAD3;MAP3K1;CAV2;NEK6;USP2;NEK7;MINK1;ASNS;OXSR1;CDC25C;RBL2;SBK2;TPX2;DLG1;TAOK3;STK26;CDK1;CKS2;PIN1;GAS1;HECA;PKN2;KIF20B
collagen fibril organization (GO:0030199)	14/29	1.157571545747916E-4	2.798600699650175	25.36656167687653	LUM;COL11A1;COL12A1;SERPINF2;LOXL2;COL1A1;GREM1;COL3A1;COL1A2;COL5A1;LOX;COL5A2;SERPINH1;CYP1B1
protein localization to	39/130	2.3403761701053333E-4	1.7391304347826089	14.539180346210847	SPTBN4;ROCK1;ROCK2;STXBP1;ZDHHC22;ABCA12;F11R;TSPAN33;GOLGA7B;EFR3A;DPP6;ZFYVE27;TMEM88;RAB26;BSG;FCHO2;

plasma membrane (GO:0072659)					TSPAN5;PIP5K1A;INPP5K;SPTBN1;S100A10;PACIN1;WNT4;RAB8B;PPIL2;SMURF1;KCNB1;KCNB2;ATP1B3;TTC7A;EFR3B;RAB10;CACNB2;DLG1;RAB31;PACS2;EZR;BLZF1;VAMP2
embryonic skeletal system development (GO:0048706)	11/21	2.5464010898937963E-4	3.0365769496204282	25.129676415941027	COL1A1;KIAA1217;OSR2;DEAF1;WNT5A;SIX1;SULF1;MEGF8;PCSK5;DSCAML1;SULF2
protein polyubiquitination (GO:0000209)	72/283	3.021361750880724E-4	1.4748809340912583	11.953368293252808	LRSAM1;UBE2D4;UBE2D3;UBE2D1;PSMD7;PSMD5;TRIM5;RNF19A;PSMD1;ARIH1;TRIM21;FBXO9;FBXW4;FBXW5;UBE2E3;FBXW9;UBE2E1;FBXO15;ZFP91;LMO7;FBXO11;PSMA5;RNF168;RNF167;CDC34;PSMA1;TRAF6;PSME4;PELI1;THOP1;DTL;BIRC2;ANAPC2;CBFB;PSMD14;PELI3;TANK;PSMB6;FBXL20;FZR1;RNF216;
cellular protein modification process (GO:0006464)	214/1001	3.144091219164577E-4	1.2393403697751526	9.995051404234014	GMFB;ARAF;UBE2L6;PSMD7;TBK1;STS;PPP4R2;PSMD5;OGFOD1;RPS6KA1;CDK20;PSMD1;PRKACA;FBXO9;ACVR1;PRKCI;ALG5;PHKA2;CDC34;PRKAR1B;PSME4;ULK1;MTMR2;CTBP1;WNK4;DCUN1D1;NLK;EVPL;HIF1A;MTMR7;NUAK2;ARJ;STK38L;LYN;CDK17;YES1;PTPRN2;DMPK;FN1;EIF2AK2;PTK6;SRPK1;WNK2;CALU;PTPRT;PTPRR;PIGT;PTPRS;GPAA1;SERPINA10;SERP2;PPP3CA;FASTK;JAK1;ANXA1;PARP4;RIPK3;
positive regulation of NIK/NF-kappaB signaling (GO:1901224)	15/35	3.4600614543806626E-4	2.4844720496894412	19.79889197933562	EIF2AK2;TNFRSF10B;ZFP91;TNFRSF10A;NOD2;ACTN4;TANK;EGFR;C1QTNF4;PTP4A3;TRAF6;TLR6;COPS8;MAP3K7;LIMS1
RNA splicing, via transesterification reactions (GO:0000375)	12/25	3.81950122299942E-4	2.782608695652174	21.899744077295665	DBR1;PRPF6;TRA2B;MPHOSPH10;WDR83;SRSF4;TXNL4A;PRPF8;SF3B1;SRSF10;SMNDC1;SRRM1

Anexo 6 – Análise de correlação de Pearson entre expressão de *DUSP11* e abundância absoluta do vtRNA2-1 em 42 linhagens celulares de ADP (dados obtidos de CCLE e GDSC através do Portal Depmap).

DepMap ID	DUSP11 log2(TPM+1) Expression Public 20Q2	VTRNA2-1 Copy Number (Absolute)	filter	Cell Line Name	Primary Disease	Lineage
ACH-000652	3,8001233530	4	pancreas	SUIT2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000502	4,1448621430	4	pancreas	TCCPAN2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-001098	4,7829327050	3	pancreas	KCIMOH1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000468	3,9754467660	2	pancreas	PK45H	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000332	4,4711874600	4	pancreas	YAPC	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000601	3,8469946870	4	pancreas	MIAPACA2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000517	4,4059923600	3	pancreas	SNU410	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000213	4,4646682670	3	pancreas	HUPT4	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000307	5,3830130150	2	pancreas	PK1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000417	4,6513387660	2	pancreas	PANCO813	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000599	3,8247678530	5	pancreas	PATU8902	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000023	4,9462629840	3	pancreas	PATU8988T	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000222	4,6438561900	3	pancreas	ASPC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000320	4,8313705880	3	pancreas	PSN1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000139	3,7441610960	4	pancreas	PANCO327	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000535	4,8104431040	2	pancreas	BXPC3	Pancreatic Cancer	Pancreas

ACH-000108	4,0746766860	2	pancreas	KP3	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000178	4,4750848830	3	pancreas	HS766T	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000155	4,3441183350	2	pancreas	SW1990	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000270	3,7169908940	3	pancreas	HPAC	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000281	4,2757520490	2	pancreas	KP2	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000060	4,2456477740	2	pancreas	PANC1005	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000164	4,2078928520	3	pancreas	PANC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000094	3,9382857920	3	pancreas	HPAFII	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000235	4,3455383100	2	pancreas	PANCO403	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000933	3,2615308150	2	pancreas	SNU324	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000243	4,8584783900	2	pancreas	DANG	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000138	4,3561438100	2	pancreas	CFPAC1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000022	3,6724253420	3	pancreas	PATU8988S	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000347	4,4215599450	5	pancreas	QGP1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000118	3,9616233280	2	pancreas	HUPT3	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000265	4,0417686500	4	pancreas	KP4	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000266	4,3052409660	3	pancreas	SNU213	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000085	4,0417686500	3	pancreas	T3M4	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000093	4,1481206310	4	pancreas	PANCO504	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000685	3,9523335660	2	pancreas	L33	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000107	4,1383230040	2	pancreas	CAPAN2	Pancreatic Cancer	Pancreas

ACH-000042	3,3334237340	4	pancreas	PANC0203	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000354	4,4356285940	2	pancreas	CAPAN1	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000205	3,8991756300	3	pancreas	PK59	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000114	3,9078520720	3	pancreas	SU8686	Pancreatic Cancer	Pancreas
ACH-000031	4,8211999780	2	pancreas	PANC0213	Pancreatic Cancer	Pancreas

Anexo 7 – Submissão do manuscrito no Periódico *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*.

Cellular and Molecular Life Sciences
Atypical phosphatase DUSP11 inhibition potentiates gemcitabine response in pancreatic cancer cells by suppressing nc886-mediated NF-κB activation
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CMLS-D-22-02679	
Full Title:	Atypical phosphatase DUSP11 inhibition potentiates gemcitabine response in pancreatic cancer cells by suppressing nc886-mediated NF-κB activation	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Vanessa Silva Silveira, PhD Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo Ribeirao Preto, Sao Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Verena Silva Santos	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Verena Silva Santos	
	Gabriela Maciel Vieira	
	Mariana Tannus Ruckert	
	Pamela Viani de Andrade	
	Luis Fernando Nagano	
	Mariangela Ottoni Brunaldi	
	Jose Sebastiao dos Santos	
	Vanessa Silva Silveira, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/10694-5)	Dr. Vanessa Silva Silveira
Abstract:	<p>Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents one of the deadliest cancers among all solid tumors. First-line treatment relies on gemcitabine (Gem) and despite treatment improvements, refractoriness remains a universal challenge. Attempts to decipher how feedback-loops control signaling pathways towards drug resistance have gained attention in recent years, particularly focused on the role of phosphatases. In this study, a CRISPR/Cas9-based phenotypic screen was performed to identify targets from the dual-specificity phosphatases (DUSP) family potentially acting in Gem response in PDAC cells. The approach revealed the atypical RNA phosphatase DUSP11 as a potential target, whose inhibition creates vulnerability of PDAC cells to Gem. DUSP11 genetic inhibition impaired cell survival and promoted apoptosis, synergistically enhancing Gem cytotoxicity. In silico transcriptome analysis of RNA-seq data from PDAC human samples identified NF-κB signaling pathway highly correlated with DUSP11 upregulation. In vitro, Gem-induced NF-κB phosphorylation was blocked upon DUSP11 inhibition. 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. Particularly, we observed a sustained expression of nc886 (aka vtRNA 2-1) after Gem exposure in DUSP11^{-/-} cells indicating that this non-coding RNA could mediate DUSP11 function to modulate NF-κB signaling cascade. In conclusion, this study provides new insights on DUSP11 role in RNA biology and Gem response in PDAC cells.</p>	