

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**PAMELA VIANI DE ANDRADE**

**DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal  
pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose**

**Ribeirão Preto**

**2019**

**Pamela Viani de Andrade**

**DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose.**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira

**Ribeirão Preto**

**2019**

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

de Andrade, Pamela Viani

DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose. Ribeirão Preto, 2019.

109p. : il. ., 30cm

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira.

1. Adenocarcinoma ductal pancreático. 2. Fosfatases de dupla especificidade. 3. Reprogramação metabólica. 4. BCI.

### **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 nº2015/10694-5);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Pamela Viani de Andrade**

**DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose.**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais, Newton e Lêda, pelo amor incondicional, incentivo constante e os conselhos dados com muito amor e paciência.*

*Às minhas irmãs Paola e Poliane e ao meu sobrinho, Guilherme, pelo amor e incentivo durante toda a minha trajetória.*

*Ao meu namorado, Moisés, por ser meu melhor amigo, por acreditar em mim, pela confiança e apoio incondicional. Muito obrigada por todo o amor e carinho durante esta caminhada.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a **Deus**, pelas bênçãos e por sua presença constante, sempre me iluminando e amparando nos momentos de indecisão e desânimo.

À minha orientadora **Profa. Dra. Vanessa da Silva Silveira**, uma das grandes responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pelo apoio, atenção e por sempre me incentivar a fazer mais e acreditar no meu potencial.

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

À **Dra Rosane Gomes de Paula Queiroz**, à **Veridiana Kill Suazo** e **Beth Perna**, técnicas do Laboratório de Puericultura e Pediatria, que sempre contribuíram com boa vontade e compreensão para todas as minhas atividades no laboratório. Sempre dispostas a ensinar e ajudar com o que fosse necessário para a concretização dessa caminhada.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de doutorado.

Às minhas parceiras de bancada e amigas dentro e fora do laboratório **Mariana** e **Verena**, que me ajudaram a crescer profissionalmente, me deram conselhos e tornaram minha vida em Ribeirão Preto mais feliz. E aos meus amigos do Laboratório de Oncologia Experimental – USP (LabOEx), **Gabriela**, **Ilze** e **Bruno** pela amizade, amor, companheirismo, risadas, discussões, confiança e pelo cafezinho diário na copa, fazendo o ambiente de trabalho um local familiar.

Aos meus colegas do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Carolina, Gabriela, Graziella, Gustavo, Karina, Keteryne, Kleiton, Lara, Lenisa, Marcela, Mirella, Pablo, Régia, Ricardo** e **Taciani** pelo carinho, apoio e conhecimento compartilhado.

Às minhas amigas, **Maraiza** e **Mayara** que sempre estiveram presentes durante essa trajetória, me aconselhando, apoiando e que estão sempre comigo independente da distância.

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

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Martin Luther King

## RESUMO

De Andrade, PV. DUSP1 modula a capacidade proliferativa de células do adenocarcinoma ductal pancreático por meio da regulação do metabolismo da glicose. 2019, 109f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) representa uma das formas mais letais de câncer com uma sobrevida global de 5 anos de apenas 8%. 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 mutação do proto-oncogene *KRAS* é a mais frequente e é responsável por desencadear o processo de progressão tumoral por meio da ativação de importantes vias de sinalização, como as vias canônicas de transdução de sinais composta por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Diversos estudos já demonstraram que a proteína *KRAS*<sup>G12D</sup> está associada à regulação de vias metabólicas importantes, como a glicólise, que através da reprogramação metabólica resulta no estabelecimento e manutenção da biologia tumoral. Alguns estudos evidenciaram que no ADP a reprogramação metabólica induzida por *KRAS* mutada, parece ser mediada pela atividade de ERKs e JNKs, moléculas efetoras das vias MAPKs. Para controlar a atividade dessas complexas redes de interação, as vias MAPKs são reguladas por mecanismos de *feedback* negativo controlados por proteínas fosfatases, sendo uma das principais classes representada pelas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs), que são responsáveis por desativar MAP quinases como ERK e JNK, por exemplo e seu papel nas células de ADP permanece por ser elucidado. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos antineoplásicos de um inibidor de DUSP1 e DUSP6, o BCI, em duas linhagens de ADP (MIA PaCa-2 e PANC-1) e seu possível efeito na modulação do metabolismo energético no ADP. Foi realizado inicialmente um teste fenotípico utilizando a técnica de edição gênica por CRISPR/Cas9 para *knockout* de diversos genes da família DUSP, para medição da reprogramação do metabolismo energético por meio do ensaio de consumo de glicose. Após o *knockout*, as fosfatases que apresentaram diferença significativa em relação ao controle foram as DUSP1 e DUSP6 na linhagem MIA PaCa-2. A inibição de DUSP1 e DUSP6 em linhagens celulares de ADP por um inibidor, o BCI, reduziu a capacidade proliferativa das células, aumentou as taxas de morte por apoptose, diminuiu a capacidade das células de formarem colônias e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Associado a perda da viabilidade celular, foi observado um aumento na captação de glicose após tratamento com BCI na linhagem MIA PaCa-2 e uma diminuição na captação na linhagem PANC-1, porém não foi observado produção de lactato em ambas as linhagens. Adicionalmente, o tratamento induziu uma ativação de vias MAPKs como JNK e p38 em ambas as linhagens e uma ativação da via ERK na linhagem PANC-1 por um breve período de tempo. Além disso, quando combinado com o quimioterápico gemcitabina, BCI agiu de modo sinérgico diminuindo a viabilidade celular das linhagens e aumentando as taxas de morte por apoptose na linhagem MIA PaCa-2. Todos esses dados sugerem que o BCI é um potencial agente a terapia adjuvante no tratamento e pode realmente ser considerado um importante agente terapêutico antineoplásico para potencializar a sensibilidade à gemcitabina com consequente modulação no metabolismo energético do ADP.

**Palavras-chave:** adenocarcinoma ductal pancreático, fosfatases de dupla especificidade, metabolismo energético tumoral, DUSP1, DUSP6, BCI.

## ABSTRACT

De Andrade, PV. DUSP1 modulates the proliferative capacity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by regulating glucose metabolism. 2019, 109p. Doctoral Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (ADP) is one of the most lethal forms of cancer with a 5-year overall survival of only 8%. Gemcitabine is the chemotherapeutic agent most used in the treatment of ADP, however, even though it has a better therapeutic response compared to other drugs, ADP cells exhibit a resistance that hinders treatment efficiency. The KRAS proto-oncogene mutation is the most frequent and is responsible for triggering the process of tumor progression through the activation of important signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Several studies have demonstrated that the KRAS<sup>G12D</sup> protein is associated with the regulation of important metabolic pathways, such as glycolysis, which through metabolic reprogramming results in the establishment and maintenance of tumor biology. Some studies have shown that in ADP metabolic reprogramming induced by mutated KRAS appears to be mediated by the activity of ERKs and JNKs, effector molecules of MAPKs. To control the activity of these complex interaction networks, MAPK pathways are regulated by negative feedback mechanisms controlled by dual-specificity phosphatases (DUSPs), which are responsible for disabling MAP kinases such as ERK and JNK, for example. Thus, the present work aimed to analyze the antineoplastic effects of a DUSP1 and DUSP6 inhibitor, BCI, on two ADP cell lines (MIA PaCa-2 and PANC-1) and its possible effect on the modulation of energetic metabolism in ADP. A phenotypic screening was carried out using the CRISPR/Cas9 gene editing technique to knockout several DUSP family genes to measure the energy metabolism reprogramming through a glucose consumption test. After knockout, the phosphatases that presented significant difference in relation to the control were DUSP1 and DUSP6 in the MIA PaCa-2 cell line. Inhibition of DUSP1 and DUSP6 in ADP cell lines by an inhibitor, BCI, reduced the proliferative capacity of cells, increased rates of apoptosis death, decreased ability of cells to form colonies, and decreased production of reactive oxygen species (ROS). Associated with loss of cell viability, an increase in glucose uptake after treatment with BCI in the MIA PaCa-2 cell line and a decrease in uptake in the PANC-1 cell line was observed, but no lactate production was observed in both cell lines. Additionally, the treatment induced an activation of MAPK pathways such as JNK and p38 in both cell lines and an activation of the ERK pathway in the PANC-1 line for a short time. In addition, when combined with the chemotherapeutic gemcitabine, BCI acted synergistically by decreasing the cell viability of the cell lines and increasing the rates of apoptosis death in the MIA PaCa-2 cell line. All of these data suggest that BCI may be a potential drug for adjuvant treatment and may actually be considered an important antineoplastic therapeutic agent to enhance sensitivity to gemcitabine with consequent modulation in the energy metabolism of ADP.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, dual specificity phosphatase, tumor energy metabolism, DUSP1, DUSP6, BCI.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do inibidor de DUSP1 e DUSP6, BCI .....	28
<b>Figura 2. Mapa do vetor lentiviral LentiCas-Blast.</b> O vetor lentiviral apresenta o gene para expressão da proteína Cas9 e o gene de resistência à Blastomicina (BlastR) .....	33
<b>Figura 3.</b> G-CUSTOM-214951 - LP_18677 crRNA Cherry-pick Library 0.5 nmol – GE Dharmacon .....	36
<b>Figura 4.</b> Confirmação da expressão proteica da endonuclease Cas9 nas linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2 .....	45
<b>Figura 5.</b> Análise do consumo de glicose nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> , e PANC-1 <b>(B)</b> após knockouts da família DUSP .....	46
<b>Figura 6.</b> Expressão gênica relativa de <i>DUSP1</i> e <i>DUSP6</i> nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 comparadas às amostras de tecido pancreático livres de tumor .....	47
<b>Figura 7.</b> Viabilidade celular após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	49
<b>Figura 8.</b> Porcentagem de células anexina-V e PI positivas após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	51
<b>Figura 9.</b> Capacidade de formar colônias após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	52
<b>Figura 10.</b> Produção de ROS após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> . Valores apresentados representam os dados absolutos de intensidade de fluorescência .....	54
<b>Figura 11.</b> Expressão das proteínas efetoras de vias MAPK após tratamento com BCI em diferentes tempos nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	55
<b>Figura 12.</b> Análise do metabolismo energético através do consumo de glicose (2-NBDG) medido em intensidade de fluorescência nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> , e PANC-1 <b>(B)</b> após tratamento com BCI .....	57
<b>Figura 13.</b> Análise do metabolismo energético através da produção de lactato (L-lactato), nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> , e PANC-1 <b>(B)</b> após tratamento com BCI .....	57
<b>Figura 14.</b> Correlação entre <i>DUSP1</i> <b>(A)</b> e <i>DUSP6</i> <b>(B)</b> com genes da família <i>GLUT</i> ( <i>SLC2A1</i> , <i>SLC2A2</i> , <i>SLC2A3</i> e <i>SLC2A4</i> ) .....	58
<b>Figura 15.</b> Análise de sobrevida em amostras de pacientes com ADP utilizando a expressão gênica dos genes <i>SLC2A1</i> e <i>SLC2A3</i> normalizada pela expressão de <i>DUSP1</i> e <i>DUSP6</i> . Para o cut off de expressão foram utilizados os valores de quartis .....	59
<b>Figura 16.</b> Viabilidade celular após tratamento com gemcitabina nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	60
<b>Figura 17.</b> Viabilidade celular após tratamento com gemcitabina e BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 <b>(A)</b> e PANC-1 <b>(B)</b> .....	61

**Figura 18.** Combinação entre BCI e gemcitabina nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 **(A)** e PANC-1 **(B)**. A linha tracejada (---) define o valor de  $CI=1$ , indicando aditivismo. CIs superiores ou inferiores indicam antagonismo ou sinergismo, respectivamente. Os pontos numerados (x) representam os valores de CI obtidos experimentalmente ..... 62

**Figura 19.** Porcentagem de células anexina-V positivas após tratamento com gemcitabina e BCI em monoterapia ou combinados nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 **(A)** e PANC-1 **(B)**. Para a combinação as linhagens foram tratadas por um período de 48h com as doses de GEM (gemcitabina) para cada linhagem, após 48h foi adicionado no mesmo meio a dose de BCI para cada linhagem, completando assim um tratamento de 72h de GEM e 24h de BCI ..... 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de IC <sub>50</sub> para BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 .....	49
<b>Tabela 2.</b> Esquema de combinação das drogas avaliado no ensaio de viabilidade celular .....	61
<b>Tabela 3.</b> Esquema de combinação das drogas avaliado no ensaio de morte celular por apoptose .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
Cas9	do inglês <i>CRISPR associated protein 9</i>
CI	Índice de combinação
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
CRISPR	do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultivo celular)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DUSP	Fosfatase de dupla especificidade
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FDA	Food and Drug Administration
G6P	Glicose-6-fosfato
GEM	Gemcitabina
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
p38	Quinase ativada por stress
PI	Iodeto de propídio
PPP	Via não oxidativa da pentose fosfato
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MAPKKK	MAP quinase quinase quinase
MAPKK	MAP quinase quinase
miRNA	MicroRNA
MOI	do inglês <i>Multiplicity of infection</i>
NIP	Neoplasia intraepitelial pancreática
NMC	Neoplasia mucinosa cística
NMPI	Neoplasia mucinosa papilar intraductal
NPIT	Neoplasia papilar intraductal tubular
NRAS/KRAS/HRAS	Proteínas homólogas codificadas pelo oncogene RAS
PBS	Tampão fosfato salino
PTP	Proteína tirosina fosfatase

PTK	Proteína tirosina quinase
RIPA	Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SBF	Soro bovino fetal
STR	Short Tandem Repeats
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBST	Tampão Tris-salino acrescido de Tween 20
VBH	Via de biossíntese da hexosamina

## LISTA DE 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 <sup>2</sup>	Centrímetros quadrados
kDa	Kilodalton
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
ng/mL	Nanograma por mililitro
<i>p</i>	Probabilidade de significância

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático .....	20
1.2. Tratamento e avanços terapêuticos .....	22
1.3. Papel da via RAS na biologia do adenocarcinoma ductal pancreático .....	23
1.4. Reprogramação metabólica do adenocarcinoma ductal pancreático – Papel da via RAS 24	
1.5. Proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) .....	26
2. OBJETIVOS .....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1. Linhagens celulares .....	31
3.2. Preparação das drogas .....	32
3.2.1 (E/Z)-BCI hydrochloride - BCI .....	32
3.2.2 Gemcitabina .....	32
3.3 Extração de RNA total .....	32
3.4 Síntese do cDNA e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	32
3.5 CRISP/Cas9 .....	33
3.5.1 Expressão do gene Cas9 nas linhagens de ADP .....	33
3.5.2 Confirmação da expressão do gene Cas9 nas linhagens de ADP .....	35
3.5.3 <i>Knockout</i> gênico – CRISPR/Cas9.....	35
3.6 Ensaio da medição do metabolismo energético – captação da glicose.....	37
3.7 Ensaio funcionais.....	38
3.7.1 Ensaio de viabilidade celular .....	38
3.7.2 Ensaio de morte celular por apoptose .....	40
3.7.3 Ensaio de capacidade clonogênica.....	41
3.7.4 Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	42
3.7.5 Ensaio de captação de glicose .....	42
3.7.6 Ensaio de produção de lactato .....	43
3.8 Efeito do inibidor BCI na modulação da expressão das proteínas efetoras de MAPK, ERK, JNK e p38. ....	43
3.9 Análise RNA-seq <i>in silico</i> .....	44
3.10 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS .....	45
4.1. <i>Screening</i> fenotípico – Análise do metabolismo energético em ADP .....	45
4.2. Análise da expressão gênica de <i>DUSP1</i> e <i>DUSP6</i> nas linhagens .....	47

4.3. Impacto da modulação de DUSP1 e DUSP6 frente ao tratamento com o inibidor de DUSP, BCI .....	47
4.3.1 Efeito do inibidor BCI na viabilidade celular .....	48
4.3.2 Efeito do inibidor BCI na indução de morte celular por apoptose.....	49
4.3.3 Efeito do inibidor BCI na capacidade de formação de colônias.....	51
4.3.4 Efeito do inibidor BCI na produção de ROS.....	53
4.3.5 Efeito do inibidor BCI na expressão das proteínas efetoras de MAPKs: ERK, JNK e p38	54
4.3.6 Efeito do inibidor BCI no metabolismo energético – Captação de glicose e produção de lactato .....	55
4.3.7 Análise RNA-seq <i>in silico</i> .....	57
4.3.8 Efeito do quimioterápico gemcitabina na viabilidade celular .....	59
4.3.9 Efeito da combinação de gemcitabina e BCI na viabilidade celular.....	60
4.3.10 Efeito da combinação de gemcitabina e BCI na morte celular por apoptose...	63
5. DISCUSSÃO .....	65
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. ANEXO.....	86
8.1. Manuscrito publicado do presente estudo.....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O pâncreas é dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda e desempenha importante papel no sistema gastrointestinal, sendo caracterizado como uma glândula mista por desempenhar funções exócrinas e endócrinas (Bardeesy e Depinho, 2002; Rafacho *et al.*, 2014). A porção exócrina representa cerca de 80% da massa tecidual do órgão, produz e secreta enzimas digestivas em resposta ao estômago e duodeno através das células acinares aglomeradas ao redor dos ductos pancreáticos, regulando o metabolismo de nutrientes do organismo; a porção endócrina, através das ilhotas de Langerhans, produz e secreta hormônios como insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, que atuam no controle do metabolismo energético e regulam a forma de utilização da glicose (Bardeesy e Depinho, 2002; Rafacho *et al.*, 2014).

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

Os tumores pancreáticos podem acometer as diferentes porções da glândula, podendo ser endócrinos ou exócrinos. Os que afetam a porção exócrina são os tipos de tumores pancreáticos mais comuns. O tumor da porção exócrina mais frequente acomete principalmente as células ductais e é conhecido como adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), correspondendo a mais de 95% de todos os cânceres pancreáticos e é mais frequentemente localizado na cabeça do pâncreas (70-80%) (Modolell *et al.*, 1999; Krautz *et al.*, 2011).

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](http://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 por câncer até o ano de 2030 (Rahib *et al.*, 2014).

De todos os tumores sólidos, o ADP apresenta um dos piores prognósticos, com uma sobrevida global em 5 anos de apenas 8% (Siegel *et al.*, 2016). As razões para essa baixa sobrevida incluem a falta de sintomas iniciais que permitam o diagnóstico precoce, a elevada resistência do tumor ao tratamento com quimioterapia e radioterapia e a capacidade metastática das células tumorais durante o desenvolvimento da doença, resultando em uma doença já bastante avançada no momento do diagnóstico (Hidalgo, 2010; Stathis e Moore, 2010). Conseqüentemente, ao diagnóstico, cerca de 80% dos casos apresentam-se com

prognóstico altamente desfavorável devido à progressão tumoral já avançada e à invasão de órgãos adjacentes (Distler *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para o ADP podem ser classificados como demográficos ou ambientais. Dentre os fatores de risco demográficos, o ADP acomete mais comumente indivíduos de etnia negra, do sexo masculino e com idade a partir dos 60 anos, sendo que o número de casos aumenta com o avanço da idade: de 10/100.000 habitantes entre 40 e 50 anos para 116/100.000 habitantes entre 80 e 85 anos (Howlader *et al.*, 2010). Dentre os fatores de risco ambientais associados ao desenvolvimento do ADP estão o tabagismo, dieta, obesidade, alcoolismo, diabetes e pancreatite. Mutações genéticas de herança familiar também constituem um importante fator de risco para o surgimento do adenocarcinoma pancreático e cerca de 7-10% dos pacientes com ADP apresentam um histórico familiar da doença (Iodice *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2011).

O quadro clínico do ADP pode variar de acordo com a localização anatômica do tumor sendo que o ADP localizado na cabeça do pâncreas apresenta-se mais comumente com icterícia, dor abdominal, esteatorréia e perda de peso (Porta *et al.*, 2005).

Estima-se que o processo de desenvolvimento tumoral do ADP desde o evento mutacional inicial até o estágio final da doença, dure de 10 a 30 anos. Durante esse processo, destacam-se três períodos críticos na evolução genética da doença: o primeiro período (T1) está relacionado com a formação de lesões precursoras; o segundo (T2) compreende o período desde a lesão precursora até o desenvolvimento do subclone metastático e finalmente o último período (T3) representa o estágio de disseminação metastática até a morte do paciente (He e Yuan, 2014). Dentre as lesões que originam o ADP estão quatro lesões precursoras distintas: neoplasia mucinosa cística (NMC), neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI), neoplasia intraepitelial pancreática (NIP – estágios 1-3) e neoplasias papilares intraductais tubulares (NPITs). Tais lesões apresentam graus variados de displasia e o acúmulo gradual de alterações genéticas desencadeia a progressão de lesões em estágio inicial benigno para o desenvolvimento de neoplasias malignas. NIP são lesões ductais microscópicas e são as mais frequentes no ADP, observadas em 82% dos pacientes (Ottenhof *et al.*, 2009).

A primeira alteração crítica que desencadeia o processo de progressão tumoral é a mutação do gene *KRAS*, sendo detectada em aproximadamente 99% das lesões NIP-1 (Macgregor-Das e Iacobuzio-Donahue, 2013). Mutações envolvendo a perda de função do gene supressor tumoral *CDKN2A* são frequentes em lesões NIP-2 (90%) e a inativação das proteínas TP53, SMAD4 e BRCA2 também contribuem para a progressão do câncer pancreático e são encontradas em lesões NIP-3 (Real *et al.*, 2008). Além destas, alterações em outros genes supressores tumorais e genes de reparo, como o *BRCA2*, podem estar envolvidas com a progressão e disseminação tumoral (Yachida *et al.*, 2010).

## 1.2. Tratamento e avanços terapêuticos

Atualmente uma das únicas opções de cura para o ADP é a ressecção cirúrgica do tumor, embora apenas um pequeno número de pacientes (aproximadamente 30%) apresente tumores ressecáveis ao diagnóstico. Na maioria dos casos, os pacientes já se encontram em fase avançada e a presença de metástases tumorais inviabiliza a intervenção cirúrgica (Distler *et al.*, 2013).

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 e 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) (Burriss *et al.*, 1997). 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 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 vêm 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; Von Hoff *et al.*, 2013)

Em 2017, resultados de um ensaio europeu demonstraram uma superioridade na combinação de gemcitabina e capecitabina em relação à gemcitabina isoladamente em termos de sobrevivência mediana e com um nível aceitável de toxicidade (Neoptolemos *et al.*, 2017). No mesmo ano, um ensaio alemão não conseguiu encontrar uma melhora na sobrevida livre de evento utilizando a combinação de gemcitabina associada ao inibidor do receptor de

fator de crescimento epidérmico (EGFR), o erlotinibe, quando comparado com gemcitabina isoladamente (Sinn *et al.*, 2017).

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.

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 (Tempero *et al.*, 2017).

A maior dificuldade para se atingir resultados mais satisfatórios é provavelmente atribuída à complexidade biológica e genética do ADP (De Sousa Cavalcante e Monteiro, 2014). Desta forma, fica clara a urgência do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dos pacientes acometidos por este tumor. Assim, com a aplicação de metodologias genômicas, a utilização de drogas citotóxicas para o tratamento do câncer abre espaço para as terapias moleculares específicas, evidenciando a necessidade da investigação da biologia tumoral e a elucidação de vias de sinalização específicas do ADP.

A alteração da função de diversos genes, alguns associados a importantes vias de sinalização têm sido frequentemente descritos no adenocarcinoma pancreático. Dentre esses genes, a mutação do gene *Ras* é a mais frequente e a principal desencadeadora do desenvolvimento do ADP (Bardeesy e Depinho, 2002).

### 1.3. Papel da via RAS na biologia do adenocarcinoma ductal pancreático

Dentre todas as alterações genéticas já descritas associadas ao ADP, a ativação do proto-oncogene *KRAS* é a mais frequente e está presente em aproximadamente 95% dos casos (Jones *et al.*, 2008). A família RAS, compreende três importantes genes (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*), e representa um dos oncogenes mais investigados em todos os tipos de neoplasias, tendo em vista que o seu produto, a oncoproteína RAS, é um dos mais importantes transdutores de sinal extracelular. A mutação do proto-oncogene *KRAS* é a mais frequente das mutações, correspondendo a 85% das mutações de *RAS*. O *KRAS* é um componente da família de GTPases, responsável pela ativação de múltiplas vias de sinalização, mediando interações entre receptores de membrana e seus ligantes além de ser responsável na transmissão de informações da membrana celular para o núcleo (Johnson e Chen, 2012). A proteína oncogênica *KRAS* resulta predominantemente de uma das três mutações de ponto presentes nos resíduos da proteína: G12, G13 ou Q61 (Scheffzek *et al.*, 1997). A proteína *KRAS*<sup>G12D</sup> é resultante da substituição de uma glicina (G) na posição 12 por ácido aspártico (D). A mutação *KRAS*<sup>G12D</sup> leva à ativação constitutiva de *KRAS* (RAS constantemente ligado

à molécula de GTP) acarretando a estimulação persistente de múltiplas 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 e 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 e Davis, 1999). As MAPKs são agrupadas em três famílias: ERK (quinase regulada por sinal extracelular), JNK (quinase c-Jun N-terminal) e p38 (quinases ativadas por stress) e sua ativação ocorre pela fosforilação de seus resíduos de tirosina e treonina por MAP2K quinases. Quando ativadas modulam processos celulares essenciais para o desenvolvimento tumoral. Dentre eles, o aumento da proliferação celular, a inibição de apoptose, alteração do microambiente tumoral, evasão da resposta imune, migração celular, reprogramação metabólica, entre outros (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

A ativação de vias metabólicas em células com altas taxas de proliferação, como as células tumorais, é diretamente controlada por oncogenes e genes supressores tumorais que regulam inúmeras vias de sinalização (Vander Heiden *et al.*, 2009). Diversos estudos já demonstraram que a proteína KRAS tem sido associada à regulação de vias metabólicas importantes, promovendo a reprogramação metabólica através da estimulação do metabolismo da glicose, canalização diferencial de intermediários da glicose, metabolismo reprogramado da glutamina, aumento autofagia e macropinocitose para o estabelecimento e a manutenção da biologia tumoral (Bryant *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2015; Kimmelman, 2015). Com isso, destaca-se a importância da atuação de KRAS no processo de reprogramação metabólica tumoral.

#### **1.4. Reprogramação metabólica do adenocarcinoma ductal pancreático – Papel da via RAS**

Sabe-se que para a manutenção e a progressão do câncer são necessárias mutações específicas para que as células tumorais possam ser capazes de obter o suprimento energético e utilizá-lo de maneira eficiente. Portanto, coordenadamente, regulam importantes vias metabólicas para suportar a elevada proliferação celular em um ambiente com reduzida concentração de oxigênio (hipóxico) (Gatenby e Gillies, 2004). Para tanto, as células tumorais

se reprogramam metabolicamente e ao invés de utilizarem a fosforilação oxidativa, as células tumorais ativam a glicólise e a obtenção de lactato para produção de adenosina trifosfato (ATP), mecanismo conhecido como “Efeito Warburg” (Warburg, 1956).

Esse efeito é evidenciado pela interação de várias proteínas de sinalização envolvidas com a proliferação celular e que também regulam vias metabólicas que estão presentes em diferentes tipos tumorais. Uma delas é KRAS, responsável pelo desenvolvimento, manutenção e regulação do metabolismo do adenocarcinoma pancreático, sendo nos últimos anos demonstrado que das três famílias de MAPKs reguladas por KRAS, ERKs e JNKs são as grandes envolvidas nesse processo de reprogramação metabólica. (Bryant *et al.*, 2014) (Papa *et al.*, 2019).

O ADP apresenta características de baixa vascularização devido à uma densa camada estromal que circunda o tumor, gerando regiões em hipóxia e com deficiência de nutrientes, o que demanda uma complexa reprogramação metabólica para a manutenção do tumor. Em geral a regulação do metabolismo tumoral depende do estado de hipóxia, sendo uma das principais funções do fator indutor de hipóxia 1 alfa (*HIF1a*), que também é responsável por mediar a expressão de transportadores de glicose como o gene *GLUT1* (Chen *et al.*, 2001; Semenza, 2010). No ADP, porém, Ying e colaboradores (2012) demonstraram que a reprogramação metabólica causada por KRAS<sup>G12D</sup> não é dependente de *HIF1a* (Ying *et al.*, 2012).

A ativação constitutiva de KRAS promove a estimulação da glicólise através do aumento da expressão do gene transportador da glicose, o *GLUT1*, independentemente da expressão de *HIF1a*, resultando em elevada captação da glicose e produção de lactato. A mutação de KRAS também aumenta a expressão de outros genes que codificam importantes proteínas presentes na via glicolítica, como a hexoquinase 1 e 2 (Hk1 e Hk2), fosfofrutoquinase-1 (Pfk1) e a lactato desidrogenase A (LDHA), a enzima responsável por converter piruvato em lactato (Ying *et al.*, 2012).

Outras vias importantes e associadas à glicólise também são ativadas pela mutação de KRAS, como a via de biossíntese da hexosamina (VBH) e a via não oxidativa da pentose fosfato (PPP), esta última responsável por produzir a ribose 5-fosfato, necessária para a biossíntese de ácidos nucleicos, acarretando no aumento da proliferação (Ying *et al.*, 2012).

Ying e colaboradores (2012) também relataram o envolvimento de KRAS com a produção de intermediários críticos para a glicólise como a glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P) e frutose-1,6-bifosfato, mostrando que KRAS<sup>G12D</sup> pode regular múltiplos passos da via glicolítica (Ying *et al.*, 2012).

Segundo os mesmos pesquisadores, aparentemente, uma das grandes responsáveis pela reprogramação metabólica no ADP é a proteína ERK atuando na reprogramação metabólica mediada pelo fator de transcrição Myc (Ying *et al.*, 2012).

Luo e colaboradores (2018) também relataram em ADP que a elevada disponibilidade de glicose resultou em elevados níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), estimulando assim a proliferação tumoral através da inativação da via JNK (Luo *et al.*, 2018).

É possível observar que existem diversas evidências sólidas que dão suporte para a investigação da reprogramação metabólica mediada por RAS em tumores pancreáticos visto que a mutação em KRAS aumenta a captação de glicose e da expressão da proteína LDHA, responsável pela produção de lactato. Como acima citado, KRAS oncogênica, ativa outras vias da glicólise o que leva a um aumento da proliferação celular, sobrevivência tumoral e consequentemente à agressividade do tumor. Tais fatos sustentam, portanto, a viabilidade de uma nova abordagem de investigação focada nos mecanismos envolvidos na reprogramação metabólica mediada por KRAS.

### **1.5. Proteínas fosfatases de dupla especificidade (DUSPs)**

A complexa conexão entre a reprogramação metabólica e a proliferação celular através da mutação de KRAS continua sendo uma importante área a ser investigada. Uma das alternativas utilizadas por KRAS para mediar este processo parece envolver as vias de MAP quinases, tendo ERK e JNK como efetoras das vias e principais responsáveis pela reprogramação metabólica no ADP (Ying *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2018). As MAPKs estão entre as mais investigadas vias de sinalização oncogênica, por controlarem importantes processos para a manutenção tumoral como proliferação celular, apoptose, diferenciação, malignidade e resistência (Steelman *et al.*, 2004). Estes processos representam um grande desafio para os pesquisadores devido à intensa complexidade das redes de transdução de sinais que os controlam.

Diversas vias de transdução de sinais agem para controlar o nível de fosforilação das proteínas quinases e são fundamentais em quase todos os processos celulares como proliferação, diferenciação, ciclo celular, migração, sobrevivência e apoptose. Para modular a amplitude dos sinais das MAPKs (em resposta a estímulos celulares) é crucial a atividade de uma rede de loops de *feedback* negativo formada por proteínas tirosina quinases (PKTs) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs) (Hunter, 1995). Em nível molecular, a fosforilação de tirosina quinases é precisamente balanceada pela ação específica de PTKs e PTPs, que podem tanto ativar ou inibir proteínas *downstream* das vias de sinalização (Hunter, 1995). As PTPs constituem uma grande família de enzimas com 125 membros divididas em quatro grupos de acordo com a sequência de aminoácidos e da função proteica. Dentre elas, o principal grupo é a classe I de PTPs, cujos membros compartilham a cisteína como resíduo catalítico na reação de fosforilação, e que também é dividida em fosfatases tirosina específicas e fosfatases de dupla especificidade (DUSPs) (Alonso *et al.*, 2004)

As proteínas DUSPs são um grupo heterogêneo de proteínas fosfatases que desfosforilam ambos os resíduos de tirosina e serina/treonina e são responsáveis por modular importantes vias de sinalização que estão desreguladas em várias doenças. Estruturalmente, todas as DUSPs contêm um domínio conservado não catalítico N-terminal e uma extremidade catalítica COOH terminal. Algumas DUSPs contêm uma região N-terminal composta por clusters de aminoácidos conhecidos como domínio de ligação a MAP quinase (MKB), o qual interage com o domínio comum das MAP quinases para mediar a interação enzima – substrato. Podem ser agrupadas, de acordo com a presença do domínio MKB, em DUSPs típicas (contém o domínio), sendo as mais estudadas, ou DUSPs atípicas (não apresentam o domínio) (Alonso *et al.*, 2004).

DUSPs típicas podem ser divididas em três grupos de acordo com sua localização subcelular (nuclear, citoplasmáticas ou dupla localização), similaridade de sequências e funcionalidade. Sendo assim, destacam-se: DUSPs citoplasmáticas ERK específicas, DUSPs nucleares induzíveis e DUSPs específicas de JNK e p38, que são igualmente distribuídas entre citoplasma e núcleo (Krishna e Narang, 2008; Caunt e Keyse, 2013).

MKPs, as DUSPs típicas, incluem 10 DUSPs ativas, todas inativadoras diretas de MAPKs, sendo as nucleares induzíveis as DUSP1/MKP1, DUSP2/PAC1, DUSP4/MKP2 e DUSP5, sendo as citoplasmáticas ERK específicas as DUSP6/MKP3, DUSP7/MKPX e DUSP9/MKP4 e as específicas de JNK e p38 são as DUSP8, DUSP10/MKP5, DUSP16/MKP7. As DUSPs atípicas representam as outras DUSPs restantes, sendo algumas delas diretamente relacionadas à regulação de MAPKS, como as, DUSP3/VHR, DUSP13a, DUSP14/MKP6, DUSP18, DUSP19, DUSP22, DUSP23, DUSP26/MKP8 e DUSP27/DUPD1 (Caunt e Keyse, 2013).

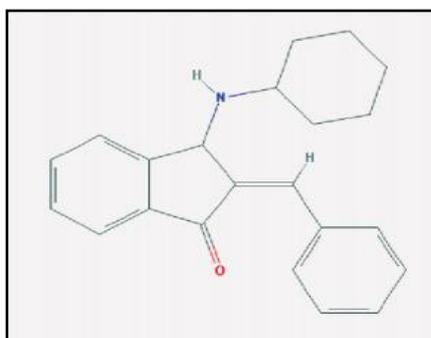
A transcrição de DUSPs pode ser ativada por diversos fatores, como *AP-1*, *Sp1*, *Sp3*, *CREB*, *USF*, *NF-κB* e receptores glicocorticoides (GR) (Wang *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que o gene supressor tumoral *TP53* regula todas as DUSPs nucleares (Ueda *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2006). Essa complexa rede de controle da expressão das DUSPs implica em diversas funções exercidas pelas DUSPs na regulação de eventos fisiológicos seguidos de vários estímulos (Arimura e Yagi, 2010).

Algumas evidências correlacionam a alteração da expressão de algumas DUSPs com o processo de indução e progressão de tumoral, sugerindo que essas fosfatases podem agir como importantes reguladores tumorais (Patterson *et al.*, 2009). No entanto, o papel exato dessas fosfatases parece ser tumor-específico, tendo em vista que a expressão de proteínas DUSPs varia significativamente dependendo do tipo de tumor e de seu estado de progressão (Patterson *et al.*, 2009).

Diversas DUSPs se encontram diferencialmente expressas em tumores pancreáticos.

Por exemplo, DUSP4 foi descrita altamente expressa em tumores pancreáticos com mutações no *KRAS* (Keyse, 2008) e experimentos realizados em camundongos nude mostraram que a hipoeexpressão de *DUSP1*, devido à hipermetilação do seu promotor, leva à redução da tumorigenicidade em tumores pancreáticos (Liao *et al.*, 2003). Outro trabalho demonstrou que a inibição de *DUSP1* leva a sensibilidade ao tratamento com gemcitabina em linhagens de tumor pancreático (Liu *et al.*, 2014). Por outro lado, a reintrodução de *DUSP6* em células de tumor pancreático através de infecção adenoviral resultou em baixa regulação da sinalização do ERK, diminuição na proliferação e aumento da morte por apoptose. A expressão de *DUSP6* é altamente regulada na progressão do tumor de pâncreas, enquanto aparece altamente expresso em lesões precursoras NIPs, sua expressão torna-se praticamente nula à medida que o tumor progride para um estado invasivo no ducto pancreático (Furukawa *et al.*, 2005).

Nos últimos anos um inibidor de DUSP1 e DUSP6 vem sendo investigado como tratamento em diversos tumores (Korotchenko *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Em 2009, Molina *et al.* descreveu pela primeira vez uma pequena molécula inibidora de Dusp6, o (E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one – o BCI (**Figura 1**), através de um screening químico em peixe-zebra transgênico. O tratamento com BCI bloqueou a atividade de Dusp6 e aumentou a expressão do gene alvo FGF (fator de crescimento de fibroblasto) em embriões de peixe-zebra (Molina *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Estrutura química do inibidor de DUSP1 e DUSP6, BCI (Shin *et al.*, 2018).

O mesmo trabalho também demonstrou que o BCI inibiu de maneira eficaz não só a DUSP6 como também a DUSP1. Foi sugerido que esse efeito inibitório nas duas MKPs se dá pelo fato delas apresentarem sobreposição na especificidade do substrato, enquanto DUSP6 é específica de ERK, DUSP1 desfosforila tanto ERK, como JNK e p38. Essa inibição se dá através de um controle alostérico. BCI se liga em uma fenda presente entre os sítios ativos das proteínas, impedindo uma alteração em suas estruturas (estimulação catalítica) necessária para que a proteína realize sua atividade de fosfatase (Molina *et al.*, 2009).

Diante desses dados fica evidente a importância da investigação de DUSPs como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento do câncer, já que estas proteínas controlam a ativação e desativação de importantes vias MAPKs, responsáveis pela diferenciação celular e sobrevivência celular, apoptose e proliferação, importantes na manutenção e progressão tumoral.

Portanto, diante do contexto aqui exposto questiona-se: de que maneira o mecanismo de controle da ativação das MAPKs, mediada pela ação das DUSPs, pode afetar o desenvolvimento de células tumorais do adenocarcinoma pancreático? Como a modulação destes mecanismos de *feedback* negativo pode impactar a reprogramação metabólica das células do adenocarcinoma pancreático?

Levando em conta essas considerações este trabalho visa testar a hipótese de que a atividade de fosfatases DUSPs interfere no mecanismo de reprogramação metabólica e afeta diretamente a sobrevivência de células de adenocarcinoma ductal pancreático.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

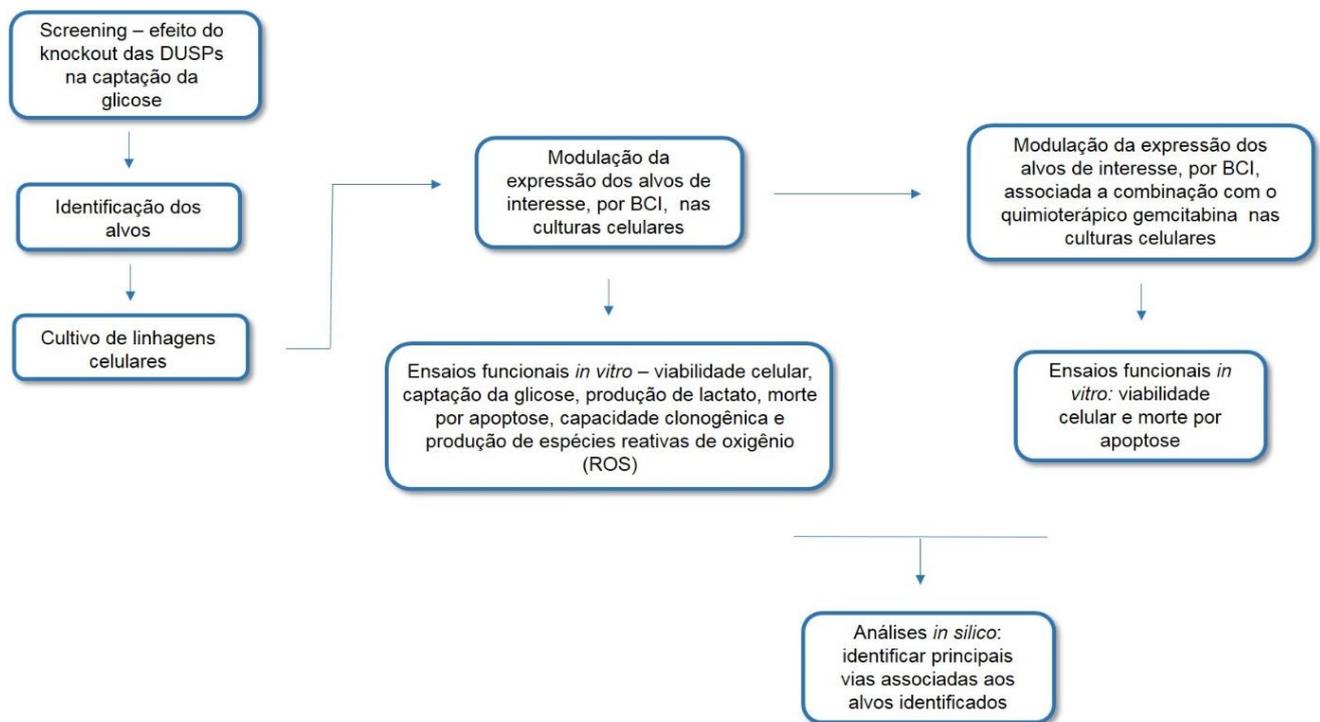
Investigar o papel da atividade regulatória das DUSPs no processo de reprogramação metabólica em células de adenocarcinoma ductal pancreático.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar alvos da família DUSP por meio de um screening *in vitro* nas linhagens de adenocarcinoma ductal pancreático a fim de avaliar o efeito da inibição de fosfatases relacionadas à regulação de MAPKs no controle do metabolismo energético;
- Avaliar os níveis de expressão gênica dos alvos identificados em linhagens celulares de ADP;
- Investigar o efeito da inibição dos alvos identificados em ensaios funcionais *in vitro* como viabilidade celular, morte por apoptose, capacidade clonôgenica, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), captação de glicose e produção de lactato;
- Avaliar o impacto da modulação dos alvos identificados na ativação das moléculas efetoras das vias de MAPKs, ERK, JNK e p38;
- Avaliar o impacto do tratamento utilizando o quimioterápico gemcitabina combinado com a inibição dos alvos identificados na viabilidade celular e morte por apoptose;
- Identificar quais as principais vias associadas aos alvos identificados em análises *in silico* utilizando-se dados públicos de RNA-Seq de amostras de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental – Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O delineamento experimental foi executado de acordo com o fluxograma descrito abaixo.



#### 3.1. Linhagens celulares

No presente estudo, foram utilizadas as linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. 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 (Sigma Aldrich, Oakville, Canadá) em pH 7.2 – 7.4, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. 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.

Na realização dos experimentos, a viabilidade e contagem celular foram determinadas utilizando o teste de exclusão de azul de Trypan em câmara de Neubauer.

### **3.2. Preparação das drogas**

#### **3.2.1 (E/Z)-BCI hydrochloride - BCI**

Uma solução estoque do inibidor de DUSP1 e DUSP6, BCI (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) foi preparada em uma concentração final de 5mM em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) e estocado em alíquotas a 4°C. A droga foi adicionada em meio de cultura e homogeneizada antes de ser aplicada à cultura de células. Neste estudo foi utilizada quantidade máxima de DMSO de 0,1% nos experimentos. Todos os controles foram normalizados adicionando-se a mesma quantidade de DMSO utilizada nas células tratadas.

#### **3.2.2 Gemcitabina**

Uma solução estoque do quimioterápico gemcitabina (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) foi preparada em uma concentração de 33,44mM em água estéril para injeção e estocada em alíquotas em temperatura ambiente. Para uso foi realizado uma nova diluição para uma concentração final de 5mM. A droga foi adicionada em meio de cultura e homogeneizada antes de ser aplicada à cultura de células.

### **3.3 Extração de RNA total**

As células foram coletadas e foi realizada a extração de RNA total a partir do reagente Trizol® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.) conforme instruções do fabricante. O RNA foi armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### **3.4 Síntese do cDNA e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)**

O RNA extraído das células foi submetido à reação de síntese do cDNA. Para tal, foi utilizado o kit *High Capacity*® (Life Technologies® Carlsbad, CA, USA), segundo as instruções do fabricante.

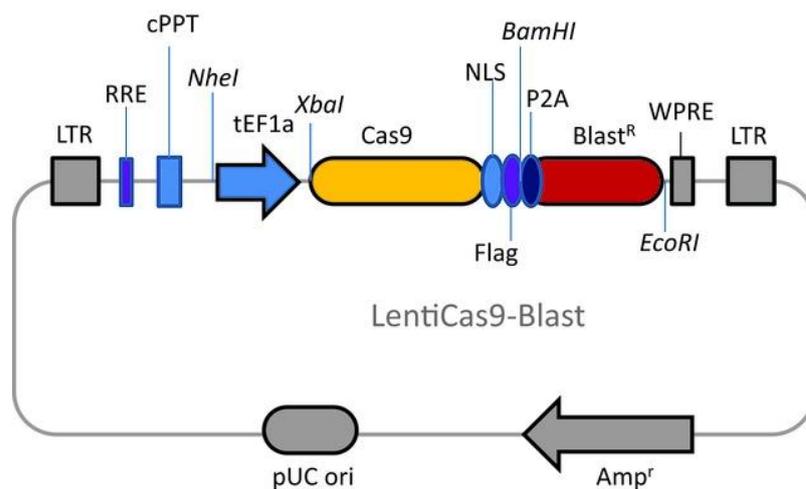
A análise da expressão genica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) em equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems), utilizando-se as sondas TaqMan® (Applied Biosystems) para os genes *DUSP1*

(Hs00610256\_g1) e *DUSP6* (Hs04329643\_s1). Como controles endógenos foram utilizadas sondas para os genes *ACTB* (Hs01060665\_g1) e *GAPDH* (Hs0278664\_g1). O volume final de cada reação foi de 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L de Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L de sonda TaqMan e 9  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10). O qRT-PCR foi realizado em duplicata e um desvio padrão (DP) <0,5 entre as duplicatas foi considerado adequado. A quantificação relativa da expressão gênica dos alvos foi determinada em relação à média de expressão gênica de amostras de tecido pancreático livres de tumor utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A coleta das amostras de tecido pancreático livre de tumor foi realizada pelo Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CAAE: 09823218.9.0000.5440).

### 3.5 CRISP/Cas9

#### 3.5.1 Expressão do gene Cas9 nas linhagens de ADP

Para o knockout gênico foi utilizada a metodologia de edição do genoma mediada por RNA “guia” (CAS9) - CRISPR/CAS9. No intuito de se obter a expressão constitutiva do gene Cas9, o mesmo foi permanentemente integrado ao genoma das duas linhagens (PANC-1 e MIA PaCa2), juntamente com um marcador de seleção (gene resistência à blasticidina), à partir de partículas lentivirais validadas (Sigma Aldrich® - LVCAS9BST - CAS9 Blasticidin Lenti Particles) (**Figura2**).



**Figura 2. Mapa do vetor lentiviral LentiCas-Blast.** O vetor lentiviral apresenta o gene para expressão da proteína Cas9 e o gene de resistência à Blasticidina (BlastR).

**a) Padronização do protocolo de transdução**

O primeiro passo realizado antes do início da transdução foi o ensaio de citotoxicidade para blasticidina nas linhagens (PANC-1 e MIA PaCa2), para determinar a mínima concentração letal (curva de mortalidade celular) do antibiótico para cada linhagem estudada.

Brevemente,  $3 \times 10^3$  células/poço foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços. Após 24h, as células foram tratadas com diferentes concentrações de blasticidina na faixa de 0 a 12,5µg/mL. Para cada tratamento, as células foram semeadas em quadruplicata e, em seguida, incubadas por 48, 96, 144 e 192 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As placas foram continuamente tratadas em intervalos de 2 dias durante 8 dias.

Para o teste de citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT que é um método colorimético para determinação *in vitro* do número de células metabolicamente ativas e, portanto, medindo a proliferação e a viabilidade celular. A clivagem do sal amarelo tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) pelas células metabolicamente ativas, em parte pela ação das enzimas desidrogenases, gera equivalentes redutores tais como NADH e NADPH. A clivagem do sal produz, no interior das células, um corante formazan de coloração roxa, sendo posteriormente solubilizado e quantificado no espectrofotômetro. O ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). A cada intervalo de tratamento foi adicionado 10µL de MTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior leitura da absorbância de 570 nm com onda de referência de 620 nm, utilizando-se o aparelho *iMark Microplate Absorbance Reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA).

Para ambas as linhagens, MIA PaCa-2 e PANC-1, a concentração adequada de blasticidina para seleção foi definida em 2,5µg/mL com no mínimo 96 horas de tratamento.

**b) Determinação do MOI (multiplicity of infection):**

Após determinada a concentração de blasticidina a ser utilizada para a seleção determinou-se a multiplicidade de infecção (MOI), que é o número de partículas virais transdutoras por célula (MOI = titulação viral (total de partículas transdutoras (TU)/mL) x volume de vírus/ número de células). Para as linhagens estudadas foram determinadas as melhores concentrações de acordo com o seguinte protocolo: as células de ADP foram semeadas ( $3 \times 10^3$  células) em placas de cultivo de 96 poços com volume final de 100µL/ poço. Após 24h, as partículas lentivirais foram adicionadas em concentrações de 2,5 e 5,0 MOI. Para cada MOI a concentração final de partículas virais foi de  $10^6$  partículas/mL. Após 48h de transdução foi realizada a seleção por meio do tratamento continuado com o antibiótico

blastocidina (concentração previamente determinada de 2,5µg/mL) até a seleção estável das linhagens expressando Cas9.

### 3.5.2 Confirmação da expressão do gene Cas9 nas linhagens de ADP

#### a) Extração de proteínas

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

#### b) Western Blotting

Concentrações iguais (60µg) de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). Após o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose, seguiu-se o processo de imunodeteção. As membranas foram bloqueadas em solução *non-fat Milk* 5% em TBST (0,1%) por uma hora. Em seguida ocorreu a incubação overnight com o anticorpo primário (Cell Signalling, EUA - Cas9 (7A9-3A3) Mouse mAb) para a proteína de estudo e para a proteína endógeno anti-GAPDH, (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por uma hora. Posteriormente as membranas foram lavadas com TBST 1X (5 lavagens de 5 minutos cada). Finalmente, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário adequado (anti- mouse 1:5000 em TBST 1X), conjugado a uma enzima horseradish peroxidase. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com TBST 1X (5 lavagens de 5 minutos cada) e reveladas com o kit Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram obtidas no aparelho ChemiDOC XRS (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

### 3.5.3 *Knockout* gênico – CRISPR/Cas9

Posteriormente à transdução e seleção através do tratamento com blastocidina, as células foram silenciadas para os genes-alvos (DUSPs).

Para o *knockout* gênico foi utilizada a metodologia de edição do genoma mediada por RNA “guia” (CAS9) - CRISPR/CAS9. Para tanto, foi adquirida da empresa *Dharmacon* (G-CUSTOM-214951 - LP\_18677 crRNA Cherry-pick Library 0.5 nmol - (GE Healthcare, Colorado, USA) uma biblioteca, em formato de placas de 96 poços, contendo três partículas

de crRNAs para cada um dos genes da família de DUSPs. A **Figura 3** ilustra o desenho da biblioteca. As moléculas de crRNAs foram ressuspensas em tampão Tris (10mM, pH7,4) em uma concentração final de 10 $\mu$ M e aliqotadas para armazenagem.

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

**Figura 3.** G-CUSTOM-214951 - LP\_18677 crRNA Cherry-pick Library 0.5 nmol – GE Dharmacon.

Para realização do *knockout* gênico também é necessário a presença de um transativador (tracrRNA), que forma um complexo com o crRNA e é direcionado ao local específico de quebra. A endonuclease Cas9 realiza induz o dano no DNA (quebra), que ao ser mal reparado, gera o *knockout* do gene de interesse. O tracrRNA foi adquirido da empresa *Dharmacon* e ressuspense em tampão Tris (10mM, pH7,4) em concentração final de 10 $\mu$ M. Brevemente, 3x10<sup>3</sup> células da linhagem MIA PaCa-2 constitutivamente expressando a endonuclease Cas9 foram semeadas em placas de 96 poços em triplicata. Após 24h, o meio de cultura foi retirado e as células foram então transfectadas com o complexo crRNA:tracrRNA em uma concentração final de 25nM, em meio de cultura sem soro e sem antibiótico. O agente de transfecção utilizado foi o DharmaFECT (GE Healthcare Dharmacon, Colorado, USA), em um tubo contendo 200  $\mu$ L. Para uso, o agente é diluído em uma concentração 1:50. Portanto, para cada poço da placa de 96 poços foram utilizados os reagentes conforme descrito no quadro abaixo.

Tubo 1: crRNA:tracRNA ( $\mu\text{L}$ /poço)			Tubo 2: Reagente de transfecção diluído ( $\mu\text{L}$ /poço)			
10 $\mu\text{M}$ tracRNA ( $\mu\text{L}$ )	10 $\mu\text{M}$ crRNA ( $\mu\text{L}$ )	Meio de cultura sem soro e sem antibiótico ( $\mu\text{L}$ )	DharmaFE CT ( $\mu\text{L}$ )	Meio de cultura sem soro ( $\mu\text{L}$ )	Meio de cultura com soro e sem antibiótico ( $\mu\text{L}$ /poço)	Volume final da transfecção ( $\mu\text{L}$ /poço)
0,25	0,25	9,5	0,2	9,8	80	100

Após 72h da transfecção, as linhagens celulares foram submetidas à análise fenotípica. Para o *screening* fenotípico direcionado para a reprogramação do metabolismo energético, foi realizado o ensaio de captação de glicose.

### 3.6 Ensaio da medição do metabolismo energético – captação da glicose

Para a análise da captação de glicose realizada na etapa de *screening* fenotípico foi utilizado o ensaio quantitativo bioluminescente *Glucose Uptake-Glo™ Assay* (#J1342, Promega Corporation, Madison, WI, USA), segundo instruções do fabricante. A captação de glicose foi medida utilizando-se um análogo de glicose, o 2-deoxyglucose (2-DG), que quando absorvido pelas células é fosforilado por uma hexoquinase e transformado em 2-DG6P; este composto não é metabolizado e se acumula nas células. A oxidação de 2-DG6P resulta na geração de NADPH, por sua vez NADPH é utilizada pela glutatona redutase em uma reação enzimática que produz glutatona. A glutatona reage com DTNB para formar TNB. Posteriormente um Tampão de Parada é adicionado para lisar as células, interromper a captação e destruir NADPH presente nas células. Por fim, um Reagente de Detecção é adicionado, ocorrendo a transformação de proluciferina em luciferina produzindo um sinal luminescente, sendo a intensidade do produto proporcional à concentração original do análogo.

Após as 72h de transfecção, o meio contendo o complexo crRNA:tracRNA foi retirado e as células foram lavadas com PBS1X. Foram então adicionados 25 $\mu\text{l}$ /poço do análogo 2DG, em uma concentração de 1mM e incubado por 10 min. Posteriormente foram adicionados 12,5 $\mu\text{l}$  /poço do Tampão de Parada e 12,5/poço do Tampão de Neutralização e por último 50 $\mu\text{l}$ /poço do Reagente de Detecção. Após 5h, foi feita a leitura em um luminômetro VICTOR™ X Multilabel Plate Reader– (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA).

As leituras de luminescência foram dadas em Unidades Relativas de Luz (RLU), sendo posteriormente analisadas em uma curva padrão para se identificar a concentração de 2DG6P

(captação do análogo de glicose) para cada condição de *knockout* gênico (referente a cada um dos genes inibidos)

### 3.7 Ensaios funcionais

#### 3.7.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de MTT é um método de determinação colorimético do número de células metabolicamente ativas *in vitro*, medindo a proliferação e viabilidade celular. A clivagem do sal amarelo tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) - (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) pelas células metabolicamente ativas, em parte pela ação das enzimas desidrogenases, gera equivalentes redutores tais como NADH e NADPH. A clivagem do sal produz, no interior das células, um corante formazan de coloração roxa, sendo posteriormente solubilizado e quantificado no espectrofotômetro.

##### a) Ensaio de viabilidade celular para o tratamento com BCI

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2,5 \times 10^3$  céls/poço em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com BCI utilizando-se os tempos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h nas doses de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 e  $50 \mu\text{M}$  nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. A cada intervalo de tratamento foi adicionado  $10 \mu\text{L}$  de MTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas e em atmosfera úmida contendo 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior leitura da absorbância de 570 nm com onda de referência de 620 nm, utilizando-se o aparelho *iMark Microplate Absorbance Reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA).

Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. A partir destes dados, foram obtidos os valores de  $\text{IC}_{50}$  do inibidor, definidos como a concentração necessária para uma redução de 50% na viabilidade celular, calculada para cada linhagem, usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA), sendo  $1,9 \mu\text{M}$  para a MIA PaCa-2 e  $4,7 \mu\text{M}$  para a PANC-1.

##### b) Ensaio de viabilidade celular para o tratamento com gemcitabina

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2,5 \times 10^3$  céls/poço em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com gemcitabina durante os tempos de 24h, 48h, 72h e 96h nas doses de 0,5, 1, 5, 50 e  $100 \mu\text{M}$  nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. A cada intervalo de tratamento foi adicionado  $10 \mu\text{L}$  de MTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas e em atmosfera úmida

contendo 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior leitura da absorbância de 570 nm com onda de referência de 620 nm, utilizando-se o aparelho *iMark Microplate Absorbance Reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA).

Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. A partir destes dados, foram obtidos os valores de IC<sub>30</sub> e IC<sub>50</sub> da gemcitabina, definidos como a concentração necessária para uma redução de 30% e 50% respectivamente na viabilidade celular, calculada para cada linhagem, utilizando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA).

### **c) Ensaio de viabilidade celular para combinação do tratamento de gemcitabina com BCI**

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de 2,5x10<sup>3</sup>céls/poço em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas simultaneamente com ambas as drogas e incubadas utilizando-se os tempos de 24h, 48h, 72h e 96h nas doses de 0,5, 1, 5, 10 e 50 µM para gemcitabina e 1, 2,5, 5, 10 e 25 µM para BCI nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. A cada intervalo de tratamento foi adicionado 10µL de MTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas e em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior leitura da absorbância de 570 nm com onda de referência de 620 nm, utilizando-se o aparelho *iMark Microplate Absorbance reader* (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Os efeitos da interação entre BCI e gemcitabina foram analisados utilizando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Este programa permite calcular o efeito dessas combinações que pode ser expresso como índice de combinação (CI). O CI é um método usado para quantificar o sinergismo causado pelos efeitos citotóxicos de diferentes drogas. Este método é baseado na lei de da ação das massas e no princípio do efeito-médio derivado de modelos de cinética enzimática desenvolvido por Chou e Talalay sendo amplamente utilizado para a análise de interações de drogas, principalmente as antineoplásicas (Chou e Talalay, 1984). Com o uso do CI, sinergismo é definido como um efeito aditivo mais que o esperado, enquanto que antagonismo é definido com um efeito aditivo menos que o esperado. Sendo assim, o CI que indica a existência de uma interação entre as drogas aditiva se for igual a 1 (CI=1), antagonista se for maior do que 1 (CI>1), ou sinérgica se for menor que 1 (CI<1).

### 3.7.2 Ensaio de morte celular por apoptose

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

#### a) Ensaio de morte celular por apoptose para o tratamento com BCI

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2 \times 10^5$  céls/poço em placas de 6 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com BCI utilizando-se o tempo de 48h tratadas com o  $IC_{50}$  do inibidor BCI, sendo  $1,9 \mu\text{M}$  para a MIA PaCa-2 e  $4,7 \mu\text{M}$  para a PANC-1.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5min, lavadas com PBS 1X gelado por 3 vezes e ressuspendidas em  $300 \mu\text{L}$  em tampão de ligação 1X para Anexina V (BD Biosciences Pharmigen, USA). As células foram então marcadas com  $5 \mu\text{L}$  de Anexina V APC e  $50 \mu\text{L}$  De uma solução de iodeto de propídeo (PI) a  $50 \mu\text{M}$ . As células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando o aparelho BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### b) Ensaio de morte celular por apoptose para combinação do tratamento de gemcitabina com BCI

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $1,5 \times 10^5$  céls/poço em placas de 6 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas primeiramente com gemcitabina utilizando-se o tempo de 72h nas doses do  $IC_{50}$  para a MIA PaCa-2 (concentração de  $3 \mu\text{M}$ ) e o  $IC_{50}$  para a PANC-1 (concentração de  $53 \mu\text{M}$ ). Após 48h de tratamento com a gemcitabina foi adicionado no mesmo meio o tratamento com BCI na dose equivalente ao  $IC_{50}$  para MIA PaCa-2 ( $4 \mu\text{M}$ ) e  $IC_{50}$  para PANC-1 ( $3 \mu\text{M}$ ) por mais 24h, completando assim um tratamento de 72h de gemcitabina e 24h de BCI.

Após as 72hs, as células foram tripsinizadas e avaliadas quanto a indução de apoptose seguindo o protocolo descrito anteriormente. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.7.3 Ensaio de capacidade clonogênica

O efeito do BCI sobre a capacidade de formação de colônias foi avaliado de acordo com o protocolo de (Franken *et al.*, 2006). As células foram semeadas em densidades de 250 céls/poço para a linhagem MIA PaCa-2 e 500 céls/poço para a linhagem PANC-1 em placas de 6 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com BCI nas concentrações de 0,25, 5 e 1  $\mu$ M no tempo de 48h em ambas as linhagens de ADP, a MIA PaCa-2 e PANC-1.

As placas foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 9 dias para a linhagem MIA PaCa-2 e 12 dias para a linhagem PANC-1, até que as colônias adquirissem uma média de 50 células por colônia. Para a visualização e contagem das colônias, o meio foi retirado, cada poço foi lavado com 0,5mL de PBS, fixados com 1mL de metanol e corados com Giemsa. A contagem das colônias (com pelo menos 50 células) foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (40x) e a eficiência de plaqueamento (EP) foi calculada com a fórmula:

$$EP = \frac{\text{Nº de colônias formadas}}{\text{Nº de células plaqueadas}} \times 100$$

Considerando a EP foi calculada a fração de sobrevivência (FS) com a fórmula:

$$FS = \frac{\text{Nº de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Nº de células plaqueadas} \times EP}$$

A EP é própria de cada linhagem para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que têm a capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células plaqueadas que após o tratamento ainda apresentam a capacidade de formar colônia. A partir dos dados de FS foram realizadas as análises estatísticas. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.7.4 Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a análise de produção de ROS após tratamento com BCI *in vitro*, foi utilizado o ensaio quantitativo fluorescente CellROX® Deep Red Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.). Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2 \times 10^5$  céls/poço em placas de 6 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas com BCI por 12, 24 ou 48h com doses equivalentes ao IC<sub>50</sub> para cada linhagem (1,9  $\mu$ M para a MIA PaCa-2 e 4,7  $\mu$ M para a PANC-1).

Após o tratamento, as células foram marcadas por 30 min com 5  $\mu$ M de CellROX® Deep Red Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.) adicionados diretamente em cada poço da placa. Após esse período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5min, lavadas com PBS 1X gelado 3 vezes e ressuspensas em 300 $\mu$ l de PBS 1X gelado. As células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando-se o aparelho BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.7.5 Ensaio de captação de glicose

Para a análise da captação de glicose foi utilizado o reagente fluorimétrico análogo de glicose, 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (**2-NBDG**) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.).

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2 \times 10^5$  céls/poço em placas de 6 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com BCI por 48h com doses equivalentes ao IC<sub>50</sub> de cada linhagem (1,9  $\mu$ M para a MIA PaCa-2 e 4,7  $\mu$ M para a PANC-1).

Após esse período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5min, lavadas com PBS 1X uma vez. Após a lavagem as células foram marcadas por 30 min com 50  $\mu$ M de 2NBDG (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc.) adicionados diretamente nas células. Por fim, elas foram lavadas mais 2 vezes com PBS 1X gelado e ressuspensas em 300 $\mu$ l de PBS 1X gelado contendo 2% de soro bovino fetal. As células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando-se o aparelho BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.7.6 Ensaio de produção de lactato

Para a análise da captação de glicose foi utilizado o ensaio quantitativo bioluminescente *Lactate Glo™ Assay* (#J5021, Promega Corporation, Madison, WI, USA), segundo instruções do fabricante. A produção de lactato é medida através da oxidação do lactato e produção de NADH. A enzima lactato desidrogenase usa lactato e NAD<sup>+</sup> para produzir piruvato e NADH. Na presença de NADH a pro-luciferina Redutase Substrato é convertida pela enzima redutase em luciferina, produzindo assim um sinal luminescente. A intensidade do produto acumulado é, portanto, proporcional à concentração de lactato no meio.

Para este ensaio, as células foram semeadas em densidades de  $2,5 \times 10^3$  céls/poço em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas com BCI por 48h em doses equivalentes ao IC<sub>50</sub> de cada linhagem (1,9  $\mu$ M para a MIA PaCa-2 e 4,7  $\mu$ M para a PANC-1). Após as 48h, 25  $\mu$ L do meio de cada poço foi retirado e adicionado em outra placa de 96 poços. Para cada poço foi adicionado mais 25 $\mu$ L do Reagente de Detecção, contendo uma mistura de Lactato Desidrogenase, NAD<sup>+</sup>, Redutase e Redutase Substrato. Após 1h, foi feita a leitura em um luminômetro (Centro LB 960 Microplate Luminometer - Berthold).

As leituras de luminescência foram dadas em Unidades Relativas de Luz (RLU), sendo posteriormente analisadas em uma curva padrão para se identificar a concentração de produção de L-lactato para cada tratamento. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

## 3.8 Efeito do inibidor BCI na modulação da expressão das proteínas efetoras de MAPK, ERK, JNK e p38.

### a) Western Blotting

Nessa etapa, a análise de expressão proteica foi conduzida para avaliar o impacto da ação do BCI na atividade (fosforilação) das proteínas efetoras de MAPK, ERK, JNK e p38 nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. Para esse ensaio doses equivalentes ao IC<sub>50</sub> do BCI de cada linhagem (MIA PaCa-2 na concentração de 1,9  $\mu$ M e para PANC-1 na concentração de 4,7  $\mu$ M) foram utilizadas para o tratamento das células nos tempos 5min, 15min, 30min e 1h.

O protocolo de análise de expressão proteica foi realizado de acordo com o método já descrito anteriormente no tópico 3.3.2. Os anticorpos primários específicos foram diluídos de acordo com as recomendações do fabricante sob agitação a 4°C (Cell Signalling, EUA – Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #9101; p44/42 MAPK (Erk1/2) #9102;

Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) #9251; SAPK/JNK #9252; Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211; p38 MAPK #9212) para as proteínas de estudo e para a proteína endógena utilizou-se o anticorpo anti-Vinculina (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Foram utilizados anticorpos secundários específicos (anti-rabbit 1:10000 e anti-mouse 1:5000) acrescidos do reagente Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate (1:20000) (BIO-RAD Laboratories, Inc.) sob agitação. Após o tempo de incubação, as membranas foram novamente lavadas com TBST 1X (5 lavagens de 5 minutos cada) 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.).

### 3.9 Análise RNA-seq *in silico*

Foi realizada uma análise *in silico* afim de avaliar a relação da expressão de *DUSP1* e *DUSP6* com os genes da família *GLUT* que codificam as proteínas transportadoras de glicose da família SLC2A, para isso foi realizada uma análise de correlação na Plataforma LinkedOmics (Vasaikar *et al.*, 2018) (<http://www.linkedomics.org/login.php>).

A expressão gênica de *DUSP1*, *DUSP6* e *GLUTs* na análise de sobrevida em amostras provenientes de pacientes com ADP foi realizada com o auxílio da plataforma GEPIA (<https://gepia.cancer-pku.cn>). 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 *DUSP1* e *DUSP6* e sua associação com os genes da família *GLUT* foi analisada em uma coorte de 178 amostras.

### 3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio de *softwares* Graph 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 foram realizados: teste T de Student, testes One-way e/ou Two-way ANOVA, com pós-teste não paramétrico de Bonferroni, quando apropriado. Para a significância estatística foi adotado um valor de alfa de 0,05.

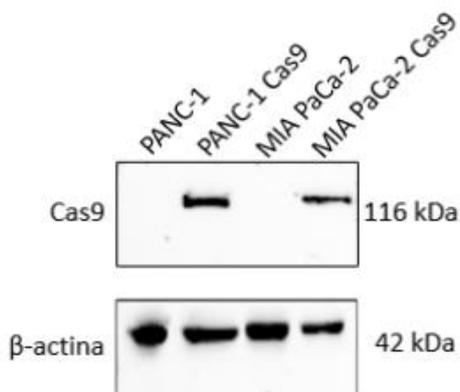
## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Screening* fenotípico – Análise do metabolismo energético em ADP

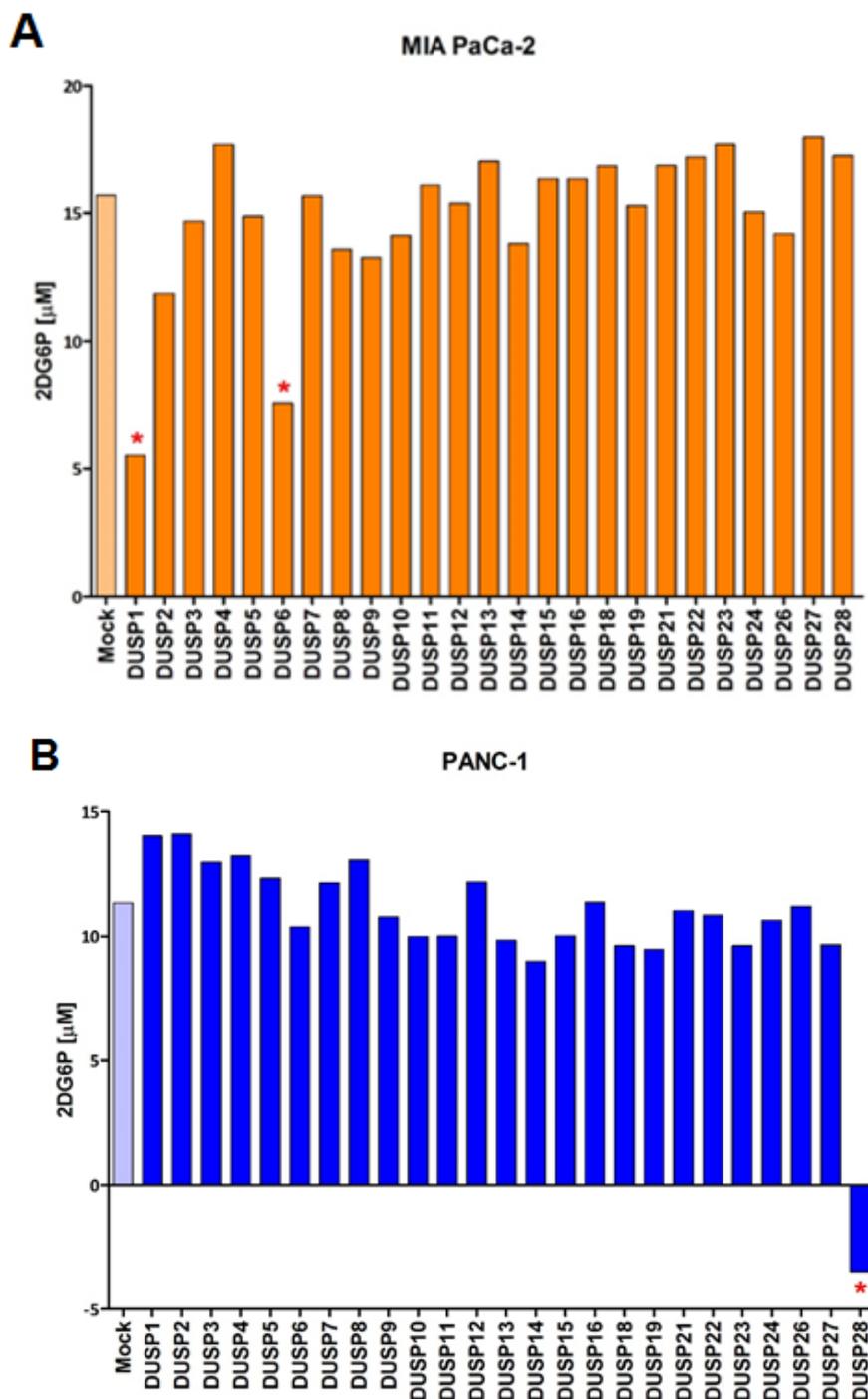
Para investigar se as fosfatases da família DUSP participam do processo do metabolismo energético do ADP, foi realizado inicialmente um teste fenotípico utilizando a técnica de edição gênica por CRISPR/Cas9, para medição da reprogramação do metabolismo energético por meio do ensaio de consumo de glicose, nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1.

A endonuclease Cas9 foi permanentemente inserida nas linhagens a fim de garantir a efetividade da técnica de CRISPR/Cas9. Após confirmação da expressão da proteína Cas9 (**Figura 4**), as linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 foram transfectadas com o complexo crRNA:tracRNA para cada um dos genes da família DUSP como anteriormente descrito.

No ensaio de captação de glicose observa-se que dentre os diversos genes da família DUSP que obtiveram diferença na captação da glicose após o *knockout*, as fosfatases que apresentaram diferença significativa em relação ao controle foram as DUSP1/MKP-1 e DUSP6/MKP-3 na linhagem MIA PaCa-2 (**Figura 5A**). Ao avaliar a linhagem PANC-1 não foi observada diferença significativa em relação ao controle na captação da glicose após o *knockout* das DUSPs (**Figura 5B**).



**Figura 4.** Confirmação da expressão proteica da endonuclease Cas9 nas linhagens celulares PANC-1 e MIA PaCa-2.

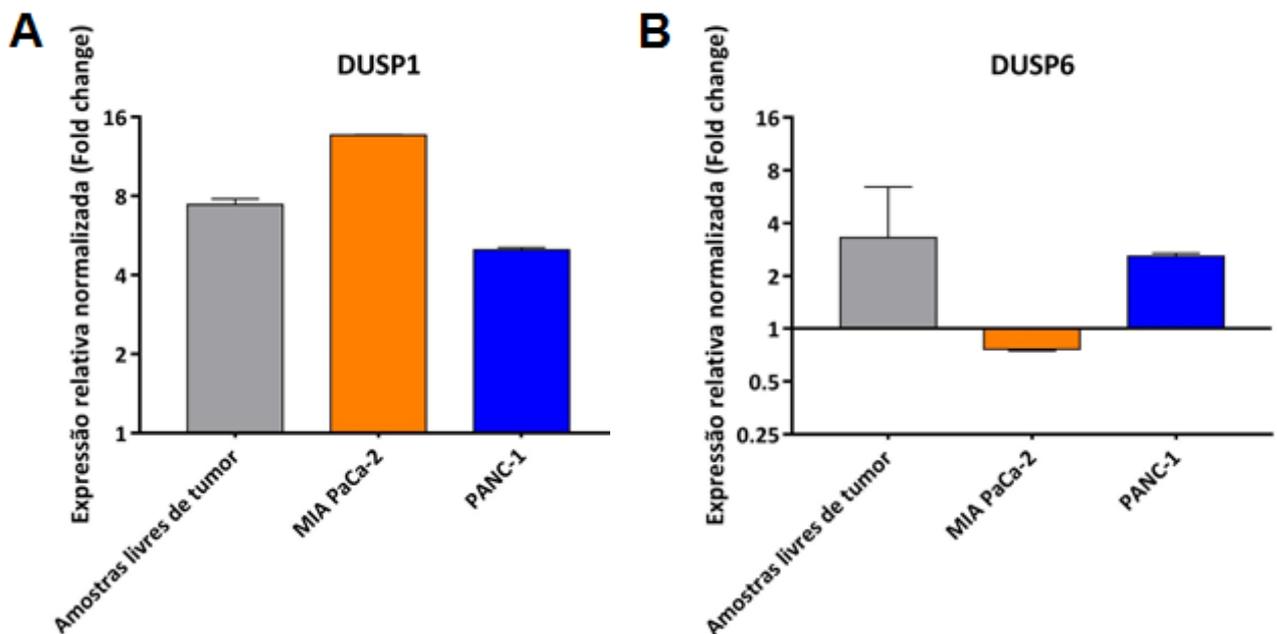


**Figura 5.** Análise do consumo de glicose nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 (A), e PANC-1 (B) após knockouts da família DUSP.

Diante dos resultados do ensaio fenotípico de consumo de glicose após knockout das DUSPs nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1, os alvos a serem estudados em ambas as linhagens serão as DUSP1 e DUSP6, apesar de não terem apresentado diferença na linhagem PANC-1.

#### 4.2. Análise da expressão gênica de *DUSP1* e *DUSP6* nas linhagens

Após *DUSP1* e *DUSP6* serem escolhidas como os alvos de estudo, foi analisada a expressão gênica de ambas nas linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 comparadas às amostras livres de tumor. A expressão de *DUSP1* se encontra elevada em ambas as linhagens, observando uma maior expressão na linhagem MIA PaCa-2 (**Figura 6A**). A expressão de *DUSP6* se encontra extremamente baixa na linhagem MIA PaCa-2, a expressão na linhagem PANC-1 segue o mesmo padrão quando comparada com as amostras livres de tumor (**Figura 6B**).



**Figura 6.** Expressão gênica relativa de *DUSP1* e *DUSP6* nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 comparadas às amostras de tecido pancreático livres de tumor.

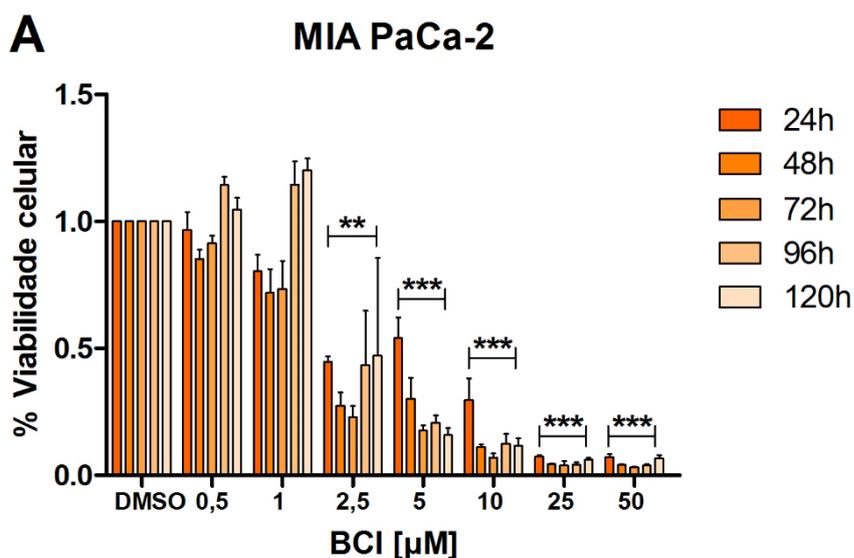
#### 4.3. Impacto da modulação de *DUSP1* e *DUSP6* frente ao tratamento com o inibidor de DUSP, BCI

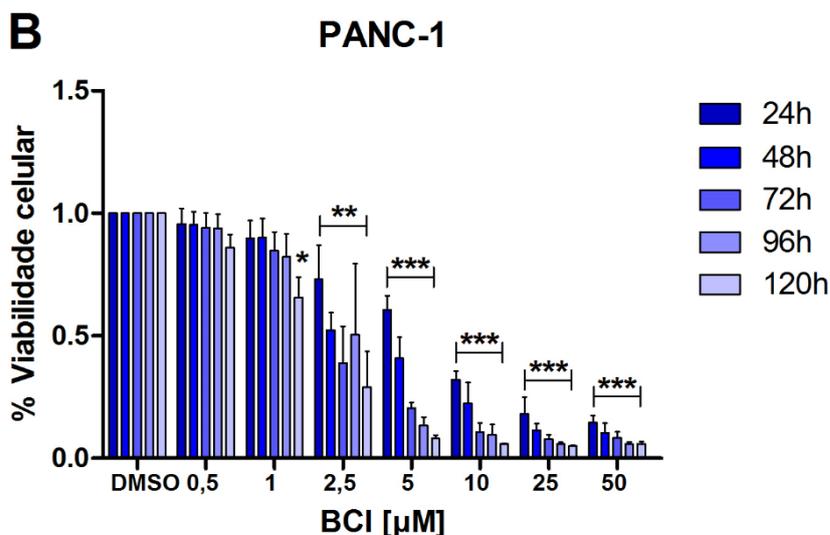
Considerando que as fosfatases *DUSP1* e *DUSP6* podem desempenhar um papel importante no processo metabólico de captação de glicose, o inibidor alostérico BCI foi escolhido para modular a atividade das fosfatases *DUSP1* e *DUSP6*. Inicialmente foi avaliado o impacto do tratamento com o inibidor BCI, e conseqüentemente da modulação de *DUSP1* e *DUSP6*, na viabilidade celular. Posteriormente, também foi averiguado o impacto do tratamento com BCI na captação de glicose e produção de lactato, que representam processos importantes para o metabolismo energético das células tumorais.

#### 4.3.1 Efeito do inibidor BCI na viabilidade celular

Para avaliar o efeito do inibidor BCI na viabilidade celular foi realizado um ensaio de citotoxicidade nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. O ensaio foi realizado em 5 dias (24h a 120h de tratamento) e utilizando doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M. Os valores obtidos representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Foi observado um efeito significativo do BCI dose e tempo dependentes em ambas as linhagens ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle tratado com o veículo (DMSO). Na linhagem MIA PaCa-2 foi observada uma redução significativa da viabilidade nos tempos de 24h, 48h e 72h a partir da dose de 2,5  $\mu$ M (**Figura 7A**). Ao avaliar a linhagem PANC-1 observou-se que esta linhagem foi mais sensível ao tratamento com BCI e a partir da dose de 1 $\mu$ M, foi observada uma redução significativa da viabilidade em todos os tempos do tratamento, iniciando em 24 horas (**Figura 7B**).





**Figura 7.** Viabilidade celular após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B).

A partir destes dados, foram calculados os valores de  $IC_{50}$  (concentração necessária para uma redução de 50% na viabilidade celular) para cada linhagem, utilizando-se o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados para os tempos de 48h e 72h para ambas as linhagens e estão representados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Valores de  $IC_{50}$  para BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1.

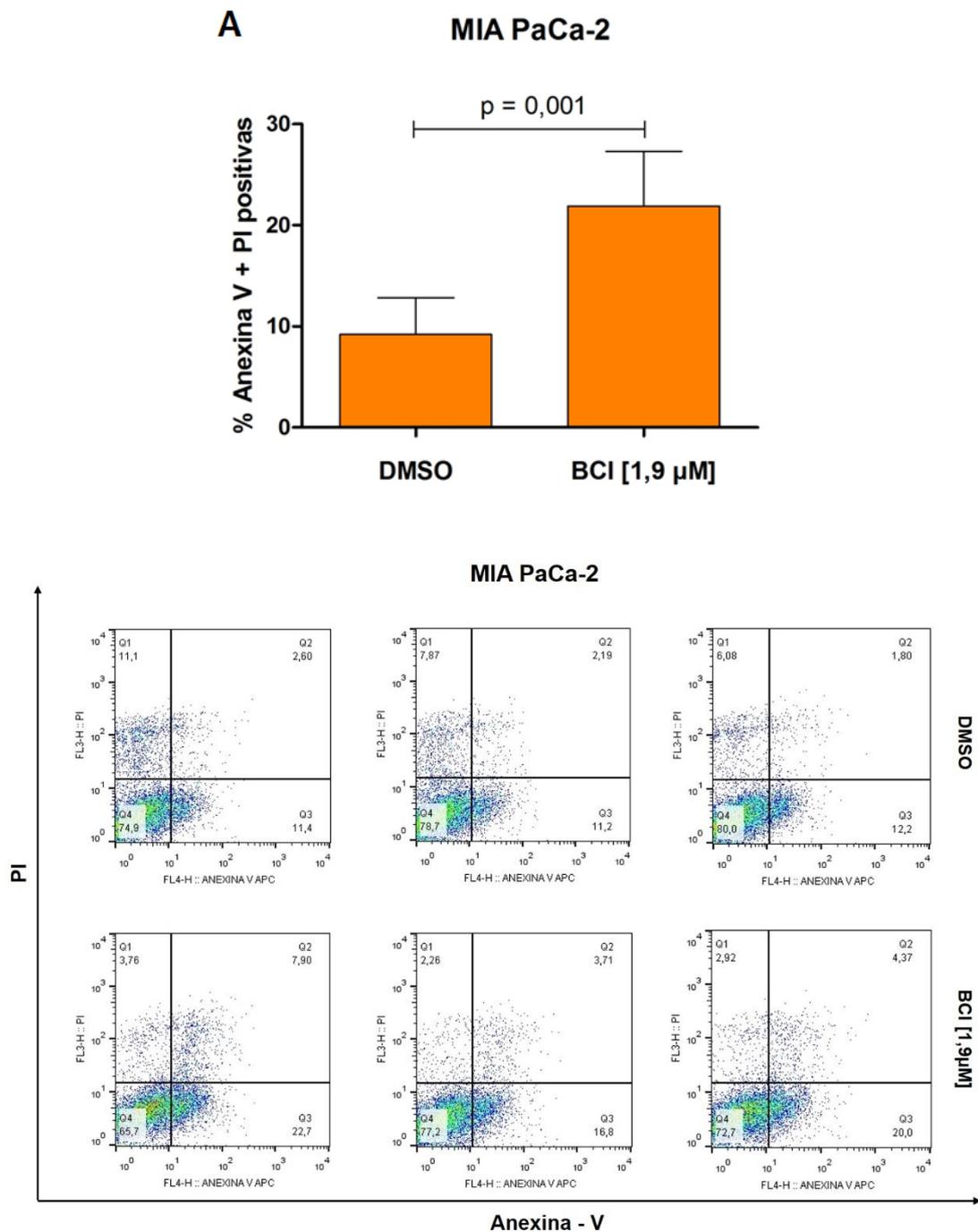
	$IC_{50}$ 48h	$IC_{50}$ 72h
	BCI [ $\mu$ M]	BCI [ $\mu$ M]
MIA PaCa-2	1,9	1,8
PANC-1	4,7	2,9

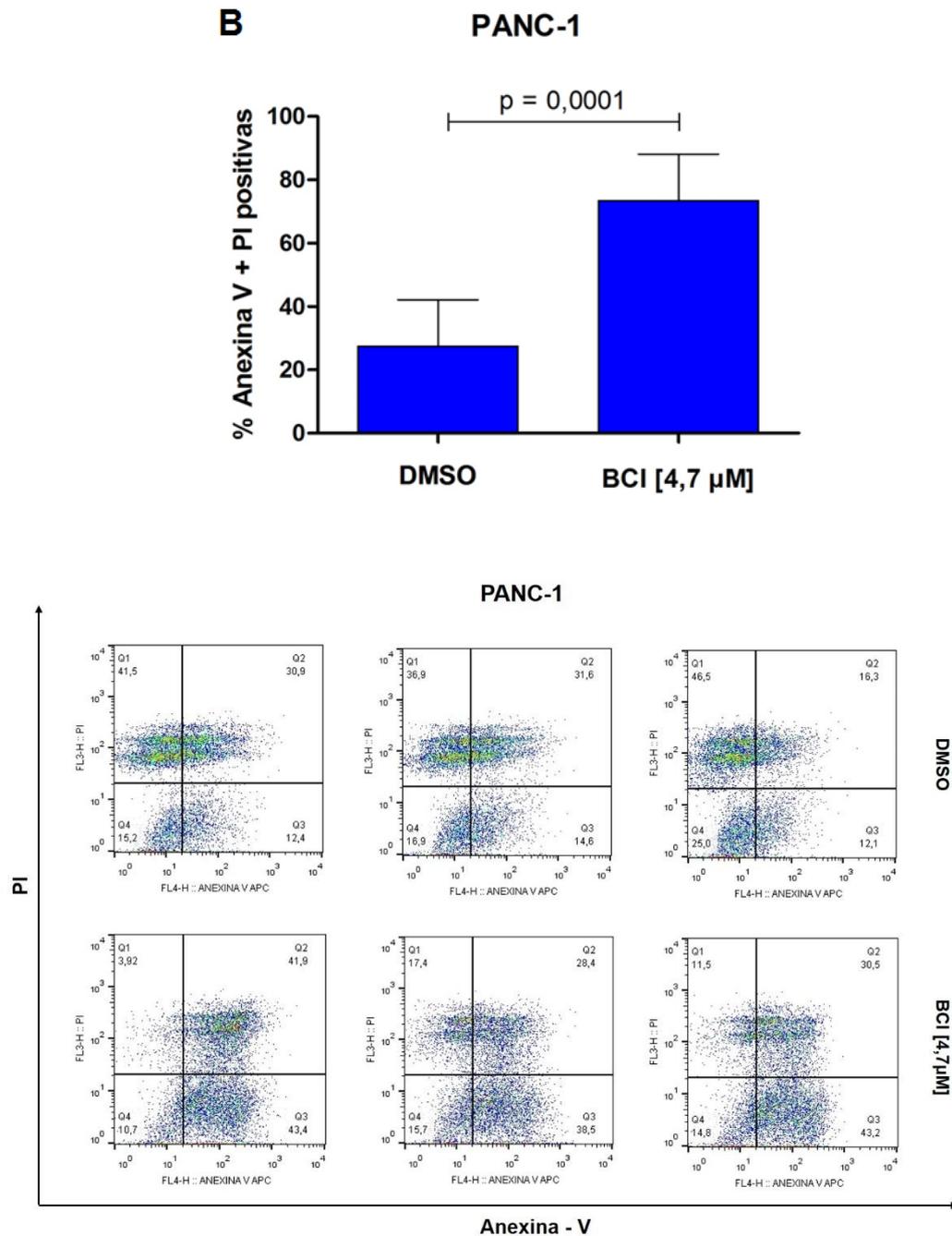
#### 4.3.2 Efeito do inibidor BCI na indução de morte celular por apoptose

Para avaliar se os efeitos citotóxicos encontrados representavam morte celular, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas após marcação com anexina-V e PI. Para tanto, o ensaio de apoptose foi realizado após o tratamento com o inibidor BCI por 48h ( $IC_{50}$  calculado para ambas as linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1).

Nessa análise foi observado um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas após o tratamento com BCI (após marcação com anexina-V e PI), em relação ao

controle não tratado. A linhagem MIA PaCa-2 apresentou uma taxa de morte celular de aproximadamente 30% ( $p = 0,001$ ) e a linhagem PANC-1 apresentou uma taxa de morte celular de 80% ( $p=0,0001$ ), mostrando que o inibidor BCI exerce de fato um efeito na indução de apoptose nessas células (**Figuras 8A e 8B**). Os ensaios foram realizados em triplicata e apresentados com o valor da média de três experimentos independentes.





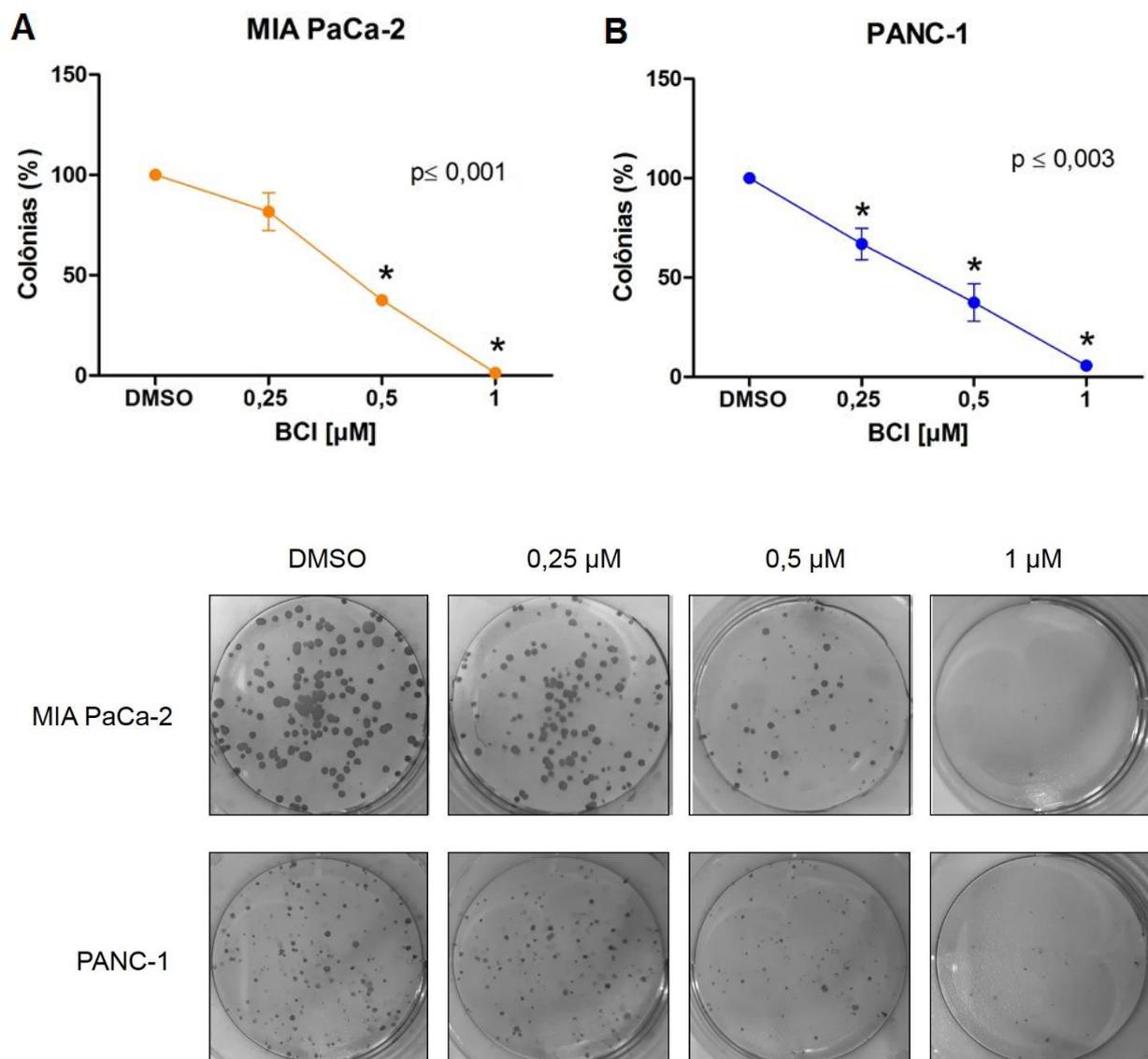
**Figura 8.** Porcentagem de células anexina-V e PI positivas após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B).

#### 4.3.3 Efeito do inibidor BCI na capacidade de formação de colônias

Com o intuito de avaliar se o inibidor BCI também poderia exercer algum impacto sobre a sobrevivência celular, foi realizado um ensaio de capacidade clonogênica de acordo com o protocolo de Franken, et al. (2006). Foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 µM de BCI para tratamento por 48h em ambas as linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. Os

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

A análise revelou que as doses de 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  causaram uma queda significativa na formação de colônias em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) na linhagem MIA PaCa-2, que apresentou uma redução de quase 100% na formação de colônias após a dose máxima (1  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 9A**). Para a linhagem PANC-1 todas as doses apresentaram uma redução significativa na capacidade clonogênica em relação ao controle ( $p < 0,003$ ), com uma inibição na formação de colônias de 90% na dose máxima (**Figura 9B**).

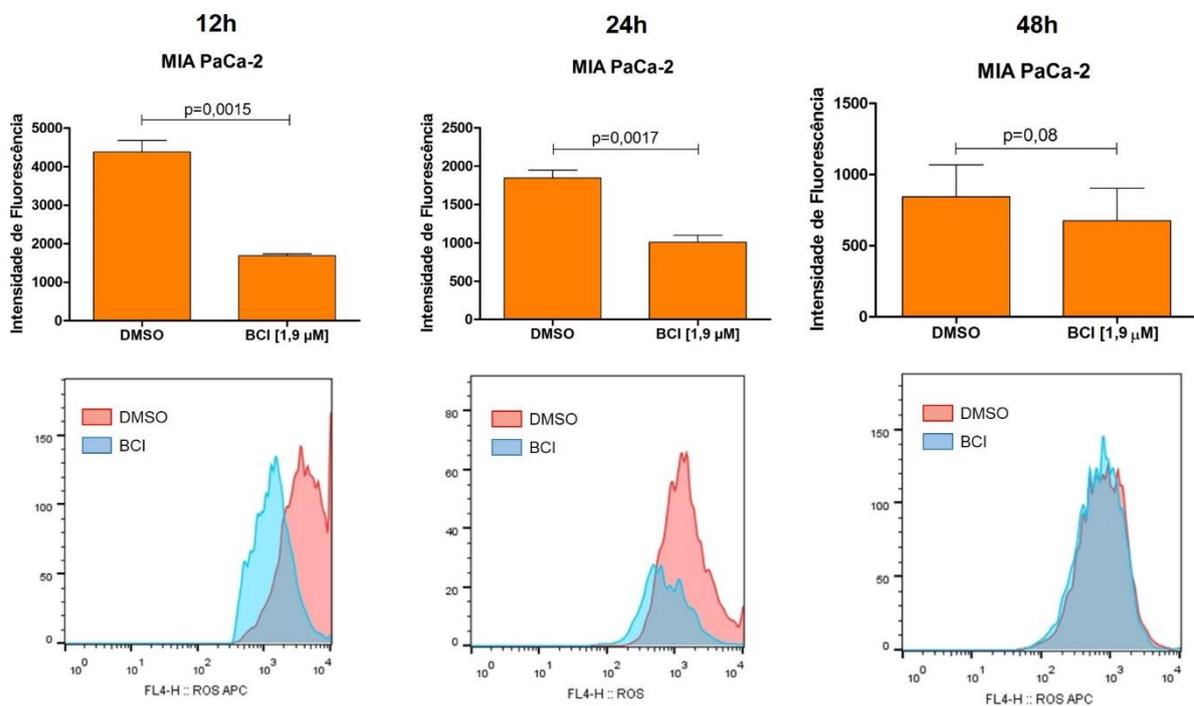


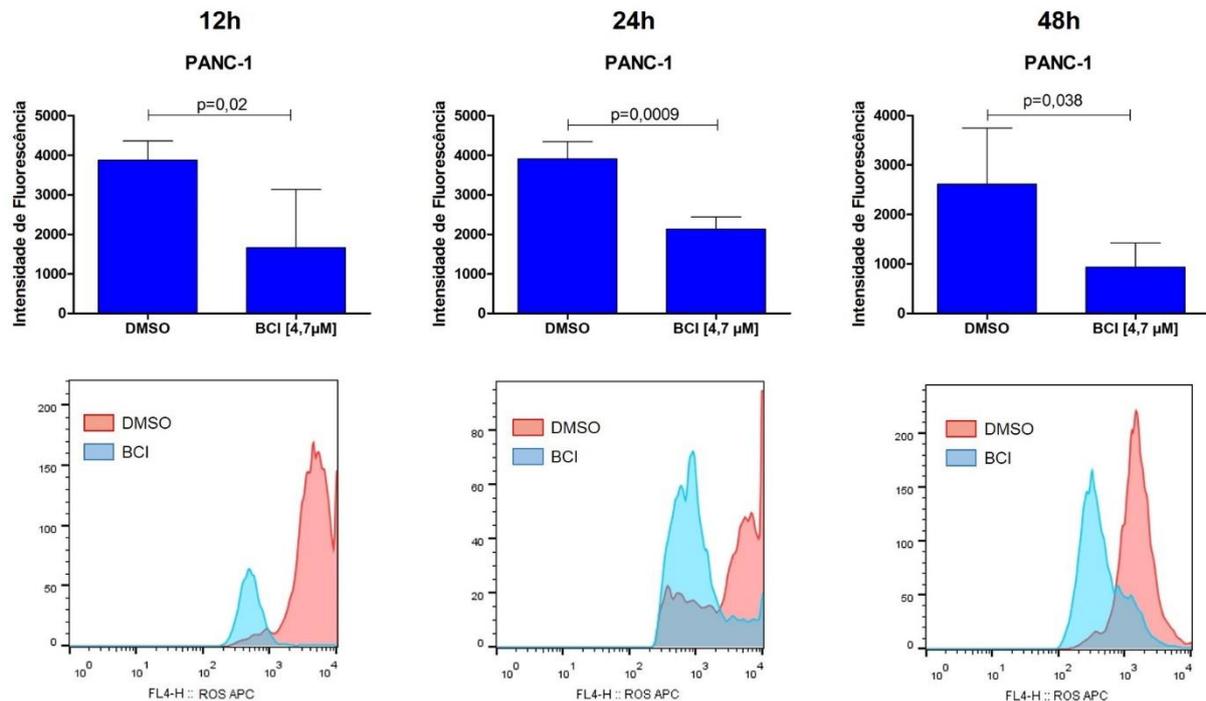
**Figura 9.** Capacidade de formar colônias após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (**A**) e PANC-1 (**B**).

#### 4.3.4 Efeito do inibidor BCI na produção de ROS

Considerando os dados previamente apresentados, observou-se que o inibidor BCI apresenta um efeito significativo no controle da morte celular e na capacidade de sobrevivência das células de ADP. Neste contexto, torna-se relevante avaliar se o papel do BCI nestes processos estava associado a um desequilíbrio na produção de ROS. Sendo assim, foi a intensidade da produção de ROS após o tratamento com o BCI foi avaliada em diferentes tempos de exposição à droga: 12h, 24h e 48h após o tratamento utilizando-se a dose correspondente ao IC<sub>50</sub> do inibidor BCI (conforme previamente descrita).

Na análise dos dados observou-se que ambas as linhagens apresentaram uma redução significativa na produção de ROS após o tratamento com BCI. A linhagem MIA PaCa-2 apresentou uma diminuição significativa nos tempos de 12h e 24h de tratamento e a linhagem PANC-1 apresentou uma queda significativa na produção de ROS em todos os tempos analisados (**Figuras 10A e 10B**). Esses resultados mostram que de fato, o BCI exerce um papel significativo no desequilíbrio redox das células de ADP.





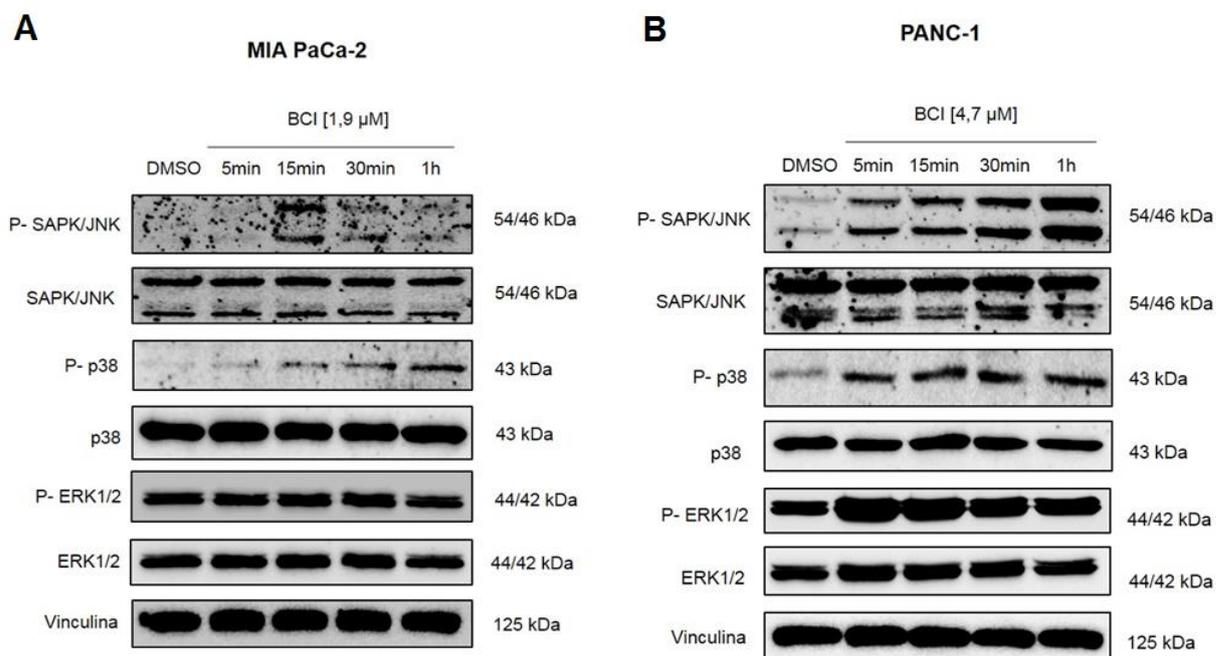
**Figura 10.** Produção de ROS após tratamento com BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B). Valores apresentados representam os dados absolutos de intensidade de fluorescência.

#### 4.3.5 Efeito do inibidor BCI na expressão das proteínas efetoras de MAPKs: ERK, JNK e p38

Considerando que as fosfatases DUSP1 e DUSP6 podem atuar em diferentes substratos e que o BCI pode inibir ambas as fosfatases, o próximo passo no delineamento experimental foi executado para compreender quais vias MAPK estariam de fato sendo moduladas no contexto celular do ADP. Para tanto, avaliou-se a capacidade inibitória do BCI e seu impacto na ativação (por fosforilação) das principais MAPKs: ERK, JNK e p38 nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. Para a realização desse estudo utilizou-se o valor de  $IC_{50}$  do BCI para o tratamento das linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 (concentrações de 1,9  $\mu$ M e 4,7  $\mu$ M, respectivamente) nos tempos de 5min, 15min, 30min e 1h.

Na análise da linhagem MIA PaCa-2 observou-se que o tratamento com o BCI teve um efeito significativo principalmente na ativação de P-JNK e P-p38, ambas alvos da fosfatase DUSP1. A ativação foi claramente observada pelo aumento da fosforilação a partir de 15min de tratamento para ambas as MAPKs. Por outro lado, a ativação de ERK, principal substrato de DUSP6, não foi alterada após o tratamento nos mesmos tempos, conforme evidenciado na **Figura 11A**. Avaliando a linhagem PANC-1 observa-se que os dados são concordantes. A ativação de JNK foi observada após 5min de tratamento com BCI, assim como a ativação de

p38. Nessa linhagem houve um aumento da fosforilação de ERK entre 5 e 15min, porém a ativação não foi tão evidente ao longo dos demais tempos analisados (**Figura 11B**).



**Figura 11.** Expressão das proteínas efetoras de vias MAPK após tratamento com BCI em diferentes tempos nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (**A**) e PANC-1 (**B**).

#### 4.3.6 Efeito do inibidor BCI no metabolismo energético – Captação de glicose e produção de lactato

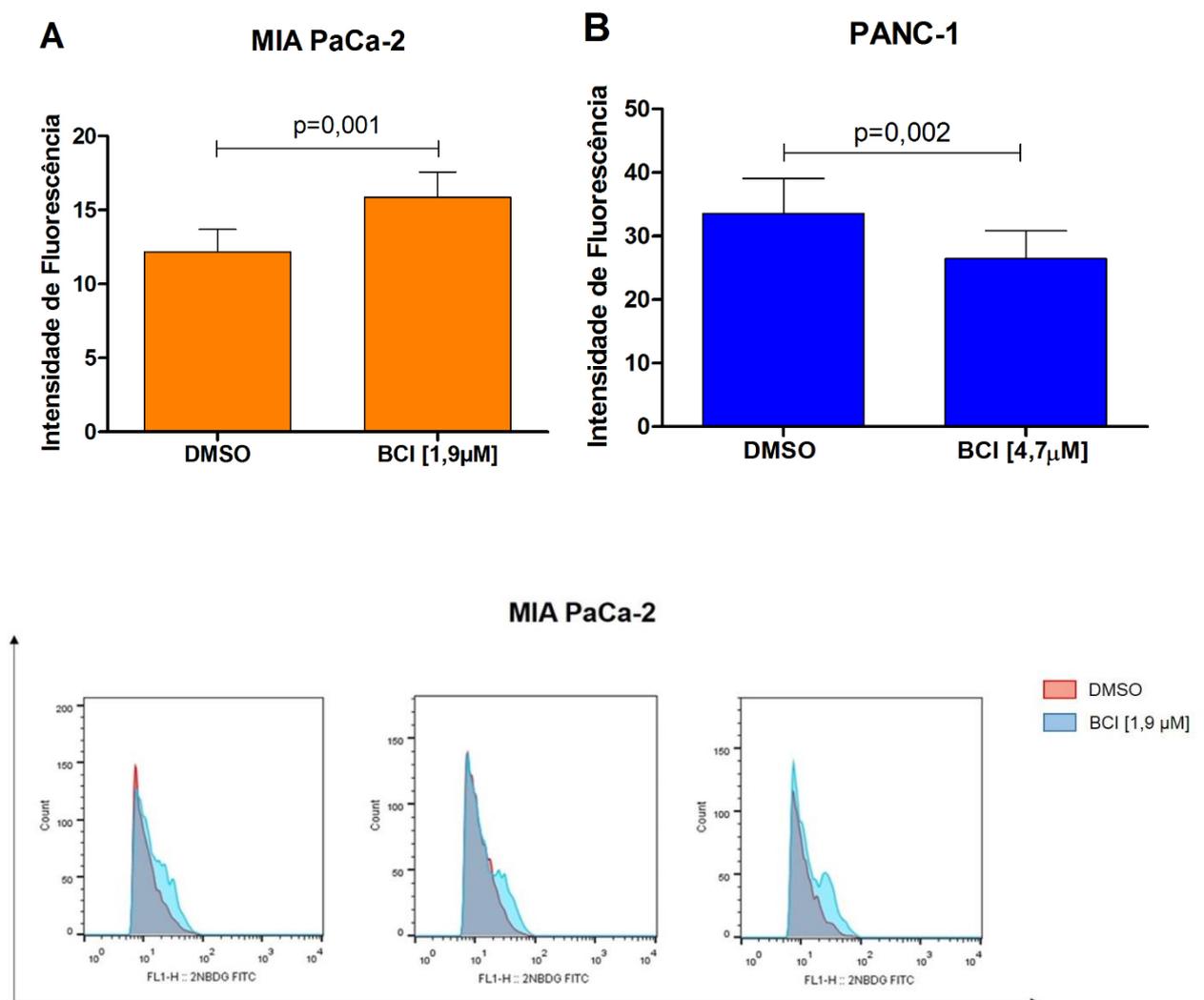
Para validarmos os achados obtidos no ensaio de *screening* o próximo passo foi avaliar o efeito da inibição farmacológica das DUSP1 e DUSP6 no metabolismo energético em ADP. Para tanto, foi realizado um ensaio para analisar o consumo de glicose e a produção de lactato pelas células de ADP após tratamento com BCI. Para ambos os ensaios foi utilizado o valor de IC<sub>50</sub> do BCI para as linhagens MIA PaCa-2 e PANC-1 (1,9 µM e 4,7 µM, respectivamente) em tratamento por 48h.

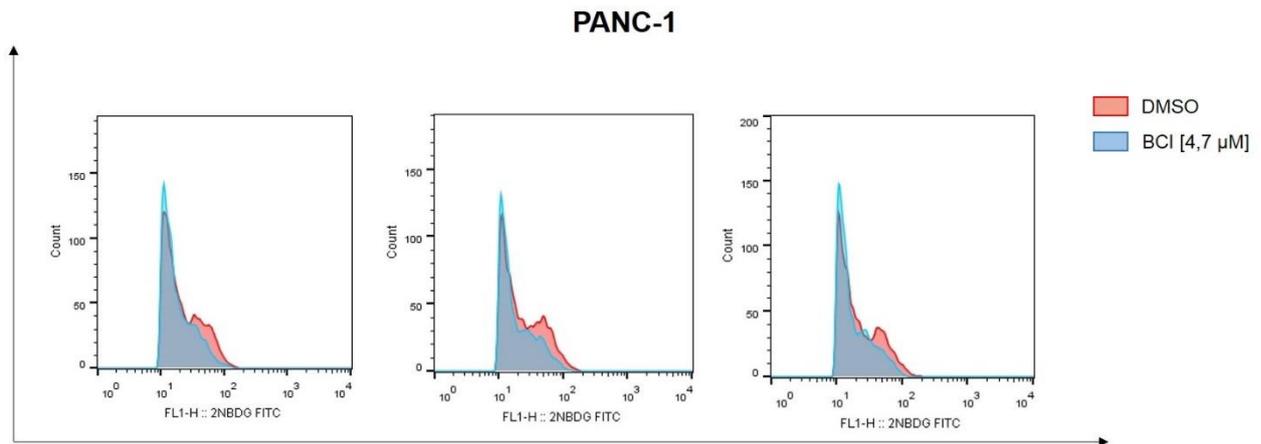
Após tratamento com BCI foi observado um aumento significativo 30% na captação de glicose na linhagem MIA PaCa-2 em relação ao controle (**Figura 12A**). Por outro lado, ao avaliar a linhagem PANC-1, observou-se um efeito contrário; neste caso a inibição de DUSP1 e DUSP6 causou uma redução significativa de 20% na capacidade de captação de glicose em relação ao controle (**Figura 12B**).

Para avaliar se a alteração da captação de glicose após o tratamento com o BCI estava acompanhada de alterações na produção de lactato, foi realizado um tratamento com BCI também por 48h em ambas as linhagens. Entretanto, observou-se que a produção de lactato

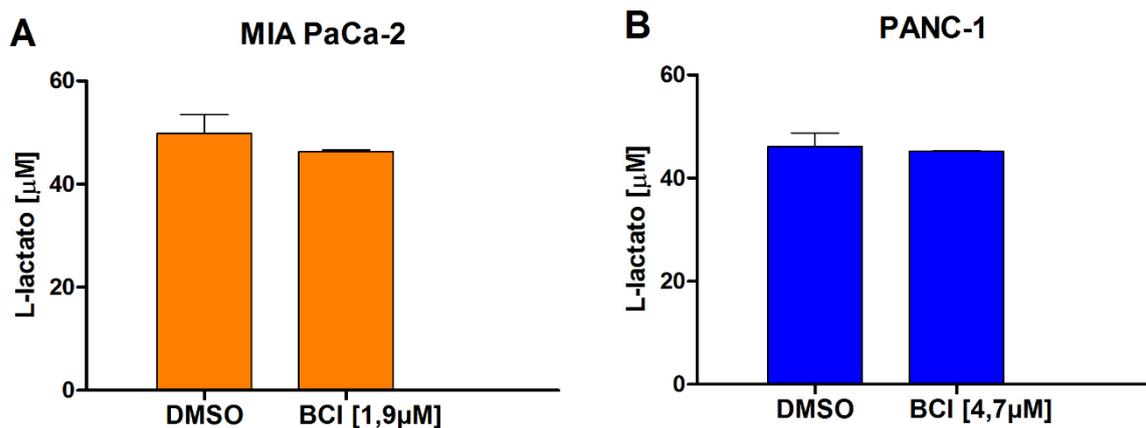
em ambas as linhagens não foi afetada pelo tratamento com BCI, e consequente inibição das DUSP1 e DUSP6, conforme demonstrado nas **Figuras 13A e Figura 13B**.

Esses dados mostram que a inibição farmacológica das fosfatases DUSP1 e DUSP6 podem apresentar resultados distintos daqueles obtidos no *screening* fenotípico. Vale ressaltar que no *screening* foi realizada a inibição gênica individual de cada fosfatase enquanto que a inibição farmacológica, tem como alvo as duas fosfatases. Esses ensaios, embora com resultados distintos, ressaltam que essas fosfatases podem de fato desempenhar um papel relevante no processo metabólico da glicose nas células de ADP





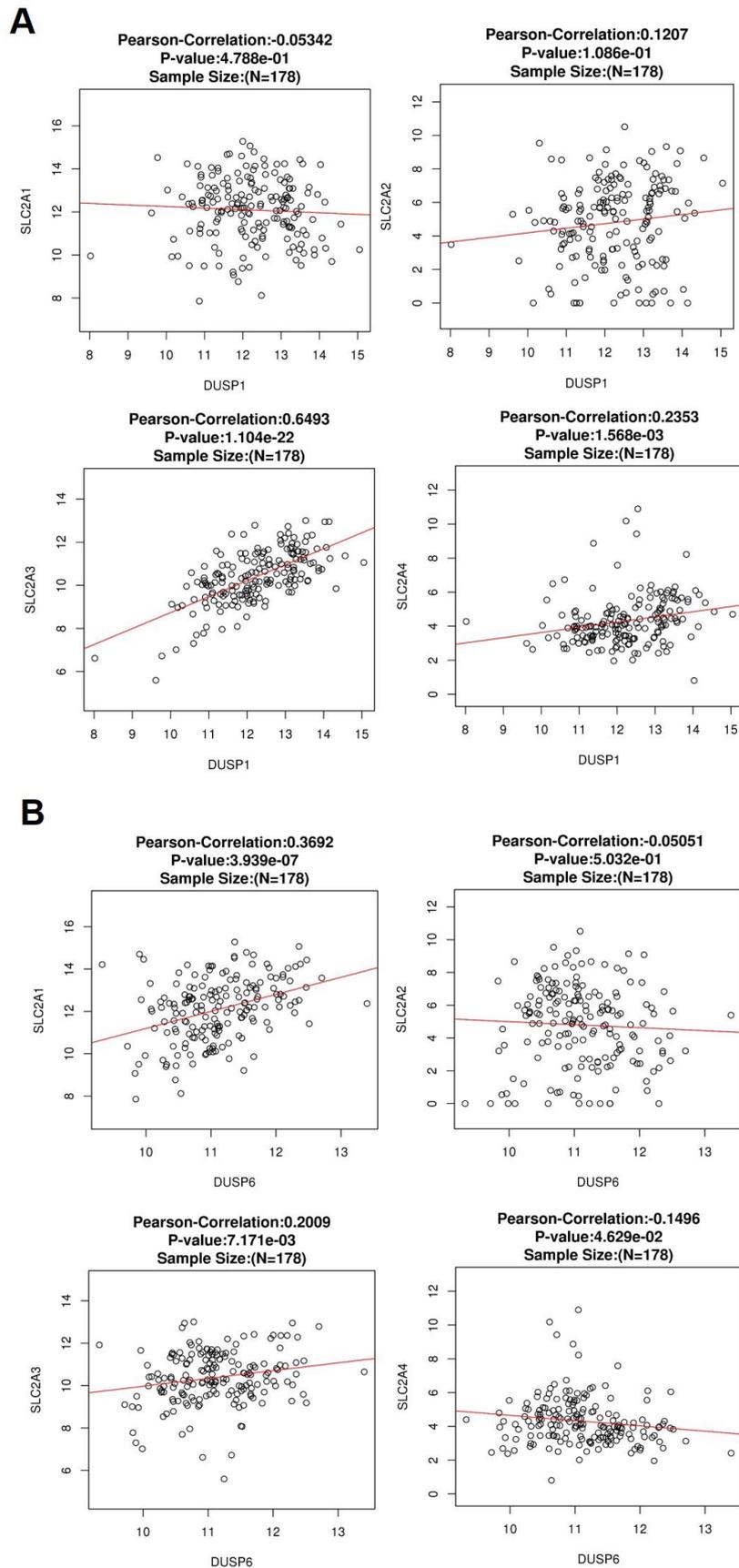
**Figura 12.** Análise do metabolismo energético através do consumo de glicose (2-NBDG) medido em intensidade de fluorescência nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 (A), e PANC-1 (B) após tratamento com BCI.



**Figura 13.** Análise do metabolismo energético através da produção de lactato (L-lactato), nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 (A), e PANC-1 (B) após tratamento com BCI.

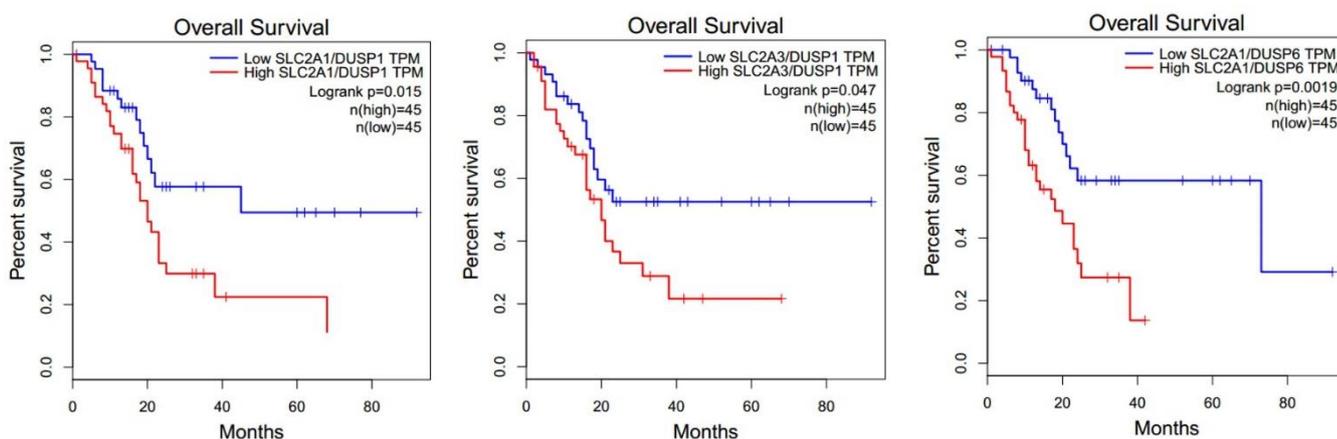
#### 4.3.7 Análise RNA-seq *in silico*

Foi realizada uma análise de correlação entre a expressão de *DUSP1* e *DUSP6* com genes da família *GLUT* na Plataforma LinkedOmics 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. Dos quatro genes, *SLC2A3* e *SLC2A4* se correlacionaram positivamente com a *DUSP1* de uma forma significativa (**Figura 14A**). *SLC2A1* se correlacionou positivamente com *DUSP6*, porém *SLC2A4* se correlacionou negativamente, ambas de uma forma significativa (**Figura 14B**).



**Figura 14.** Correlação entre *DUSP1* (**A**) e *DUSP6* (**B**) com genes da família *GLUT* (*SLC2A1*, *SLC2A2*, *SLC2A3* e *SLC2A4*).

Na análise de sobrevida global dos pacientes avaliados (Kaplan-Meier), verifica-se uma associação significativa da expressão elevada de *SLC2A1/DUSP1*, *SLC2A3/DUSP1* e *SLC2A1/DUSP6* com esse parâmetro clínico, na qual maior nível de expressão gênica está associado aos casos que apresentam as menores taxas de sobrevida (**Figura 15**). Estes resultados sugerem que a associação entre a expressão de *DUSP1* e *DUSP6* com importantes genes envolvidos no metabolismo energético podem estar envolvidos na agressividade do adenocarcinoma ductal pancreático.



**Figura 15.** Análise de sobrevida em amostras de pacientes com ADP utilizando a expressão gênica dos genes *SLC2A1* e *SLC2A3* normalizada pela expressão de *DUSP1* e *DUSP6*. Para o cut off de expressão foram utilizados os valores de quartis.

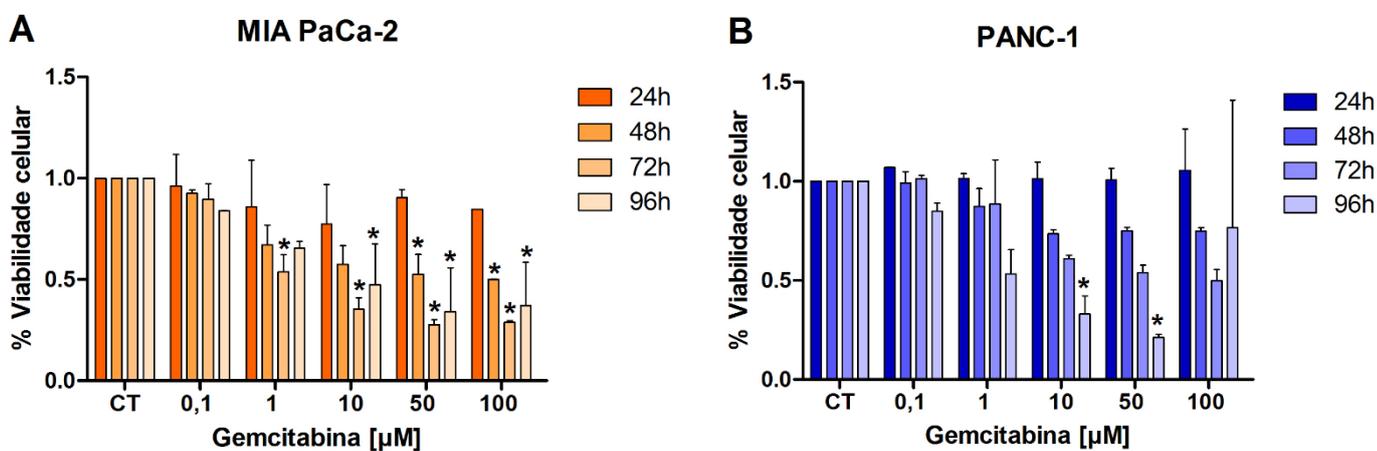
#### 4.3.8 Efeito do quimioterápico gemcitabina na viabilidade celular

O quimioterápico de escolha para o tratamento do ADP é o agente citotóxico gemcitabina, seja em regime de monoterapia ou politerapia. Primeiramente, para avaliar sua citotoxicidade, foi investigado o efeito da gemcitabina na viabilidade celular, utilizando-se um ensaio de citotoxicidade de 4 dias (24 a 96h) para ambas as linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. As doses utilizadas foram de 0,1, 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  e os valores representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Foi observado um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da gemcitabina dose e tempo dependentes na linhagem MIA PaCa-2 a partir de 72h de tratamento considerando a dose de 10  $\mu\text{M}$  em relação ao controle não tratado. Em doses superiores de gemcitabina (50  $\mu\text{M}$ ) observou-se um efeito citotóxico significativo já a partir de 48h ( $p < 0,05$ ) (**Figura 16A**).

Na linhagem PANC-1 foi encontrada uma significativa inibição da viabilidade ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle apenas no tempo de 96h e em doses superiores (10 e 50  $\mu\text{M}$ ). (**Figura**

**16B).** A partir destes dados, foram obtidos os valores do IC<sub>30</sub> e IC<sub>50</sub> de gemcitabina, usando o programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA) para ambas as linhagens.



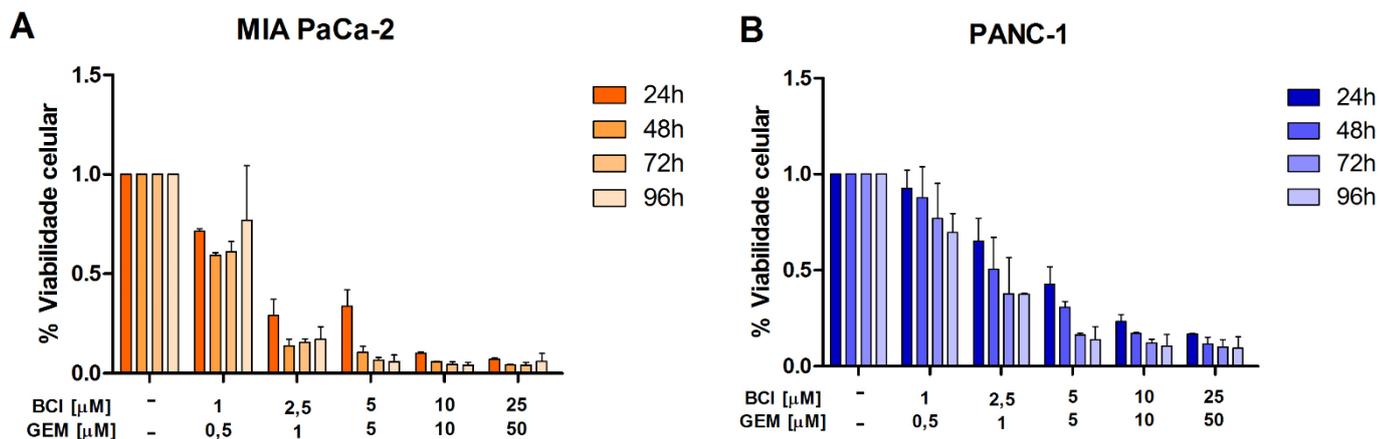
**Figura 16.** Viabilidade celular após tratamento com gemcitabina nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B).

#### 4.3.9 Efeito da combinação de gemcitabina e BCI na viabilidade celular

Adicionalmente aos efeitos de BCI e gemcitabina isolados, foi investigado a capacidade do inibidor BCI de sensibilizar as células para a ação da gemcitabina quando as duas drogas são combinadas. Baseando-se nas doses obtidas nos ensaios com as drogas isoladas, realizou-se a combinação com diferentes doses de cada droga pelo ensaio de viabilidade celular em ambas as linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 (**Figura 17A e Figura 17B, respectivamente**). A **Tabela 2** mostra o esquema de combinação de drogas realizado. As drogas foram administradas simultaneamente e a viabilidade celular foi analisada nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.

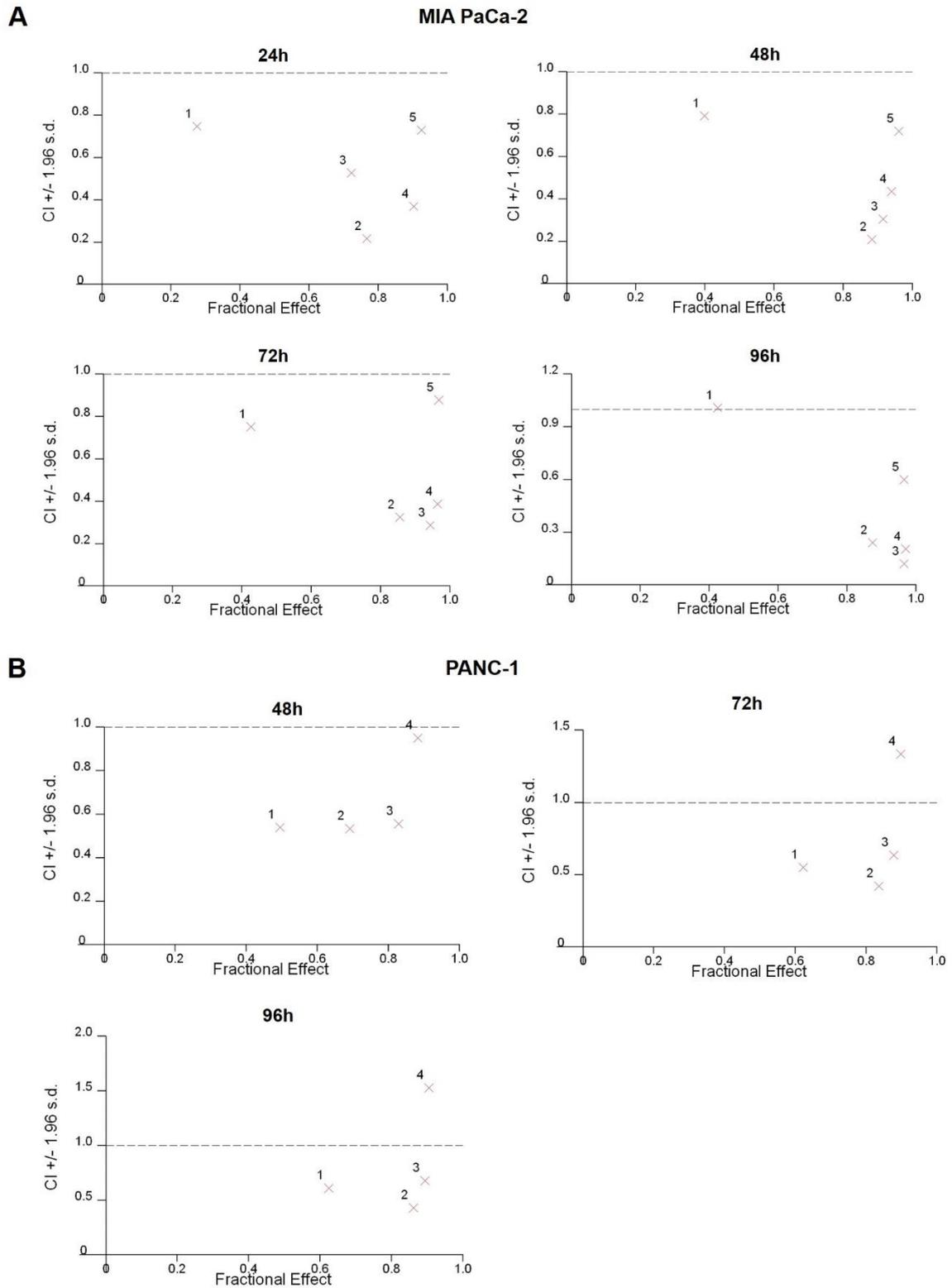
**Tabela 2.** Esquema de combinação das drogas avaliado no ensaio de viabilidade celular

Combinação	
BCI [ $\mu\text{M}$ ]	Gemcitabina [ $\mu\text{M}$ ]
1	0,5
2,5	1
5	5
10	10
25	50

**Figura 17.** Viabilidade celular após tratamento com gemcitabina e BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B).

Em seguida, foi calculado o índice de combinação (CI) para determinar se ambas as drogas atuam em sinergismo ou antagonismo. Como é possível observar na **Figura 18**, a maioria dos CIs obtidos da combinação entre BCI e gemcitabina apresentou valores de  $CI < 1$ , o que indica que há sinergismo entre as drogas. Para a linhagem MIA PaCa-2 todas as doses combinadas foram sinérgicas ou aditivas ( $CI = 1$ ) em todos os tempos analisados (**Figura 18A**). Na linhagem PANC-1, a menor e a maior combinação de doses resultaram em valores de  $CI > 1$ , indicando efeito antagônico. As outras doses combinadas foram sinérgicas a partir do tempo de 48h (**Figura 18B**). O efeito da combinação das menores doses não está

apresentado na figura. Em resumo, esses dados mostram que as drogas BCI e gemcitabina atuam em sinergismo.



**Figura 18.** Combinação entre BCI e gemcitabinas nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B). A linha tracejada (---) define o valor de CI=1, indicando aditivismo. CIs superiores ou inferiores indicam

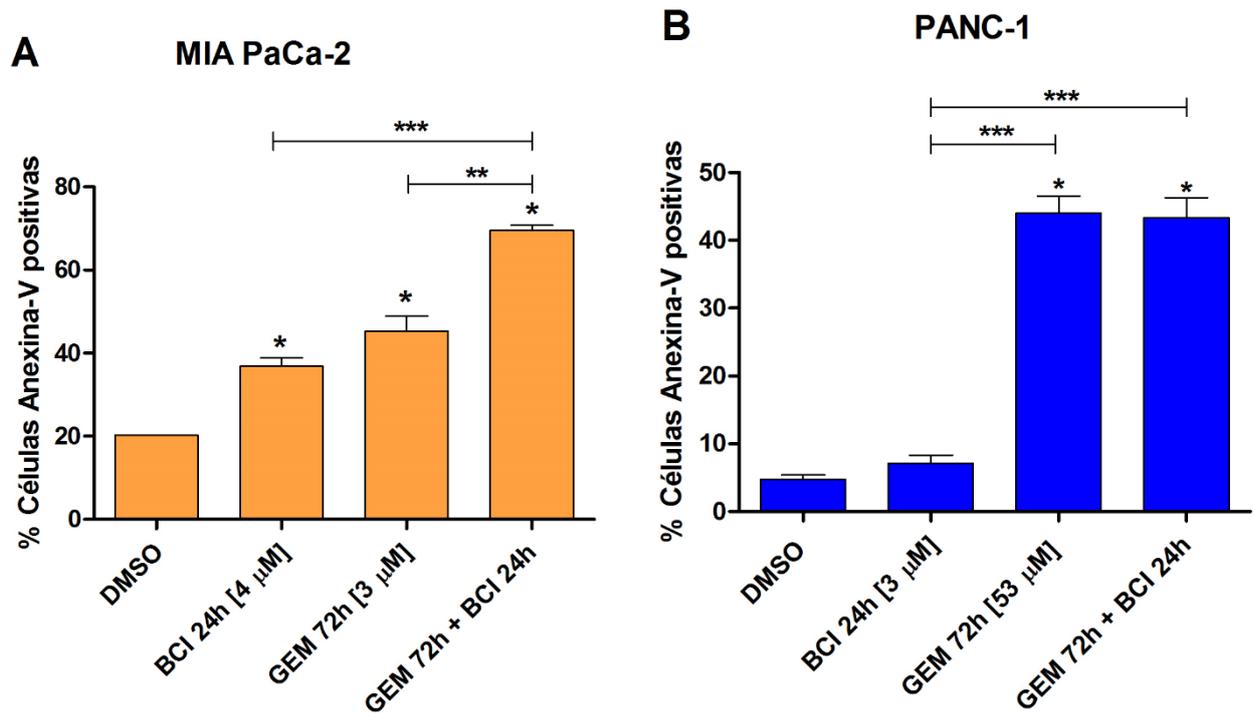
antagonismo ou sinergismo, respectivamente. Os pontos numerados (x) representam os valores de CI obtidos experimentalmente.

#### 4.3.10 Efeito da combinação de gemcitabina e BCI na morte celular por apoptose

Considerando o sinergismo entre as drogas observado no ensaio de viabilidade celular, decidiu-se analisar o efeito da combinação entre as drogas também na indução de morte celular por apoptose. Para esse ensaio ambas as linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com as drogas isoladas e/ou combinadas com doses equivalentes ao  $IC_{50}$  de gemcitabina por 72h e  $IC_{50}$  de BCI por 24h, descritas na **Tabela 3**. Na linhagem MIA PaCa-2 o tratamento combinado de gemcitabina seguido de BCI causou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de células apoptóticas e mostrou um efeito superior na indução de apoptose quando comparado ao tratamento com gemcitabina ou BCI isolados (**Figura 19A**). Por outro lado, na linhagem PANC-1 tanto o tratamento isolado com a gemcitabina quanto o tratamento combinado de BCI e gemcitabina foram igualmente eficientes na indução de apoptose ( $P < 0,05$ ). Nesse caso, a combinação entre as drogas não apresentou um efeito superior e não potencializou o efeito da gemcitabina isolada (**Figura 19B**).

**Tabela 3.** Esquema de combinação das drogas avaliado no ensaio de morte celular por apoptose

	$IC_{50}$ 24h BCI [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ 72h GEM [ $\mu$ M]
MIA PaCa-2	4	3
PANC-1	3	53



**Figura 19.** Porcentagem de células anexina-V positivas após tratamento com gemcitabina e BCI em monoterapia ou combinados nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 (A) e PANC-1 (B). Para a combinação as linhagens foram tratadas por um período de 48h com as doses de GEM (gemcitabina) para cada linhagem, após 48h foi adicionado no mesmo meio a dose de BCI para cada linhagem, completando assim um tratamento de 72h de GEM e 24h de BCI.

## 5. DISCUSSÃO

O ADP representa uma das formas mais letais de câncer no mundo apresentando um dos piores prognósticos, com uma sobrevida global de 5 anos de apenas 8% (Siegel *et al.*, 2016). O processo de progressão tumoral do ADP é desencadeado pela mutação do gene *KRAS* que é a primeira alteração molecular crítica e que inicia a tumorigênese por meio da ativação de importantes vias de sinalização como as MAPKs (Jones *et al.*, 2008). Nesse processo, a proteína oncogênica *KRAS* também é responsável pela regulação de vias metabólicas importantes para o estabelecimento e a manutenção do tumor como por exemplo, a glicólise (Bryant *et al.*, 2014). Em células de ADP a ativação da glicólise é modulada, entre outras formas, pela atividade de proteínas efetoras de MAPKs, como ERK e JNK, que já foram relatadas como uma das principais responsáveis pela reprogramação metabólica no ADP (Ying *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2018).

O controle da ativação das vias MAPKs tem sido amplamente estudado e demonstra uma complexa rede de interação entre proteínas quinases e fosfatases, e dentre elas destacam-se as fosfatases de dupla especificidade (DUSPs), que regulam negativamente as proteínas MAPKs e estão, portanto, diretamente envolvidas na atividade de importantes proteínas efetoras. Algumas dessas enzimas DUSPs têm sido relatadas desreguladas em diversos tipos de tumores, assim como em células de ADP (Alonso *et al.*, 2004).

No presente estudo, o *screening* fenotípico para análise do consumo de glicose demonstrou que o *knockout* de *DUSP1* e *DUSP6* diminuíram significativamente a captação de glicose da linhagem MIA PaCa-2, sugerindo que dentre os genes da família de fosfatases de dupla especificidade, essas fosfatases sejam as principais envolvidas nesse processo. Esse dado é inédito e para avaliar se o papel dessas fosfatases é, de fato, relevante para o metabolismo energético e demais processos celulares das células de ADP, inicialmente explorou-se o padrão de expressão dessas fosfatases em amostras de pacientes com ADP. Nesse caso, foi possível observar que tanto a *DUSP1* como *DUSP6* apresentam um elevado padrão de expressão gênica quando comparado com tecido pancreático normal, sugerindo que essas fosfatases possam desempenhar funções importantes no processo tumorigênico do ADP e conseqüentemente representar moléculas com papel clínico relevante.

Essa hipótese ganha força ao ser corroborada por achados anteriores em diferentes tipos tumorais nos quais a análise de expressão de *DUSP1* e *DUSP6* também demonstra um perfil de indução de expressão. Por exemplo, o gene *DUSP1* apresenta-se altamente expresso em tumores de mama, gástrico, de ovário, de pulmão, de próstata e também já foi relatado em carcinoma pancreático (Haagenson e Wu, 2010; Nunes-Xavier *et al.*, 2011).

Por outro lado, o perfil de expressão de *DUSP6* pode variar de acordo com o tipo tumoral, mostrando que essa fosfatase pode exercer tanto a função de supressor tumoral

como de oncogene. Em tumores de mama HER2+, mielomas, melanomas e em glioblastoma, *DUSP6* se encontra altamente expresso, exercendo assim um papel oncogênico associado a mutações nos genes *NRAS* e *EGFR* (Croonquist *et al.*, 2003; Bloethner *et al.*, 2005; Ramnarain *et al.*, 2006; Lucci *et al.*, 2010).

Contrariamente, em tumores de mama e de ovário, *DUSP6* exerce papel de supressor tumoral e sua expressão se encontra altamente baixa, favorecendo a progressão tumoral (Warmka *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008). Em câncer de pulmão a expressão se encontra inativada, assim como também já foi relatado em adenocarcinoma pancreático (Furukawa *et al.*, 2003; Okudela *et al.*, 2009).

Essa discrepância no padrão de expressão de *DUSP6* no câncer pancreático foi melhor explorada e alguns estudos demonstraram que a expressão de *DUSP6* pode variar de acordo com o estágio de progressão tumoral. Em lesões precursoras NIPs observa-se um padrão elevado de expressão de *DUSP6* enquanto no carcinoma já estabelecido ocorre a redução da expressão. Esses dados reforçam a suspeita de que a *DUSP6* é altamente regulada na progressão do tumor de pâncreas (Furukawa *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2005).

Diante desses dados, observou-se que de fato, essas fosfatases desempenham um papel relevante no processo tumoral do ADP e que deveriam ser melhor investigadas. Para essa investigação, a análise da expressão gênica de ambas as fosfatases foi avaliada em linhagens celulares de ADP para a escolha da melhor estratégia de modulação dos alvos. Nessa análise foi observada que na linhagem PANC-1 ambas as fosfatases (*DUSP1* e *DUSP6*) se expressam; por outro lado, a linhagem MIA PaCa-2 apresentou apenas a expressão de *DUSP1*, sugerindo que a fosfatase *DUSP6* estava inibida nessa linhagem.

Esse achado está de acordo com os dados descritos por Xu e colaboradores (2005) que realizaram um *screening* em diferentes linhagens de ADP para averiguar os níveis de expressão de *DUSP6*. Dentre as linhagens avaliadas (e divididas em quatro grupos de acordo com sua expressão, que variavam de extremamente baixa a extremamente elevada), a linhagem MIA PaCa-2 apresentou perfil de expressão de *DUSP6* extremamente baixo quando comparadas com uma linhagem controle. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que essa perda da expressão de *DUSP6* na linhagem MIA PaCa-2 se deve a uma hipermetilação de sequências CpG no promotor do gene. Esse dado foi comprovado com o tratamento com o agente desmetilante 5-azacitidina, que restaurou a expressão de *DUSP6* nessa linhagem (Xu, S. *et al.*, 2005). Outros estudos também corroboram os dados de expressão obtidos para *DUSP1* que também se encontra altamente expressa nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 e em amostras tumorais em estudo realizado por Liao e colaboradores (2003) (Liao *et al.*, 2003).

Como podemos observar, há evidências que correlacionam a alteração da expressão de DUSPs com o processo de indução e progressão tumoral sugerindo que essas fosfatases

podem agir como importantes reguladores do processo tumorigênico. Dessa forma, após os resultados obtidos no ensaio fenotípico e considerando o padrão de expressão das DUSP1 e DUSP6 nas linhagens celulares e nos tecidos tumorais de ADP, decidiu-se estudar a modulação dessas moléculas utilizando-se um inibidor farmacológico. Para tanto, o inibidor de DUSP1 e DUSP6, BCI, foi escolhido para avaliar a resposta celular das células de ADP frente a inibição dessas fosfatases. Considerando que a abordagem terapêutica para o tratamento do ADP ainda permanece um desafio para os oncologistas, a investigação de terapias moleculares alvo-específicas é extremamente relevante.

Inicialmente, foi avaliado o papel da inibição de DUSP1 e DUSP6 frente ao tratamento com o inibidor BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1 em ensaios *in vitro* de viabilidade celular, morte celular (por apoptose) e capacidade de sobrevivência clonogênica. O tratamento com BCI causou uma redução significativa na viabilidade celular (tempo e dose dependentes) em ambas as linhagens. Concordante com esse dado, o inibidor BCI induziu a apoptose em ambas as linhagens, sugerindo que a inibição da atividade das DUSP1 e DUSP6, por meio do tratamento com BCI, pode reduzir a viabilidade e causar a morte das células de ADP. Esse achado é de grande relevância, visto que a indução de morte por apoptose é um dos efeitos desejados para o tratamento de células tumorais com drogas alvo-específicas.

Os dados observados neste trabalho estão de acordo com os publicados recentemente por Shin e colaboradores (2018) acerca dos efeitos do BCI. Neste estudo, o tratamento com BCI em doses similares àquelas utilizadas no presente estudo diminuiu significativamente (tempo e dose dependente) a viabilidade de diversas linhagens celulares de câncer de pulmão (Shin *et al.*, 2018). Vale ressaltar, que o maior efeito citotóxico do BCI foi observado na linhagem que possuía mutação no gene *TP53*, apresentando uma redução de quase 80% na viabilidade celular em relação ao controle. Da mesma forma, o BCI também induziu morte celular por apoptose e mudanças morfológicas nas mesmas linhagens. Análises proteicas corroboraram os dados obtidos, mostrando um aumento na expressão proteica de Bax, uma proteína pro-apoptótica e diminuição na expressão proteica de Bcl-2 (linfoma de célula-B 2), uma proteína anti-apoptótica. Shin e colaboradores ainda relataram que a morte celular por apoptose se deu através da via intrínseca apresentando, após tratamento com diferentes doses de BCI, um aumento na expressão de caspase-9, caspase-3 e PARP (poli-ADP ribose polimerase) clivadas (Shin *et al.*, 2018).

Efeitos similares foram relatados por Wu e colaboradores (2018), que avaliaram o efeito de BCI em linhagens celulares de tumor gástrico. A maioria das linhagens apresentaram uma redução da viabilidade de quase 80% em relação ao controle, assim como a significativa indução de apoptose. Em modelos xenográficos o mesmo autor observou que o tratamento com BCI diminuiu significativamente o tamanho e peso da massa tumoral ao longo de 14 dias

de observação. Os dados foram confirmados por análise imunoistoquímica que revelou diminuição da proteína Ki67 (marcador de proliferação celular) nas amostras dos camundongos (Wu *et al.*, 2018).

Outro dado relevante e que corrobora nos achados foi descrito para linhagens de tumor maligno da bainha dos nervos periféricos (MPNST). Neste estudo, tumores MPNST que apresentavam perda de função do gene *NF1* foram sensíveis ao tratamento com BCI e apresentaram uma diminuição significativa da proliferação celular. Também foi observado um aumento na morte celular por apoptose após o tratamento com BCI, apresentando um aumento de caspase-3 e PARP clivadas. No mesmo trabalho, em análise de modelos PDX houve diminuição do volume tumoral com a presença de áreas necróticas e apoptóticas (Ramkissoon *et al.*, 2019).

O mesmo padrão foi observado para tumores de ovário que apresentavam elevada expressão de DUSP6 e consequente inibição de ERK1/2. Em ensaio *in vitro* utilizando coculturas da linhagem de tumor de ovário SKOV3 e de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) o tratamento com BCI reduziu a proliferação celular e aumentou a expressão de caspase-3 clivada, indicando um aumento na apoptose induzida pelo tratamento (James *et al.*, 2019).

É interessante ressaltar que o BCI também apresentou um efeito drástico na capacidade formação de colônias em ambas as linhagens de ADP avaliadas. Em todas as doses testadas houve uma queda significativa na capacidade de sobrevivência clonogênica, mostrando mais uma vez que o efeito do BCI é de fato relevante para a viabilidade e a sobrevivência das células de ADP. O mesmo foi relatado por Wu e colaboradores. (2017), que utilizaram as mesmas doses e observaram uma diminuição na formação de colônias de quase 100% na capacidade de formação de colônias em linhagens de tumor gástrico.

Em conjunto, esses dados reafirmam nossos achados e ressaltam a importância do BCI como agente anti-tumoral por meio da inibição das fosfatases DUSP1 e DUSP6.

Para elucidar de que modo a inibição das fosfatases estudadas estavam induzindo a morte celular, decidiu-se avaliar se o tratamento com o BCI poderia induzir a produção de ROS. ROS são substâncias com atividade oxidativa significativa, oxidando dentro da célula lipídios, proteínas e DNA, podendo causar danos em várias organelas celulares. Células tumorais apresentam níveis elevados de ROS, no entanto a célula precisa manter um equilíbrio desses níveis. Danos no DNA mediados por ROS promovem o início da carcinogênese e a transformação maligna das células, e ao mesmo tempo como moléculas de sinalização, ROS podem facilitar a sobrevivência celular e a progressão tumoral. Por outro lado, o excesso de ROS promove a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, liberando no citoplasma proteínas como o citocromo c, que servem de gatilho para a indução da morte celular programada (Mccarthy, 2011). Portanto, para alcançar a manutenção e

progressão tumoral, os níveis intracelulares de ROS devem ser modulados adequadamente para serem mantidos em concentrações ótimas para o desenvolvimento tumoral.

É sabido que as células tumorais, incluindo as de ADP, são altamente dependentes de mecanismos de feedback negativo para controlar a proliferação celular desordenada e manter os níveis de ROS controlados (Ogrunc *et al.*, 2014). Nesse contexto, a atividade de fosfatases como DUSP1 e DUSP6 (enquanto reguladores negativos da atividade de MAPKs) são críticas nesse processo. Sendo assim, decidiu-se averiguar o impacto da inibição de DUSP1 e DUSP6 na produção de ROS. Contrariamente ao esperado, o tratamento com o BCI causou uma redução na produção de ROS em ambas as linhagens. Ao contrário do que a maioria dos estudos publicados relatam, esse dado pode sugerir que a redução da viabilidade celular e sobrevivência das células de ADP (mediado pelo tratamento com o BCI), pode ser causado pela significativa redução de ROS e sugere uma dependência das células tumorais de ADP ao estresse oxidativo.

Diferente do nosso trabalho, Shin e colaboradores (2018), observaram elevada produção de ROS após tratamentos com BCI em linhagem de câncer de pulmão com consequente aumento da apoptose. Neste estudo, o tratamento com o antioxidante NAC restabeleceu a viabilidade celular, sugerindo que a morte por apoptose observada era, de fato, induzida pelos elevados níveis de ROS (Shin *et al.*, 2018).

Por outro lado, Cheng e Lanza-Jacoby (2015) demonstraram que o tratamento com metformina nas linhagens celulares de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1, resultou em aumento da apoptose e diminuição na produção de ROS associados a uma baixa expressão de NOX2 e NOX4 (Cheng e Lanza-Jacoby, 2015). Curiosamente, Gong e colaboradores (2014) também demonstraram que o tratamento de linhagens de ADP com Nexrutine®, um analgésico natural, resultou em diminuição da proliferação e redução na produção de ROS, o que corrobora nossos dados e indica que as células de ADP podem ser dependentes de ROS para a manutenção da proliferação celular. É válido ressaltar que nesse último estudo, as células apresentavam elevada autofagia (Gong *et al.*, 2014) e não morte por apoptose, como observado em nosso estudo.

Outro estudo interessante, e que está de acordo com os nossos achados, foi realizado por Kaltenmeier e cols (2017) utilizando um análogo de BCI para o tratamento de linhagens celulares de câncer de mama. Neste estudo, após o tratamento com BCI-215 houve aumento significativo de apoptose acompanhado de redução na produção de ROS e da ativação das vias MAPKs, ERK e JNK (Kaltenmeier *et al.*, 2017). Em conjunto esses dados sugerem que é possível que ROS não desempenhe um papel direto na mediação de efeitos antiproliferativos e citotóxicos induzidos por BCI em células de ADP.

Sendo assim, a fim de entendermos qual(ais) mecanismo(s) estaria(m) envolvido(s) nos processos estudados foi realizada a investigação de quais vias MAPKs são afetadas pela modulação das DUSP1 e DUSP6 pelo BCI.

Sabe-se que enquanto a DUSP1 se encontra somente no núcleo e desfosforila tanto ERK1/2 como p38 e JNK, a DUSP6 é citoplasmática e desfosforila especificamente ERK1/2 (Caunt e Keyse, 2013). Considerando que a modulação da atividade de MAPKs por mecanismos de fosforilação e desfosforilação é um mecanismo fino de regulação, as linhagens MIA PacA-2 e PANC-1 foram submetidas ao tratamento com BCI e avaliadas em intervalos de tempo que variaram de 5 minutos a 1 hora. Nessa análise, foi possível observar que houve uma ativação significativa de JNK (via fosforilação) fosforilada em ambas as linhagens, enquanto apenas uma discreta modulação de p38 e ERK. Esse resultado sugere que os efeitos do BCI, até o momento demonstrados, são causados especialmente pela ativação da via JNK. Como já é bem descrito pela literatura, JNK é o principal substrato de DUSP1. Nesse contexto, como a linhagem MIA PaCa-2 não possui expressão de *DUSP6* mas, ainda assim, apresenta os mesmos efeitos fenotípicos (sob tratamento com BCI) da linhagem PANC-1, nossos dados sugerem que em linhagens de ADP, a inibição de DUSP1 e não de DUSP6, é a principal responsável pela ativação de JNK e mediação dos efeitos antitumorais causados pelo BCI.

Outros estudos corroboram com nossos achados. Em linhagens de tumor maligno da bainha dos nervos periféricos (MPNST), a ativação da via JNK também foi demonstrada após inibição de DUSP1 e DUSP6 tanto após tratamento com BCI quanto por inibição por shRNA (Ramkissoon *et al.*, 2019). O mesmo foi observado em linhagens de câncer de pulmão após inibição de DUSP1 (Moncho-Amor *et al.*, 2011) e também foi demonstrado em amostras de pacientes com leucemia linfóide aguda pré-B, que o tratamento com BCI também resultou em um elevado aumento na expressão de JNK fosforilada (Shojaee *et al.*, 2015).

A família da quinase JNK inclui três proteínas (JNK1, JNK2 e JNK3) que são codificadas por três diferentes genes *JNK1* (*MAPK8*), *JNK2* (*MAPK9*) e *JNK3* (*MAPK10*). Enquanto JNK1 e JNK2 são expressas na maioria dos tecidos, a JNK3 é específica de alguns tecidos como o de cérebro e coração. As proteínas JNK - também conhecidas como proteína-quinases ativadas por estresse (SAPKs) - semelhantes a outras MAPKs, são ativadas por uma série de eventos de fosforilação em resposta a múltiplos estímulos, como citocinas, fatores de crescimento, patógenos, estresse, toxinas e drogas. A ativação da via acaba ativando também diversas proteínas envolvidas em diversas respostas celulares como proliferação, diferenciação, morte celular e sobrevivência (Bogoyevitch e Kobe, 2006).

Como já descrito anteriormente os níveis de RNAm e proteína de DUSP1 se encontram elevados em tumores pancreáticos e a inibição de DUSP1 nessas células resultou em redução do crescimento tumoral, apontando a elevada expressão de DUSP1 como principal

responsável pela atividade reduzida de JNK (Liao *et al.*, 2003). Esses dados corroboram os nossos achados e mais uma vez sugerem que a inibição da atividade de DUSP1 pode resgatar a atividade pro-apoptótica exercida por JNK.

Além de exercer atividade pró-apoptótica, vale ressaltar que observamos que a inibição de DUSP1 e DUSP6 diminuíram significativamente a captação de glicose, sugerindo que essas fosfatases podem desempenhar um papel importante no metabolismo da glicose nas células de ADP. Para confirmar essa hipótese, o efeito na captação de glicose e produção de lactato foi avaliada após a inibição simultânea tanto de DUSP1 e DUSP6 pelo agente BCI nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1.

Nesse contexto, foi observado que o BCI causou uma redução significativa na captação de glicose na linhagem PANC-1, sugerindo que a inibição de DUSP1 e consequente ativação de JNK, reduzem a capacidade de captação de glicose. Na linhagem MIA PaCa-2, entretanto, observou-se o aumento da captação de glicose. Não foi observado nenhum efeito na produção de lactato após o tratamento. Embora o efeito do BCI na captação de glicose seja contrário em ambas as linhagens e a modulação na produção de lactato não tenha ficado evidente, os dados obtidos deixam claro que a atividade das fosfatases DUSP1 e DUSP6 pode interferir no metabolismo da glicose.

É importante ressaltar que a modulação da atividade das DUSPs pelo BCI pode afetar de maneira distinta cada uma das linhagens visto que a linhagem MIA PaCa-2 não apresenta expressão de DUSP6 e conseqüentemente, pode apresentar dependência da alça de feedback negativo exclusivamente pela atividade de DUSP1. Atualmente não existe nenhum estudo que evidencie o envolvimento de DUSP1 e DUSP6 no papel da reprogramação metabólica em tumores ou na modulação do consumo de glicose através destas fosfatases, principalmente em adenocarcinoma pancreático, o que torna esse dado inédito. De qualquer modo, os dados aqui apresentados sugerem que a principal via afetada pela inibição da atividade de DUSP1 pode ser mesmo a ativação de JNK.

Alguns estudos já descreveram a associação de JNK com o metabolismo de glicose e corroboram nossos achados. Por exemplo, Luo e colaboradores (2018) demonstraram que a inibição da via JNK está associada à elevada disponibilidade de glicose, que além de promover a proliferação de células do adenocarcinoma pancreático, também provoca o aumento na produção de ROS (Luo *et al.*, 2018), o que está de acordo com os dados obtidos para a linhagem PANC-1.

O papel de JNK no metabolismo energético de tumores também já foi descrito em carcinoma hepatocelular, no qual a inibição de JNK1 (mediada por PARP14) promove o aumento de genes envolvidos na via glicolítica, como o aumento da atividade da isoenzima piruvato quinase tipo 2 (PKM2) (Iansante *et al.*, 2015). A PKM2 é uma isoforma da enzima glicolítica piruvato quinase (PK), que catalisa a síntese de piruvato e ATP e é sabidamente

uma importante mediadora do efeito Warburg (Hitosugi *et al.*, 2009; Cairns *et al.*, 2011; Hitosugi e Chen, 2014). Em conjunto, esses dados reafirmam a importância de JNK no processo metabólico.

Ainda nesse contexto, é válido discutir que os dados discordantes obtidos para a linhagem MIA-PaCa-2 chamam a atenção para a complexidade dessa cascata de regulação, e sugerem que outros genes podem estar envolvidos na regulação da captação de glicose mediada por DUSP1/JNK. Com isso, para tentar elucidar o papel da fosfatase DUSP1 nesse processo, foram utilizados dados de RNA-Seq provenientes de plataformas públicas (disponibilizados pelo consórcio TCGA) para avaliar as principais redes de correlação gênica envolvendo essa fosfatase.

Em análise de correlação gênica, envolvendo a DUSP1, e com enriquecimento funcional, observou-se que vias envolvidas com o metabolismo de carboidratos e com a fosforilação oxidativa são de fato relevantes e apontam a DUSP1 como possível mediador do processo de reprogramação metabólica. Além disso, dentre os inúmeros genes correlacionados com a DUSP1 as proteínas transportadoras de glicose da família GLUT (SLC2A Family) estão fortemente correlacionadas, principalmente GLUT3 (SLC2A3), sugerindo que DUSP1 possa ter um papel na captação de glicose por meio da modulação (direta ou indireta) desses transportadores.

A expressão de GLUT1 e GLUT3 já foi descrita por estar associada a uma baixa sobrevivência global em pacientes acometidos por diversos tipos tumorais, dentre eles o ADP (Chen *et al.*, 2017; Sharen *et al.*, 2017). A inibição de GLUT1 em adenocarcinoma pancreático acarretou em diminuição do consumo de glicose e produção de lactato levando a uma inibição da atividade da via mTOR e conseqüente redução de c-Myc associadas a expressão de proteínas transmembranas mucinas, MUC13 e MUC16 (Shukla *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2018).

Koch e colaboradores também avaliaram o papel de GLUT em melanoma e observaram que a inibição de GLUT1 diminui a captação de glicose a produção de lactato, porém a diminuição na proliferação e aumento da morte por apoptose foram associados a inativação da via JNK (Koch *et al.*, 2015).

Esses dados reafirmam que a proteína GLUT1 é uma das grandes envolvidas no consumo de glicose, e pode sugerir que a redução no consumo de glicose na linhagem PANC-1 após a inibição de DUSP1 poderia ser mediada pela ação de GLUT1. Por outro lado, é possível afirmar que o aumento do consumo de glicose na linhagem MIA PaCa-2 se deve ao fato da diminuição da viabilidade celular causada pelo inibidor induzir as células tumorais a optarem por um maior consumo de glicose para aumentar a produção de metabólitos essenciais para conseqüente manutenção tumoral através da ativação de outras vias ou

outras proteínas envolvidas na via da glicólise. Porém, experimentos adicionais precisam ser realizados para se confirmar essa suspeita.

As DUSPs ainda não foram descritas no contexto do metabolismo tumoral, porém desempenham um papel no metabolismo da insulina, o que pode sugerir sua importância no processo metabólico. A resistência à insulina é caracterizada pela perda da capacidade da insulina em estimular a absorção da glicose para dentro da célula, gerando uma hiperinsulinemia e hipoglicemia, que é uma característica comum em diabetes mellitus e obesidade (Kolterman *et al.*, 1980). Sendo importante ressaltar que dentre os fatores de risco ambientais associados ao desenvolvimento do ADP estão a obesidade e a diabetes (Vincent *et al.*, 2011).

Khadir e colaboradores (2015) observaram que os níveis de DUSP1 eram consideravelmente mais elevados em tecido adiposo e em células mononucleares de sangue periférico de adultos obesos quando comparados com adultos magros, acompanhados de um aumento no nível de ERK fosforilada (Khadir *et al.*, 2015). O mesmo foi observado por Fujimoto e colaboradores (2010) em camundongos obesos e resistentes à insulina (Fujimoto *et al.*, 2010). As proteínas p38 e JNK são responsáveis por controlar o metabolismo hepático e a elevada expressão de DUSP1 em fígados de pacientes que possuem uma dieta rica em gordura, leva a uma diminuição na expressão dessas proteínas efetoras e consequente obesidade e resistência à insulina nesses pacientes (Lawan *et al.*, 2015).

A expressão de DUSP6 também se encontra altamente expressa no fígado de camundongos obesos e resistentes à insulina e foi associada positivamente na regulação da expressão de genes envolvidos na gliconeogênese, aumentando assim a produção de glicose e seus níveis no sangue (Xu, H. *et al.*, 2005). Wu e colaboradores (2010) também observaram que elevada expressão de DUSP6 leva a desfosforilação de FOXO1, promovendo a sua translocação para o núcleo, atuando assim na transcrição de importantes genes envolvidos na gliconeogênese (Wu *et al.*, 2010).

Como podemos observar, ainda é pouco elucidado os efeitos das DUSPs na captação da glicose e consequente modulação no metabolismo energético, principalmente em tumores como o de pâncreas.

Finalmente, levando em consideração a importância das fosfatases DUSP1 e DUSP6 em importantes processos discutidos até o momento, decidiu-se avaliar a relevância e o potencial de aplicação do inibidor BCI como alvo terapêutico. Para tanto, realizou-se a combinação de BCI com o quimioterápico gemcitabina, a fim de avaliarmos o efeito combinado de ambas as drogas nas linhagens de ADP, MIA PaCa-2 e PANC-1. Por meio de ensaio de viabilidade celular, foi possível observar que BCI age de modo sinérgico com a gemcitabina em ambas as linhagens e, mais importante, com doses reduzidas dos dois agentes. O mesmo foi observado no ensaio de morte celular por apoptose na linhagem MIA PaCa-2, em que a

combinação resultou em um maior número de células apoptóticas quando comparadas com os tratamentos com gemcitabina ou BCI sozinhos, também utilizando-se doses baixas de gemcitabina e BCI. Esses dados sugerem que o tratamento com a gemcitabina pode ser significativamente beneficiado da combinação com BCI, podendo potencializar a indução de apoptose com a redução das doses de gemcitabina.

O efeito da combinação de BCI e de outros agentes quimioterápicos também já foi descrito como o efeito da combinação entre BCI e CDDP (cisplatina), quimioterápico padrão no tratamento de tumores gástricos. Foi observado que a combinação entre as drogas potencializou o efeito citotóxico, apresentando uma diminuição da viabilidade de quase 80% utilizando uma pequena dose de BCI e CDDP. Nas mesmas condições a dose necessária de BCI isolada para se obter a mesma redução de viabilidade era significativamente maior. O mesmo foi observado em modelos xenográficos, em que a combinação entre BCI e CDDP (diminuiu significativamente o tamanho e peso da massa tumoral em comparação com os tratamentos sem combinação. A combinação entre as drogas potencializou o efeito citotóxico significativo quando comparadas com os tratamentos sem combinação e causou o aumento de quase 90% de células apoptóticas e redução na formação de colônias (Wu *et al.*, 2018).

Considerando que BCI inibe DUSP1 e que essa inibição leva ao aumento da expressão de JNK, e consequente da atividade pró apoptótica, é possível que o sinergismo e morte celular resultante dessa combinação pode ser devido a estas mudanças promovidas pelo inibidor.

Liu e colaboradores (2014) observaram o mesmo efeito em linhagens de ADP após inibição de *DUSP1* utilizando o silenciamento gênico mediado por shRNA. A inibição de *DUSP1* causou a ativação de JNK e consequentemente promoveu a sensibilidade à gemcitabina. Para a combinação, as doses de gemcitabina para as linhagens foram diminuídas em até 50x para se obter o mesmo efeito quando tratadas isoladamente com gemcitabina. Também foi analisado o efeito da inibição de *DUSP1* pelo agente doxíciclina em combinação com gemcitabina em modelos ortotópicos. A combinação resultou em aumento da sobrevivência, diminuição da angiogênese e aumento de morte celular por apoptose (Liu *et al.*, 2014). O efeito da inibição de *DUSP1* associado a quimioterápicos também já foi descrito em outros tumores. Em tumores de pulmão a inibição de *DUSP1* aumentou a sensibilidade à droga cisplatina resultando em um aumento na morte por apoptose através da ativação das vias JNK e p38 (Vicent *et al.*, 2004; Cimas *et al.*, 2015). Em câncer de mama, a sensibilidade a droga cisplatina, induzida pela inibição de *DUSP1*, se deu através da ativação da via ERK (Wang *et al.*, 2009). O mesmo foi observado em carcinoma hepatocelular onde a inibição de *DUSP1* combinado com cinco diferentes quimioterápicos resultou em ativação da via JNK e uma maior morte celular quando comparado com os tratamentos dos quimioterápicos sozinhos (Park *et al.*, 2013).

Os dados mostrados neste projeto confirmam que BCI é um potencial agente a terapia adjuvante no tratamento do adenocarcinoma pancreático e pode realmente ser considerado um importante agente terapêutico antineoplásico para potencializar a sensibilidade à gemcitabina.

Considerando todos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que nossos dados permitiram avaliar o impacto do uso de inibidores de DUSPs em células de ADP e sugerir um mecanismo de ação inédito dessas fosfatases no processo de reprogramação do metabolismo. Nossos achados sugerem que a alteração do metabolismo tumoral pode representar uma estratégia promissora no tratamento do ADP. Porém, é importante ressaltar que esse processo é extremamente complexo e que experimentos adicionais utilizando outros modelos precisam ser realizados afim de elucidar o papel exato da atividade das DUSPs na regulação do metabolismo energético tumoral.

## 6. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados no presente estudo permite concluir que:

- O *knockout* de *DUSP1* e *DUSP6* resultou em uma modulação do metabolismo energético através da diminuição do consumo de glicose nas linhagens;
- A expressão do gene de *DUSP1* se encontra elevada em comparação com amostras livres de tumor em ambas as linhagens, enquanto a expressão do gene de *DUSP6* se encontra com a expressão praticamente inativada na linhagem MIA PaCa-2;
- O tratamento com BCI inibiu a viabilidade celular, induziu morte por apoptose, diminuiu a capacidade de formação de colônias, a produção de ROS e o consumo de glicose, porém não alterou a produção de lactato em ambas as linhagens;
- Após tratamento com BCI, houve uma ativação significativa de JNK (via fosforilação) fosforilada em ambas as linhagens, enquanto apenas uma discreta modulação de p38 e ERK;
- As análises *in silico* de amostras de ADP sugerem que os genes *DUSP1* e *DUSP6* estão correlacionados com importantes genes associados ao metabolismo energético, como genes da família *GLUT*;
- O BCI agiu sinergicamente com gemcitabina, acarretando em uma diminuição da viabilidade celular e um aumento de morte por apoptose nas linhagens.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, Jun 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186772> >.

ARIMURA, Y.; YAGI, J. Comprehensive expression profiles of genes for protein tyrosine phosphatases in immune cells. **Sci Signal**, v. 3, n. 137, p. rs1, Aug 2010. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807954> >.

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

BLOETHNER, S. et al. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1224-32, Jul 2005. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760917> >.

BOGOYEVITCH, M. A.; KOBE, B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, n. 4, p. 1061-95, Dec 2006. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158707> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRYANT, K. L. et al. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 2, p. 91-100, Feb 2014. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388967> >.

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

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, Feb 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258394> >.

CAUNT, C. J.; KEYSE, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. **FEBS J**, v. 280, n. 2, p. 489-504, Jan 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22812510> >.

CHAN, D. W. et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 9, p. 1742-50, Sep 2008. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632752> >.

CHEN, C. et al. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. **J Biol Chem**, v. 276, n. 12, p. 9519-25, Mar 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120745> >.

CHEN, X. et al. Predictive value of glucose transporter-1 and glucose transporter-3 for survival of cancer patients: A meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 13206-13213, Feb 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28086215> >.

CHENG, G.; LANZA-JACOBY, S. Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: Role of NOX4. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 465, n. 1, p. 41-6, Sep 2015. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225747> >.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv Enzyme Regul**, v. 22, p. 27-55, 1984. ISSN 0065-2571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6382953> >.

CIMAS, F. J. et al. MKP1 mediates chemosensitizer effects of E1a in response to cisplatin in non-small cell lung carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44095-107, Dec 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26689986> >.

COHEN, R. et al. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 16832-47, Jul 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26164081> >.

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

CROONQUIST, P. A. et al. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2581-92, Oct 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791645> >.

DE SOUSA CAVALCANTE, L.; MONTEIRO, G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. **Eur J Pharmacol**, v. 741, p. 8-16, Oct 2014. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25084222> >.

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

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473> >.

FUJIMOTO, S. et al. Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. **Life Sci**, v. 87, n. 23-26, p. 679-85, Dec 2010. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934436> >.

FURUKAWA, 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**, v. 18, n. 8, p. 1034-42, Aug 2005. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832194> >.

\_\_\_\_\_. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. **Am J Pathol**, v. 162, n. 6, p. 1807-15, Jun 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759238> >.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-9, Nov 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516961> >.

GONG, J. et al. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2529-41, May 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796733> >.

HAAGENSON, K. K.; WU, G. S. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 1, p. 143-9, Mar 2010. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111893> >.

HE, X. Y.; YUAN, Y. Z. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 32, p. 11241-8, Aug 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25170208> >.

HIDALGO, M. Pancreatic cancer. **N Engl J Med**, v. 362, n. 17, p. 1605-17, Apr 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427809> >.

HITOSUGI, T.; CHEN, J. Post-translational modifications and the Warburg effect. **Oncogene**, v. 33, n. 34, p. 4279-85, Aug 2014. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096483> >.

HITOSUGI, T. et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. **Sci Signal**, v. 2, n. 97, p. ra73, Nov 2009. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920251> >.

HOWLADER, N. et al. Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 20, p. 1584-98, Oct 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937991> >.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 225-36, Jan 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834742> >.

IANSANTE, V. et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. **Nat Commun**, v. 6, p. 7882, Aug 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26258887> >.

IODICE, S. et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. **Langenbecks Arch Surg**, v. 393, n. 4, p. 535-45, Jul 2008. ISSN 1435-2451. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193270> >.

JAMES, N. E. et al. Human Epididymis Secretory Protein 4 (HE4) Compromises Cytotoxic Mononuclear Cells via Inducing Dual Specificity Phosphatase 6. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 216, 2019. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30941033> >.

JOHNSON, D. S.; CHEN, Y. H. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 4, p. 458-63, Aug 2012. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401931> >.

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

KALTENMEIER, C. T. et al. A Tumor Cell-Selective Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases Sensitizes Breast Cancer Cells to Lymphokine-Activated Killer Cell Activity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 361, n. 1, p. 39-50, 04 2017. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154014> >.

KEYSE, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 2, p. 253-61, Jun 2008. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18330678> >.

KHADIR, A. et al. MAP kinase phosphatase DUSP1 is overexpressed in obese humans and modulated by physical exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 1, p. E71-83, Jan 2015. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370852> >.

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

KOCH, A. et al. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32748-60, Oct 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26293674> >.

KOLTERMAN, O. G. et al. Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. **J Clin Invest**, v. 65, n. 6, p. 1272-84, Jun 1980. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6997333> >.

KOROTCHENKO, V. N. et al. In vivo structure-activity relationship studies support allosteric targeting of a dual specificity phosphatase. **Chembiochem**, v. 15, n. 10, p. 1436-45, Jul 2014. ISSN 1439-7633. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909879> >.

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

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

KUMARI, S. et al. MUC13 contributes to rewiring of glucose metabolism in pancreatic cancer. **Oncogenesis**, v. 7, n. 2, p. 19, Feb 2018. ISSN 2157-9024. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467405> >.

LAWAN, A. et al. Hepatic mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 selectively regulates glucose metabolism and energy homeostasis. **Mol Cell Biol**, v. 35, n. 1, p. 26-40, Jan 2015. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312648> >.

LIAO, Q. et al. Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1830-45, Jun 2003. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806617> >.

LIAO, W. C. et al. Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 11, p. 1095-1103, Oct 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035532> >.

LIU, F. et al. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84982, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24409315> >.

LUCCI, M. A. et al. Expression profile of tyrosine phosphatases in HER2 breast cancer cells and tumors. **Cell Oncol**, v. 32, n. 5-6, p. 361-72, 2010. ISSN 1875-8606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413845> >.

LUO, J. et al. High Glucose-Induced ROS Production Stimulates Proliferation of Pancreatic Cancer via Inactivating the JNK Pathway. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 6917206, 2018. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30584464> >.

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

MACKEY, J. R. et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4349-57, Oct 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766663> >.

MCCARTHY, N. Tumorigenesis: oncogene detox programme. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 9, p. 622-3, Jul 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779002> >.

MODELELL, I.; GUARNER, L.; MALAGELADA, J. R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. **Ann Oncol**, v. 10 Suppl 4, p. 82-4, 1999. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436792> >.

MOLINA, G. et al. Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 9, p. 680-7, Sep 2009. ISSN 1552-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578332> >.

MONCHO-AMOR, V. et al. DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 6, p. 668-78, Feb 2011. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890299> >.

NEOPTOLEMOS, J. P. et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, n. 10073, p. 1011-1024, 03 2017. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129987> >.

NUNES-XAVIER, C. et al. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 1, p. 109-32, Jan 2011. ISSN 1875-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288197> >.

OGRUNC, M. et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 6, p. 998-1012, Jun 2014. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583638> >.

- OKUDELA, K. et al. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. **Am J Pathol**, v. 175, n. 2, p. 867-81, Aug 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608870> >.
- OTTENHOF, N. A. et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 3, p. 375-81, Mar 2009. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19260743> >.
- PAPA, S.; CHOY, P. M.; BUBICI, C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. **Oncogene**, v. 38, n. 13, p. 2223-2240, 03 2019. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30487597> >.
- PARK, J. et al. TGF- $\beta$ 1 and hypoxia-dependent expression of MKP-1 leads tumor resistance to death receptor-mediated cell death. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e521, Feb 2013. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449457> >.
- PATTERSON, K. I. et al. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. **Biochem J**, v. 418, n. 3, p. 475-89, Mar 2009. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228121> >.
- PORTA, M. et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. **Clin Transl Oncol**, v. 7, n. 5, p. 189-97, Jun 2005. ISSN 1699-048X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960930> >.
- PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761-74, Oct 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993244> >.
- RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J Endocrinol**, v. 223, n. 3, p. R49-62, Dec 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271217> >.
- RAHIB, L. et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. **Cancer Res**, v. 74, n. 11, p. 2913-21, Jun 2014. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840647> >.
- RAMKISSOON, A. et al. Targeted Inhibition of the Dual Specificity Phosphatases DUSP1 and DUSP6 Suppress MPNST Growth via JNK. **Clin Cancer Res**, Apr 2019. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30936125> >.
- RAMNARAIN, D. B. et al. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 2, p. 867-74, Jan 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424019> >.
- REAL, F. X.; CIBRIÁN-UHALTE, E.; MARTINELLI, P. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. **Gastroenterology**, v. 135, n. 3, p. 724-8, Sep 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692502> >.
- SCHEFFZEK, K. et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 333-8, Jul 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219684> >.

- SEMENZA, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 51-6, Feb 2010. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942427> >.
- SHAREN, G. et al. Prognostic value of GLUT-1 expression in pancreatic cancer: results from 538 patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19760-19767, Mar 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28178665> >.
- SHEN, W. H. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: a novel transcription target of p53 in apoptosis. **Cancer Res**, v. 66, n. 12, p. 6033-9, Jun 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778175> >.
- SHIN, J. W. et al. BCl induces apoptosis via generation of reactive oxygen species and activation of intrinsic mitochondrial pathway in H1299 lung cancer cells. **Sci China Life Sci**, v. 61, n. 10, p. 1243-1253, Oct 2018. ISSN 1869-1889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29524123> >.
- SHOJAEI, S. et al. Erk Negative Feedback Control Enables Pre-B Cell Transformation and Represents a Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 28, n. 1, p. 114-28, Jul 2015. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073130> >.
- SHUKLA, S. K. et al. MUC16-mediated activation of mTOR and c-Myc reprograms pancreatic cancer metabolism. **Oncotarget**, v. 6, n. 22, p. 19118-31, Aug 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046375> >.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998> >.
- SINN, M. et al. CONKO-005: Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine Plus Erlotinib Versus Gemcitabine Alone in Patients After R0 Resection of Pancreatic Cancer: A Multicenter Randomized Phase III Trial. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 29, p. 3330-3337, Oct 2017. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817370> >.
- STATHIS, A.; MOORE, M. J. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 3, p. 163-72, Mar 2010. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101258> >.
- STEELMAN, L. S. et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, v. 18, n. 2, p. 189-218, Feb 2004. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737178> >.
- TEMPERO, M. A. et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 15, n. 8, p. 1028-1061, 08 2017. ISSN 1540-1413. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784865> >.
- UEDA, K.; ARAKAWA, H.; NAKAMURA, Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. **Oncogene**, v. 22, n. 36, p. 5586-91, Aug 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944906> >.
- UENO, H. et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. **Br J Cancer**, v. 101, n. 6, p. 908-15, Sep 2009. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690548> >.

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

VASAIKAR, S. V. et al. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D956-D963, Jan 2018. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29136207> >.

VICENT, S. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 11, p. 3639-49, Jun 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173070> >.

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

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

\_\_\_\_\_. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 34, p. 4548-54, Dec 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969517> >.

WANG, J.; FORD, H. R.; GRISHIN, A. V. NF-kappaB-mediated expression of MAPK phosphatase-1 is an early step in desensitization to TLR ligands in enterocytes. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 5, p. 523-34, Sep 2010. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555314> >.

WANG, J. et al. Involvement of MKP-1 and Bcl-2 in acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 19, p. 3191-8, Oct 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755862> >.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 1956. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> >.

WARMKA, J. K.; MAURO, L. J.; WATTENBERG, E. V. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 is a tumor promoter target in initiated cells that express oncogenic Ras. **J Biol Chem**, v. 279, n. 32, p. 33085-92, Aug 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159408> >.

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. **Sci STKE**, v. 1999, n. 1, p. PE1, Sep 1999. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865181> >.

WU, Q. N. et al. Pharmacological inhibition of DUSP6 suppresses gastric cancer growth and metastasis and overcomes cisplatin resistance. **Cancer Lett**, v. 412, p. 243-255, 01 2018. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050982> >.

WU, Z. et al. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3901-11, Nov 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921625> >.

XU, H. et al. Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 43, p. 36013-8, Oct 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16126724> >.

XU, S. et al. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. **J Hum Genet**, v. 50, n. 4, p. 159-67, 2005. ISSN 1434-5161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824892> >.

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

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

## **8. ANEXO**

### **8.1. Manuscrito publicado do presente estudo**

#### **DUSP1 modulates the proliferative capacity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by regulating glucose metabolism**

**Pamela Viani de Andrade<sup>1</sup>, Vanessa da Silva Silveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Genetics, Ribeirao Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, Brazil.

Avenida Bandeirantes, 3900 – 14049-900

Ribeirão Preto – São Paulo

+55 16 33153152

Main author: Pamela Viani de Andrade – pamelaviani@gmail.com

#### **Abstract**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly lethal cancer characterized by rapid metastasis and resistance to chemotherapy. In ADP, the KRAS mutation is responsible for triggering the process of tumor progression through the activation of important signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and metabolic pathways, such as glycolysis, which through metabolic reprogramming results in the establishment and maintenance of tumor biology. Metabolic reprogramming induced by mutated KRAS appears to be mediated by the activity of ERKs and JNKs, effector molecules of MAPKs, regulated by negative feedback mechanisms controlled by dual-specificity phosphatases (DUSPs). A previous phenotypic screening carried out by our group demonstrated the knockout of DUSP1 and DUSP6 modulated the glucose consumption in PDAC cell lines. Here, our results demonstrate that inhibition of DUSP1 by BCI diminished cell viability, colony formation and

induced apoptosis with decreased reactive oxygen species (ROS) production also effectively modulating glucose uptake followed by increased activation of the JNK and p38 pathways. BCI also enhanced gemcitabine cytotoxicity at pharmacological concentrations in the PDAC cell lines. Our results suggest that the use of DUSP inhibitor in ADP is a potential antineoplastic agent that enhances sensitivity to gemcitabine and inhibits the action of these phosphatases in the metabolic reprogramming process.

## **Introduction**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer deaths presenting one of the worst prognoses, with a 5-year overall survival of only 8% (1). The reasons for this low survival include the lack of early symptoms that allow the early diagnosis, the high resistance of the tumor to the chemotherapy treatment and the metastatic capacity of the tumor cells during the development of the disease, resulting in an already advanced disease in the moment of the diagnosis (2, 3). Nowadays, the chemotherapeutic agent of choice for the treatment of PDAC is the cytotoxic agent gemcitabine but the greatest difficulty in achieving satisfactory treatment results is probably attributed to the biological and genetic complexity of PDAC (4, 5).

Among all the genetic alterations associated with PDAC, activation of the *KRAS* oncogene is the most frequent and is present in approximately 95% of cases, leading to the activation of multiple signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs). MAPKs are grouped into three families: ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 (stress-activated kinases) which modulates essential cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, alteration of the tumor microenvironment, immune response evasion, cell migration, metabolic reprogramming, among others (6, 7).

For the maintenance and progression of cancer, specific mutations are required for the tumor cells be able to obtain the energy supply and use it efficiently. Therefore, they coordinate important metabolic pathways to support high cell proliferation in an environment with low

oxygen concentration (8). To achieve that, tumor cells are reprogrammed metabolically and instead of using oxidative phosphorylation, tumor cells activate glycolysis and lactate secretion to produce adenosine triphosphate (ATP), a mechanism known as the "Warburg Effect"(9). This effect occurs through the interaction of several signaling proteins involved with cell proliferation that also regulates metabolic pathways present in several tumor types (10). One of this protein is KRAS responsible for the development, maintenance and regulation of the metabolism in PDAC, being demonstrated that ERKs and JNKs pathways are the ones involved in the process of metabolic reprogramming (11, 12).

To control the activity of these complex interaction networks, the MAPK pathways are regulated by negative feedback mechanisms controlled by protein phosphatases, such as dual specificity phosphatases (DUSPs), some evidence correlates the altered expression of some DUSPs with the process of induction and tumor progression, suggesting that these phosphatases may act as important tumor regulators (13). In pancreatic cancer, a study demonstrated that inhibition of DUSP1 leads to sensitivity to treatment with gemcitabine (14). In the last years, an inhibitor of DUSP1 and DUSP6, the (E) -2-benzylidene-3-(cyclohexylamino) -2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI) inhibitor has been investigated as a treatment in several tumors (15-17).

The goal of this study was to assess the effects of BCI in PDAC cells. Inhibition of DUSP1 by BCI diminished cell viability, colony formation and induced apoptosis with decreased reactive oxygen species (ROS) production in both PDAC cell lines, MIA PaCa-2 and PANC-1. Associated with loss of cell viability, an increase in glucose uptake after treatment with BCI in the MIA PaCa-2 cell line and a decrease in uptake in the PANC-1 cell line was observed, but no lactate production in both cell lines. Additionally, the treatment induced an activation of MAPK pathways such as JNK and p38 in both cell lines. In addition, when combined with the chemotherapeutic agent gemcitabine, BCI acted synergistically by decreasing the cell viability of the cell lines and increasing the rates of apoptosis death. All of these data suggest that BCI may be a potential drug for adjuvant treatment and may actually

be considered an important antineoplastic therapeutic agent to enhance sensitivity to gemcitabine with consequent modulation in the energy metabolism of ADP.

## **Materials and methods**

### **Cell culture and drugs**

The PDAC cell lines, MIA PaCa-2 and PANC-1 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS), and kept in a 37 °C humidified incubator in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. BCI and gemcitabine were purchased from Sigma Aldrich Co. Stock solutions of BCI (5 mM) in dimethyl sulfoxide (DMSO) were stored at 4°C and stock solution of gemcitabine (5mM) in water were stored at room temperature. Drugs were diluted in DMEM medium immediately before use at the indicated concentrations. Maximum amount of 0.1% DMSO was used in the experiments.

### **Cell viability assay**

Cell viability was measured by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded at  $2.5 \times 10^3$  per well in 96-wells plates and maintained in culture. After 24h, cells were treated with BCI, and/or gemcitabine at different doses and time points. After each time point, 10 $\mu$ L of MTT was added directly to the medium and after 4h the absorbance of each well was determined at 570 nm using an iMarkmicroplate reader (BioRad, Hercules, California, USA).

### **Colony formation assay**

For colony formation assay, cell lines were seeded in a 6-well plate at a density of 250 cells per well for MIA PaCa-2 and 500 cells per well for PANC-1. After 24h, cells were treated with BCI at different doses for 48h. After treatment, the culture medium was replaced with a drug-

free medium for incubation for 12 days. Colonies were fixed with methanol and stained with Giemsa. Colonies with more than 50 cells were scored.

### **Apoptosis assessment by annexin V/propidium iodide staining**

Apoptotic cells were identified by annexin V FITC (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA) and PI (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA).

Cells were seeded at  $2 \times 10^5$  in a 6-well plate and after 24h, cells were treated with BCI and/or gemcitabine at different doses and time points. After treatment cells were harvested and washed three times with cold PBS. Cells were resuspended in annexin-binding buffer and 5  $\mu$ l of Annexin V-FITC and 50  $\mu$ M of PI were added before being analyzed by flow cytometry.

### **Detection of intracellular levels of ROS**

CellROX® Deep Red Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc., Waltham, MA, USA) was used to evaluate ROS production. Cells were seeded at  $2 \times 10^5$  in a 6-well plate and after 24h cells were treated with  $IC_{50}$  values of BCI for 24h. After treatment, 5 $\mu$ M of the reagent was directly added to the medium for 30 min. Cells were harvested and washed twice with cold PBS and fluorescence was analyzed by flow cytometry.

### **Glucose uptake assay**

Glucose uptake was measured by a non-metabolizable glucose analog, 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientifics, Inc., Waltham, MA, USA). Cells were seeded at  $2 \times 10^5$  per well in a 6-well plate and after 24h cells were treated with  $IC_{50}$  values of BCI for 48h. After treatment cells were harvested and washed with PBS, then 50 $\mu$ M of 2NBDG was added to the cells and incubated for 30 min in a 37°C warm bath. Cells were then washed twice with cold PBS and fluorescence was analyzed by flow cytometry.

### **Lactate production assay**

Lactate production was measured by bioluminescent *Lactate Glo*<sup>™</sup> Assay (#J5021, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Cells were seeded at  $2.5 \times 10^3$  per well in 96-wells plates and after 24h cells were treated with with  $IC_{50}$  values of BCI for 48h. After treatment cell medium was harvested and reagents were added to measure lactate production according to the to the manufacturer's instructions. Luminescence was analyzed VICTOR multilabel plate reader.

### **Western Blotting**

Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #9101; anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) #9102; anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) #9251; anti-SAPK/JNK #9252; anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211; anti-p38 MAPK #9212 all purchased from Cell Signalling (Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-vinculin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Equal amounts of protein (60µg) were size-fractionated by 10% SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane (AmershamHybond ECL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), and incubated in Tris-buffered saline-0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. After blocking and washing in TBS-T with 0.1% Tween 20 for 30 min, each membrane was incubated overnight with appropriately diluted primary antibodies. After incubation, the membrane was washed three times in TPBS-T with 0.1% Tween 20 and bound to a biotinlabeled horseradish peroxidase-conjugated species-specific secondary antibody (1:10 000) (AbCam, San Francisco, California, USA). The complexes were visualized using an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham, Uppsala, Sweden).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out using one-way or two-way analysis of variance, followed by Bonferroni's test, as appropriate. A  $p$  value of less than

0.05 was considered to be statistically significant. Data analysis was carried out using the SPSS 22.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Graph Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **Results**

### ***DUSP1* and *DUSP6* knockout modulates glucose uptake**

In order to investigate whether DUSP phosphatases participate in the process of energy metabolism in PDAC, a previous phenotypic screening was carried out by our group using the CRISPR/Cas9 gene editing technique to measure the metabolic reprogramming through a glucose uptake assay, in the PDAC cell lines, MIA PaCa-2 and PANC-1. It was observed that among the several DUSP family genes that was involved in diminished glucose uptake after knockout, the phosphatases that presented a significant difference were *DUSP1* and *DUSP6* in those cell lines (Data no shown).

These results prompted us to investigate the gene expression of *DUSP1* and *DUSP6* in those cell lines. The expression of *DUSP1* is elevated in both cell lines, with higher expression in MIA PaCa-2. The expression of *DUSP6* is extremely low in MIA PaCa-2 as previously demonstrated (18) and PANC-1 has the same expression as the tumor free samples (data not shown).

According to these results, we decided to investigate the role of the regulatory activity of *DUSP1* and *DUSP6* in the process of metabolic reprogramming and aggressiveness in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

### **BCI inhibits cell viability and colony formation of PDAC cells in a dose-dependent manner**

Considering that DUSP1 and DUSP6 may play an important role in the glucose uptake process, BCI was chosen to modulate the activity of DUSP1 and DUSP6. The impact of BCI treatment and consequent modulation of DUSP1 and DUSP6 on cell viability was evaluated. MTT assays demonstrated that cell viability was significantly decreased by BCI treatment in a dose and time-dependent manner in both cell lines. In MIA PaCa-2, a significant reduction in viability was observed after 24h, 48h and 72h treatment with 2.5  $\mu\text{M}$  (**Fig. 1A**). In PANC-1, a significant reduction in viability was observed at all treatment times beginning with 1  $\mu\text{M}$  (**Fig. 1B**).  $\text{IC}_{50}$  values of BCI were calculated for each cell line, using the program Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA)  $\text{IC}_{50}$  is defined as the concentration required for a 50% reduction in cell viability. In addition, colony formation assays demonstrated a significantly decrease in colony number in a dose-dependent manner. BCI treatment with 1  $\mu\text{M}$  was approximately 100% and 90% after treatment in MIA PaCa-2 ( $p \leq 0.001$ ) and PANC-1 ( $p \leq 0.003$ ) respectively (**Fig. 2A and Fig. 2B**).

### **Inhibition of DUSP1 and DUSP6 by BCI modulates glucose uptake with no difference in lactate production**

To validate the findings in the phenotypic screening we next investigated the inhibition of DUSP1 and DUSP6 on glycolytic properties of PDAC cells on glucose and lactate assays performed in MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines after BCI treatment. MIA PaCa-2 and PANC-1 were treated with BCI  $\text{IC}_{50}$  values (concentrations of 1.9  $\mu\text{M}$  and 4.7  $\mu\text{M}$ , respectively) for 48h. After BCI treatment, a significant 30% increase in glucose uptake in MIA PaCa-2 was observed ( $p=0.001$ ) (**Fig 3A**). On the contrary, an opposite effect was observed in PANC-1; the inhibition of DUSP1 and DUSP6 caused a significant reduction of 20% in glucose uptake ( $p=0.002$ ) (**Fig. 3B**). To evaluate whether altered glucose uptake after treatment with BCI would alter lactate production, the same BCI treatment was also performed for 48 h in both cell lines. However, it was observed that lactate production in both cell lines was not modulated after DUSP1 and DUSP6 inhibition by BCI treatment (**Fig4A and Fig.4B**). These data show

that the pharmacological inhibition of DUSP1 and DUSP6 may present different results from those demonstrated in the phenotypic screening. It is important to emphasize that in the screening it was performed an individual gene inhibition of each phosphatase while the pharmacological inhibition targets the two phosphatases. These assays, although with distinct results, point out that these phosphatases may indeed play a relevant role in the metabolic process of glucose in PDAC cells.

### **Inhibition of DUSP1 and DUSP6 by BCI activated MAPK pathways**

Considering that DUSP1 and DUSP6 may act on different substrates and BCI can inhibit both phosphatases, we investigated which MAPK pathways would be modulated in the cellular context of PDAC. The inhibitory capacity of BCI and its impact on the activation of the main MAPKs: ERK, JNK and p38 in MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines was evaluated. In this assay, it was used the BCI IC<sub>50</sub> values for the treatment of MIA PaCa-2 and PANC-1 (concentrations of 1.9 µM and 4.7 µM, respectively) at 5 min, 15 min, 30 min and 1h. In MIA PaCa-2 it was observed that treatment with BCI had a significant effect mainly on the activation of P-JNK and P-p38, both targets of DUSP1. Activation was observed by increased phosphorylation from 15 min of treatment for both MAPKs, and activation of ERK, the main substrate of DUSP6, was not altered after treatment at the same times (**Fig. 5A**). In PANC-1 the same results are observed. JNK activation was observed after 5min of BCI treatment, as well as activation of p38. There was an increase in ERK phosphorylation between 5 and 15min, but the activation was not so evident in the other analyzed times (**Fig. 5B**).

### **BCI induced apoptosis and decreased reactive oxygen species (ROS) production in PDAC cells**

Whereas the inhibition of DUSP1 and DUSP6 by BCI caused the activation of JNK and p38, we next investigated cellular mechanisms regulated by these MAPKs and among them

the main process is the control of cell death by apoptosis. Thus, to assess whether inhibition of DUSPs and the consequent modulation of JNK and p38 could impact the cell death process, we carried out a flow cytometry analysis to test a pro-apoptotic effect of BCI in PDAC cells. The apoptosis assay was performed after BCI treatment for 48h (IC<sub>50</sub> values concentrations of 1.9  $\mu$ M for MIA PaCa-2 and 4.7  $\mu$ M for PANC-1). Annexin-V/PI dual staining in both cell lines demonstrated that BCI induced a decrease in cell viability by inducing apoptosis. MIA PaCa-2 showed a cell death rate of approximately 30% ( $p = 0.001$ ) (**Fig. 6A**) and PANC-1 a cell death rate of 80% ( $p = 0.0001$ ) (**Fig. 6B**). ROS have been reported to be involved in the antitumor activity of BCI in different tumors (15, 16). To explore the effects of BCI on the redox state of PDAC cells, we used a fluorescent assay to monitor the intracellular ROS level in MIA PaCa-2 and PANC-1 cells after 24h of BCI treatment (IC<sub>50</sub> calculated for both MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines). It was observed that both cell lines presented a significant reduction in ROS production after BCI treatment (**Fig. 7A and Fig. 7B**). These results demonstrate that BCI plays a significant role in the redox imbalance of PDAC cells.

### **BCI enhances chemosensitivity to gemcitabine in PDAC cells**

To examine the capacity of BCI to sensitize PDAC cells to gemcitabine, assays were carried out involving a combination of BCI and gemcitabine with different doses. First, we studied the effects of these chemotherapeutic agents alone on MIA PaCa-2 and PANC-1 viability to determine the doses for the combination analysis (**Fig. 1A and Fig.1B**, data not shown for gemcitabine assay). The combination of BCI with gemcitabine showed synergistic effects (with CI values below 1) (**Fig. 8A and 8B**). The effects between BCI and gemcitabine combination were analyzed using the Calcsyn program.

To enhance the relevance of our drug combination studies, we investigated the sensitization capacity of BCI in the apoptosis assay. MIA PaCa-2 and PANC-1 cells were treated as described. The doses used were gemcitabine IC<sub>50</sub> for 72h and BCI IC<sub>50</sub> for 24h, for the combination cells were treated for a period of 48h with doses of gemcitabine (3  $\mu$ M for MIA

PaCa-2 and 53  $\mu$ M for PANC-1) after 48h the dose of BCI (4  $\mu$ M for MIA PaCa-2 and 3  $\mu$ M for PANC-1) was added in the same medium, thus completing a treatment of 72h of gemcitabine and 24h of BCI. In MIA PaCa-2 the combined treatment of gemcitabine followed by BCI caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the percentage of apoptotic cells and showed a superior effect on the induction of apoptosis when compared to treatment with gemcitabine or BCI alone (**Fig. 9A**). On the contrary, in PANC-1 both the treatment with gemcitabine alone and the combined treatment of BCI and gemcitabine were equally efficient in the induction of apoptosis ( $p < 0.05$ ). In this case, the combination of drugs did not have a superior effect and did not potentiate the effect of gemcitabine alone (**Fig. 9B**).

## Discussion

PDAC represents one of the most lethal forms of cancer in the world presenting one of the worst prognoses, with a 5-year overall survival of only 8% (19). The process of PDAC tumor progression is triggered by the mutation of the *KRAS* gene being the first critical molecular alteration that initiates tumorigenesis through the activation of important signaling pathways such as MAPKs (6). In this process, the oncogenic KRAS protein is also responsible for the regulation of metabolic pathways such as glycolysis, important for the establishment and maintenance of the tumor (10). In PDAC cells the activation of glycolysis is modulated, among other mechanisms, by the activity of MAPK effector proteins, such as ERK and JNK (11, 12). DUSPs negatively regulate MAPKs and therefore are directly involved in the activity of important effector proteins, being dysregulated in several tumor types, as well as in PDAC (20).

A previous phenotypic screening for glucose uptake carried out by our group demonstrated that DUSP1 and DUSP6 knockout significantly decreased glucose uptake in PDAC cell line, suggesting that among the genes of the DUSP family, these phosphatases are involved in this process. Gene expression analysis, demonstrated that *DUSP1* displays a high

expression profile in the MIA PaCa-2 and PANC-1 lines, which was not observed in *DUSP6* expression, especially in MIA PaCa-2 where *DUSP6* expression is practically inactivated.

Similar to our study, *DUSP1* has been described highly expressed in several tumors including pancreatic carcinoma (21, 22). On the contrary, the expression profile of *DUSP6* may vary according to tumor type, suggesting that this phosphatase may exert both tumor suppressor and oncogene function. The pattern of *DUSP6* expression in pancreatic cancer was best explored and some studies have demonstrated that expression may vary according to the stage of tumor progression, displaying high patterns in precursor lesions whereas in established carcinoma the reduction of expression is observed (23, 24). This loss of *DUSP6* expression in MIA PaCa-2 is due to hypermethylation of CpG sequences in the gene promoter. This data was confirmed by treatment with the demethylating agent 5-azacytidine, which restored the expression of *DUSP6* in this cell line (18).

These data suggest that in fact, these phosphatases play a relevant role in the tumor process of PDAC, acting, as important regulators of the tumorigenic process and should be better investigated. Thus, we decided to study the modulation of these molecules using a pharmacological inhibitor, a *DUSP1* and *DUSP6* inhibitor named BCI was chosen to evaluate the cellular response of the PDAC cell lines, MIA PaCa-2 and PANC-1 against inhibition of these phosphatase.

Here, we demonstrated that BCI inhibitor decreased cell viability and colony formation followed by induction of apoptosis with decreased ROS production in both lines suggesting that inhibition of *DUSP1* and *DUSP6* activity by BCI treatment can reduce viability and induce cell death in PDAC. These findings are of great relevance, since the induction of apoptosis death is one of the desired effects for the treatment of tumor cells with target-specific drugs.

The results observed are in agreement with those recently published on the effects of BCI on cell viability and induction of apoptosis both *in vivo* and *in vitro* in different tumors with similar doses. Also demonstrating a modulation in the expression of important pro- and anti-apoptotic proteins, such as increased Bax, cleaved caspase-3 and PARP and decreased Bcl-2 expression (15, 16, 25, 26).

BCI treatment caused a reduction in ROS production in both cell lines. Contrary to what most published studies report, these data suggest that ROS may not play a direct role in mediating BCI-induced antiproliferative and cytotoxic effects in PDAC cells. In breast cancer, A BCI analog, also a decreased ROS production after treatment (27). The same effects were reported in PDAC, where treatments with Nexrutine®, a natural analgesic and metformin, also induced apoptosis with decreased production of ROS, but in metformin treatment the decreased production of ROS was associated with low expressions of NOX2 and NOX4 (28, 29).

Which MAPK pathways are affected by the modulation of DUSP1 and DUSP6 by BCI was analyzed. It is known that DUSP1 is only present in the nucleus and dephosphorylates ERK1/2, p38 and JNK, whereas DUSP6 is cytoplasmic and specifically dephosphorylates ERK1/2 (30). We identified a significant activation of phosphorylated JNK in both cell lines, while only a discrete modulation of p38 and ERK was observed, suggesting that the effects of BCI are caused especially by the activation of the JNK pathway. Since MIA PaCa-2 does not have *DUSP6* expression but still presents the same phenotypic effects (under BCI treatment) as PANC-1, our data suggest that in PDAC, the inhibition of DUSP1 and not DUSP6, is the main responsible for the activation of JNK and the antitumor effects caused by the BCI.

Other studies corroborate our findings suggesting that inhibition of DUSP1 activity may rescue the pro-apoptotic activity exerted by JNK pathway. (31, 32). In addition, it is worth noting that DUSP1 and DUSP6 inhibition significantly decreased glucose uptake in PANC-1 cell line, suggesting that these phosphatases may play an important role in the metabolism of glucose in PDAC cells. In MIA PaCa-2, however, BCI treatment increased glucose uptake. No effect on lactate production was observed after treatment. Since MIA PaCa-2 does not show *DUSP6* expression, the negative feedback dependence must be exclusively by DUSP1 activity.

Studies have described the association of JNK pathway with glucose metabolism and corroborate our findings, demonstrating that inhibition of JNK promotes the increase of genes involved in the glycolytic pathway, such as PKM2 (12, 33). DUSPs have not yet been described

in the context of tumor metabolism, but they play a role in insulin metabolism, which may suggest its importance in the metabolic process (34-36).

The combination of BCI and gemcitabine resulted in a synergistic effect with low doses of the two agents in both cell lines and elevated cell death by apoptosis when compared to treatments with gemcitabine or BCI alone in MIA PaCa-2. The effect of BCI combined with other chemotherapeutic agents has also been described (15). Similarly to our results, inhibition of DUSP1 caused the activation of JNK and consequently promoted sensitivity to gemcitabine in PDAC (14) and to other chemotherapeutic agents also through the activation of the JNK and p38 pathways in various tumors (37-39).

Altogether, our study demonstrates that BCI is a potential agent for adjuvant therapy in the treatment of pancreatic adenocarcinoma and may actually be considered an important antineoplastic therapeutic agent to enhance sensitivity to gemcitabine, suggesting an unprecedented mechanism of DUSP1 and DUSP6 inhibition in the process of metabolism reprogramming.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Patrícia Vianna Bonini Palma and Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo, Hemocentro-FMRP-USP, Ribeirão Preto, Brazil, for their assistance with the flow cytometry and Sarah Capelupe Simões, Biochemical Department-FMRPSS-USP, Ribeirão Preto, Brazil, for the assistance with the multilabel plate reader analysis.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

### **Funding**

This study was financial supported from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2015/10694-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

## References

1. 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.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(17):1605-17.
3. Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(3):163-72.
4. 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.* 2013;14(11):1095-103.
5. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:8-16.
6. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321(5897):1801-6.
7. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):761-74.
8. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-9.
9. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
10. Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(2):91-100.
11. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 2012;149(3):656-70.
12. Luo J, Xiang Y, Xu X, Fang D, Li D, Ni F, et al. High Glucose-Induced ROS Production Stimulates Proliferation of Pancreatic Cancer via Inactivating the JNK Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:6917206.

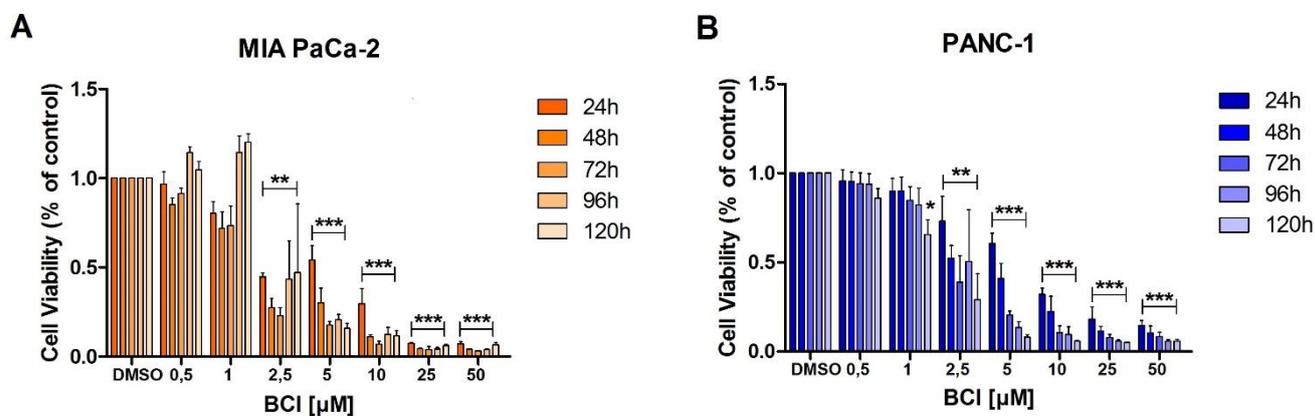
13. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.* 2009;418(3):475-89.
14. Liu F, Gore AJ, Wilson JL, Korc M. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS One.* 2014;9(1):e84982.
15. Wu QN, Liao YF, Lu YX, Wang Y, Lu JH, Zeng ZL, et al. Pharmacological inhibition of DUSP6 suppresses gastric cancer growth and metastasis and overcomes cisplatin resistance. *Cancer Lett.* 2018;412:243-55.
16. Shin JW, Kwon SB, Bak Y, Lee SK, Yoon DY. BCI induces apoptosis via generation of reactive oxygen species and activation of intrinsic mitochondrial pathway in H1299 lung cancer cells. *Sci China Life Sci.* 2018;61(10):1243-53.
17. Korotchenko VN, Saydmohammed M, Vollmer LL, Bakan A, Sheetz K, Debiec KT, et al. In vivo structure-activity relationship studies support allosteric targeting of a dual specificity phosphatase. *Chembiochem.* 2014;15(10):1436-45.
18. Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *J Hum Genet.* 2005;50(4):159-67.
19. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
20. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004;117(6):699-711.
21. Haagenson KK, Wu GS. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(1):143-9.
22. Nunes-Xavier C, Romá-Mateo C, Ríos P, Tárrega C, Cejudo-Marín R, Tabernero L, et al. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(1):109-32.
23. Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, Matsuno S, Horii A. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1807-15.
24. 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.* 2005;18(8):1034-42.

25. Ramkissoon A, Chaney KE, Milewski D, Williams KB, Williams RL, Choi K, et al. Targeted Inhibition of the Dual Specificity Phosphatases DUSP1 and DUSP6 Suppress MPNST Growth via JNK. *Clin Cancer Res.* 2019.
26. James NE, Oliver MT, Ribeiro JR, Cantillo E, Rowswell-Turner RB, Kim KK, et al. Human Epididymis Secretory Protein 4 (HE4) Compromises Cytotoxic Mononuclear Cells via Inducing Dual Specificity Phosphatase 6. *Front Pharmacol.* 2019;10:216.
27. Kaltenmeier CT, Vollmer LL, Verneti LA, Caprio L, Davis K, Korotchenko VN, et al. A Tumor Cell-Selective Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases Sensitizes Breast Cancer Cells to Lymphokine-Activated Killer Cell Activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;361(1):39-50.
28. Gong J, Muñoz AR, Chan D, Ghosh R, Kumar AP. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth. *Oncotarget.* 2014;5(9):2529-41.
29. Cheng G, Lanza-Jacoby S. Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: Role of NOX4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(1):41-6.
30. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* 2013;280(2):489-504.
31. Moncho-Amor V, Ibañez de Cáceres I, Bandres E, Martínez-Poveda B, Orgaz JL, Sánchez-Pérez I, et al. DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2011;30(6):668-78.
32. Shojaee S, Caeser R, Buchner M, Park E, Swaminathan S, Hurtz C, et al. Erk Negative Feedback Control Enables Pre-B Cell Transformation and Represents a Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2015;28(1):114-28.
33. Iansante V, Choy PM, Fung SW, Liu Y, Chai JG, Dyson J, et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun.* 2015;6:7882.
34. Kolterman OG, Insel J, Saekow M, Olefsky JM. Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *J Clin Invest.* 1980;65(6):1272-84.
35. Khadir A, Tiss A, Abubaker J, Abu-Farha M, Al-Khairi I, Cherian P, et al. MAP kinase phosphatase DUSP1 is overexpressed in obese humans and modulated by physical exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(1):E71-83.

36. Lawan A, Zhang L, Gatzke F, Min K, Jurczak MJ, Al-Mutairi M, et al. Hepatic mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 selectively regulates glucose metabolism and energy homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2015;35(1):26-40.
37. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2011;378(9791):607-20.
38. Cimas FJ, Callejas-Valera JL, Pascual-Serra R, García-Cano J, Garcia-Gil E, De la Cruz-Morcillo MA, et al. MKP1 mediates chemosensitizer effects of E1a in response to cisplatin in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncotarget.* 2015;6(42):44095-107.
39. Park J, Lee J, Kang W, Chang S, Shin EC, Choi C. TGF- $\beta$ 1 and hypoxia-dependent expression of MKP-1 leads tumor resistance to death receptor-mediated cell death. *Cell Death Dis.* 2013;4:e521.

## Figures and Legends

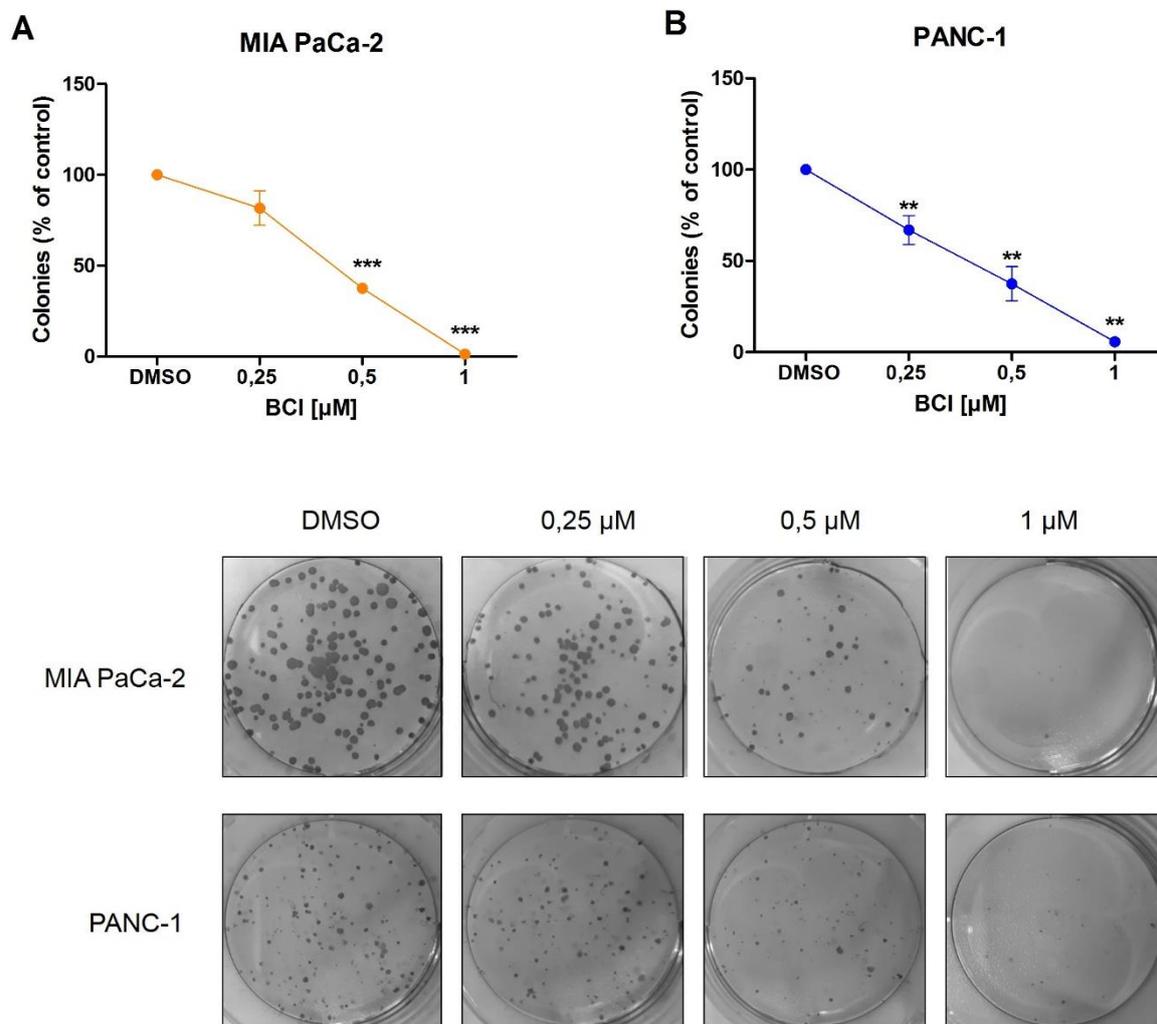
Figure 1.



**Figure 1.** BCI treatment decreases cell viability in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 (A), and PANC-1 (B).

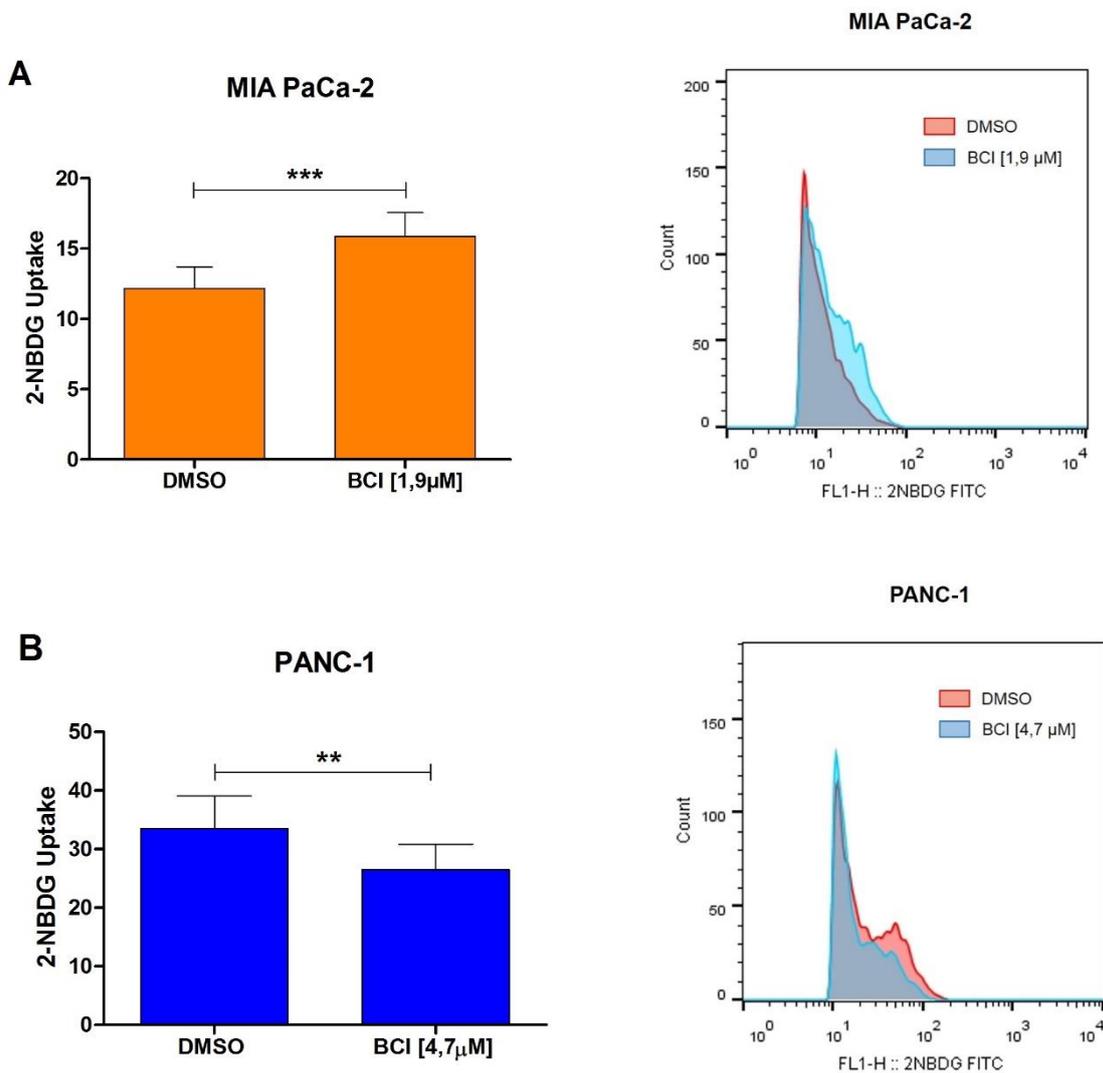
Experiments were repeated three times. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Figure 2.



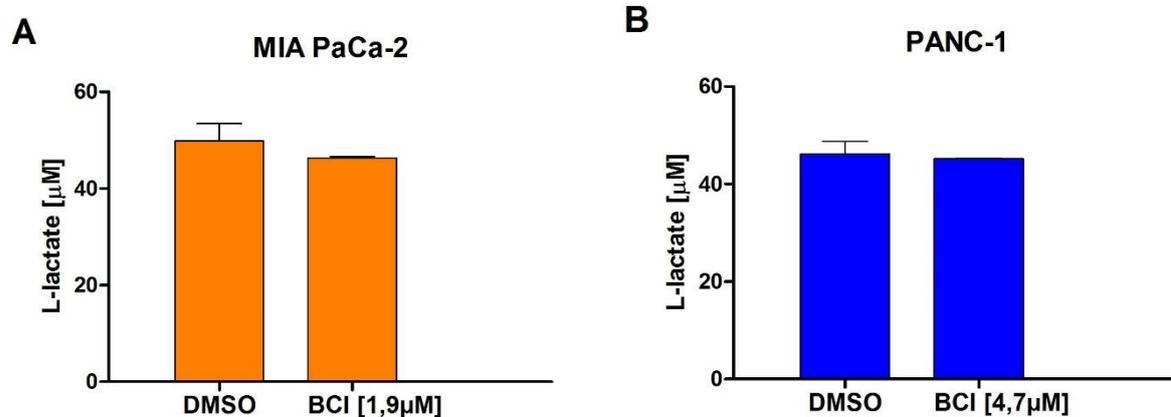
**Figure 2.** BCI treatment decreases colony formation capacity in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 (**A**), and PANC-1 (**B**). Cells were treated for 48h. Experiments were repeated three times. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Figure 3.



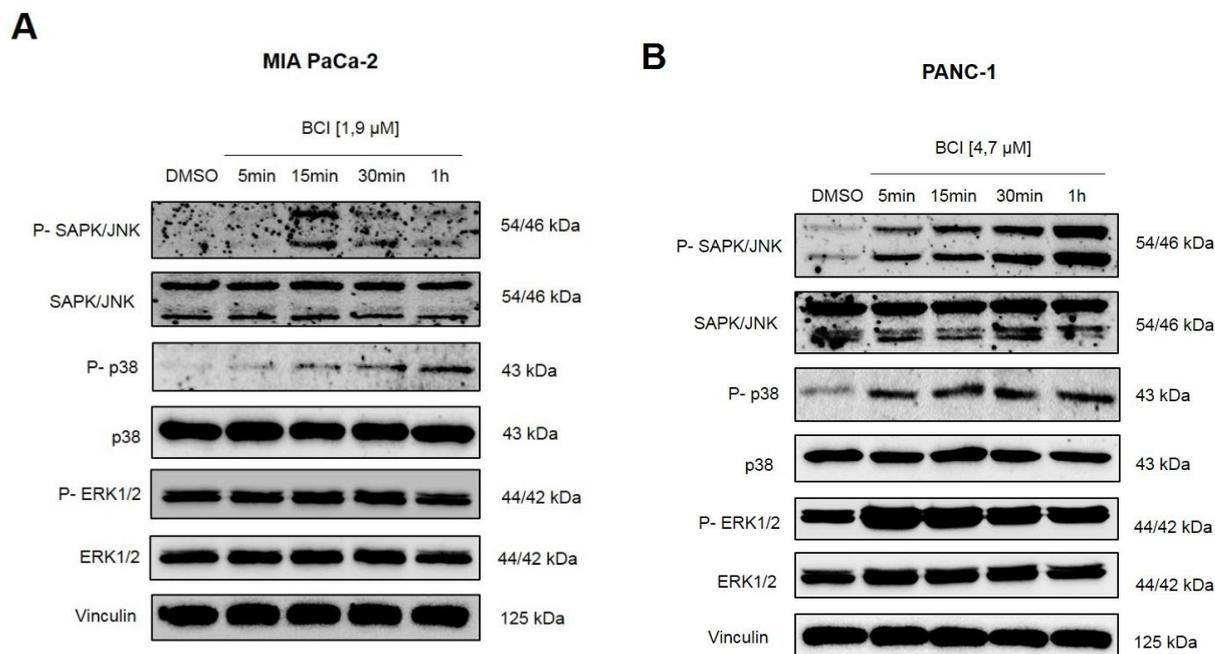
**Figure 3.** BCI treatment decreases glucose uptake in PDAC cell line, MIA PaCa-2 (**A**), but enhances glucose uptake in PANC-1 (**B**). Cells were treated for 48h and glucose uptake was measured. Experiments were repeated two times. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Figure 4.



**Figure 4.** BCI treatment does not modulates lactate production in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 (**A**), and PANC-1 (**B**). Cells were treated for 48h and lactate production was measured. Experiments were repeated two times.

Figure 5.



**Figure 5.** Western Blot analysis of effector proteins involved in MAPKs pathways after BCI treatment in PDAC, MIA PaCa-2 (**A**), and PANC-1 (**B**) cell lines. Cell lines demonstrated activation of P-JNK and P-p38, both targets of DUSP1. In PANC-1 there was an increase in ERK phosphorylation between 5 and 15min, but the activation was not so evident in the other analyzed times.

Figure 6.

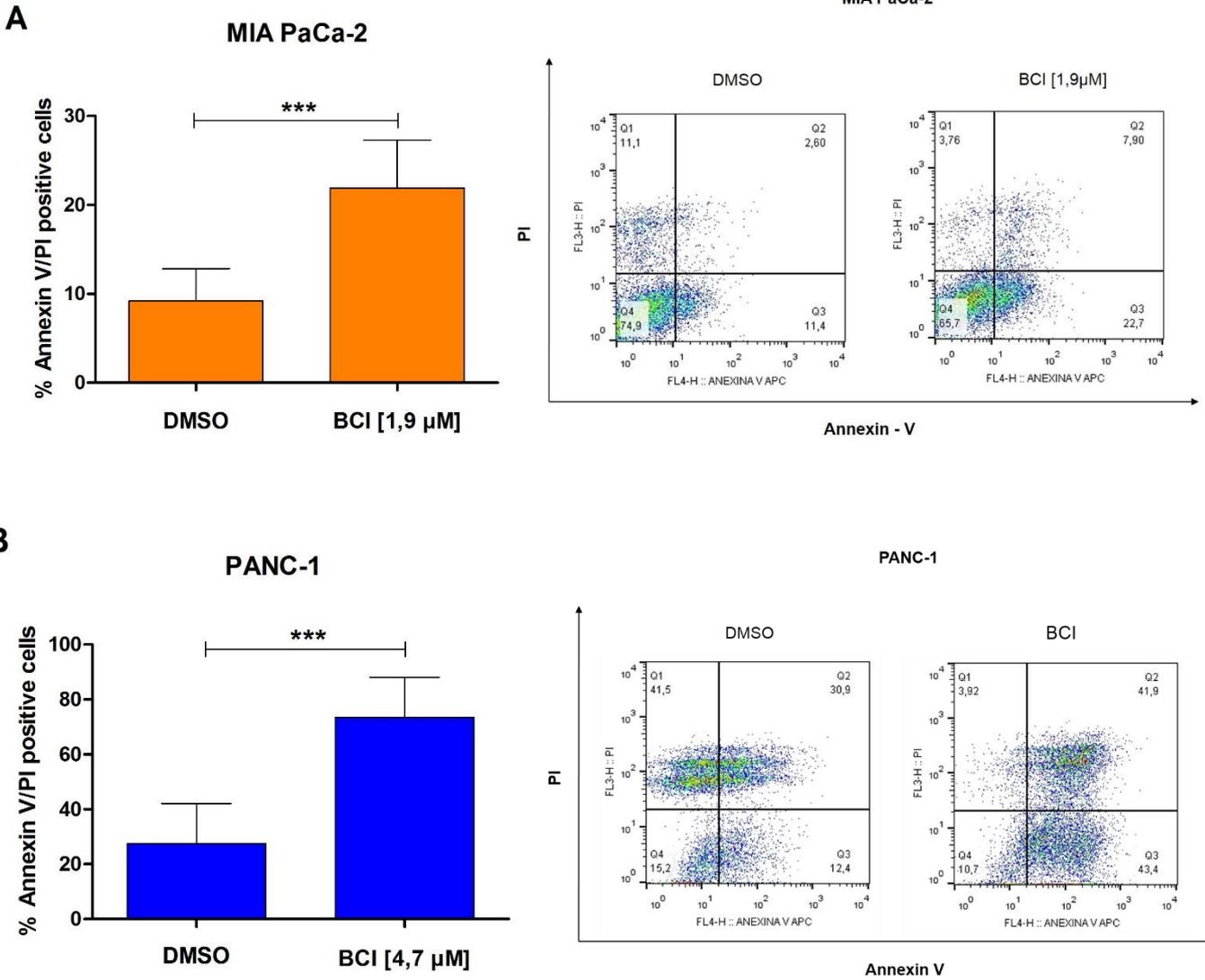


Figure 6. BCI treatment induces apoptosis cell death in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 (A), and PANC-1 (B). Cells were treated for 48h. Experiments were repeated three times. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Figure 7.

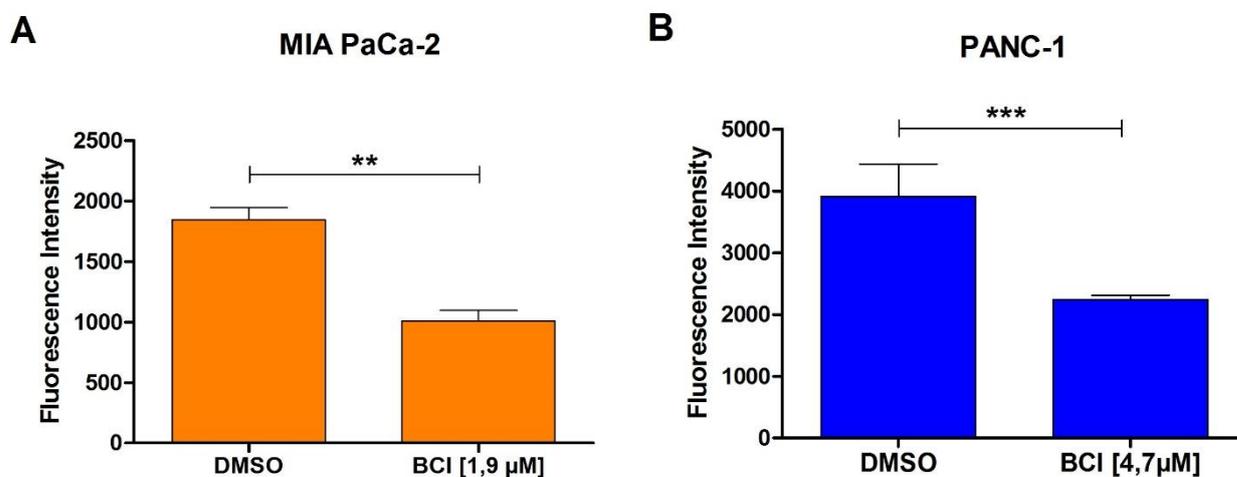
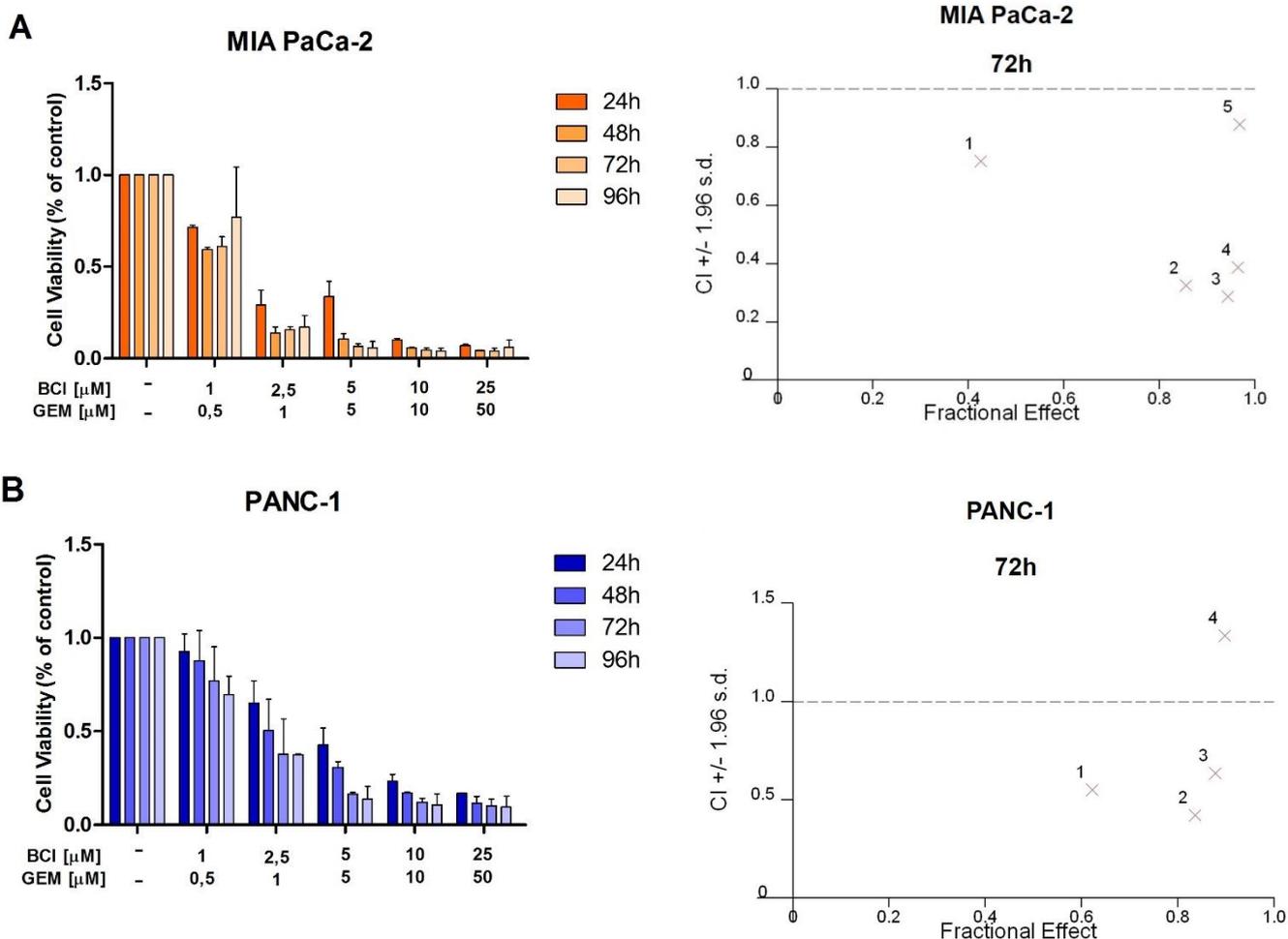


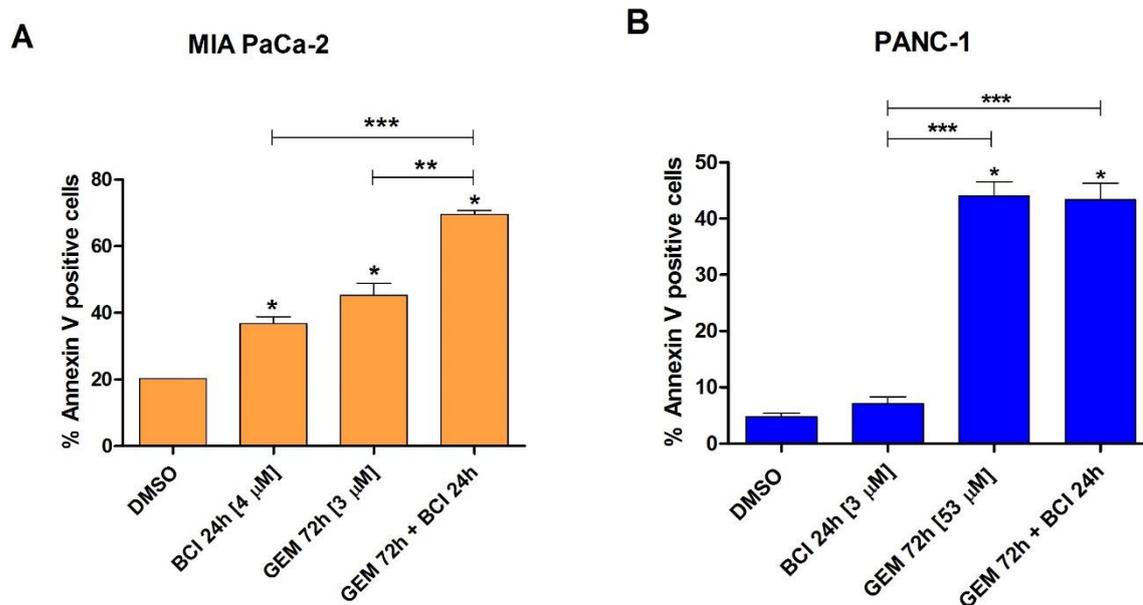
Figure 7. BCI treatment decreases ROS production in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 (A), and PANC-1 (B). Cells were treated for 48h. Experiments were repeated three times. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$

Figure 8.



**Figure 8.** BCI treatment enhances gemcitabine sensitivity displaying synergistic effects (with CI values below 1) in PDAC cell lines, MIA PaCa-2 **(A)**, and PANC-1 **(B)**. Experiments were repeated two times.

**Figure 9.**



**Figure 9.** Percentage of annexin V positive cells after treatment with BCI in monotherapy or combined in PDAC cell lines MIA PaCa-2 **(A)** e PANC-1 **(B)**. For the combination cells were treated for a period of 48h with doses of gemcitabine (3  $\mu$ M for MIA PaCa-2 and 53  $\mu$ M for PANC-1) after 48h the dose of BCI (4  $\mu$ M for MIA PaCa-2 and 3  $\mu$ M for PANC-1) was added in the same medium, thus completing a treatment of 72h of gemcitabine and 24h of BCI. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . Experiments were repeated two times.