

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

VERENA SILVA SANTOS

**Efeito da modulação de *DUSP11* na sensibilização à gemcitabina em linhagens celulares de
adenocarcinoma ductal pancreático**

Ribeirão Preto

2018

VERENA SILVA SANTOS

Efeito da modulação de *DUSP11* na sensibilização à gemcitabina em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

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

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Verena Silva

“Efeito da modulação de *DUSP11* na sensibilização à gemcitabina em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático.” Ribeirão Preto, 2018.

69f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

1. Adenocarcinoma pancreático. 2. Gemcitabina. 3. Quimiorresistência. 4. Fosfatase. 5. *DUSP11*.

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 2016/23013-9);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- 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

Efeito da modulação de *DUSP11* na sensibilização à gemcitabina em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

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

Área de concentração: Genética

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Todo homem precisa de uma mãe...”

Caetano Veloso

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, por todas as bênçãos em minha vida;

À minha mãe, **Vera**, por ser minha maior inspiração nesta vida e por me dar forças para chegar até aqui. Meu agradecimento vai também para o meu pai, **Josias**, pelo apoio concedido nesta caminhada;

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira**, grande responsável pelo meu crescimento profissional. Obrigada por ter me escolhido, apostado sua confiança em mim e, acima de tudo, por ter sido uma orientadora amiga e, por vezes, mãe. O apoio que me destes fez toda diferença em minha vida acadêmica e pessoal;

Ao Prof. **Dr. Luiz Gonzaga Tone** pelo carinho e por ter disponibilizado o Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas – FMRP – USP, onde realizei parte dos meus experimentos;

Às técnicas do Laboratório de Pediatria **Rosane Queiroz, Veridiana Suazo e Beth Perna** pelos ensinamentos, compreensão e amizade nos momentos que estive com vocês;

Às minhas companheiras de dentro e fora do laboratório **Pamela e Mariana**, e aos meus amigos do LabOEx **Gabriela Vieira, Ilze e Bruno** pela amizade, amor, companheirismo, risadas, discussões, confiança e pelo belo cafezinho diário na copa. Vocês fizeram diferença em minha vida!

Aos meus colegas do Laboratório de Pediatria (HC – FMRP – USP): **Lenisa, Marcela, Carolina, Graziella, Keteryne, Taciani, Mirella, Pablo, Gustavo, Kleiton e Ricardo** pelo carinho, apoio e conhecimento compartilhado. Em especial a **Lara, Karina e Régia** que inicialmente me ajudaram e me deram um suporte científico;

As minhas amigas **Elcione e Daniele**, que sempre compreenderam minha ausência e me apoiaram nesta jornada;

Aos **professores** que tive durante a minha graduação na UESB, que foram e são meus exemplos de excelentes profissionais que um aluno pode ter. Em especial, a **Profa. Dra. Patrícia Santos Pereira Lima** e a **Profa. Dra. Sandra Mara Bispo Sousa** que possibilitaram meu ingresso na pesquisa científica em Genética e me impulsionaram a prosseguir com a pós-graduação;

A meus amados amigos do BEM: **Juliana, Breno, Elcia, Giovanni, Malu, Isa, Josué, Jaque e Sandira**. A graduação me deu meus melhores amigos da vida, que estão sempre comigo, independente da distância;

A meu grande companheiro, **Diego**, pelo amor, confiança e por não medir esforços para me apoiar a fazer o Mestrado e a me ajudar. Agradeço também a toda sua família pelo carinho que têm por mim e por estarem ao meu lado;

A meus companheiros da pensão da Jô: **Juliana, Joelma, Rodrigo, Fábio** e especialmente à **Dona Jô** que me acolheu tão bem em Ribeirão Preto, fazendo de sua casa o meu refúgio;

A minha **família** da Bahia, que sempre se preocuparam comigo, compreenderam a minha ausência e fizeram de cada visita minha, uma festa;

À **Susie Nalon**, secretária do Departamento de Genética (FMRP – USP), pelos auxílios concedidos;

Às agências de fomento **FAPESP** e **CAPES**, pelo apoio financeiro;

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

RESUMO

SANTOS, V. S. *“Efeito da modulação de DUSP11 na sensibilização à gemcitabina em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático.”* 2018, 69f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) apresenta um potencial altamente maligno, exibindo mau prognóstico na maioria dos diagnósticos. A gemcitabina é o quimioterápico mais utilizado no tratamento do ADP. Contudo, mesmo apresentando melhor resposta terapêutica em relação a outros fármacos, as células de ADP exibem uma resistência que dificulta a eficiência ao tratamento. A ativação do oncogene *KRAS* representa uma das principais alterações genéticas que desencadeia vias de sinalização específicas essenciais para a progressão tumoral e quimiorresistência, especialmente mediada por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs coordenam complexas redes de sinalização e são precisamente reguladas por mecanismos de *feedback* exercidos pela atividade de proteínas fosfatases. Uma das principais classes de fosfatases envolvida é representada por proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) e seu papel nas células de ADP permanece por ser elucidado. O nosso grupo de estudo demonstrou que o nocaute de *DUSP11* em linhagens celulares de ADP por meio de um *screening* fenotípico com CRISPR-Cas9 aumentou a resposta à gemcitabina, indicando que *DUSP11* pode mediar o processo de quimiorresistência. As linhagens celulares de ADP apresentam uma maior expressão de *DUSP11* em relação a amostras de tecido pancreático livres de tumore sua inibição foi realizada utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9. Análises de expressão gênica de *DUSP11* em amostras de ADP humano e associação com sobrevida foram realizadas com o auxílio de plataformas *in silico*. Ensaio de proliferação celular, apoptose, capacidade clonogênica, migração celular e invasão celular foram realizadas na linhagem MIA PaCa-2. Foi observado que *DUSP11* apresenta-se mais expresso em amostras de ADP, conforme estadiamento tumoral, associando-se a uma menor taxa de sobrevida dos pacientes. Na linhagem MIA PaCa-2 observou-se que a inibição de *DUSP11* em combinação com o tratamento com gemcitabina: reduziu a capacidade proliferativa das células; aumentou as taxas de apoptose e diminuiu a capacidade das células de formarem colônias. Contudo, não foi observada redução na capacidade migratória e

invasiva dessas células. Os resultados sugerem que DUSP11 atue na modulação de processos envolvidos na progressão e quimiorresistência mas pode não estar envolvido no controle de processos que levam ao desenvolvimento de metástase.

Palavras-chave: Adenocarcinoma pancreático. Gemcitabina. Quimiorresistência. Fosfatase. DUSP11.

ABSTRACT

SANTOS, V. S. "*Effect of DUSP11 modulation on gemcitabine sensitivity in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines.*" 2018, 69p. Master's Degree Dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has a highly malignant potential, with poor prognosis in most diagnoses. Gemcitabine is the chemotherapeutic agent most used in the treatment of PDAC. However, even presenting better therapeutic response over other drugs, ADP cells exhibit resistance that hinders treatment efficiency. Activation of the KRAS oncogene represents one of the major genetic alterations that triggers specific signaling pathways essential for tumor progression and chemoresistance, especially mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs). MAPKs coordinate complex signaling networks and are precisely regulated by feedback mechanisms exerted by the activity of protein phosphatases. One of the major classes of phosphatases involved is represented by dual-specificity protein phosphatases (DUSPs) and their role in PDAC cells remains to be elucidated. Our study group demonstrated that *DUSP11* knockout on PDAC cell lines by CRISPR-Cas9 phenotypic screening increased the response to gemcitabine, indicating that *DUSP11* may mediate the chemoresistance process. PDAC cell lines show increased expression of *DUSP11* relative to tumor-free pancreatic tissue samples. Their inhibition was performed using CRISPR / Cas9 technology. Analyzes of *DUSP11* gene expression in human PDAC samples and association with survival were performed with the aid of *in silico* platforms. Cell proliferation assays, apoptosis, clonogenic capacity, cell migration and cell invasion were performed in the MIA PaCa-2 cell line. It was observed that *DUSP11* is more expressed in ADP samples, according to tumor staging, associating with a lower survival rate of the patients. In the MIA PaCa-2 cell line, inhibition of *DUSP11* in combination with gemcitabine treatment has been observed to reduce the proliferative capacity of cells; increased rates of apoptosis and decreased the ability of cells to form colonies. However, no reduction in the migratory and invasive capacity of these cells was observed. The results suggest that *DUSP11* acts in the modulation of processes involved in progression and chemoresistance but may not be involved in the control of processes that lead to the development of metastasis.

Key words: Pancreatic adenocarcinoma. Gemcitabine. Chemoresistance. Phosphatase. *DUSP11*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo estrutural e de ação das proteínas DUSPs.....	24
Figura 2. Fluxograma de atividades.....	30
Figura 3. Mapa do vetor lentiviral LentiCas-Blast..	33
Figura 4. Representação gráfica do teste de citotoxicidade celular nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2	42
Figura 5. Expressão gênica relativa de DUSP11 em amostras de tecido pancreático livres de tumor e em linhagens celulares de ADP.	44
Figura 6. Análise de expressão de DUSP11 em amostras de ADP, conforme banco de dados do TCGA.	44
Figura 7. Análise de sobrevivência baseada na expressão de DUSP11... ..	45
Figura 8. Confirmação da expressão proteica da endonuclease Cas9 nas linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2.....	46
Figura 9. Sequenciamento de Sanger.....	47
Figura 10. Análise de expressão de DUSP11.	47
Figura 11. Avaliação da capacidade proliferativa das células com a inibição de DUSP11.	48
Figura 12. Análise do perfil de morte celular por apoptose..	49
Figura 13. Análise da capacidade de formação de colônias após modulação da DUSP11..	50
Figura 14. Fotos e gráficos correspondentes ao ensaio de migração wound healing.	51
Figura 15. Fotos e gráficos correspondentes ao ensaio de invasão celular.....	52
Figura 16. Heatmap que descreve os miRNAs positivamente correlacionados com a expressão de DUSP11 em pacientes com ADP.....	53
Figura 17. Heatmap que descreve os miRNAs negativamente correlacionados com a expressão de DUSP11 em pacientes com ADP.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Identificação das sequências dos crRNAs utilizados para a edição gênica da DUSP11, com as respectivas sequências PAM, as localizações genômicas e os códigos de acesso das sequências.....	34
Tabela II - Sequência dos primers e tamanho dos produtos de PCR (em pares de base - pb) utilizados na reação de RT-PCR e Sequenciamento de Sanger.	35
Tabela III - Programação da ciclagem para a realização das reações de PCR.	35
Tabela IV - Programação da ciclagem para realização das reações de sequenciamento.	36
Tabela V. Tabela dos valores do IC50 da gemcitabina determinado para PANC-1 e MIA PACA-2.	43
Tabela VI. Tabela comparativa de valores do IC50 da gemcitabina determinado para MIA PaCa-2 selvagem e nocaute para DUSP11.	48
Tabela VII. Relação de miRNAs diferencialmente correlacionados com a expressão de DUSP11 ($p \leq 0,05$) em amostras de adenocarcinoma ductal pancreático.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
APC	Aloficocianina
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
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MAPKKK	MAP quinase quinase quinase
MAPKK	MAP quinase quinase
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
miRNA	microRNA
NIP	Neoplasia intraductal pancreática
NRAS/KRAS/HRAS	Proteínas homólogas codificadas pelo oncogene RAS
PBS	Tampão fosfato salino
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
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

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático	19
1.2. Tratamento e avanços terapêuticos	20
1.3. Via RAS e Proteínas Fosfatases de Dupla Especificidade (DUSPs)	22
1.4. Atividade da Proteína Fosfatase de Dupla Especificidade 11 (DUSP11)	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	31
3.2. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Gemcitabina	31
3.3. Edição genética <i>in vitro</i> utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9	32
3.3.1. Transdução das linhagens celulares com partículas lentivirais	32
3.3.2. Transfecção celular do complexo crRNA e tracrRNA para edição de <i>DUSP11</i>	33
3.4. Isolamento de célula única	34
3.5. Validação da edição gênica	34
3.5.1. PCR Convencional (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	34
3.5.2. Sequenciamento de Sanger	35
3.6. Ensaio funcionais	36
3.6.1. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	36
3.6.2. Ensaio de proliferação celular <i>in vitro</i>	36
3.6.3. Ensaio de apoptose	37
3.6.4. Ensaio de capacidade clonogênica <i>in vitro</i>	37
3.6.5. Ensaio de migração celular por Wound Healing <i>in vitro</i>	38
3.6.6. Ensaio de invasão em matrigel <i>in vitro</i>	38
3.6.7. Western blot	38
3.7. Análise <i>in silico</i>	39
3.8. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Ensaio de Citotoxicidade	42
4.1.1. Gemcitabina	42

4.2.	Análise da expressão gênica de <i>DUSP11</i> em linhagens celulares e amostras de pacientes.	43
4.3.	Validação da edição gênica de <i>DUSP11</i> , pela técnica de CRISPR-Cas9	45
4.4.	Análise da capacidade proliferativa, <i>in vitro</i> , após modulação de <i>DUSP11</i>	48
4.5.	Avaliação da indução de apoptose nas linhagens nocautes para <i>DUSP11</i>	49
4.6.	Efeito da inibição de <i>DUSP11</i> na capacidade clonogênica.....	50
4.7.	A inibição de <i>DUSP11</i> não altera a capacidade de migração e invasão das células de ADP	51 51
4.8.	Expressão de <i>DUSP11</i> está correlacionada com microRNAs com papel relevante para o ADP.....	53
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÕES.....	62
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O pâncreas é uma glândula mista dividida em três regiões anatômicas (cabeça, corpo e cauda) e que desempenha funções exócrinas e endócrinas que atuam nos processos fisiológicos de digestão e regulação da glicose (Bardeesy and DePinho 2002; Hezel et al. 2006; Rafacho et al. 2014). A porção exócrina representa cerca de 80% da massa tecidual do órgão, composta por uma rede de células acinares e ductos, as quais produzem enzimas digestivas em resposta ao estômago e ao duodeno. A porção endócrina, por meio de células reunidas na ilhota de Langerhans, produz e secreta hormônios na corrente sanguínea (glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático) que atuam na homeostase da glicose (Bardeesy and DePinho 2002; Röder et al. 2016).

Os tumores pancreáticos podem acometer as diferentes porções da glândula, podendo ser endócrinos ou exócrinos. Os tumores endócrinos, também conhecidos como tumores pancreáticos neuroendócrinos são incomuns (Fitzgerald et al. 2008). Dentre os demais tumores exócrinos, o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), é a neoplasia maligna mais frequente da porção exócrina correspondendo a mais de 95% de todos os cânceres pancreáticos. O ADP origina-se a partir das células ductais e, em sua maioria, localiza-se na cabeça do pâncreas (Modolell et al. 1999; Krautz et al. 2011; Kleeff et al. 2016).

O ADP é considerado uma das formas mais letais de câncer, ocupando no mundo a quarta posição na taxa de mortalidade para ambos os sexos e, no Brasil, representa aproximadamente 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados no País (INCA - www.inca.gov.br). Diante do quadro atual e na ausência de novas abordagens terapêuticas mais efetivas, estima-se que o câncer de pâncreas represente a segunda causa de morte or câncer até o ano de 2030 (Rahib et al. 2014).

A etiologia do adenocarcinoma pancreático é pouco compreendida. No entanto, é mais frequente em indivíduos do sexo masculino e com idade a partir de 60 anos (Howlader et al. 2010). Além disso, fatores de risco como tabagismo (Blackford et al. 2009), diabetes (Wang et al. 2003) e pancreatite (Guerra et al. 2011) contribuem para o desenvolvimento do ADP.

O processo de desenvolvimento tumoral do adenocarcinoma ductal pancreático, a partir do evento mutacional até o estágio final da doença, é estimado que dure de 10 a 30 anos. A evolução genética da doença é composta por três períodos: o primeiro período (T1)

que está relacionado à formação de lesões precursoras; o segundo período (T2), que compreende o período desde a lesão precursora até o desenvolvimento do subclone metastático e o terceiro período (T3) é a disseminação metastática desse subclone até o óbito do paciente (He and Yuan 2014).

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 malignas (Ottenhof et al. 2009). O ADP mais frequentemente surge da neoplasia intraepitelial pancreática (NIP) que, com base em análises histológicas, é classificada em três estágios de desenvolvimento tumoral (NIP-estágios 1-3) (Hruban et al. 2001; Hezel et al. 2006).

O conjunto de processos moleculares e os respectivos eventos celulares envolvidos com a progressão do ADP já são bem conhecidos (Ryan et al. 2014). Dentre as principais alterações genéticas destaca-se a ativação desregulada do gene *KRAS*, presente em mais de 90% dos casos (Kleeff et al. 2016). Essa ativação é a primeira alteração crítica que desencadeia o processo de progressão tumoral, sendo detectada em aproximadamente 99% das lesões NIP-1 (MacGregor-Das and Iacobuzio-Donahue 2013). Conforme as lesões NIP-1 adquirem novas alterações genéticas, ocorre a progressão para os estágios mais avançados e com maior grau de displasia. Outras mutações envolvendo a perda de função do gene supressor tumoral *CDKN2A* são frequentes em lesões NIP-2 (90%) e a inativação das proteínas TP53 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 (Koorstra et al. 2008; Real et al. 2008; Yachida et al. 2010).

1.2. Tratamento e avanços terapêuticos

O tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático permanece um desafio clínico, pois, ao diagnóstico, cerca de 80% dos casos já exibem progressão tumoral avançada e invasão à órgãos adjacentes (Distler et al. 2013). Esse quadro representa um dos primeiros desafios clínicos, que recai sobre o diagnóstico do ADP, que invariavelmente é feito tardiamente e

portanto, em estádios muito avançados. O diagnóstico tardio ocorre principalmente devido à inespecificidade dos sintomas e até mesmo a casos assintomáticos. A depender da localização anatômica do tumor, o paciente pode apresentar icterícia, dor abdominal, esteatorreia e perda de peso (Porta et al. 2005). Contudo, quando iniciam-se tais sintomas, a maioria dos pacientes apresentam diagnóstico metastático, inviabilizando a ressecção cirúrgica que é a estratégia de tratamento mais eficaz para o ADP (Barugola et al. 2009; Hidalgo 2010). Diante desse cenário, a sobrevida global em cinco anos, mesmo com a ressecção cirúrgica, é extremamente baixa (aproximadamente 5%) o que torna o diagnóstico de ADP potencialmente fatal (Siegel et al. 2015).

Além da ressecção cirúrgica, o tratamento pode contar com a radioterapia e quimioterapia (associados ou não) na tentativa de elevar, ainda que discretamente, a sobrevida global dos pacientes com ADP. Quando submetidos à ressecção cirúrgica, os pacientes recebem quimioterapia adjuvante. Se ao diagnóstico o paciente apresentar um quadro avançado pode-se recorrer à quimioterapia neoadjuvante (Stathis and Moore 2010). Em casos metastáticos, o tratamento é apenas paliativo. O quimioterápico de escolha para o tratamento do ADP é o agente citotóxico gemcitabina, em regime de monoterapia ou politerapia, nesse caso combinado à derivados de fluoropirimidinas (Liao et al. 2013).

A gemcitabina (2', 2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) é um análogo de nucleosídeo que, após ser ativado por trifosforilação no citoplasma, incorpora-se ao DNA, impedindo a sua síntese (Mackey et al. 1998). Seu uso foi estabelecido como terapia padrão em 1996 pelo FDA (*Food and Drug Administration* - Estados Unidos) (Binenbaum et al. 2015). Porém, mesmo após o tratamento, a sobrevida global dos pacientes não é prolongada por períodos superiores a 6 meses, mostrando que alternativas terapêuticas são urgentemente necessárias (Ueno et al. 2009).

Esquemas alternativos de poliquimioterapia utilizando a gemcitabina em combinação com outros fármacos têm sido frequentemente testados buscando o aperfeiçoamento do tratamento e o aumento da taxa de sobrevida dos pacientes. Um dos principais esquemas (conhecido como FOLFIRINOX) utiliza uma combinação de ácido folínico (leucovorina), 5-fluoracil, irinotecano e oxaliplatina. Esse regime demonstrou uma boa atividade em comparação ao regime monoterápico da gemcitabina, porém, elevou consideravelmente o índice de toxicidade, que inclui náusea, fadiga, diarreia e neuropatias (Conroy et al. 2011).

Desde então, outros esquemas vem sendo testados, como a combinação de gemcitabina e nab-paclitaxel, que apresentou um discreto aumento da eficácia em comparação ao uso da gemcitabina isolada (Von Hoff et al. 2011, 2013). Apesar do discreto aumento da eficácia, os esquemas testados em ensaios clínicos, até o momento, ainda apresentam alta toxicidade e elevam a taxa de sobrevida dos pacientes em apenas algumas semanas.

Desde então, outros esquemas vêm sendo testados e a imunoterapia iniciou uma nova era no tratamento do câncer. O tratamento de outras neoplasias malignas utilizando antitumorais antagonistas de repressores da resposta imune, como o anti-PD-1, tem experimentado progresso, como por exemplo o tratamento do melanoma (Hu et al. 2018). No entanto, o sucesso da imunoterapia observado para outros tumores não se replicou no tratamento do câncer de pâncreas que mostrou resposta insatisfatória frente a essa alternativa terapêutica (Royal et al. 2010; Brahmer et al. 2012). Com isso, a gemcitabina ainda é considerada a principal estratégia para o tratamento de pacientes com ADP, mesmo diante da baixa eficácia do tratamento, causada principalmente pelos altos índices de resistência e também pela falta de alternativas terapêuticas mais eficientes (Mikamori et al. 2017).

Diante desse cenário, a busca por terapias alternativas é urgentemente necessária e uma das principais estratégias tem como principal foco elucidar os mecanismos que permeiam a resistência das células de ADP à gemcitabina. Como a maioria dos tumores (ADP) apresentam KRAS mutado, a elucidação dos mecanismos que permeiam as vias por ele reguladas é de grande importância para o entendimento do processo de tumorigênese e da biologia tumoral.

1.3. Via RAS e Proteínas Fosfatases de Dupla Especificidade (DUSPs).

A família *RAS* é composta pelos genes *KRAS*, *NRAS* e *HRAS* que codificam proteínas classificadas como pequenas GTPases capazes de catalisar a conversão de guanina trifosfato (GTP) em guanina difosfato (GDP) (Hancock 2003). As proteínas *RAS* são ativadas por fatores de troca de guanina (GEF) que liberam o GDP ligado a *RAS* e permite a ligação de GTP, potencializando a interação de *RAS* a seus efetores *downstream* (Johnson and Chen 2012).

O proto-oncogene *KRAS*, é responsável pela ativação de vias de sinalização por meio da interação entre receptores de membrana e da transmissão de informações da membrana celular para o núcleo (Gysin et al. 2011). A ativação de *KRAS* resulta de uma mutação de único nucleotídeo que pode ocasionar uma substituição da sequência GGT (codificadora de glicina

(G) no códon 12 pelas sequências GAT (ácido aspártico (D) – G12D), GTT (valina (V) – G12V), CGT (arginina (R) – G12R) ou TCG (alanina (A) – G12A), bem como pode haver alterações nos códons 13 (G13D) e 61 (Q61H) (Bryant et al. 2014). A proteína KRAS^{G12D}, resultante da substituição da glicina (G) por ácido aspártico (D), está presente no estágio inicial de lesões pré-neoplásicas, como a neoplasia intraepitelial pancreática – NIP e é responsável por cerca de 85% dos casos de adenocarcinoma ductal pancreático (Scheffzek et al. 1997).

A mutação KRAS^{G12D} torna KRAS constitutivamente ativa (constantemente ligada à molécula de GTP) e, conseqüentemente, ativa inúmeras vias de sinalização *downstream*. Dentre as principais vias reguladas por KRAS estão: PI3K/-mTOR e vias de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos). As vias de MAP quinases (MAPKs) constituem um módulo de três quinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via sequencial de ativação de proteínas quinase: a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), a MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase (Whitmarsh and Davis 1999). O primeiro componente pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família RAS. As MAPKKK requerem uma dupla fosforilação (nos resíduos de treonina e tirosina) e quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase no módulo, a MAP quinase quinase (MAPKK). Estas por sua vez, fosforilam as MAP quinases (MAPK), que constituem a quinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos em resíduos de serina e treonina (Whitmarsh and Davis 1999). As MAPKs são agrupadas em três famílias: ERK, JNK e MAPK p38 e sua ativação ocorre pela fosforilação de seus resíduos de tirosina e treonina por MAP2K quinases. Quando ativadas, fosforilam fatores de transcrição e por isso desempenham um papel crítico na regulação da proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e apoptose (Sebolt-Leopold and Herrera 2004; Wagner and Nebreda 2009).

A fosforilação e desfosforilação de proteínas são mecanismos regulatórios bem conhecidos em células eucarióticas (Hunter 2014). O controle da fosforilação das MAPKs pode ser feito por um grupo de proteínas denominadas proteínas tirosino fosfatases (PTPs), que podem ativar ou inibir as proteínas *downstream* das vias de sinalização (Alonso and Pulido 2016). As proteínas tirosino fosfatases (PTPs) contituem uma família de 125 membros e são divididas em 3 classes (I, II e III), de acordo com sua estrutura. A classe I de PTPs é responsável por mais de 100 membros da superfamília é o grupo mais extenso (Alonso and Pulido 2016)

podendo ainda ser dividida em fosfatases tirosina específicas e fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) (Alonso et al. 2004).

As proteínas DUSPs constituem uma família de 44 proteínas, segundo o banco de dados do Genoma Humano (HUGO – *Human Genome Organization*). Elas podem 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 (Alonso et al. 2004). Com isso, as DUSPs são agrupadas em típicas ou atípicas, de acordo a presença do domínio MKB (Alonso et al. 2004). Os resíduos de treonina/serina e tirosina podem ser desfosforilados de seus substratos por DUSPs, as quais podem atuar como potenciais reguladores negativos de MAPKs (Figura 1) (Bermudez et al. 2010).

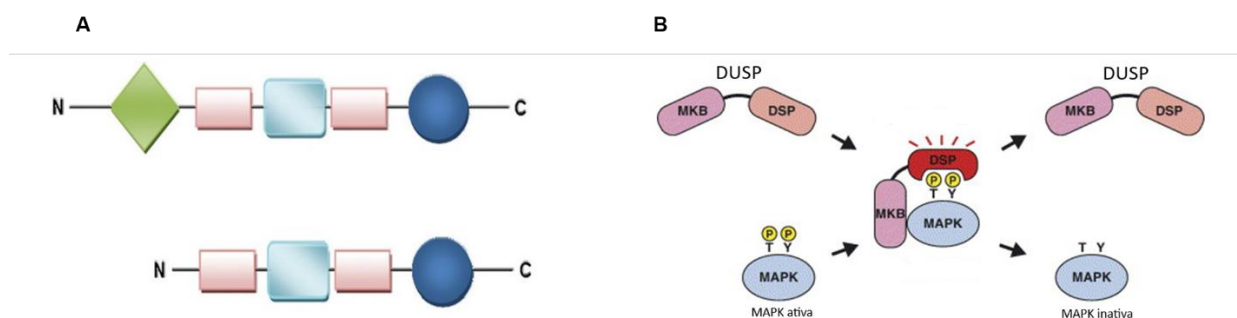


Figura 1. Modelo estrutural e de ação das proteínas DUSPs. (A) Estrutura em verde representando o domínio MKB de ligação de MAP quinases, o que caracteriza uma DUSP típica. **(B)** Esquema da atividade das DUSPs sobre proteínas MAPKs. As DUSPs desfosforilam dois sítios específicos nas MAPKs, inativando-as. Adaptado de: Kondoh and Nishida 2007; Lawan et al. 2012.

Até o presente momento, poucos trabalhos investigaram o papel de DUSPs e sua relação com o câncer de pâncreas. Algumas delas, como a DUSP1 e a DUSP6 já foram investigadas quanto a sua atuação no adecarcinoma pancreático. Foi observado que a inibição de DUSP1, por exemplo, foi associada ao aumento da ativação de JNK e MAPK p38 e à quimiossensibilidade à gemcitabina; neste caso, experimentos conduzidos em modelos xenográficos ortotópicos mostraram redução de angiogênese, indução de apoptose e, consequentemente, o aumento da sobrevivência dos animais (Liu et al. 2014). A DUSP6, por sua vez, que tem ERK como principal alvo de regulação, apresenta-se pouco expressa em linhagens

de ADP. No estudo publicado por Furukawa e colaboradores foi observado que na ausência de DUSP6, ERK encontra-se ativa; porém, após reintrodução de DUSP6 por meio da transdução adenoviral em células de tumor pancreático, houve uma redução da ativação de ERK, o que ocasionou a diminuição da proliferação celular e o aumento da morte por apoptose (Furukawa et al. 2005). Com isso, esses estudos sugerem que as DUSPs desempenham um papel importante na tumorigênese do ADP.

Diante dos dados decritos na literatura científica até o momento, o nosso grupo de pesquisa decidiu investigar o papel das DUSPs na resistência à gemcitabina por meio de um screening de investigação de toda a família de DUSPs. Para tanto, as linhagens celulares de ADP (PANC-1 e MIA PaCa-2) foram transduzidas para expressar estavelmente a endonuclease Cas9 e em seguida submetidas a um ensaio de *screening* fenotípico mediado pela tecnologia de CRISPR-CAS9. Para esse ensaio utilizou-se a biblioteca Edit-R (GE Dharmacon) de crRNAs, construída especificamente para os genes da família DUSP. Pada gene foram utilizadas três (3) sequências distintas de crRNAs (guideRNA). A análise fenotípica foi conduzida para avaliar a resposta das células de ADP à gemcitabina por meio de um ensaio citotóxico. Diante dos resultados, foi observado que dentre as DUSPs com potencial de modulação da resposta das células de ADP à gemcitabina, a inibição de *DUSP11* reduziu significativamente a taxa de proliferação celular em mais de 30% em ambas as linhagens testadas ($p=0,04$), sugerindo que essa fosfatase pode desempenhar um papel importante no processo de sensibilização à gemcitabina (Dados não publicados).

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

A DUSP11 é uma proteína fosfatase de dupla especificidade atípica – ou seja, que não contém o domínio MKB de ligação com MAP quinases. Foi primeiramente descrita em 1998 e nomeada como “fosfatase que interage com RNA complexo 1” (*phosphatase that interacts with RNA/ribonucleoprotein complex 1* – PIR1) (Yuan et al. 1998). Localizada no núcleo, pode ligar-se diretamente ao RNA especialmente desfosforilando a porção 5’ tri-fosforilada de mRNAs e removendo dois grupos fosfatos (Burke et al. 2016, 2017). Esse processo de desfosforilação torna a molécula de RNA mensageiro instável e pode levar à sua degradação (Burke et al. 2017). Além disso, já foi observado que a DUSP11 também apresenta a atividade de desfosforilar microRNAs virais, especificamente pré-miRs, que contém a extremidade 5’ trifosforilada, interferindo portanto, em sua biogênese (Burke et al. 2016).

Apesar dos dados sugestivos já publicados envolvendo outras DUSPs e os dados apresentados pelo ensaio de *screening in vitro*, o papel da DUSP11 nunca foi investigado quando ao seu envolvimento na regulação de processos relacionados à tumorigênese. Sendo assim, levando-se em conta que a inibição da *DUSP11* pode potencializar o tratamento com gemcitabina, este trabalho visa testar a hipótese de que a modulação de *DUSP11* pode interferir na regulação de processos que favorecem a quimiorresistência do ADP à gemcitabina.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto da modulação de *DUSP11* frente à gemcitabina em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão gênica de *DUSP11* em amostras de tecido pancreático livres de tumor e linhagens celulares de ADP;
- Avaliar o perfil de expressão gênica de *DUSP11* em amostras de ADP humano em dados de RNA-Seq disponibilizados em plataformas públicas pelo Consórcio “*The Cancer Genome Atlas*” - TCGA;
- Verificar o efeito da inibição de DUSP11 em eventos de proliferação celular, capacidade clonogênica e morte por apoptose;
- Analisar o impacto da inibição de DUSP11 em processos *in vitro* de invasão e migração celular.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental – Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O delineamento experimental do trabalho está representado na Figura 2.

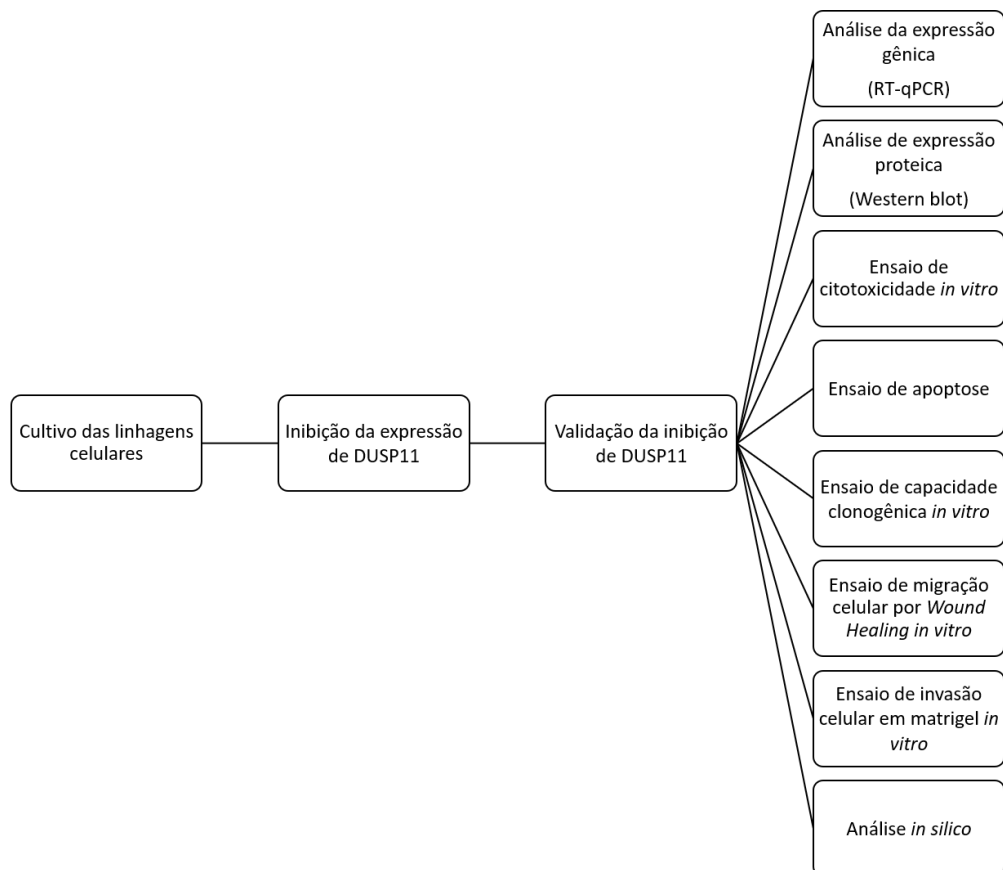


Figura 2. Fluxograma de atividades.

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Para o presente estudo, foram utilizadas duas linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), as quais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Sebastião dos Santos (Departamento de Cirurgia e Anatomia – FMRP/USP). As linhagens PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) e MIA PaCa-2 (ATCC® CRM-CRL-1420™) – apresentam *KRAS* ativado (G12D e G12C) e *TP53* deficiente. As linhagens foram mantidas em meio DMEM (Merck, KGaA Darmstadt, Germany) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB 12657 Gibco Laboratories, Invitrogen) (pH 7.2–7.4), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para realização dos ensaios funcionais, a análise da viabilidade celular foi avaliada utilizando o reagente azul de tripan (Merck, KGaA Darmstadt, Germany) segundo recomendações do fabricante. As linhagens utilizadas foram devidamente autenticadas segundo recomendações da ATCC por meio da análise do perfil de STR (*Short Tandem Repeats*), gentilmente realizada pelo Laboratório de Genética Bioquímica-FMRP/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões.

3.2. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

3.2.1. Gemcitabina

A citotoxicidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando o kit MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium). O ensaio de MTT é um método colorimétrico para determinação do número de células metabolicamente ativas *in vitro*, medindo, conseqüentemente, a proliferação e viabilidade celular. As células metabolicamente viáveis apresentam desidrogenases mitocondriais capazes de clivar o sal amarelo tetrazolium MTT gerando equivalentes redutores tais como NADH e NADPH. A clivagem do sal no interior das células produz o formazan, um composto de coloração roxa formado por cristais insolúveis em soluções aquosas. Após a adequada solubilização realiza-se a leitura de absorbância. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

As linhagens celulares de ADP foram semeadas (2×10^3 células/poço) em placas de cultivo de 96 poços, em meio DMEM completo, em um volume final de 100 µl. Após 24 horas de incubação em condições de cultivo celular, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Gemcitabina (Sigma Aldrich, Inc.) (0,1 µM a 100 µM). Nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, 10 µl de MTT (5mg/ml) (Sigma Aldrich, Inc.) foram adicionados aos poços para avaliar a viabilidade celular, seguindo de incubação adicional a 37° por 4 horas. Em

seguida, 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço após remoção do meio antigo, e a absorbância foi medida a 570nm utilizando o espectrofotômetro iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories). A concentração de Gemcitabina necessária para inibir a proliferação celular em 50% (IC50) foi calculada utilizando o *software* CalcuSyn.

3.3. Edição genética *in vitro* utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 é um mecanismo de defesa de bactérias e Archeas contra invasores como fagos. Surge, então, uma memória imunitária após o DNA ser fragmentado e incorporado no CRISPR *locus*, designando-se por protoespaçador (Doudna and Charpentier 2014). O *locus* é transcrito numa cadeia de RNA não codificante (pré-crRNA). Essas cadeias sofrem hibridação com um outro RNA não codificante, o *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA), formando uma cadeia dupla de RNA que é então clivada e processada. O complexo crRNA:tracrRNA associa-se com a nucleasse Cas9, formando um complexo de reconhecimento e destruição do DNA invasor *in vitro* (Mali et al. 2013). Se domínio enzimático HNH cliva a cadeia complementar e o outro domínio enzimático RuvC a cadeia não complementar, provocando duplo corte no DNA (Richter et al. 2012). Isso só é possível, caso a sequência alvo se encontre na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como *protospacer adjacent motif* (PAM)(Sander and Joung 2014).

3.3.1. Transdução das linhagens celulares com partículas lentivirais

O gene *Cas9* foi permanentemente integrado ao genoma das linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2, juntamente com um marcador de seleção (gene resistência à Blastidina), a partir de partículas lentivirais validadas (Sigma Aldrich, Inc.[®] - LVCAS9BST - CAS9 Blastidina Lenti Particles) (Figura 3).

As linhagens celulares foram semeadas (3×10^3 células/poço) em placas de cultivo de 96 poços, em meio DMEM completo, em um volume final de 100µl/poço. Após 24 horas de incubação, foi removido o meio antigo dos poços e adicionados 100µl/poço do meio de transdução contendo polibreno (*Hexadimethrine bromide* - Sigma Aldrich, Inc.) - a uma concentração final de 8µg/ml e 0,25µl/poço de partículas lentivirais LentiCas9-Blast (Sigma Aldrich, Inc.) apropriadas para obter uma multiplicidade de infecção de 2,5 partículas lentivirais/célula (MOI 2,5) . Após 48 horas, o meio de transdução foi retirado e adicionado

aos poços meio de cultura contendo Blastidina (2,5µg/ml)(Sigma Aldrich, Inc.) para seleção estável das células expressando *Cas9*.

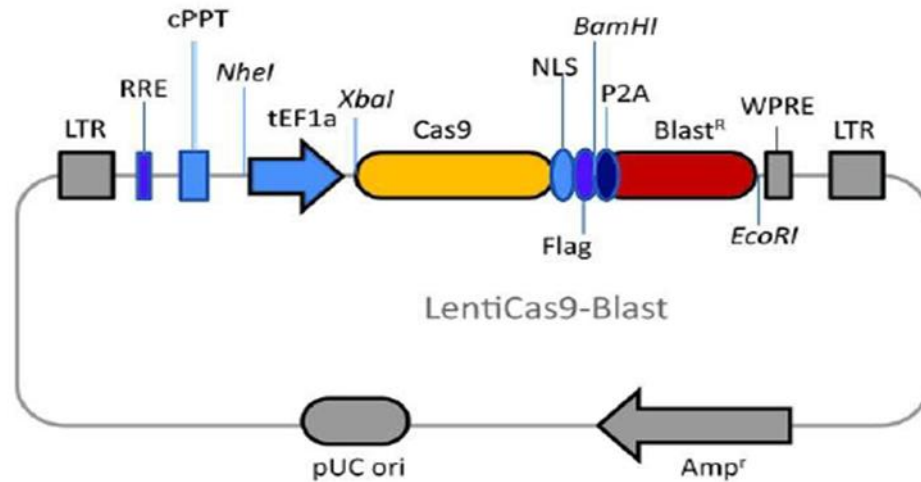


Figura 3. Mapa do vetor lentiviral LentiCas9-Blast. O vetor lentiviral apresenta o gene para expressão da proteína Cas9 e o gene de resistência à Blastidina (BlastR).

3.3.2. Transfecção celular do complexo crRNA e tracrRNA para edição de *DUSP11*

As linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2 foram semeadas (1×10^4 células/poço) em placas de cultivo de 24 poços, em meio DMEM completo, em um volume final de 500µl/poço. No dia seguinte, foi preparada a solução para transfecção celular: em um tubo *nuclease-free*, foram adicionados 1,25µl do crRNA (10µM) + 1,25µl do tracrRNA (10µM) (Dharmacon) + 47,5µl de DMEM sem soro bovino fetal. Foram utilizados três crRNAs da *DUSP11* (Tabela I). Em outro tubo, foi adicionado 1µl do reagente de transfecção DharmaFECT 3 (Dharmacon) + 49µl de DMEM sem soro bovino fetal e incubou por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou os 50µl da solução de DharmaFECT ao tubo contendo o complexo crRNA:tracrRNA, totalizando um volume de 100µl e incubou por vinte minutos em temperatura ambiente. Ao final, 400µl de meio DMEM completo foram adicionados à solução. O meio de cultura antigo de cada poço foi substituído por 500µl da solução de transfecção e as células foram incubadas por 72 horas em condições ideais de cultivo celular. Completado o tempo necessário, foi realizado o isolamento de célula única em placa de petri para obtenção homogênea de células clonais. Neste processo, não foi possível isolar célula única da linhagem

celular PANC-1, inviabilizando a realização dos ensaios funcionais com a mesma. Diante disso, os funcionais foram passíveis de serem executados com a linhagem MIA PaCa-2.

Tabela I – Identificação das sequências dos crRNAs utilizados para a edição gênica da *DUSP11*, com as respectivas sequências PAM, as localizações genômicas e os códigos de acesso das sequências.

crRNA	Gene alvo	Sequência	PAM	Localização Genômica	Acesso à sequência
crRNA (1)	DUSP11	TACCTAGGTCCTTGTTAAC	AGG	hg38 +chr2:73766496-73766518	NM_003584 (Éxon8)
crRNA (2)	DUSP11	CTGGAGAGGACTATTACAC	AGG	hg38 -chr2:73762778-73762800	NM_003584 (Éxon9)
crRNA (3)	DUSP11	CAGGCATCCGCTGTCCAAC	GGG	hg38 +chr2:73778339-73778361	NM_003584 (Éxon2)

3.4. Isolamento de célula única

Para a obtenção de uma população oriunda de um único clone foi realizado o seguinte procedimento para isolamento de células únicas provenientes do *pool* celular da transfecção com o complexo crRNA:tracrRNA. Brevemente, 80 células da linhagem MIA PaCa-2 transfectada foram semeadas em placas de petri em meio DMEM e, no intervalo de sete dias, foram identificadas as células únicas. Ao formarem colônias, cerca de 15-20 dias, elas foram retiradas da placa e transferidas para uma placa de cultivo celular de 96 poços. De acordo com a confluência celular, elas foram transferidas para expansão em frascos de cultivo celular de 75cm² e posterior congelamento a -80°C. Ao final, foram isolados cinco clones de cada crRNA de *DUSP11*, totalizando a expansão de quinze clones. Para cada clone avaliado foram obtidas amostras pareadas para extração de DNA e proteína.

3.5. Validação da edição gênica

3.5.1. PCR Convencional (*Polymerase Chain Reaction*)

Para validação molecular da edição gênica da *DUSP11* na linhagem celular MIA PaCa-2, foi realizada a amplificação das regiões de interesse para posterior sequenciamento. A extração de DNA foi procedida utilizando o QUIAamp DNA Mini Kit (Quiagen), de acordo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas pelo aparelho Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, foi efetuada a PCR convencional (volume final = 25µl) utilizando: 2,5µl de tampão 10X; 1µl e MgSO₄; 0,5µl de dNTP; 0,5µl de cada *primer* (*forward* e *reverse* – 10µM); 0,1µl de Taq polimerase (Platinum™Taq, Invitrogen, EUA) e 1,5µl de DNA. As sequências dos *primers* e as condições das reações estão descritas nas Tabela II e Tabela III. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, tendo

como agente intercalante o UniSafe Dye® (Uniscience). A eletroforese procedeu-se com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 1X e o gel revelado em transiluminador de luz ultravioleta ChemiDoc™ Imaging Systems (BioRad Laboratories, Inc.). O padrão de peso molecular utilizado foi de 1kb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.).

Tabela II - Sequência dos *primers* e tamanho dos produtos de PCR (em pares de base - pb) utilizados na reação de RT-PCR e Sequenciamento de Sanger.

Região	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Produto de PCR (pb)
Éxon 2	AGGTCGTTACTTGGTGGGGT	TTCAGGATAGTAAAGGGGTCA	372
Éxon 8	AGGAATGGGAGAAGGAAGAA	AAACGAAGAATTCCTCATCAGT	384
Éxon 9	AGGTCACACAGGTAGGAAACAGT	ACACCAGTAATTTTCAGGCCAGC	404

Tabela III - Programação da ciclagem para a realização das reações de PCR.

Desnaturação inicial	94°C (2')
Desnaturação (30 ciclos)	94°C (15")
Anelamento	55°C (30")
Extensão Intermediária	68°C (30")
Extensão Final	72°C (5')

3.5.2. Sequenciamento de Sanger

Os fragmentos amplificados por PCR foram sequenciados por meio do aparelho ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit “*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*” (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Os *primers* para o sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR convencional (Tabela 2). A reação de sequenciamento (volume final = 10µl) foi preparada com 2µl do BigDye Terminator v3.1, 2µl do 5X Sequencing Buffer, 1µl de um *primer* (*forward* ou *reverse* – 2,5µM), 1µl do produto de PCR purificado e 4µl de água *nuclease free*. O produto de PCR foi previamente purificado utilizando o reagente Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) segundo recomendações do fabricante. O programa para reação de sequenciamento está demonstrado na Tabela IV.

Após o término da reação, foi realizada precipitação com 40µL de isopropanol 75%. O material foi incubado à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugado por 20 minutos a 13000 rpm. Após descarte do sobrenadante, 200µL de etanol 70% gelado foram

adicionados seguido por centrifugação por 5 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionados novamente 200µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante é então desprezado e as amostras foram ressuspensas em tampão de injeção (formamida) e sequenciadas por método automatizado. As análises foram realizadas no *software* Codon Code Aligner Editor.

Tabela IV - Programação da ciclagem para realização das reações de sequenciamento.

Desnaturação inicial	95°C (1')
Desnaturação (25 ciclos)	96°C (10")
Temperatura de anelamento	50°C (5")
Extensão Intermediária	60°C (4')
Extensão Final	4°C (∞)

3.6. Ensaios funcionais

3.6.1. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Para análise da expressão gênica, o RNA total proveniente das linhagens celulares e de 9 amostras de tecido pancreático livre de tumor (CEP 4910/2008) foi extraído por meio reagente *Trizol Reagent Kit* (Invitrogen Inc.) de acordo com as recomendações do fabricante. A partir do mRNA extraído, foi sintetizado o cDNA por meio do *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad Laboratories, Inc.), conforme instruções. As amostras de cDNA foram submetidas à reação de RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real) no aparelho QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), para análise de expressão gênica de *DUSP11*. As sondas TaqMan® inventoriadas para os genes *DUSP11* (Hs01061375_m1) e genes endógenos *GAPDH* (Hs02786624_g1) e *β-actina* (Hs01060665_g1) foram adquiridas da Applied Biosystems (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). O volume final para cada reação de PCR foi de 10µl, sendo utilizados 5,0µl do kit 2x qPCR BIO Probe Mix Separate-ROX (PCR Biosystems), 0,5µl de sonda e 4,5µl de cDNA (1:10). Como amostra calibradora, foi utilizada a linhagem celular ReH e a quantificação relativa da expressão gênica foi determinada por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001).

3.6.2. Ensaio de proliferação celular *in vitro*

Neste ensaio, os clones da MIA PaCa-2 e o controle foram semeados em concentração inicial de 2×10^3 células/poço em placas de cultivo de 96 poços e mantidos em condições de

cultura. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de gemcitabina (Sigma Aldrich, Inc.) (0,1 μM a 100 μM). No intervalo de 72 horas, a citotoxicidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando o kit MTT (methylthiazolyl-tetrazolium). Para tanto 10 μl do reagente MTT (5mg/ml) (Sigma Aldrich, Inc.) foram adicionados aos poços para avaliar a viabilidade celular, seguindo de incubação adicional a 37° por 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e foram adicionados 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço e a absorbância foi medida em comprimento de onda de 570nm utilizando o espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific). A concentração de gemcitabina necessária para inibir a proliferação celular em 50% (IC50) foi calculada utilizando o *software* CalcuSyn.

3.6.3. Ensaio de apoptose

O ensaio de indução de apoptose foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V conjugada com APC (BD Biosciences) e células necróticas com iodeto de propídio (PI). Anexina V é uma molécula que apresenta afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido presente na face interna da membrana celular. Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina externaliza-se, possibilitando a ligação e marcação com a Anexina V. A marcação com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana.

Para o ensaio, 3×10^5 células de cada clone e do controle foram semeadas em placas de cultivo de seis poços e tratadas, após 24 horas de incubação, com Gemcitabina (IC50 = 16 μM). Após 72 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas com PBS 1X gelado e ressuspensas em 300 μl de Tampão de ligação 1X para Anexina V (BD Biosciences). As células foram então marcadas com 5 μL de Anexina V APC e 50 μL da solução de iodeto de propídeo (PI) (50 μM). As análises foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando o aparelho BD FACSCalibur™ (BD Biosciences), contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Foi considerado para análise de apoptose apenas os valores referentes à marcação positiva com Anexina V.

3.6.4. Ensaio de capacidade clonogênica *in vitro*

Foram semeadas 250 células/poço da linhagem celular MIA PaCa-2 transfectada para *DUSP11* e da linhagem controle, em placas de cultivo de seis poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com Gemcitabina (IC30 = 2,95 μM). As células foram

incubadas por nove dias, tempo suficiente para a formação de colônias. Para visualização das colônias o meio de cultura foi descartado e as células foram fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (1%). A contagem foi realizada com auxílio de uma lupa e foram consideradas apenas colônias com número de células maior ou igual a 50.

3.6.5. Ensaio de migração celular por Wound Healing *in vitro*

As linhagens celulares foram semeadas (3×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e, após 24 horas de incubação, foi realizado um risco central em cada poço para a retirada mecânica das células nesta região com o auxílio de uma ponteira de 200 μ l. Imediatamente após o procedimento, isto é, no tempo zero (T0), o risco central foi fotografado com o auxílio do *software* AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 e, em seguida, efetuado o tratamento com Gemcitabina (IC₅₀ = 16 μ M). Após 24 horas a partir do processo de lesão mecânica, as células foram novamente fotografadas e o *software* Image J foi utilizado para calcular a área livre de células. A taxa de migração celular foi calculada de acordo como a distância em nanômetros migrada ao longo do tempo.

3.6.6. Ensaio de invasão em matrigel *in vitro*

Para avaliar a capacidade de invasão celular foram utilizados insertos com poros de 8 μ m cobertos por 100 μ l matrigel® (Corning) em placas de 24 poços (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). As células foram ressuspensas em 500 μ l de meio DMEM sem suplementação com SBF e aplicadas sobre o matrigel em uma concentração de 500×10^3 células/inserto. Na câmara inferior foram adicionados 500 μ l de meio DMEM suplementado com 10% de SBF, servindo como quimioatrativo. Após 24h de incubação, as células que não transpassaram a camada de matrigel foram removidas com o uso de *swabs*. As células que invadiram foram fixadas com metanol absoluto por 15 min e coradas com uma solução de Giemsa 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As membranas do inserto foram então removidas, montadas em lâminas de vidro com Entellan (Merk®) e fotografadas ao microscópio de campo claro (magnificação de 40x), sendo contadas com o auxílio do *software* Image J.

3.6.7. Western blot

A extração de proteínas totais foi realizada por meio de lise celular utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Sigma Aldrich, Inc.), acrescido de um coquetel de inibidores de

proteases e fosfatases. Posteriormente, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976), por meio do kit BioRad DC Protein Assay Kit (BioRad Laboratories, Inc.), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida-SDS. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e/ou PVDF as quais foram bloqueadas, sob agitação, com solução bloqueadora (5% de leite em pó diluído em TBS-T 1X) (BIO-RAD Laboratories, Inc.). Em seguida, foram incubadas *overnight* com anticorpo primário específico, diluído de acordo com as recomendações do fabricante sob agitação a 4°C.

Após incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T 1X e posteriormente incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário específico diluído em TBST 1X (1:15000) e acrescidos do reagente Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate (BIO-RAD Laboratories, Inc.) (1:15000), sob agitação. Completado o tempo de incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram novamente lavadas com TBST 1X e reveladas com o kit Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (BIO-RAD Laboratories, Inc.), de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram obtidas no aparelho ChemiDoc™ Touch Imaging System + Image Lab™ Software (BIO-RAD Laboratories, Inc.).

Foram utilizados os anticorpos primários anti-Cas9 (7A9-3A3 #14697 - Cell Signaling Technology, Inc), anti-DUSP11, anti β -actina (C4) (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-vinculina, adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos secundários adequados (anti-mouse IgG) foram obtidos da GE Healthcare (Chicago, Illinois, EUA).

3.7. Análise *in silico*

Foi realizada uma análise *in silico* da expressão gênica de *DUSP11* em amostras provenientes de pacientes com ADP por meio da ferramenta UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) (Chandrashekar et al. 2017) e análise de sobrevida com o auxílio da plataforma UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>). Essas plataformas contêm dados genômicos advindos de bases de dados importantes para o estudo do câncer, incluindo o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (<https://cancergenome.nih.gov/>). Acessando os dados de RNA-Seq (IlluminaHiSeq) do TCGA, a expressão gênica de *DUSP11* foi analisada em uma coorte de 164 amostras e a análise de sobrevida em uma coorte 196 amostras de ADP. Afim de avaliar

a relação de DUSP11 com microRNAs, foi realizada uma análise de correlação na Plataforma LinkedOmics (Vasaikar et al. 2018) (<http://www.linkedomics.org/login.php>).

3.8. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas estatísticos GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata, abrangendo entre dois e três experimentos independentes, considerando-se a média dos experimentos. Para a análise dos ensaios funcionais foi utilizado o teste Two-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para analisar a associação com sobrevida foi usado o teste de Kaplan Meier e para análise de correlação o coeficiente de Person. Foi considerado como significância estatística um valor de alfa de 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de Citotoxicidade

4.1.1. Gemcitabina

Para determinar a sensibilidade das linhagens estudadas, o teste de citotoxicidade para Gemcitabina foi realizado. As células foram tratadas por 96 horas com diferentes concentrações da droga (0,1 a 100 μM). As taxas de proliferação celular foram reduzidas conforme o aumento da concentração da droga e o tempo de tratamento (tempo e dose dependente) (Figura 4). Após 24 horas de tratamento, não foi observada redução significativa das células quando comparadas ao controle. Nos intervalos seguintes, principalmente após 72 horas de tratamento, nota-se uma redução estatisticamente significativa na proliferação celular ($p=0,04$). Contudo, a linhagem celular PANC-1 mostrou-se mais resistente à gemcitabina comparada à linhagem MIA PaCa-2 de acordo com o IC50 (dose média em que a droga causa a inviabilidade de 50% das células) calculado após 72h de tratamento (635 μM e 16 μM respectivamente). Esses dados estão listados na Tabela V.

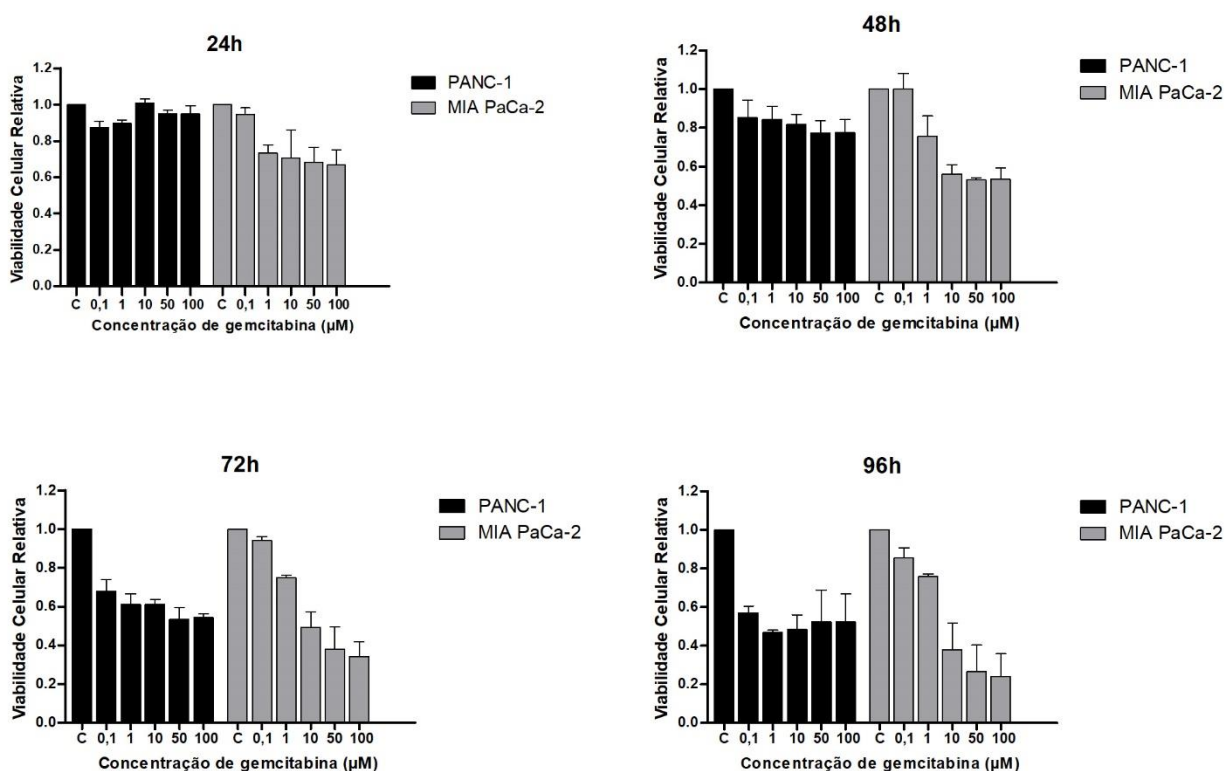


Figura 4. Representação gráfica do teste de citotoxicidade celular nas linhagens PANC-1 e MIA PaCa-2 tratadas com gemcitabina em gradiente de concentração (0,1 a 100 μM), de 24 a 96 horas.

Tabela V. Tabela dos valores do IC50 da gemcitabina determinado para PANC-1 e MIA PACA-2.

Linhagens celulares	Gemcitabina (IC50)
PANC-1	635 μ M
MIA PaCa-2	16 μ M

4.2. Análise da expressão gênica de *DUSP11* em linhagens celulares e amostras de pacientes.

Após a identificação de *DUSP11* (nos ensaios de *screening* realizados anteriormente pelo grupo) como um alvo relevante para a resposta das células de ADP à gemcitabina, o próximo passo foi analisar o padrão de expressão desse gene nas linhagens celulares e em amostras de tecido pancreático livres de tumor. Nessa análise foi observada uma maior expressão de *DUSP11* nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 quando comparadas às amostras livres de tumor (Figura 5).

Buscando compreender, então, o perfil de expressão deste gene nas amostras tumorais, analisamos 164 amostras provenientes de plataformas públicas contendo dados de RNA-Seq disponibilizados pelo TCGA. Nessa análise observou-se que, a expressão de *DUSP11* aumenta proporcionalmente ao estadiamento tumoral, mostrando uma diferença significativa de níveis de expressão gênica entre os estágios II e IV ($p=0,04$) (Figura 6). O estadiamento do tumor de pâncreas é classificado pelo parâmetro TNM. A letra “T” refere-se ao tamanho do tumor principal e se ele se estende a órgão vizinhos; “N” refere-se à extensão para gânglios linfáticos e “M” refere-se à disseminação do tumor para órgão distantes (fígado, pulmão, etc.). Por esse critério, o estágio I indica que o tumor se apresenta *in situ*, e o estágio IV representa a forma mais agressiva do tumor, quando há a presença de metástases para órgãos adjacentes e/ou distantes (Dagleish et al. 2007).

Na análise de sobrevida global dos 164 pacientes avaliados (Kaplan-Meier), verifica-se uma associação significativa de *DUSP11* com esse parâmetro clínico, na qual maior nível de expressão gênica está associado aos casos que apresentam as menores taxas de sobrevida ($p=0,012$) (Figura 7). Estes resultados sugerem que *DUSP11* pode estar envolvido na agressividade do adenocarcinoma ductal pancreático e, conseqüentemente, estar relacionado com a quimiorresistência tumoral à Gemcitabina.

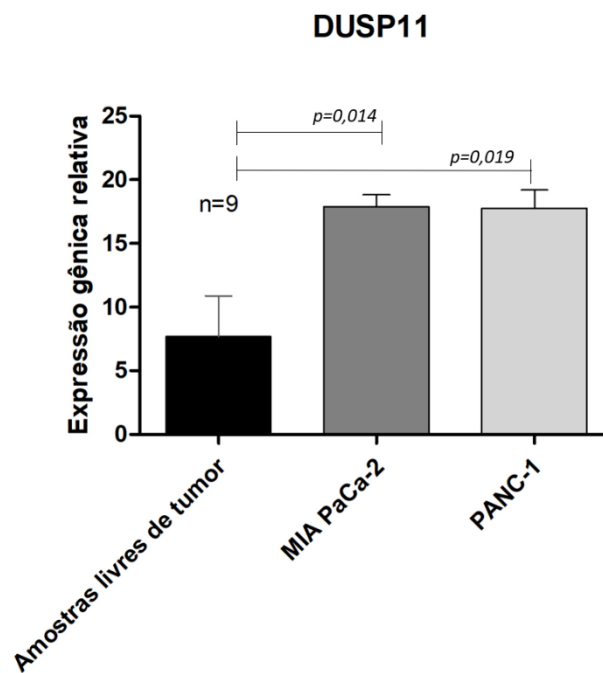


Figura 5. Expressão gênica relativa de *DUSP11* em amostras de tecido pancreático livres de tumor e em linhagens celulares de ADP.

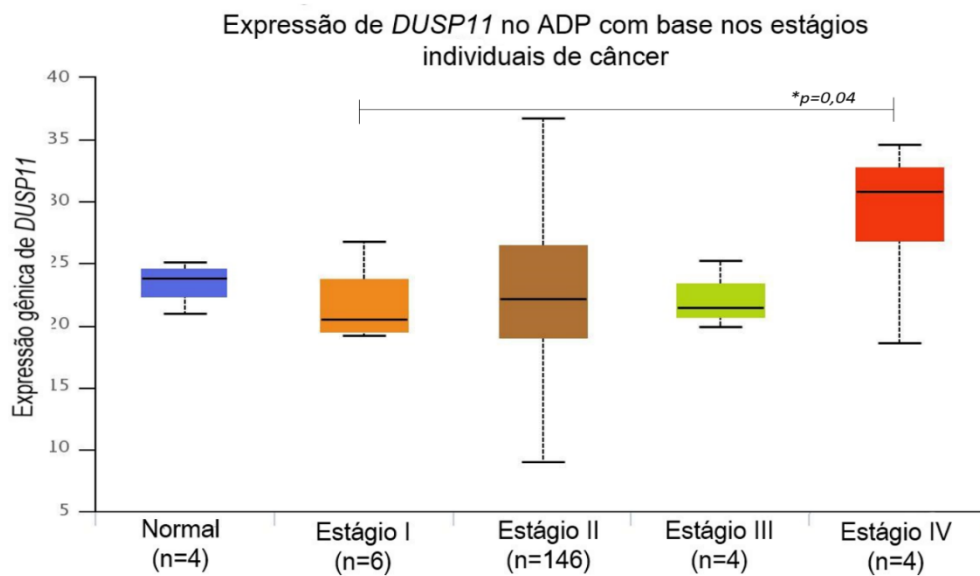


Figura 6. Análise de expressão de *DUSP11* em amostras de ADP, conforme banco de dados do TCGA. Expressão de *DUSP11* em uma coorte de 164 amostras de pacientes, apresentando aumento na expressão gênica conforme mais agressivo é o tumor (estágio IV). Dado obtido por meio da ferramenta OncoLnc (Dalgleish et al. 2007).

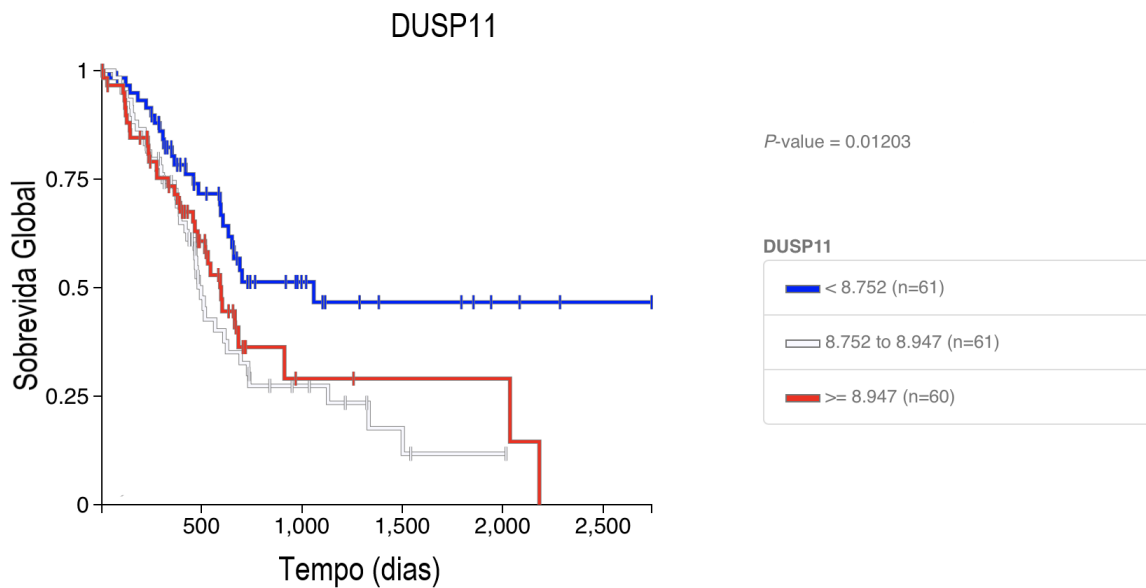


Figura 7. Análise de sobrevida baseada na expressão de DUSP11. Análise de sobrevida (Kaplan-Meier) de uma coorte de 196 pacientes, baseado na expressão de DUSP11. Em azul, pacientes que apresentaram baixa expressão e melhor taxa de sobrevida (aproximadamente 50%). Em vermelho, pacientes que apresentam maior expressão de DUSP11 e uma menor taxa de sobrevida. Esses dados representam uma provável análise de sobrevida desses pacientes [(UCSC Xena Platform (Goldman *et al*, 2018)].

4.3. Validação da edição gênica de DUSP11, pela técnica de CRISPR-Cas9

Após a análise da associação de dados de expressão gênica de *DUSP11* com parâmetros clínicos relevantes para o ADP em amostras humanas, o próximo passo foi a investigação funcional de DUSP11 nas linhagens celulares de ADP. Avaliando os dados obtidos nas análises de expressão gênica de *DUSP11* nas linhagens celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, foi observado uma maior expressão de expressão desse gene em relação ao tecido normal, indicando que *DUSP11* poderia desempenhar um papel importante no processo tumorigênico do ADP. Assim, para investigar esse papel, foi utilizada a técnica de CRISPR-Cas9 para inibir a expressão deste gene. A endonuclease Cas9 foi permanentemente inserida nas células afim de garantir a efetividade da técnica de CRISPR. Confirmada a expressão da Cas9 (Figura 8), a linhagem MIA PaCa-2 foi transfectada com o complexo crRNA:tracrRNA. Para confirmação da edição gênica, quinze amostras isoladas à partir de um clone único, foram sequenciadas pelo método de Sanger e analisadas quanto a expressão gênica e proteica.

No sequenciamento de Sanger, pode-se observar que houve uma alteração na sequência dos clones isolados do crRNA de *DUSP11* correspondente ao éxon 9. Ao analisar o crRNA de um dos clones isolados, verifica-se uma substituição de bases em heterozigose na

fita antisense. Nesse caso, houve uma substituição de uma adenina (A) por uma guanina (G) (Figura 9). Essa alteração reduziu significativamente os níveis de expressão gênica de *DUSP11*, posteriormente confirmado também em nível proteico (Figura 10). A análise de expressão proteica por *Western blot* apresenta o resultado da expressão proteica dos cinco clones inicialmente analisados do crRNA (éxon 9), e ilustra os clones identificados como DUSP11 #4 e DUSP11 #5 e que correspondem àqueles com uma redução significativa da expressão proteica de DUSP11. Diante desses resultados, essas duas amostras foram utilizadas para a realização dos ensaios funcionais *in vitro*. Nos ensaios, as linhagens com inibição de DUSP11 foram nomeadas de #KO1 e #KO2 e a linhagem controle de #WT.

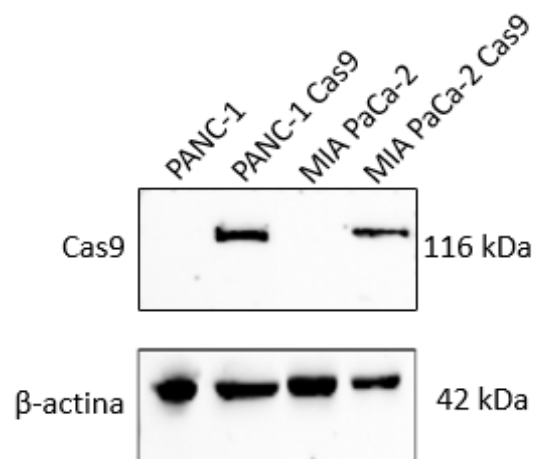


Figura 8. Confirmação da expressão proteica da endonuclease Cas9 nas linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2.

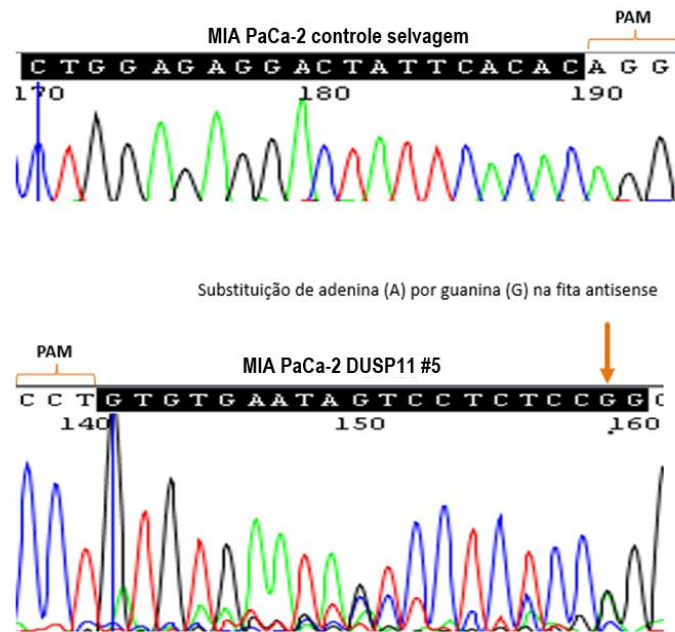


Figura 9. Sequenciamento de Sanger. Análise do sequenciamento nas amostras MIA PaCa-2 selvagem e MIA PaCa-2 nocaute. No clone #5, houve a substituição heterozigota de uma adenina (A) por uma guanina (G), não observado na amostra selvagem.

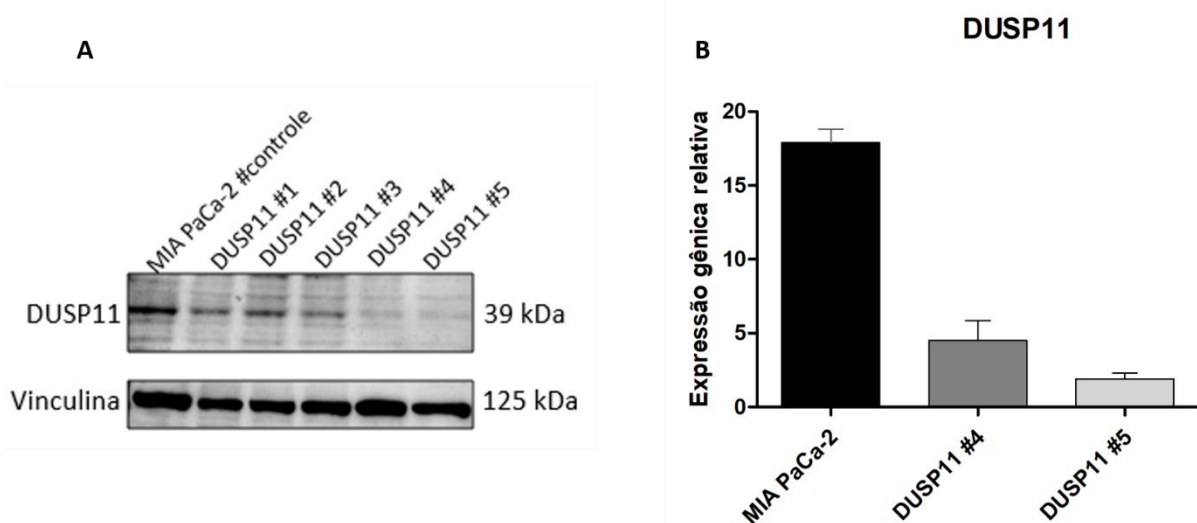


Figura 10. Análise de expressão de DUSP11. Após transfecção com o complexo crRNA:tracrRNA, foram isolados clones de célula única para obtenção de população homogênea. **(A)** Amostra controle e cinco clones de célula única de um crRNA (éxon9). Os clones #4 e #5 apresentaram redução na expressão proteica, comparado à amostra controle. **(B)** Silenciamento em nível gênico nos clones DUSP11#4 e DUSP11#5.

4.4. Análise da capacidade proliferativa, *in vitro*, após modulação de *DUSP11*

Visando compreender o papel de *DUSP11* na capacidade proliferativa das células de adenocarcinoma ductal pancreático, as células nocaute para *DUSP11* e as células selvagens (controle) foram analisadas, no período de 72 horas após tratamento com gemcitabina (0,1 μ M a 100 μ M). Esse tempo foi estabelecido de acordo com o ensaio de citotoxicidade, e demonstrou o melhor intervalo de ação do quimioterápico. Como ilustrado na Figura 12, as linhagens com baixa expressão de *DUSP11* revelaram-se mais sensíveis ao tratamento. Esse dado mostra que a inibição de *DUSP11* reduz a capacidade proliferativa das células, indicando que a *DUSP11* pode atuar no processo de sensibilização das células à gemcitabina. A inibição de *DUSP11*, também reduziu significativamente a dose necessária para inibir a viabilidade celular em 50% alterou o valor de IC50 de 16 μ M para 6,50 μ M (Tabela VI).

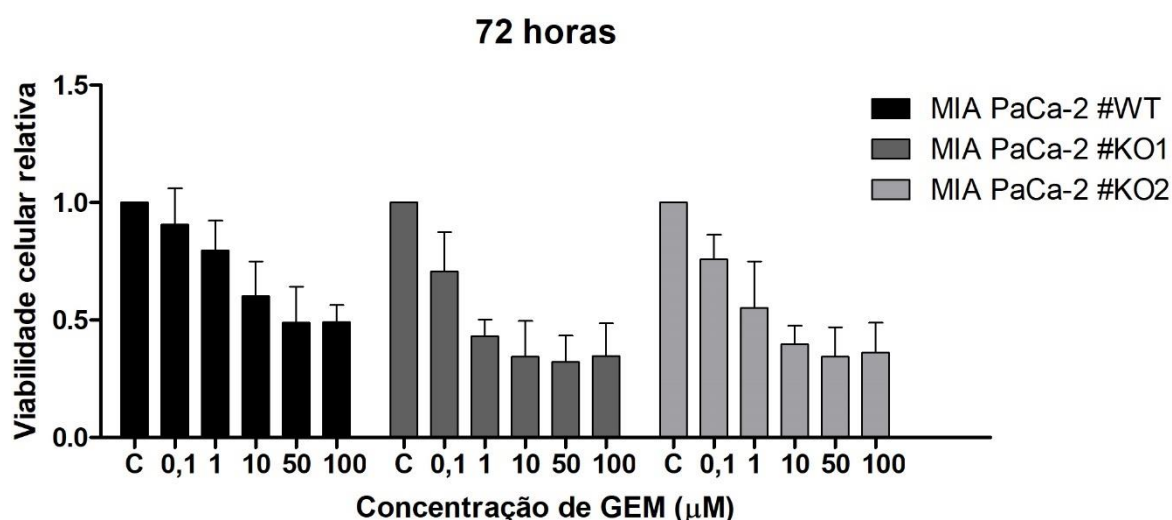


Figura 11. Avaliação da capacidade proliferativa das células com a inibição de *DUSP11*. Após inibição de *DUSP11*, se observa uma redução da viabilidade celular relativa entre os clones #KO1 e #KO2 comparado à linhagem selvagem. Legenda: GEM = Gemcitabina, #WT = wild type (selvagem), #KO1 = linhagem nocaute1, #KO2 = linhagem nocaute 2.

Tabela VI. Tabela comparativa de valores do IC50 da gemcitabina determinado para MIA PaCa-2 selvagem e nocaute para *DUSP11*.

Linhagens celulares	Gemcitabina (IC50)
MIA PaCa-2 selvagem	16 μ M
MIA PaCa-2 nocaute	6,50 μ M

4.5. Avaliação da indução de apoptose nas linhagens nocautes para *DUSP11*

Ao observar a redução da capacidade proliferativa das células após inibição de *DUSP11*, avaliou-se, então, a análise da indução da apoptose por meio da marcação das células com Anexina-V APC, no intuito de compreender se a redução da proliferação dessas células era devido à indução de apoptose. Na figura 12, é possível observar que no clone #KO1 e no clone #KO2, observa-se um aumento de 21% ($p=0,035$) e 33% ($p=0,038$), respectivamente, na taxa de apoptose em relação à linhagem selvagem #WT.

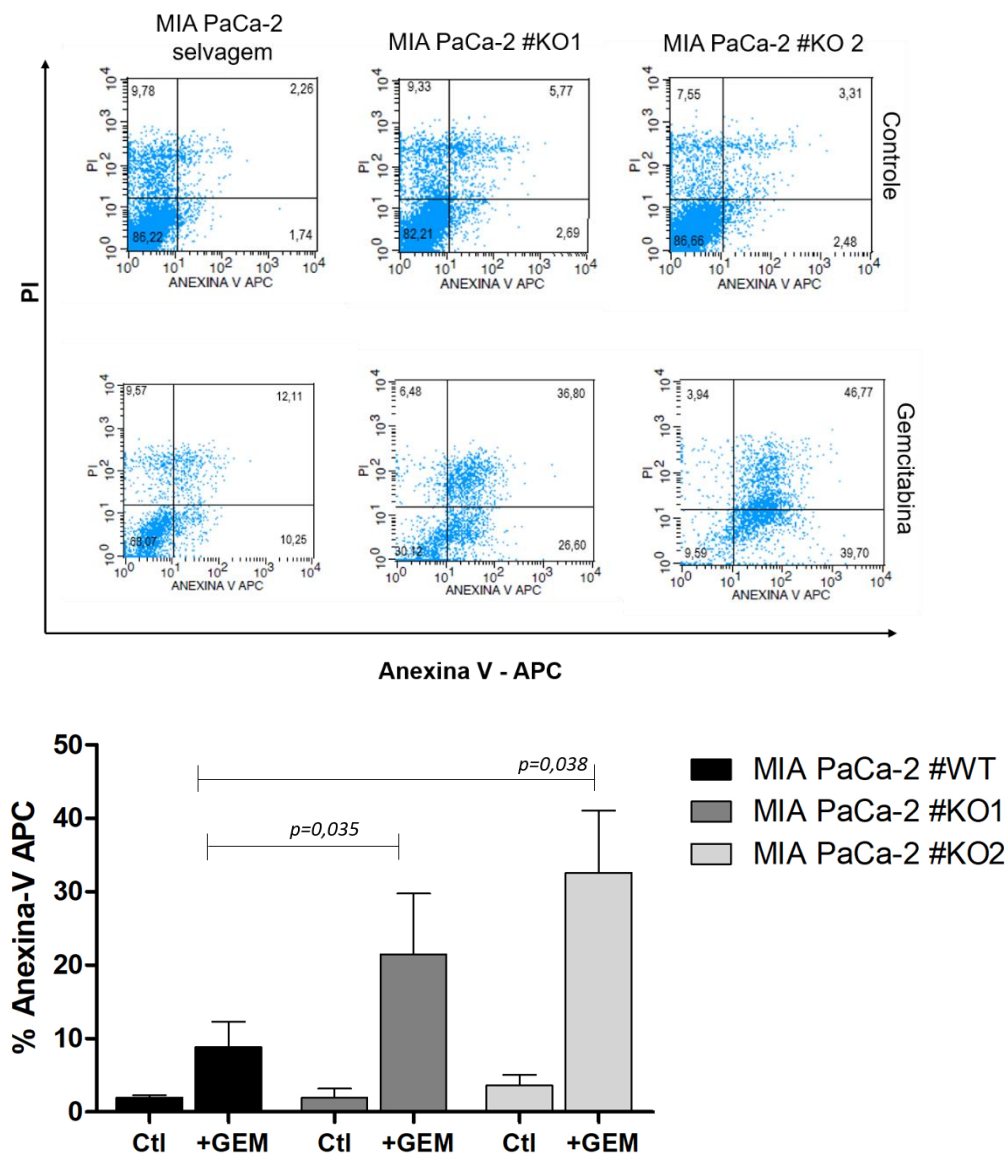


Figura 12. Análise do perfil de morte celular por apoptose. Os gráficos representam a média de quantificação da marcação em 2 experimentos independentes nas linhagens. Houve diferença estatística entre os clones, quando comparado a linhagem selvagem. Legenda: GEM = Gemcitabina, #WT = wild type (selvagem), #KO1 = linhagem nocaute1, #KO2 = linhagem nocaute 2.

4.6. Efeito da inibição de DUSP11 na capacidade clonogênica

Afim de avaliar o efeito da modulação de *DUSP11* na capacidade clonogênica das células, estas foram tratadas com gemcitabina com a dose de $IC_{30} = 2,95\mu M$ durante 48 horas. Após nove dias – tempo suficiente para formação de colônia na linhagem MIA PaCa-2, foi observada uma redução significativa no número de colônias formadas pelos clones #KO1 ($p=0,046$) e #KO2 ($p=0,029$) na presença de Gemcitabina, comparado ao tratamento da linhagem selvagem (Figura 13). A combinação da inibição de DUSP11 com gemcitabina foi capaz de reduzir a capacidade clonogênica da linhagem MIA PaCa-2.

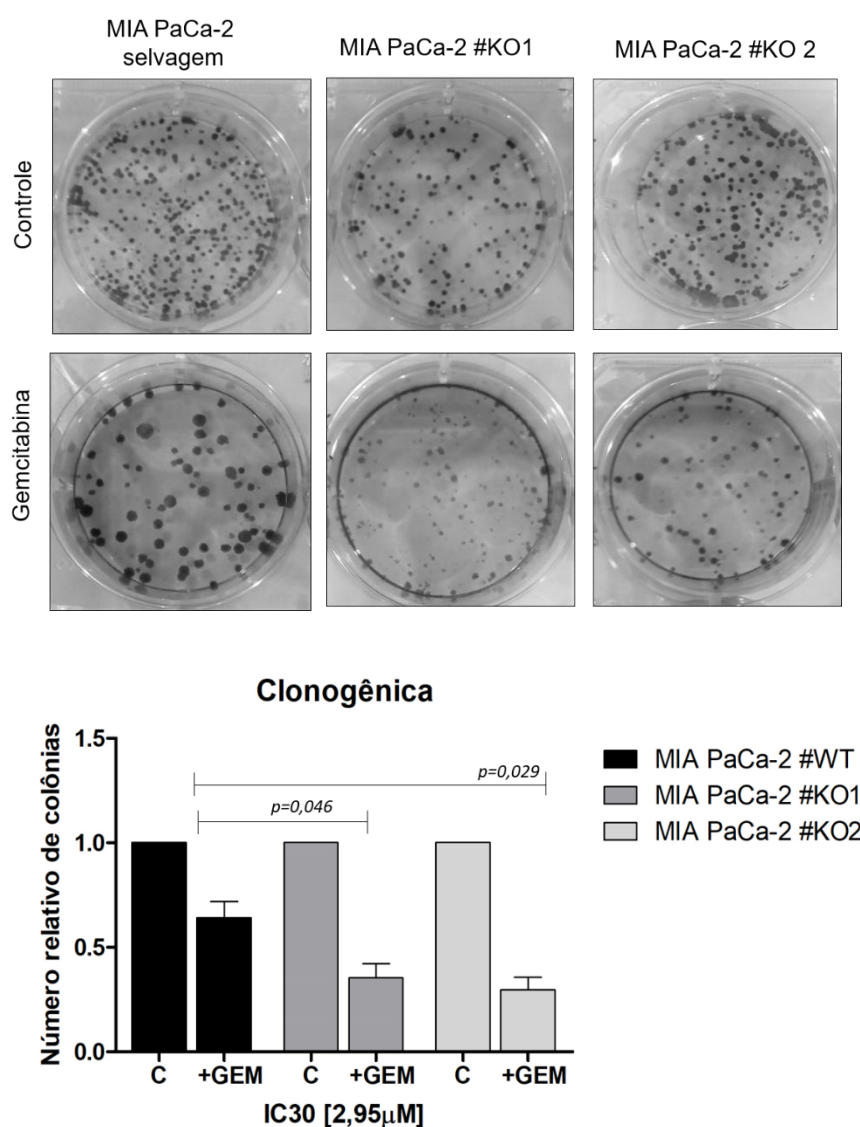


Figura 13. Análise da capacidade de formação de colônias após modulação da DUSP11. A diminuição da expressão de DUSP11 levou a redução na capacidade clonogênica na linhagem MIA PaCa-2 nocaute em relação à linhagem selvagem, em combinação com a Gemcitabina. Legenda: GEM = Gemcitabina, #WT = wild type (selvagem), #KO1 = linhagem nocaute1, #KO2 = linhagem nocaute 2.

4.7. A inibição de DUSP11 não altera a capacidade de migração e invasão das células de ADP

A capacidade de migração das células foi avaliada por meio do ensaio de *wound healing*. Neste ensaio, foi observado que a inibição de DUSP11 não alterou a capacidade migratória do clone #KO1, diminuindo apenas 9% ($p=0,333$). Contudo, o clone #KO2, reduziu 23% a taxa de migração em comparação à capacidade migratória da linhagem selvagem ($p=0,026$) (Figura 14).

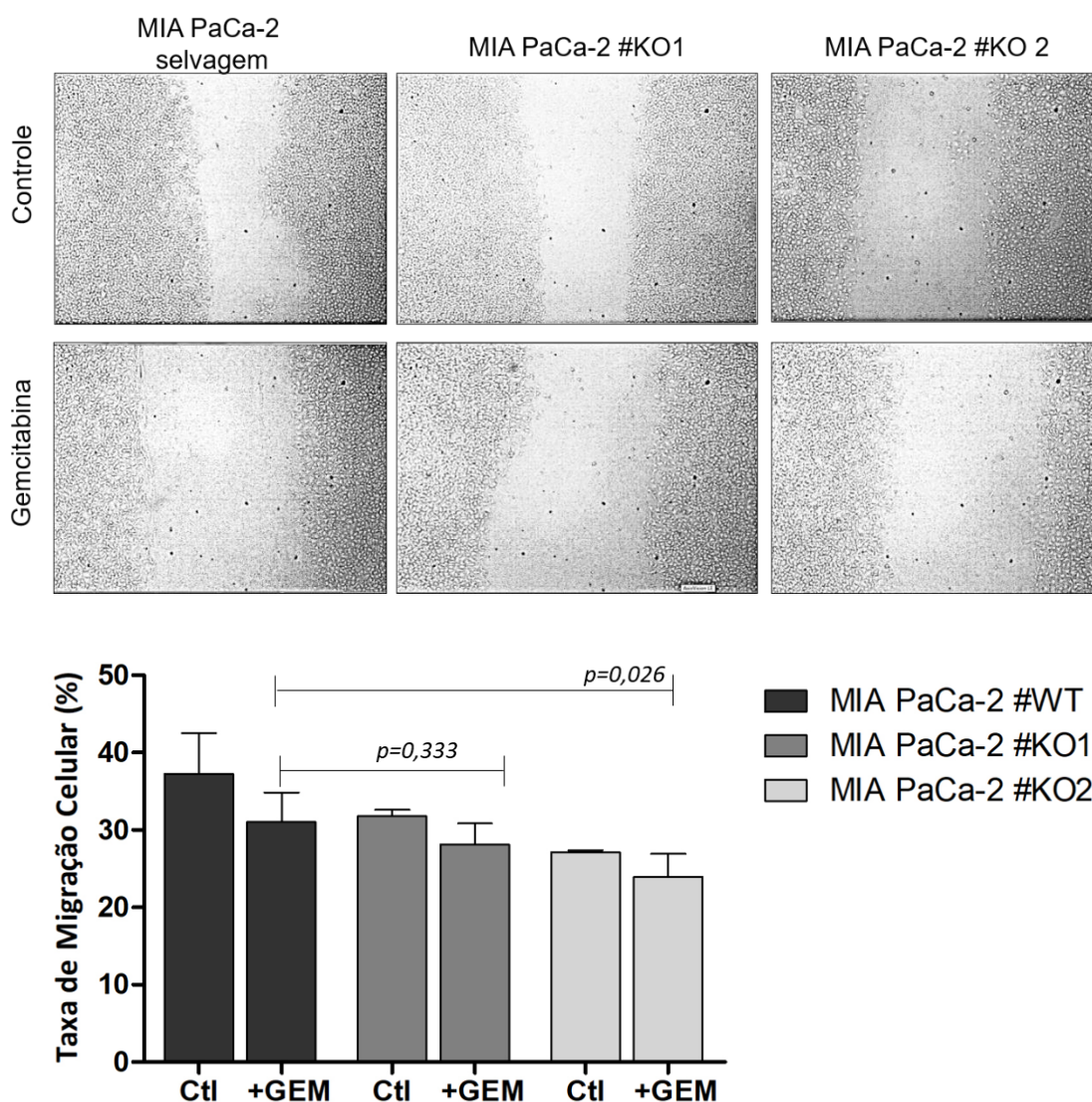


Figura 14. Fotos e gráficos correspondentes ao ensaio de migração wound healing. Não houve diferença estatística quanto a diminuição da capacidade de migração celular no clone #KO1. Contudo, teve diferença no clone #KO2, comparado à linhagem selvagem #WT, após 24 horas de tratamento. Legenda: GEM = Gemcitabina, #WT = wild type (selvagem), #KO1 = linhagem nocaute1, #KO2 = linhagem nocaute 2.

A capacidade invasiva de células de ADP foi avaliada através do ensaio de invasão em matrigel. Após 24 horas de tratamento, foi observado que a inibição de DUSP11 não causou impacto significativo na diminuição do processo invasivo das células. Os clones #KO1 e #KO2 apresentaram redução de apenas 20% ($p=0,892$ e $p=0,610$, respectivamente) na taxa de invasão celular quando comparado à linhagem selvagem tratada com gemcitabina.

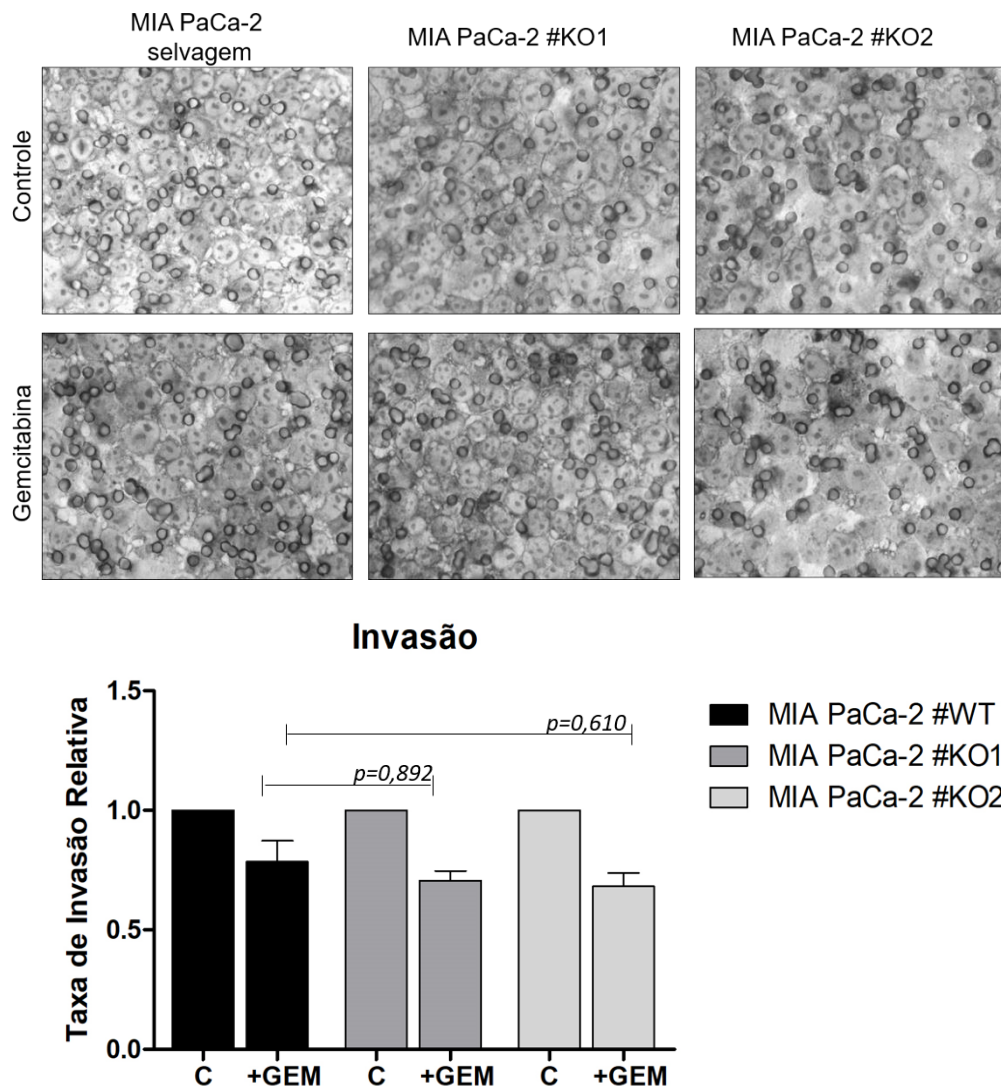


Figura 15. Fotos e gráficos correspondentes ao ensaio de invasão celular. A inibição de DUSP11 não reduziu a capacidade invasiva dos clones #KO1 e #KO2, comparado à linhagem selvagem #WT com tratamento. Legenda: GEM = Gemcitabina, #WT = wild type (selvagem), #KO1 = linhagem nocaute1, #KO2 = linhagem nocaute 2.

4.8. Expressão de DUSP11 está correlacionada com microRNAs com papel relevante para o ADP

Como descrito, DUSP11 é uma fosfatase atípica que atua desfosforilando RNAs, incluindo os microRNAs (miRNA) (Burke et al. 2016). Desta forma, foi então realizada uma análise de correlação da expressão de DUSP11 com miRNAs na Plataforma LinkedOmics (Vasaikar et al. 2018) que integra dados genômicos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Com isso, 178 amostras de pacientes foram avaliadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Um total de 100 miRNAs encontram-se correlacionados com a expressão de *DUSP11*, seja positivamente (Figura 16) ou negativamente (Figura 17). Dentre os principais microRNAs que apresentaram correlação significativa com a expressão de *DUSP11* estão os miR-21, miR-153, miR181 e miR199b. Alguns destes, encontram-se listados na Tabela VII.

Genes Significativos Positivamente Correlacionados

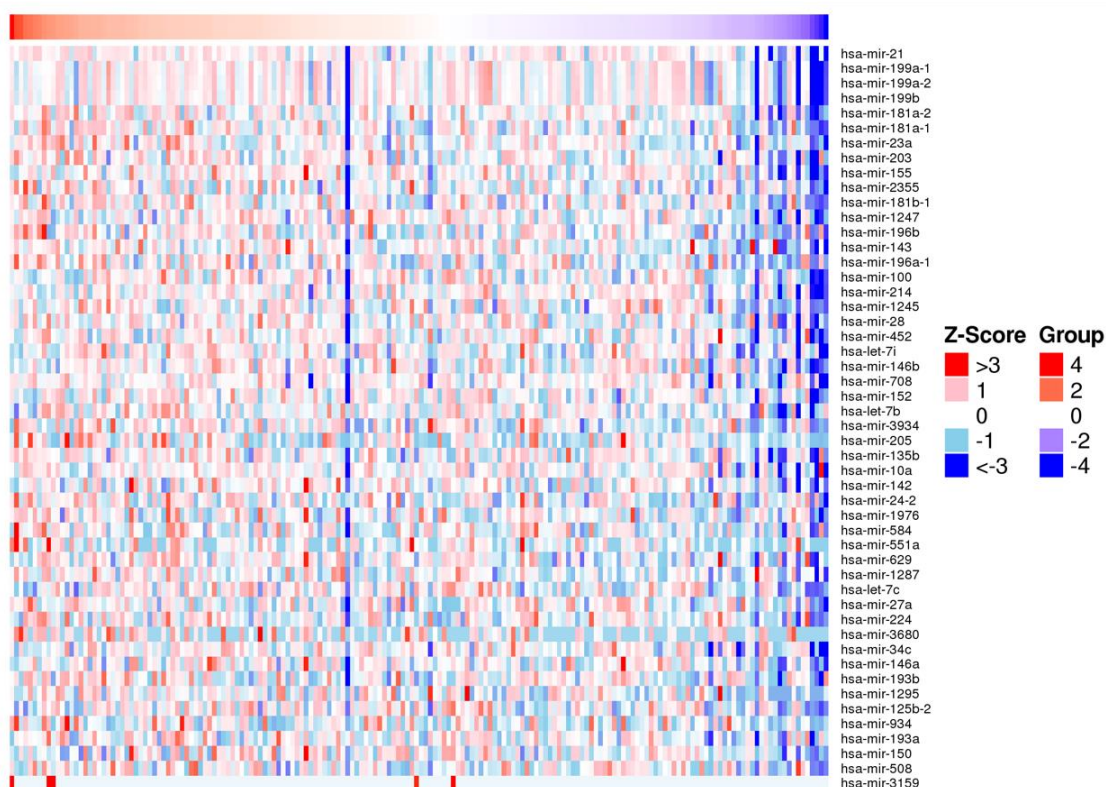


Figura 16. Heatmap que descreve os miRNAs positivamente correlacionados com a expressão de *DUSP11* em pacientes com ADP. A expressão mais baixa e mais alta é representada em azul e vermelho, respectivamente. Cada linha indica um único gene e cada coluna indica uma amostra clínica.

Genes Significativos Negativamente Correlacionados

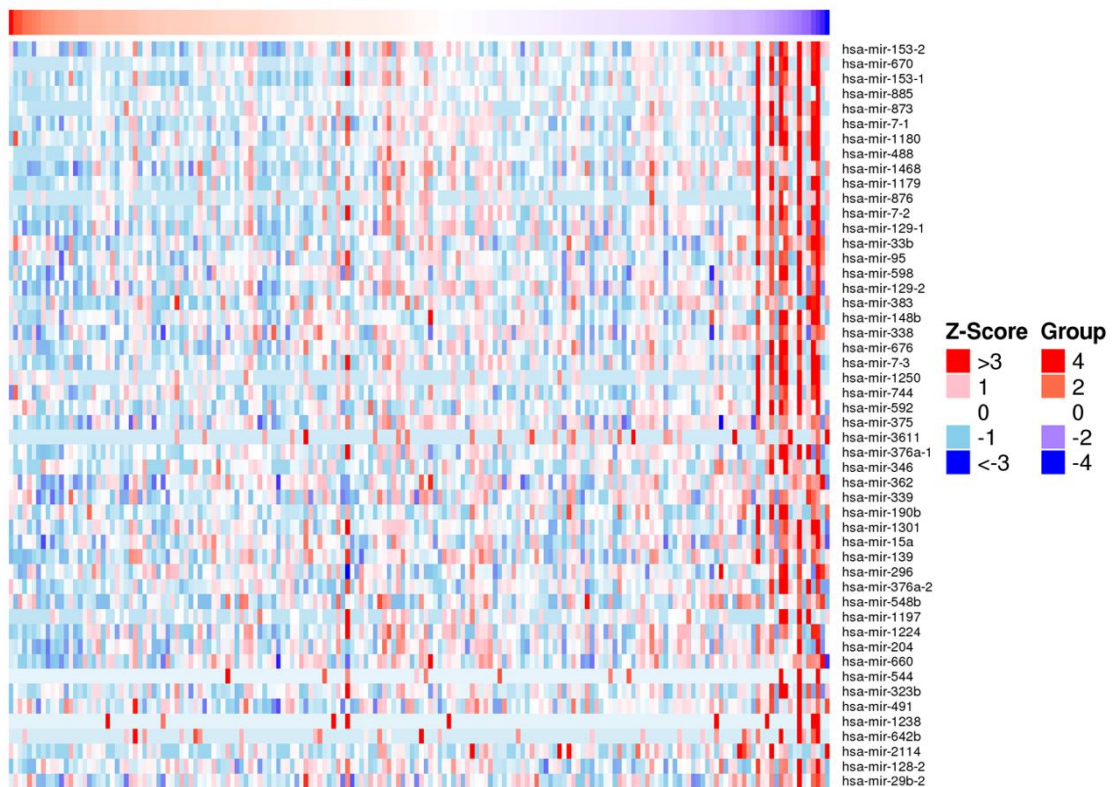


Figura 17. Heatmap que descreve os miRNAs negativamente correlacionados com a expressão de *DUSP11* em pacientes com ADP. A expressão mais baixa e mais alta é representada em azul e vermelho, respectivamente. Cada linha indica um único gene e cada coluna indica uma amostra clínica.

Tabela VII. Relação de miRNAs diferencialmente correlacionados com a expressão de *DUSP11* ($p \leq 0,05$) em amostras de adenocarcinoma ductal pancreático.

Genes	Correlação de Pearson	<i>p-value</i>
hsa-mir-21	0,439	8,16E-10
hsa-mir-153-2	-0,426	2,98E-09
hsa-mir-670	-0,401	2,70E-08
hsa-mir-153-1	-0,399	3,44E-08
hsa-mir-199a-1	0,397	3,80E-08
hsa-mir-199a-2	0,397	3,88E-08
hsa-mir-199b	0,396	4,17E-08
hsa-mir-181a-2	0,396	4,23E-08
hsa-mir-181a-1	0,389	8,03E-08
hsa-mir-885	-0,386	1,01E-07

Discussão

5. DISCUSSÃO

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma neoplasia letal com uma taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 5%. A gemcitabina (GEM) é uma droga chave para o tratamento do ADP, sendo comumente utilizada como quimioterapia adjuvante (Vincent et al. 2011). No entanto, nenhuma das estratégias terapêuticas disponíveis até o momento é capaz de prolongar de forma satisfatória o tempo médio de sobrevida dos pacientes que varia de 22,1 a 23,6 meses (Oettle et al. 2013). Deste modo, torna-se primordial a busca por novos alvos terapêuticos.

As proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) compõem uma subfamília de proteínas tirosino fosfatases que desempenham um importante papel na transdução de sinal, regulação do ciclo celular e supressão tumoral. Muitos dos seus membros possuem como substrato proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases), as quais podem ser desfosforiladas em ambos os resíduos de serina/treonina ou tirosina. Contudo, dentre as 44 DUSPs já identificadas, algumas não tem como alvo as MAP quinases, pois não possuem o domínio de ligação MKB (DUSPs atípicas). Um exemplo de DUSP atípica é a fosfatase de dupla especificidade 11 (DUSP11). A DUSP11, também conhecida como PIR1 (*phosphatase that interacts with RNA/ribonucleoprotein complex 1*) é capaz de desfosforilar RNAs e também foi recentemente relacionada ao processo de desfosforilação de microRNAs virais, podendo interferir em sua biogênese (Burke et al. 2016).

A fosfatase DUSP11 nunca foi investigada quanto ao seu papel no processo tumorigênico e este trabalho é o primeiro a apresentar uma atuação de *DUSP11* na resposta à quimiorresistência. No presente estudo, foi avaliado o papel da DUSP11 frente ao tratamento de células de adenocarcinoma ductal pancreático com o quimioterápico gemcitabina.

Inicialmente as linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 foram submetidas a um *screening* fenotípico pela técnica de CRISPR-Cas9 tendo como alvo todos os genes da família DUSP, afim de avaliar a resposta das células ao tratamento com gemcitabina. Diante dos resultados obtidos, foi observado que, dentre as DUSPs estudadas, a DUSP11 apresentou um potencial sensibilizante à gemcitabina após inibir a proliferação de ambas as linhagens em 30% ($p=0,04$), indicando, assim, um potencial alvo de estudo.

Diante desse resultado, foi avaliada então a expressão do gene *DUSP11* nas linhagens

celulares de ADP. As linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 apresentaram um aumento significativo da expressão gênica quando comparadas às amostras de tecido pancreático livres de tumor sugerindo que esse gene pode desempenhar um papel importante na tumorigênese do ADP. Para confirmar esses dados, realizou-se em seguida uma análise de dados genômicos provenientes de dados de RNA-Seq disponibilizados pelo banco de dados do TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>). A expressão de *DUSP11* foi analisada em cada estágio de desenvolvimento tumoral do ADP que varia do estágio I ao estágio IV, sendo que o último estágio indica o grau de maior agressividade (tumor avançado e/ou metastático) (Dagleish et al. 2007). Nesta análise, foi possível verificar um aumento na expressão de *DUSP11* proporcional ao estadiamento tumoral, principalmente quando foram comparadas amostras de grau II em relação às amostras de grau IV, onde a diferença de expressão foi mais evidente. Esse dado sugere que a *DUSP11* pode exercer um papel importante na progressão tumoral do ADP.

Até o presente momento não há relatos do papel de *DUSP11* no processo tumorigênico do ADP. Um dos primeiros estudos que avaliaram a expressão de *DUSP11* foi realizado por Yuan e colaboradores (1998) em linhagens celulares humanas normais e transformadas (derivadas de diferentes tecidos). Neste trabalho foi observado um padrão elevado de expressão de *DUSP11* nas linhagens celulares HaCat, A431 e ML1. Em contrapartida as linhagens tumorais HeLa e SAOS2 revelaram um baixo nível de expressão deste gene. Esses dados sugerem que a expressão de *DUSP11* é tecido-específica.

Para compreender o impacto clínico da expressão de *DUSP11* aos pacientes acometidos com adenocarcinoma ductal pancreático, foi realizada uma análise da sobrevida global desses pacientes, analisando os dados genômicos disponibilizados pelo TCGA. Os dados analisados revelaram que a expressão de *DUSP11* encontra-se associada à uma menor taxa de sobrevida comparado aos pacientes que apresentaram menores níveis de expressão gênica.

Esse dado reafirma o potencial envolvimento de *DUSP11* no processo tumorigênico bem como no prognóstico dos pacientes. Para elucidar se de fato a *DUSP11* exerce um papel funcionalmente relevante para o ADP, questionou-se em quais processos essa fosfatase poderia atuar para promover a tumorigênese no ADP? Para tanto, com o objetivo de compreender o papel desta fosfatase no adenocarcinoma pancreático, foram realizados ensaios *in vitro* na linhagem celular MIA PaCa-2 após inibição de *DUSP11* pela tecnologia de

CRISPR-Cas9.

Confirmada a inibição de DUSP11, o ensaio de proliferação celular foi realizado com o intuito de avaliar o impacto desta modulação no processo proliferativo. Após a inibição de DUSP11, houve uma redução significativa na taxa de proliferação celular e também na dose de IC50 da gemcitabina, sugerindo que a fosfatase DUSP11 pode desempenhar um papel importante na resposta a esse quimioterápico. Caprara e colaboradores (2009) demonstraram que o aumento da expressão proteica de DUSP11 causou uma redução significativa na proliferação celular de células de carcinoma colorretal, sugerindo que a DUSP11 pode de fato desempenhar um papel no processo de quimiorresistência, embora esse seja específico para cada tipo de tumor.

Como a inibição de DUSP11 diminuiu a proliferação celular na linhagem MIA PaCa-2, foi investigado qual seria seu impacto na indução de morte por apoptose dessas células. Os resultados revelaram que a inibição de DUSP11 combinada ao tratamento com gemcitabina foi capaz de aumentar a apoptose em mais de 20% em relação à linhagem selvagem, sugerindo que a DUSP11 pode modular o processo de morte celular por apoptose. Um trabalho semelhante foi realizado com a DUSP1, que se apresenta hiperexpressa em linhagens celulares de ADP. Sua inibição foi capaz de quimiossensibilizar as células ao tratamento com a gemcitabina e potencializar a indução de morte celular por apoptose (em comparação com o tratamento com a gemcitabina isolada) por meio da ativação de JNK e MAPK p38 (Liu et al. 2014). Esses dados se assemelham aos nossos achados, embora as informações acerca da atuação de DUSP11, principalmente em processos relacionados à tumorigênese, ainda sejam bastante limitadas. Vale ressaltar ainda, que diferentemente da DUSP1, a DUSP11 é uma fosfatase atípica que possui como substrato RNAs.

Buscando o entendimento da atividade desta DUSP na tumorigênese do ADP avaliamos o impacto da inibição de DUSP11 na formação de colônias e foi observado que a ausência de DUSP11 combinada ao tratamento com gemcitabina reduz a capacidade de sobrevivência das células, sugerindo mais uma vez que a DUSP11 pode exercer um papel essencial na progressão tumoral e consequente sensibilização das células de ADP.

A agressividade e o potencial metastático do adenocarcinoma ductal pancreático já estão bem descritos. A migração das células cancerosas envolve várias moléculas que são orquestradas para ajudar as células neste processo (Roussos et al. 2011). A metástase no

câncer está diretamente associada ao prognóstico e o controle da migração dessas células é uma estratégia eficaz no tratamento do câncer (Dorsam and Gutkind 2007). Desta forma, a análise de processos relacionados à capacidade invasiva e migratória das células de ADP também foram investigadas no presente estudo. Apesar do índice migratório de um dos clones (#KO2) ter sido reduzido após o tratamento com a gemcitabina, o envolvimento da DUSP11 nos processos de migração e invasão não foram evidentes. Isso sugere que a inibição de DUSP11 não altera a atividade de moléculas de adesão presentes na superfície celular que regulam o potencial de metástase das células de ADP (Liu et al. 2012).

Os dados apresentados até o presente momento ilustra como os mecanismos que regulam a resistência das células à quimioterapia são pouco compreendidos, especialmente considerando o envolvimento da DUSP11. Adicionalmente vale ressaltar que a DUSP11 é uma fosfatase atípica e portanto, o seu real papel nesses processos deve ser elucidado por meio da investigação dos principais substratos dessa fosfatase: RNAs e microRNAs. Os microRNAs (miRs) são pequenas moléculas de RNA não codificante que regulam o processo pós-transcricional de expressão gênica por meio da degradação e/ou inibição da tradução de RNAm (Kim et al. 2009).

Na tentativa de investigar uma potencial correlação entre a expressão de DUSP11 e a expressão de microRNAs (miRs), os dados genômicos disponibilizados pelo TCGA foram analisados. Diversos miRs foram significativamente correlacionados com a expressão gênica de DUSP11 apontando para um envolvimento dessa fosfatase na regulação dos mesmos. Um dado interessante foi a correlação positiva da expressão da DUSP11 com o miR-21.

O miR-21 é um dos mais estudados microRNAs no adenocarcinoma ductal pancreático. Sua expressão demonstrou estar envolvida na progressão tumoral do ADP e estudos relataram correlações significativas entre a expressão de miR-21 e resistência a agentes quimioterápicos (Blower et al. 2008; Li et al. 2009). Em particular, a inibição do miR-21 aumentou a sensibilidade à gemcitabina em células de ADP (Park et al. 2009). A expressão do miR-21 já foi associada à inibição da apoptose e à aquisição de propriedades invasivas, tendo como alvo o PTEN, cuja perda de função inibe a apoptose e promove o processo metastático (Park et al. 2009). Neste contexto podemos sugerir que a inibição de DUSP11 pode interferir na expressão do miR-21 e considerando o papel da DUSP11 como fosfatase de RNAs e/miRs pode-se levantar a possibilidade de que o aumento da expressão de DUSP11 causaria a inibição de

moléculas reguladoras do miR-21, causando o fenótipo mais sensível das células ao tratamento com a gemcitabina.

Considerando os resultados aqui obtidos, a inibição de DUSP11 atenuou a proliferação celular, reduziu a capacidade clonogênica e teve um impacto significativo na indução da morte celular por apoptose. Contudo, não teve efeito nos processos ligados à metástase celular. Em conclusão, o presente estudo aponta evidências inéditas quanto ao papel da DUSP11 na modulação dos principais processos ligados a resistência à gemcitabina em ADP. Ressalta-se porém, que os mecanismos moleculares pelos quais a DUSP11 media a modulação dessas vias ainda devem ser elucidados.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- *DUSP11* apresenta-se mais expresso nas linhagens celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 em relação ao tecido pancreático livre de tumor;
- As amostras de ADP hiperexpressam *DUSP11* conforme avanço do estadiamento tumoral;
- A inibição de *DUSP11* combinada ao tratamento com gemcitabina, reduz a capacidade proliferativa da linhagem MIA PaCa-2 associada à um aumento das taxas de apoptose e diminuição da capacidade clonogênica, *in vitro*;
- A ausência de *DUSP11* não teve impacto na redução das taxas de migração e invasão celular na linhagem MIA PaCa-2 tratada com gemcitabina, *in vitro*.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso A, Pulido R. The extended human PTPome: A growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J.* 2016;283(8):1404–29.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg II, Osterman A, et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell.* 2004;117:699–711.
- Bardeesy N, DePinho R. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002;2(12):897–909. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459728>
- Barugola G, Partelli S, Marcucci S, Sartori N, Capelli P, Bassi C, et al. Resectable pancreatic cancer: Who really benefits from resection? *Ann Surg Oncol.* 2009;16(12):3316–22.
- Bermudez O, Pages G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2010;299(2):C189-202. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/ajpcell/299/2/C189.full.pdf>
- Binenbaum Y, Na'Ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2015;23:55–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.002>
- Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, Wolfgang C, Jones S, Zhang X, et al. Genetic mutations associated with Cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2009;69(8):3681–8.
- Blower PE, Chung J-H, Verducci JS, Lin S, Park J-K, Dai Z, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008;7(1):1–9. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-07-0573>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ. M, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455–65.
- Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2014;39(2):91–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- Burke JM, Kincaid RP, Nottingham RM, Lambowitz AM, Sullivan CS. DUSP11 activity on triphosphorylated transcripts promotes Argonaute association with noncanonical viral microRNAs and regulates steady-state levels of cellular noncoding RNAs. *Genes Dev.* 2016;30(18):2076–92.
- Burke JM, Sullivan CS, Burke JM, Sullivan CS, An D, Burke JM, et al. DUSP11 – An RNA phosphatase that regulates host and viral non-coding RNAs in mammalian cells. *RNA Biol.* 2017;6286(January 2018):1457–1465.
- Caprara G, Zamponi R, Melixetian M, Helin K. Isolation and characterization of DUSP11, a novel p53 target gene. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8 B):2158–70.
- Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I,

- Chakravarthi BVSK, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2017;19(8):649–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Adenis A, Raoul J-L, et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *Nejm*. 2011;1817–25.
- Dagleish T, Williams JMG., Golden A-MJ, Perkins N, Barrett LF, Barnard PJ, et al. TNM Classification of Malignant Tumours. Vol. 136, International Union Against Cancer. 2007.
- Distler M, Rückert F, Hunger M, Kersting S, Pilarsky C, Saeger H-D, et al. Evaluation of survival in patients after pancreatic head resection for ductal adenocarcinoma. *BMC Surg* [Internet]. 2013;13:12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3639824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79–94.
- Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 2014;346(6213).
- Fitzgerald TL, Hickner ZJ, Schmitz M, Kort EJ. Changing incidence of pancreatic neoplasms: A 16-year review of statewide tumor registry. *Pancreas*. 2008;37(2):134–8.
- Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, Kanai N, Sunamura M, Abe T, et al. Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* [Internet]. 2005;18(8):1034–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832194>
- Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2011;19(6):728–39.
- Gysin S, Salt M, Young A, McCormick F. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer* [Internet]. 2011;2(3):359–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779505>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3128641>
- Hancock JF. Ras proteins: Different signals from different locations. Vol. 4, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003. p. 373–84.
- He XY, Yuan YZ. Advances in pancreatic cancer research: Moving towards early detection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11241–8.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2012:18–1249. 2006;20:1218–49.
- Hidalgo MD. Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;390–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128036785003222>
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in

- Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369(18):1691–703. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1304369>
- Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(34):4548–54.
- Howlander N, Ries LAG, Mariotto AB, Reichman ME, Ruhl J, Cronin KA. Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(20):1584–98.
- Hruban RH, Adsay V, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Steven N. Goodman, et al. Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(5):579–86.
- Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):168–82.
- Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(5).
- Johnson DS, Chen YH. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2012;12(4):458–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.02.003>
- Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126–39.
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin A V., et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2016;2(April):16022. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201622>
- Koorstra JBM, Hustinx SR, Offerhaus GJA, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol*. 2008;8(2):110–25.
- Krautz C, Rückert F, Saeger H-D, Pilarsky C, Grützmann R. An Update on Molecular Research of Pancreatic Adenocarcinoma. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11:411–7.
- Li Y, Li W, Yang Y, Lu Y, He C, Hu G, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res* [Internet]. 2009;1286:13–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.053>
- Liao WC, Chien KL, Lin YL, Wu MS, Lin JT, Wang HP, et al. Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and network meta-analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(11):1095–103. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70388-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70388-7)
- Liu F, Gore AJ, Wilson JL, Korc M. DUSP1 Is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS One*. 2014;9(1).
- Liu H, Ma Q, Xu Q, Lei J, Li X, Wang Z, et al. Therapeutic potential of perineural invasion, hypoxia and desmoplasia in pancreatic cancer. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012;18(17):2395–403. Available from: [/pmc/articles/PMC3414721/?report=abstract](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2395403/)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative

- PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
- MacGregor-Das AM, Iacobuzio-Donahue CA. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *J Surg Oncol*. 2013;107(1):8–14.
- Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*. 1998;58(19):4349–57.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*. 2013;10(10):957–63.
- Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, et al. MicroRNA-155 controls exosome synthesis and promotes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(January):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42339>
- Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol*. 1999;4:14–6.
- Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr D J, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *JAMA*. 2013;297(3):267–77.
- Ottendorf NA, Milne ANA, Morsink FHM, Drillingburg P, Ten Kate FJW, Maitra A, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: Of mice and men. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):375–81.
- Park JK, Lee EJ, Esau C, Schmittgen TD. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2009;38(7):190–9.
- Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, De Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005;7(5):189–97.
- Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol*. 2014;223(3):R49–62.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res*. 2014;74(11):2913–21.
- Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P. Pancreatic Cancer Development and Progression: Remodeling the Model. *Gastroenterology*. 2008;135(3):724–8.
- Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*. 2012;4(10):2291–311.
- Röder P V., Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016;48(December 2015):e219.

- Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(8):573–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3078>
- Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, et al. Phase 2 trial of single agent ipilimumab (Anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother*. 2010;33(8):828–33.
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;371(11):1039–49. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1404198>
- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–55.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein a, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* (80-) [Internet]. 1997;277(5324):333–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219684><http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.277.5324.333>
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004;4(12):937–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573115>
- Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics , 2015 . *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015;65(1):29. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf>
- Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2010;7(3):163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.236>
- Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, 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* [Internet]. 2009;101(6):908–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605256>
- Vasaikar S V., Straub P, Wang J, Zhang B. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D956–63.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* [Internet]. 2011;378(9791):607–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2009;9(8):537–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2694><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629069>
- Wang F, Herrington M, Larsson J, Permert J. The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003;2:4.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ. Signal Transduction by MAP Kinases: Regulation by Phosphorylation-

Dependent Switches. *Sci Signal* [Internet]. 1999;1999(1):pe1-pe1. Available from: <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.1999.1.pe1>

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114–7.

Yuan Y, Li DM, Sun H. PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA-ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*. 1998;273(32):20347–53.