

# **A Expressão e Relevância da Proteína IMPACT no Adenocarcinoma de Pâncreas**

**Bárbara de Bellis**

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção  
do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2021

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Bellis, Barbara.**

A expressão e relevância da proteína IMPACT no Adenocarcinoma de Pâncreas / Barbara de Bellis. – São Paulo, 2021. 87f.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.  
Orientador: Glauca Noeli Maroso Hajj.

1. Início da tradução. 2. Adenocarcinoma de Pancreas. 3.IMPACT.

CDU 616

## SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - 2017/10125-6 e 2019/09939-4)

*Nada é tão grande que não possa ser alcançado  
e nada é tão pequeno que não seja importante.*

*Allan Kardek*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que me apoiou e me sustentou na minha jornada material e espiritual até aqui, que não me abandonou nos momentos mais difíceis e que está sempre presente nos momentos mais felizes.

À minha mãe e meu pai que dedicaram tudo que tinham a mim a minha irmã e que fizeram de nós o que somos hoje. À Dona Maúde, a melhor avó que alguém poderia querer que se dedica a mim e a minha irmã de um jeito especial só dela...

À minha irmã querida, que eu amo profundamente e que me inspira a ser a melhor pessoa que eu posso ser. Obrigada Vivi por ser exatamente a pessoa que você é e me dar o privilégio de estar ao seu lado nessa vida.

Ao meu marido, que me apoia e me sustenta em todas as minhas escolhas, que está sempre ao meu lado e que enche minha vida de amor e carinho. Obrigada meu amor por ser essa luz na minha vida.

Aos amigos que fiz durante esses anos de Doutorado e que me ajudaram a crescer como pessoa e como cientista, Fernanda Ferreira, Dimas Pontes e Julia Vassalakis, obrigada meus amigos por me apoiarem nessa jornada, sem vocês eu jamais teria conseguido chegar até o final dessa tarefa, vocês foram um ponto de apoio e carinho na minha vida e pretendo que continuem eternamente. Fe, eu só tenho gratidão por você ter entrado na minha vida, obrigada por todas as risadas, por toda a cumplicidade e carinho, sua presença diária faria muita falta na minha vida. Di, seu lindo, obrigada por todas as conversas e reflexões ao longo

de tantos anos, nossa amizade com certeza fez de mim uma pessoa melhor. Juba minha querida, obrigada pela sua amizade, pelo apoio e por todo o carinho esses anos todos.

À Fernanda Lupinacci, tanto pela amizade quanto por me ensinar quase tudo que sei fazer dentro de um laboratório hoje. Lupi, obrigada por ser minha professora, por toda a paciência e todo carinho em me ensinar e me tornar uma profissional e cientista melhor, sua presença foi um ponto chave na minha formação e eu nunca vou me esquecer disso.

Aos alunos e amigos do CIPE que sempre me acompanharam com tanto carinho, Denise Harumi, Arielly Dahora, Paula Borzino, Adriano Bezerra, Danielle Nascimento e Matheus Lima que fizeram parte da minha jornada e aos quais desejo toda a sorte do mundo!

À Dra. Glauca, minha orientadora, primeiramente pela oportunidade e confiança no meu trabalho, em segundo pela orientação, por me auxiliar no meu desenvolvimento como cientista e aprimoramento do meu pensamento analítico.

Aos técnicos e funcionários do CIPE que passaram pela minha trajetória acadêmica e que me auxiliaram inúmeras vezes, Ederson Barbosa, Felipe Moreira, Danilo Santos e Julia Cassin. Aos funcionários do escritório de projetos e do departamento de Patologia que indiretamente foram fundamentais para o desenvolvimento desse projeto.

As amigas que a vida me trouxe e que são fundamentais, Giovanna Maia e Mila Maria, a amizade de vocês é um porto seguro na minha vida.

Ao Dr. Alexandre André, uma das melhores pessoas que eu conheci, que me deu a oportunidade de rever meus conceitos sobre a vida e de passar meus conhecimentos, obrigada por me mostrar que pessoas como você existem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que ao me conceder a bolsa de doutorado ( processo FAPESP 2019/09939-4) permitiu o desenvolvimento desse projeto.

Às agências CAPES e CNPQ que financiam e apoiam esse e outros trabalhos nas diversas áreas da ciência nesse Brasil.

E por último a Deus, que deu sentido a minha existência ao longo dos anos e que faz com que a cada dia eu acorde tentando ser uma pessoa melhor.

## RESUMO

B. Bellis, A.Oliveira , M. D Begnami, H. C. Freitas, V. R. Martins, M. Roffé e G. M. Hajj. Um dos principais pontos de controle da tradução de mRNAs ocorre através da fosforilação da subunidade alfa do fator de início de tradução eIF2 (eIF2 $\alpha$ ), o que leva à inibição da síntese geral de proteínas. GCN2 é uma das quinases de eIF2 $\alpha$  que responde à carência de aminoácidos e radiação UV, fosforilando eIF2 $\alpha$  e inibindo a tradução geral. Sua atividade depende da união com a proteína GCN1. A proteína IMPACT também interage com GCN1, competindo pela ligação GCN1-GCN2, inibindo a atividade de GCN2 e estimulando a tradução. Através de pesquisas em bancos de dados utilizando o cBioPortal, observamos que em adenocarcinomas de pâncreas, existem alterações nos genes que codificam IMPACT, GCN1 e GCN2 em uma porcentagem significativa de casos. No Brasil, este tumor é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e por 4% do total de mortes por câncer. Devido à natureza agressiva da doença e ao diagnóstico tardio, a maioria dos pacientes apresenta o câncer localmente avançado ou metastático, possuindo uma alta taxa de mortalidade e sobrevivência de 5 anos menor que 7%. Portanto, desvendar mecanismos moleculares associados a este tumor é de extrema importância para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Utilizando um modelo celular de adenocarcinoma de pâncreas, nocaute para IMPACT, realizamos ensaios funcionais. eIF2 foi mais fosforilado pelas linhagens nocautes na avaliação por estresse a UV, mas não para privação de leucina. Além disso, células nocautes também apresentaram menor capacidade de formar colônias independentemente de ancoragem, e menos formação tumoral nos ensaios em vivo, além de apresentarem menor capacidade de formar e manter estruturas 3D avaliadas no ensaio de esferoides e adesão. A partir da avaliação dos Tissue Micro Arrays (TMAs), tumores primários apresentaram maior quantidade de IMPACT quando comparados com tumores metastáticos e tecido normal. Interessantemente, tanto no TMA quanto nas linhagens celulares foram observados grânulos de IMPACT tanto no núcleo quanto no citoplasma e associados a proteínas características de grânulos de estresse e proteínas do nucléolo. Diante dos resultados encontrados, podemos concluir que a proteína IMPACT pode ter atuação no ciclo celular além de fazer parte de grânulos de estresse. Além disso, levanta-se a hipótese que pode atuar em dois momentos na progressão tumoral: um primeiro momento onde a superexpressão favoreceria a sobrevivência do tumor e um segundo momento onde a diminuição de IMPACT facilitaria a metástase. Portanto o estudo dessa proteína pode melhorar o entendimento não só dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do

Adenocarcinoma de Pâncreas, mas também de processos biológicos relacionados com outros tumores e até mesmo outras doenças. [Tese] São Paulo, Fundação Antônio Prudente, 2021.

## ABSTRACT

B. Bellis, A.Oliveira , M. D Begnami, H. C. Freitas, V. R. Martins, M. Roffé e G. M. Hajj. One of the main control points for the translation of mRNAs occurs through the phosphorylation of the alpha subunit of the translation-initiating factor eIF2 (eIF2 $\alpha$ ), which leads to the inhibition of general protein synthesis. GCN2 is one of the eIF2 $\alpha$  kinases that responds to amino acid depletion and UV radiation, phosphorylating eIF2 $\alpha$  and inhibiting general translation. Its activity depends on binding with the GCN1 protein. The IMPACT protein also interacts with GCN1, competing for the GCN1-GCN2 binding, inhibiting GCN2 activity and stimulating translation. Through database searches using cBioPortal, we observed that in pancreatic adenocarcinomas, there are alterations in the genes encoding IMPACT, GCN1 and GCN2 in a significant percentage of cases. In Brazil, this tumor is responsible for about 2% of all types of cancer diagnosed and for 4% of all cancer deaths. Due to the aggressive nature of the disease and the late diagnosis, most patients have locally advanced or metastatic cancer, having a high mortality rate and a 5-year survival of less than 7%. Therefore, unraveling molecular mechanisms associated with this tumor is extremely important for the development of new therapeutic approaches. Using a cellular model of pancreatic adenocarcinoma, knockout for IMPACT, we performed functional assays. eIF2 was more phosphorylated by the knockout strains in the UV stress evaluation, but not for leucine deprivation. In addition, knockout cells also showed less ability to form colonies regardless of anchorage, and less tumor formation in in vivo assays, in addition to showing lower ability to form and maintain 3D structures evaluated in the spheroid and adhesion assays. From the evaluation of Tissue Micro Arrays (TMAs), primary tumors showed a higher amount of IMPACT when compared to metastatic tumors and normal tissue. Interestingly, both in TMA and in cell lines, IMPACT granules were observed both in the nucleus and in the cytoplasm and associated with proteins characteristic of stress granules and nucleolus proteins. Given the results found, we can conclude that the IMPACT protein can act in the cell cycle in addition to being part of stress granules. Furthermore, it is hypothesized that it may act in two moments in tumor progression: a first moment where overexpression would favor tumor survival and a second moment where the IMPACT decrease would facilitate metastasis. Therefore, the study of this protein can improve the understanding not only of the mechanisms involved in the development and progression of Pancreatic Adenocarcinoma, but also of biological processes related to other tumors and even other diseases [Tese] São Paulo, Fundação Antônio Prudente, 2021.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pâncreas.....	1
Figura 2	Maquinaria do processo de tradução.....	7
Figura 3	Representação da via de mTORC1 via ativação de PI3K-Akt e RAS-ERK para início do processo de tradução geral.....	8
Figura 4	Esquema explicando a relação de mTORC-1 com a fosforilação de 4E-BP e S6K1.....	9
Figura 5	Modelo do processo de fosforilação do eIF2 $\alpha$ .....	9
Figura 6	Ilustração explicando a relação entre IMPACT, GCN1 e GCN2 e a ação dessas proteínas no processo do início de tradução.....	11
Figura 7	Gráfico apresentando o resultado da busca de alterações gênicas em <i>IMPACT</i> , <i>GCN1</i> e <i>GNC2</i> no cBioPortal.....	13
Figura 8	Representação do cromatograma gerado a partir da absorbância de 254nm do perfil polissomal.....	24
Figura 9	Western Blotting e quantificação para a proteína IMPACT nas linhagens celulares de Adenocarcinoma de Pâncreas disponíveis na instituição.....	26
Figura 10	Teste de transfecção com plasmídeo contendo apenas GFP para as linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2.....	26
Figura 11	Mapa do Plasmídeo PX330 utilizado no processo de silenciamento do gene <i>IMPACT</i> .....	27
Figura 12	Sequenciamento realizado após o procedimento de inserção das guias TOP e BOT no plasmídeo PX330.....	27
Figura 13	Western Blotting das sub-linhagens ASPC-1 Vazio e IMPACT ko e Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko.....	28
Figura 14	Western Blot e quantificação da fosforilação de eIF2 $\alpha$ para as linhagens Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko e ASPC-1 Vazio e IMPACT ko após tratamento com 40 J de luz UV.....	29
Figura 15	Western Blot e quantificação da fosforilação de eIF2 $\alpha$ para as sub-linhagens Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT, ASPC-1 Vazio e IMPACT após tratamento com meio de cultura sem leucina.....	30

Figura 16	Curva de crescimento .....	31
Figura 17	Formação de colônias da linhagem ASPC-1 Vazio e IMPACT ko.....	32
Figura 18	Formação de colônias da linhagem Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko.....	32
Figura 19	Quantificação das colônias para as linhagens ASPC-1 Vazio e IMPACT ko e Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko.....	33
Figura 20	Curva de crescimento tumoral após injeção das células ASPC-1 e Mia Paca-2 Vazio e IMPACT ko em camundongos nude.....	34
Figura 21	Níveis de viabilidade celular comparadas entre as linhagens celulares Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko e ASPC-1 Vazio e IMPACT ko sob estresse de UV.....	34
Figura 22	Quantificação da migração em área das linhagens ASPC-1 Vazio e IMPACT ko e Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko.....	36
Figura 23	Imagens dos esferoides formados pelas linhagens ASPC-1 IMPACT ko e Vazio e Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio.....	37
Figura 24	Gráficos mostrando a diferença das áreas de migração entre as linhagens nocautes e controles.....	37
Figura 25	Ensaio de adesão celular.....	38
Figura 26	Western blot mostrando as proteínas downstream a mTORC e suas fosforilações tanto nas linhagens IMPACT ko quanto nas linhagens Vazio de ambas as células de adenocarcinoma de pâncreas.....	39
Figura 27	Quantificação dos experimentos de Western Blot para avaliar as diferenças de expressão e fosforilação das proteínas RPS6 e 4eBP, relacionadas com a via de mTORC.....	39
Figura 28	Cromatograma gerado a partir dos valores de absorbância normalizados dos perfis polissomais.....	40
Figura 29	Gráficos apresentando a taxa de tradução das linhagens ASPC-1 IMPACT ko e Vazio e Mia Paca-2 IMPACT ko e Vazio com diversos tratamentos: Soro, Carenciada, Rapamicina e UV.....	40
Figura 30	Comparação entre anticorpos de IMPACT para utilização na imunohistoquímica.....	47

Figura 31	Reação de imuno-histoquímica para a proteína IMPACT no tecido de Adenocarcinoma de Pâncreas.....	48
Figura 32	Comparação da quantidade de IMPACT presente nos tecidos tumorais, de metástase linfonodal e normais.....	48
Figura 33	Comparação da quantidade de IMPACT presente nos tecidos tumorais e normais.....	49
Figura 34	Sobrevida dos pacientes correlacionadas com os casos com altos níveis de IMPACT e baixos níveis de IMPACT.....	50
Figura 35	Imunofluorescência das linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2, tratadas com Arsenito de Sódio.....	51
Figura 36	Imunofluorescência das linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2, sem o tratamento com Arsenito de Sódio.....	52
Figura 37	Imunofluorescência multiplex do tecido tumoral.....	52
Figura 38	Imunofluorescência de FMRP e IMPACT das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio.....	53
Figura 39	Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de Pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização entre FMRP e IMPACT.....	54
Figura 40	Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e FMRP no tecido tumoral, metastático e normal.....	55
Figura 41	Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e FMRP.....	56
Figura 42	Gráfico mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e FMRP com a co-localização dessas proteínas.....	56
Figura 43	Imunofluorescência de GCN2 e IMPACT nas células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio.....	58
Figura 44	Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de Pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização de GCN2 e IMPACT.....	59
Figura 45	Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e GCN2 no tecido tumoral, metastático e normal.....	60
Figura 46	Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e	

	GCN2.....	60
Figura 47	Gráfico, mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e GCN2 com a co-localização dessas proteínas.....	61
Figura 48	Imunofluorescência de TIA 1 e IMPACT nas células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio.....	62
Figura 49	Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de Pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização entre TIA1 e IMPACT.....	63
Figura 50	Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e TIA1 no tecido tumoral, metastático e normal.....	64
Figura 51	Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e TIA1.....	64
Figura 52	Gráfico, mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e TIA1 com a co-localização dessas proteínas.....	65
Figura 53	Gráfico comparando a colocalização de IMPACT com FMRP, GCN2 e TIA1.....	65
Figura 54	Comparação da co-localização de IMPACT com TIA1, GCN2 e FMRP no tecido tumoral, metastático e normal.....	66
Figura 55	Imunofluorescência de B23 e IMPACT nas células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio.....	69
Figura 56	Imunofluorescência de PELO e IMPACT nas células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio.....	70
Figura 57	Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de Pâncreas apresentando co-localização entre P53 e IMPACT.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação TMN da American Joint Committee on Cancer (AJCC) para câncer de pâncreas.....	3
Tabela 2	Genes frequentemente encontrados mutados em adenocarcinoma pancreático.....	6
Tabela 3	Dados das correlações dos dados clínicos com a quantidade de IMPACT no tecido tumoral.....	50
Tabela 4	Mediana dos tecidos tumoral, metastático e normal, para as colocalizações de IMPACT com TIA1, GCN2 e FMRP.....	66
Tabela 5	Correlações entre dados clínicos e colocalizações entre IMPACT, TIA1, GCN2 e FMRP.....	67

## LISTA DE ABREVIATÖES

°C	- Graus Celsius
3' UTR	- Do inglês, 3' Untranslated Region
4EBP	- Do inglês, eIF4E-binding protein
40S	- Subunidade menor do ribossomo eucariótico
43S PIC	- Do inglês, Pre Initiation Complex 43S
48S	- Complexo de início de tradução composto pelo 43S PIC + eIF4FmRNA 4E-BPs - do inglês, eIF4E Binding Proteins
5' UTR	- Do inglês, 5' Untranslated Region
60S	- Subunidade maior do ribossomo eucariótico
80S	- Ribossomos eucariótico completo
AJCC	- Do inglês, American Joint Committee on Cancer
AKT	- Do inglês, RAC-alpha kinase serine/threonine-protein
ARF	- Do inglês, ADP-ribosylation factor
ATF4	- Do inglês, Activating transcription factor 4
AUG	- Códon de início da tradução
B23	- Do inglês, Nucleolar protein B23
BRCA	- Do inglês, Breast Cancer
BSA	- Albumina do soro bovino
CA19.9	- Antígeno carboidrato 9
CAS9	- Do inglês, CRISPR associated protein 9
CASR	- Do inglês, Calcium sensing receptor
CDC28	- Do inglês, Cyclin-dependent kinase 1
Cdk	- Do inglês, Cyclin-dependent kinase
Cdk1	- Do inglês, Cyclin-dependent kinase 1
CDKN2A	- Do inglês, Cyclin dependent kinase inhibitor 2 <sup>a</sup>
CFTR	- Do inglês, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHX	- Cicloheximida
cm	- Centímetros
CRISPR	- Do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAB	- 3,3 – Diaminobenzidina
DDIT3	- Do inglês, DNA damage inducible transcript 3
DNA	- Do inglês, Deoxyribonucleic acid
DNase	- Desoxirribonuclease
DRAQ5	-1,5-bis[[2-(di-methylamino) ethyl]amino]-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
DTT	- Ditioneitol
eIFs	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factors
eIF1	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 1
eIF2	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 2
eIF2B	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 2B
eIF3	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 3
eIF4A	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 4 <sup>a</sup>
eIF4E	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 4E
eIF4F	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 4F
eIF4G	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 4G
eIF5	- Do inglês, Eukaryotic Initiation Factor 5
EIF2AK4	- Do inglês, Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4
ERK	- Do inglês, Extracellular Signal-Regulated Kinase
EtOH	- Etanol
FMRP	- Do inglês, Fragile X mental retardation 1
G3BP1	- Do inglês, RAS-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein 1
GCN1	- Do inglês, General Control Nonderepressible 1
GCN2	- Do inglês, General Control Nonderepressible 2
GDP	- Do inglês, Guanosine Diphosphate
GFP	- Do inglês, Green fluorescent protein
GTEX	- Do inglês, Genotype-tissue expression. Project
GTP	- Do inglês, Guanosine Triphosphate
h	- Hora
H2O	- Água
H2O2	- Peróxido de hidrogênio

HCL	- Acido clorídrico
HIF1	- Hypoxia-Inducible Factor
HRI	- Do inglês, Heme-regulated inhibitor
HRP	- Do inglês, Horseradish peroxidase
IMPACT	- Do inglês, Imprinted and Ancient
IRES	- Do inglês, Internal Ribosome Entry Site
J	- Joules
KRAS	- Do inglês, KRAS proto-oncogene, GTPase
KCl	- Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Fosfato monopotássico
Ko	- Nocaute
M	- Molar
Mm	- Milímetros
Met tRNAi	- RNA transportador aminoacilado com uma metionina iniciadora
Mg	- Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
MIT	- Do inglês, Melanocyte inducing transcription fator
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA mensageiro
mTOR	- Do inglês, Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	- Do inglês, mTOR Complex 1
MTT	- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
MYC	- Do inglês, MYC proto-oncogen
NaCl	- Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Fosfato dissódico
nM	- Nanomolar
ORF	- Do inglês, Open Reading Frame
p16	- Do inglês, CDKN2A, multiple tumor suppressor 1
p21	- Do inglês, CDK-interacting protein 1
p53	- Do inglês, Protein 53

PAM	- Do inglês, Protospacer adjacente motif
PBS	- Do inglês, Phosphate-buffered saline
PBS <sup>++</sup>	- Do inglês, Phosphate-buffered saline containing calcium
PERK	- Do inglês, RNA-like endoplasmic reticulum kinase
pH	- Potencial hidrogeniônico
PI3K	- Do inglês, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKR	- Do inglês, RNA-activated protein kinase
PRSS1	- Do inglês, Protease serie 1
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RAS	- Do inglês, RAS proto-oncogene, GTPase
RNA	- Do inglês, Ribonucleic Acid
RNase	- Ribonuclease
rpm	- Rotações por minuto
RPS6KN1	- Do inglês, Ribosomal Protein S6 Kinase B1
S6K1	- Do inglês, Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70)
SFB	- Soro fetal bovino
sgRNAs	- Guias de RNA
SMAD4	- Do inglês, SMAD family member 4
SPINK1	- Do inglês, Serine peptidase inhibitor kazal type 1
STAT3	- Do inglês, Signal transducers and activators of transcription
TBST	- Polyoxyethylene sorbitane monolaureate add tween 20
TCGA	- Do inglês, The Cancer Genome Atlas
TIA1	- Do inglês, T-cell internal antigen 1
TGFβ	- Do inglês, Transforming growth factor beta
TMA	- Do inglês, Tissue Microarray
TNF	- Do inglês, Tumoral necrose fator
TNM	- Sistema TNM: T = Tumor primário; N = linfonodo; M = Metástase
TP53	- Do inglês, Tumor Protein 53
TRIAL	- Do inglês, TNF related apoptosis-inducing ligant
Tris	- Trisaminometano ((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> )
tRNA	- RNA transportador

UTSW - UT Southwestern Medical Center

UV - Radiação ultra violeta

$\mu\text{g}$  - Microgramas

$\mu\text{L}$  - Microlitro

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Adenocarcinoma Pancreático.....	1
1.2.	
Tratamento.....	2
1.3. Classificação Tumoral.....	3
1.4. Genética e Plasticidade Tumoral.....	5
1.5. Controle de Tradução de mRNAs.....	7
2. Objetivo.....	14
3. Material e Métodos e Resultados.....	15
3.1. Parte I – Experimentos Funcionais em Linhagens Celulares.....	15
3.1.1. Material e Métodos.....	15
3.1.1.1. Cultura Celular.....	15
3.1.1.2. Comparação dos Níveis de IMPACT nas Linhagens Celulares.....	15
3.1.1.3. Geração de Linhagens Nocautes para o Gene IMPACT.....	15
3.1.1.4. Determinação da Fosforilação da Subunidade $\alpha$ de eIF2.....	17
3.1.1.5. Curva de Crescimento.....	17
3.1.1.6. Ensaio de Formação de Colônias - Soft Agar.....	18
3.1.1.7. Modelo Xenotransplante Ectópico.....	18
3.1.1.8. Ensaio de Migração Celular.....	19
3.1.1.9. Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	20
3.1.1.10. Ensaio de Formação de Esferoides.....	20
3.1.1.11. Ensaio de Adesão Celular.....	21
3.1.1.12. Avaliação da relação de IMPACT com a via de mTORC.....	22
3.1.1.13. Perfil Polissomal.....	23
3.1.2. Resultados.....	25
3.1.2.1. Níveis de IMPACT nas linhagens celulares e seleção do modelo de estudo.....	25
3.1.2.2. Geração de linhagens nocautes para IMPACT.....	26
3.1.2.3. Determinação da fosforilação da subunidade $\alpha$ de eIF2.....	28

3.1.2.4.	Curva de Crescimento .....	30
3.1.2.5.	Ensaio de Formação de Colônias - Soft Agar.....	31
3.1.2.6.	Modelo Xenotransplante Ectópico.....	32
3.1.2.7.	Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	33
	Ensaio de Migração celular.....	34
	Ensaio de Formação de Esferoides.....	35
	Ensaio de Adesão Celular.....	37
	Avaliação da relação de IMPACT com a via de mTORC.....	37
	Perfil Polissomal.....	39
3.2	Parte II- Localização subcelular.....	42
	Material e Métodos.....	42
	Tissue Micro Array (TMA) e casuística.....	42
	Imuno-histoquímica.....	42
	Imunofluorescência.....	43
	Imuno-histoquímica Multiplex- Kit OPAL.....	44
	Resultados.....	45
	Imuno-histoquímica, Tissue Micro Array (TMA) e casuística.....	45
	Localização subcelular de IMPACT em células e tecidos.....	49
	Discussão.....	70
	Conclusão.....	78
	Bibliografia.....	80

# 1. Introdução

## 1.1 Adenocarcinoma Pancreático

O adenocarcinoma pancreático corresponde a quarta principal causa de morte por câncer no mundo ocidental com taxas de sobrevivência de aproximadamente 5 anos menores do que 7% <sup>(1)</sup>. Comparada com outros tipos de câncer, a incidência do adenocarcinoma pancreático é muito menor, entretanto, este possui alta mortalidade <sup>(2)</sup>. Sua incidência anual global é de aproximadamente 8/100.000 variando bastante entre países e dentro de um mesmo país <sup>(2)</sup>. Além disso, as projeções indicam este câncer como provável segundo maior causador de mortes em 2040 nos Estados Unidos, atrás somente do câncer de pulmão <sup>(38)</sup>. No Brasil é responsável por 2% de todos os cânceres e por 4% das mortes por esta doença, sendo projetado como o causador de 80 mil mortes de 2025-2029 <sup>(39)</sup>.

O pâncreas é uma glândula que apresenta duas funções principais: produção de insulina, e de enzimas digestivas. Se divide em cabeça, colo pancreático, corpo e cauda (colada ao baço) (Figura 1) <sup>(3)</sup>. O tipo tumoral mais comum neste órgão é aquele que se origina do tecido glandular, correspondendo a 90% dos casos diagnosticados. Na grande maioria dos casos o local afetado é a cabeça. O desenvolvimento desse tipo de câncer é mais comum a partir dos 60 anos de idade e afeta mais os homens do que as mulheres <sup>(4)</sup>.

Entre os fatores de risco, o uso de tabaco aparece como um fator importante, contribuindo com 25% dos casos <sup>(39)</sup>, aumentando em três vezes o risco no desenvolvimento da doença. Além disso, o grupo de pessoas que sofrem de pancreatite

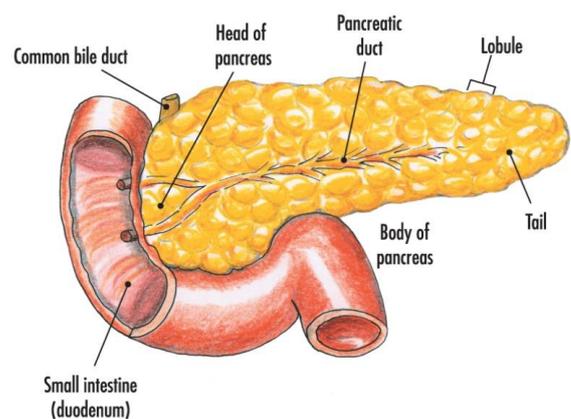


Figura 1. Pâncreas. Anatomy medicine.

crônica ou de diabetes mellitus de início tardio (a partir dos 50 anos), submetidas a cirurgias de úlcera no estômago ou duodeno, que sofreram retirada da vesícula biliar, bem como com histórico familiar de câncer têm mais chances de desenvolver a doença <sup>(4, 41)</sup>.

Os sintomas podem ser confundidos com sintomas relacionados a outras doenças. Se iniciam leves, de forma gradual com desconfortos e dores na região epigástrica, as vezes irradiando para a

região das costas, perda de peso, mal-estar, náusea e fadiga, sendo que a icterícia está relacionada apenas com o desenvolvimento tumoral na cabeça do pâncreas devido a compressão do ducto de bile <sup>(41)</sup>.

As metástases ocorrem principalmente no pulmão e fígado, sendo que pacientes com acometimento linfonodal apresentam principalmente recorrência pulmonar, enquanto pacientes com elevado IMC apresentam principalmente recorrência no fígado <sup>(43)</sup>.

A causa de tantas mortes, portanto, é devido à dificuldade de diagnósticos precoces e precisos, ausência de tratamentos efetivos e por ser um câncer extremamente agressivo.

## 1.2 Tratamento

Atualmente a maior parte dos pacientes acaba morrendo em decorrência de metástases que ocorrem no fígado, pulmão ou região peritoneal <sup>(27)</sup>.

Mesmo baixas, as chances de cura existem se a doença for descoberta na fase inicial, nesses casos o mais indicado é a cirurgia com retirada do tumor. Entretanto, mais de 90% dos indivíduos são diagnosticados tardiamente e já se encontram em estado avançado da doença ou com quadro metastático, enquanto somente 10% dos casos são descobertos em estágio inicial e podem ser elegíveis para cirurgia <sup>(40)</sup>.

Os procedimentos de radioterapia e quimioterapia, associados ou não, também podem ser utilizados para redução do tamanho do tumor exócrino (mais comum) e alívio dos sintomas. O tratamento de quimioterapia pode ser ministrado utilizando dois ou mais medicamentos em conjunto.

Como primeira linha de tratamento, os esquemas de tratamento utilizados atualmente são Folfirinox (composto de 4 fármacos: ácido folínico, fluorouracila, irinotecano e oxaliplatina) ou Firinox (composto de fluorouracil, irinotecano e oxaliplatin) e Gencitabina em pacientes sem limitações clínicas. Nos Estados Unidos, como 60% dos pacientes normalmente apresentam algum tipo de comorbidade associada ao quadro oncológico, são alocados para um segundo grupo de tratamento onde a quimioterapia monoterapia com Gencitabina ou combinada com Nabpaclitaxel é indicada <sup>(42)</sup>. Para a segunda linha de tratamento não há um padrão, sendo levado em consideração o estado geral do paciente.

O marcador mais utilizado é o CA19.9 (antígeno carboidrato 19.9) secretado pelo pâncreas, correlacionado com os níveis de cholestasis e bilirrubinas e diretamente relacionados também com o peso tumoral. Apresenta uma sensibilidade de 80% e especificidade de 82-90% <sup>(42)</sup>.

Tanto para tratamentos convencionais quanto para novas propostas terapêuticas, alguns grupos apresentam respostas positivas, entretanto, a maioria deles já se apresentam resistentes aos tratamentos ou acabam se tornando resistentes com o passar do tempo.

A resistência às drogas se dá pela plasticidade pronunciada das células do câncer de pâncreas, permitindo que elas mudem entre estados fenotípicos e selecionem clones celulares resistentes à terapia <sup>(6)</sup>. Para pacientes com metástases e que apresentam limitações relacionadas à comorbidade e que apresentam contraindicações ao tratamento ativo, existem somente alternativas paliativas, a fim de melhorar a qualidade de vida com a colocação de endo próteses <sup>(42)</sup>.

### 1.3 Classificação Tumoral

A classificação tumoral descreve a extensão da enfermidade no momento do diagnóstico e é um dos fatores mais importantes para selecionar as opções de tratamento e prever um diagnóstico para o paciente.

O sistema empregado com maior frequência para a classificação tumoral é o TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tabela 1) que classifica o tamanho do tumor, sua propagação em gânglios linfáticos e indica se ele está em processo de metástase <sup>(5)</sup>.

Tabela 1. Classificação TMN da American Joint Committee on Cancer (AJCC) para câncer de pâncreas <sup>(28)</sup>

<b>Estágio AJCC</b>	<b>Grupo de estadiamento</b>	<b>Descrição do estadiamento</b>
<b>0</b>	Tis/N0/M0	O câncer está confinado às camadas superiores das células do ducto pancreático e não invadiu tecidos mais profundos. Não se espalhou para fora do pâncreas. Não se espalhou para os nódulos linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
<b>AI</b>	T1/N0/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e não é maior que 2 cm (T1). Não se espalhou para os nódulos linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0)

<b>IB</b>	T2/N0/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e é maior que 2 cm, mas não mais que 4 cm (T2). Não se espalhou para os nódulos linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
<b>IIA</b>	T3/N0/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e é maior do que 4 cm de diâmetro (T3). Não se espalhou para os nódulos linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
<b>IIB</b>	T1/N1/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e não é maior que 2 cm (T1) E se espalhou para não mais que 3 linfonodos próximos (N1). Não se espalhou para locais distantes (M0).
	T2/N1/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e é maior que 2 cm, mas não mais que 4 cm (T2) E se espalhou para não mais que 3 linfonodos próximos (N1). Não se espalhou para locais distantes (M0).
	T3/N1/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e tem mais de 4 cm de diâmetro (T3) E se espalhou para não mais que 3 linfonodos próximos (N1). Não se espalhou para locais distantes (M0).
<b>III</b>	T1/N2/M0	O câncer é confinado ao pâncreas e não é maior do que 2 cm (T1) e se espalhou para 4 ou mais linfonodos próximos (N2). Não se espalhou para locais distantes (M0).
	T2/N2/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e é maior que 2 cm, mas não mais que 4 cm através (T2) E se espalhou para 4 ou mais linfonodos próximos (N2). Não se espalhou para locais distantes (M0).
	T3/N2/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e tem mais de 4 cm de diâmetro (T3) E se espalhou para 4 ou mais linfonodos próximos (N2). Não se espalhou para locais distantes (M0).
	T4/Qualquer N/M0	O câncer está confinado ao pâncreas e tem mais de 4 cm de diâmetro (T3) e é espalhado para 4 ou mais linfonodos próximos (N2). Não é espalhada por locais distantes (M0).

<b>IV</b>	Qualquer T/Qualquer N/M1	O câncer se espalhou para locais distantes, como o fígado, o peritônio (o revestimento da cavidade abdominal), pulmões ou ossos (M1). Pode ser de qualquer tamanho (qualquer T) e pode ou não ter se espalhado para os nódulos linfáticos próximos (qualquer N)
-----------	--------------------------------	---

## 1.4 Genética e plasticidade tumoral

Cada tumor apresenta, além das alterações mais frequentes, muitos outros eventos genéticos, fazendo do câncer de pâncreas uma das doenças malignas geneticamente mais diversas e heterogêneas <sup>(6 e 8)</sup>.

Nos últimos 10 anos, o conhecimento sobre a progressão molecular do câncer de pâncreas aumentou, transformando esta malignidade em um dos tumores geneticamente mais bem caracterizados e levando à criação de um modelo de progressão baseado em evidências histopatológicas, clínicas e genéticas.

O desenvolvimento de pancreatite se destaca como um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento de câncer de pâncreas. Ela se caracteriza como uma condição inflamatória que é gerada por uma falha na inibição das enzimas digestivas produzidas pelo pâncreas podendo levar a um comprometimento da parte exócrina do órgão e até a uma insuficiência pancreática. Essa condição pode se iniciar durante a infância de um indivíduo e acompanhá-lo até a vida adulta. As alterações genéticas comumente responsáveis pela pancreatite são normalmente encontradas em um ganho de função no gene *PRSS1* que codifica para uma tripsina, uma enzima digestiva normalmente sintetizada pela porção exócrina do pâncreas e alterações no gene *SPINK1* responsável pela codificação de um inibidor de tripsina, além disso alterações menos frequentes em outros genes também podem auxiliar no desenvolvimento da pancreatite como *CFTR* e *CASR* <sup>(29)</sup>.

No processo de desenvolvimento do câncer de pâncreas em um primeiro momento as alterações genéticas encontradas geram instabilidade genômica durante a recombinação homóloga como *BRCA1* e *BRCA2* <sup>(30)</sup> por exemplo, possibilitando a geração de outras mutações em genes importantes, tanto oncogenes como genes supressores de tumor, relacionados com outros

processos celulares como proliferação celular, remodelamento do citoesqueleto, vias de apoptose, controle de danos do DNA, diferenciação celular e manutenção de homeostase por exemplo <sup>(9, 30)</sup>.

Um dos genes normalmente afetados e relacionados com algumas dessas vias é o *KRAS*, um oncogene cujas mutações estão presentes em aproximadamente de 92% a 95% dos tumores avaliados <sup>(8, 30)</sup>, colocando esse gene como protagonista no desenvolvimento desse tipo de tumor já que está associado a diversas vias importantes para a sobrevivência e desenvolvimento tumoral como a via glicolítica, metabolismo de lipídeos <sup>(44)</sup>. Embora as alterações em *KRAS* sejam encontradas com tanta frequência no tumor, quase sempre são encontradas no PAIN, que corresponde a uma escala de lesão anterior à tumoral, indicando que mutações nesse gene podem ser consideradas como pioneiras no evento de transformação maligna <sup>(44)</sup>. Além disso, *SMAD4*, relacionado com a via de TGF $\beta$ , associada ao crescimento celular, diferenciação e manutenção da homeostase celular, pode apresentar alterações em 55% dos casos avaliados, *TP53*, um supressor tumoral responsável pela resposta ao estresse gerando dano no DNA pode ser encontrado em 85% dos casos e *CDKN2A*, um importante supressor tumoral, aproximadamente em 90%. A tabela 2 apresenta as alterações genéticas mais frequentemente encontradas em tumores pancreáticos.

Tabela 2. Genes frequentemente encontrados mutados em adenocarcinoma pancreático <sup>(30)</sup>

Pathway	Genes targeted	Prevalence in pancreatic cancer (%)	Mutation effect	Downstream consequences	Evolutionary stage of occurrence <sup>†</sup>
RAS-ERK signalling	* <i>KRAS</i> * <i>BRAF</i>	* 95 * 5	Activating	* Ligand-dependent RTK growth independence * Immunosuppression * Metabolic reprogramming * Protein scavenging	Stage 1 or 2
G1/S transition	* <i>CDKN2A</i> * <i>APC2</i> * <i>CHD1</i> * <i>FBXW7</i>	* 90 * <5 * <5 * <5	Inactivating	Loss of G1/S checkpoint	Stage 1 or 2
DNA damage response	* <i>TP53</i> * <i>ATM</i> * Numerous others	* 80–85 * <5 * <5 each	Gain of function ( <i>TP53</i> only) or inactivating	* Loss of G1/S checkpoint * Loss of G2/M checkpoint * Resistance to apoptotic signals	Stage 1 or 2
TGF $\beta$ signalling	* <i>SMAD4</i> * <i>TGFBR1</i> * <i>TGFBR2</i> * <i>ACVR1B</i> * <i>SMAD3</i>	* 55 * 5–10 * 5–10 * <5 * <5	Inactivating	* Loss of homeostatic mechanisms * Loss of expression of genes co-regulated by TGF $\beta$ and p53	Stage 2
Epigenomic reprogramming (SWI/SNF)	* <i>ARID1A</i> * <i>ARID1B</i> * <i>ARID2</i> * <i>PBRM1</i> * <i>SMARCA2</i> * <i>SMARCA4</i>	* <10 * <10 * <10 * 5 * 5 * 5	Inactivating	Inability to disrupt histone–DNA contacts within nucleosomes	Stage 2 or 3
Epigenomic reprogramming (KMT2)	* <i>KMT2C</i> * <i>KMT2D</i> * <i>KMT2A</i>	* <10 * <10 * <10	Inactivating	Reduced H3K4 methylation	Stage 2 or 3
Cell stress response	<i>MKK4</i>	<5	Inactivating	* Loss of JNK signalling * Perturbed TLR signalling	Stage 2
Axonal guidance	* <i>ROBO1</i> * <i>ROBO2</i> * <i>SLIT</i>	5	Inactivating	Altered cellular migration	Stage 2 or 3
RNA splicing	<i>SF3B1</i>	~10	Altered function	* Disruption of Polycomb repressive complex binding to HOX genes * Altered pre-mRNA splicing	Stage 2 or 3
Homophilic cell adhesion	* <i>PCDH15</i> * Numerous others	10 <5 each	Inactivating	Calcium-dependent cell adhesion within the cadherin superfamily	Stage 2 or 3



é o início da tradução, que é definido por dois eventos: a formação do complexo eIF4F, composto pelos fatores de início de tradução eucarióticos (eIFs) eIF4G, eIF4E e eIF4A que auxilia a ligação do complexo ribossomal 43S ao cap <sup>(1)</sup>, e a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC43S) <sup>(10,11 e 12)</sup>. O PIC43S é composto pelos fatores eIF1, eIF3, eIF5, a subunidade 40S do ribossomo e o complexo ternário (Figura 2).

Uma das vias de controle do processo de início da tradução é a via de PI3K/Akt/mTORC1. A ativação da via de mTORC1 ocorre a partir do reconhecimento de fatores de crescimento por receptores Tyr Kinases e receptores acoplados a proteína G que ativam as vias de PI3K-AKT e Ras-ERK promovendo a tradução de mRNAs dependentes de cap, favorecendo o crescimento e proliferação celular <sup>(1 e 2)</sup> (Figura 3). A regulação da síntese proteica é promovida por mTORC1 através da fosforilação de 4E-BP. Essa proteína apresenta uma função inibidora quando não está no seu estado fosforilado, impedindo que eIF4E se ligue a eIF4A e eIF4G para formar o complexo eIF4F e dar início ao processo de tradução <sup>(2)</sup>. Ao ser fosforilada na via de mTORC1, 4E-BP disponibiliza eIF4E para formar o complexo eIF4F, que se associa ao complexo ternário formando o complexo traducional de pré-iniciação 48S, dando início a tradução e favorecendo a tradução de mRNAs dependente de cap <sup>(1 e 2)</sup>. Além de fosforilar 4E-BP, mTORC1 também tem como alvo as proteínas S6Ks que quando inativadas permanecem ligadas ao complexo eIF3. Ao ser recrutado mTORC1 fosforila a kinase S6 que se dissocia do complexo eIF3 permitindo que ambas as proteínas se liguem a região 5'UTR (Figura 4).

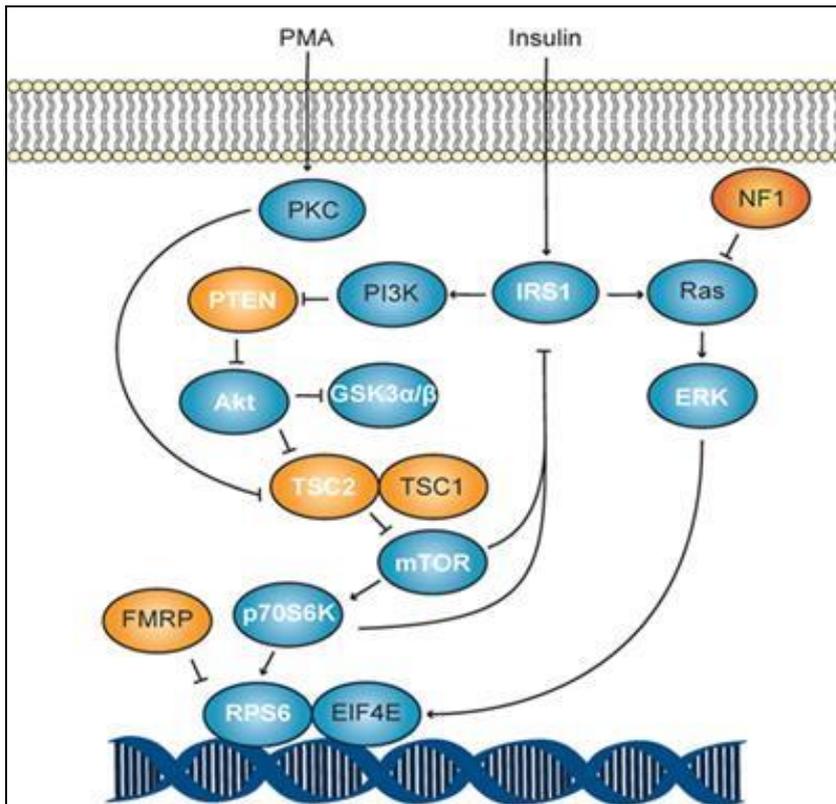


Figura 3: Representação da via de mTORC1 via ativação de PI3K- AKT e RAS-ERK para início do processo de tradução geral <sup>(74)</sup>.

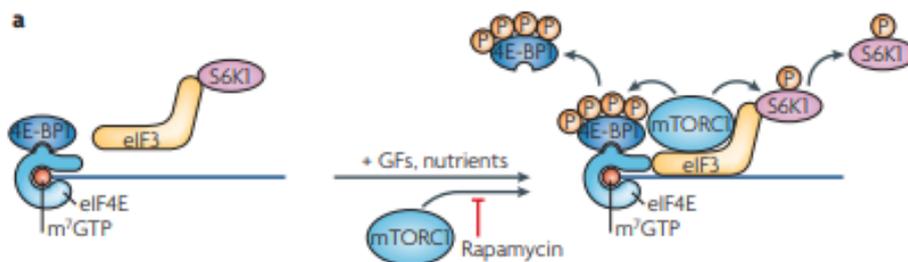


Figura 4: Esquema explicando a relação de mTORC-1 com a fosforilação de 4E-BP e S6K1. Ao fosforilar as duas proteínas, o complexo eIF3-mTORC1 e eIF4F podem se associar e dar prosseguimento ao início do processo de tradução <sup>(2)</sup>.

Outra via de controle da tradução ocorre na resposta ao estresse. O complexo ternário, formado por eIF2 associado ao Met-tRNAi e GTP e é responsável pela entrega do tRNA de metionina para a subunidade 40S do ribossomo. Para iniciar o processo de tradução o complexo eIF4F já formado recruta o complexo de pré-iniciação 43S que pode então se ligar ao cap localizado na região 5'UTR do mRNA e iniciar a varredura em busca do primeiro códon de iniciação, onde o ribossomo será posteriormente montado para o início da formação da proteína <sup>(10 e 11)</sup> (Figura 5).

Quando o primeiro AUG é localizado, o GTP de eIF2 é hidrolisado e sofre uma alteração conformacional diminuindo a sua afinidade pelo Met-tRNA<sub>i</sub>, sendo então liberado da maquinaria de tradução. eIF2B catalisa a reação de reciclagem de GDP para GTP em eIF2, habilitando-o para ser utilizado em outra rodada de tradução <sup>(12 e 13)</sup> (Figura 5).

eIF2 apresenta 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A fosforilação do resíduo de Ser51 do eIF2 $\alpha$  é um evento regulatório altamente conservado evolutivamente e ativado em resposta à diversos tipos de estresses <sup>(14)</sup> que resulta na inibição da tradução geral dependente de cap, inibindo a entrega do iniciador Met-tRNA<sub>i</sub> para o complexo de iniciação <sup>(14)</sup> (Figura 5).

O bloqueio da síntese proteica é uma estratégia utilizada pela célula em situações de estresse para poupar energia e prevenir possíveis erros nos processos de tradução. Concomitantemente com esta inibição global da tradução, a fosforilação do eIF2 $\alpha$  melhora a tradução independente de cap de mRNAs que apresentam ORFs “upstream Open Reading Frames” <sup>(11 e 17)</sup> e expressão de genes relacionados a via e ATF4 que estão associados a resposta de adaptação ao estresse <sup>(18)</sup>.

Alguns estudos também evidenciam o papel da fosforilação de eIF2 $\alpha$  e resposta ao estresse no desenvolvimento tumoral, ligado principalmente com a via de apoptose. Y Teng e seu grupo demonstraram, por exemplo, que a desfosforilação do eIF2 $\alpha$  melhora a apoptose induzida por TNF related apoptosis-inducing ligante (TRAIL) um indutor de apoptose, portanto a manutenção da fosforilação através de drogas pode potencializar a morte de células de tumores hepáticos <sup>(19)</sup>.

Outro estudo demonstrou que células que apresentam eIF2 $\alpha$  mutado que não pode ser fosforilado transforma malignamente células NIH 3T3 enquanto a fosforilação sustentada induz apoptose <sup>(20)</sup>. Portanto, com o bloqueio da fosforilação do eIF2 $\alpha$ , a célula cancerígena manteria a tradução mesmo em condições de estresse e inibiria parte das vias de controle celular e apoptose,

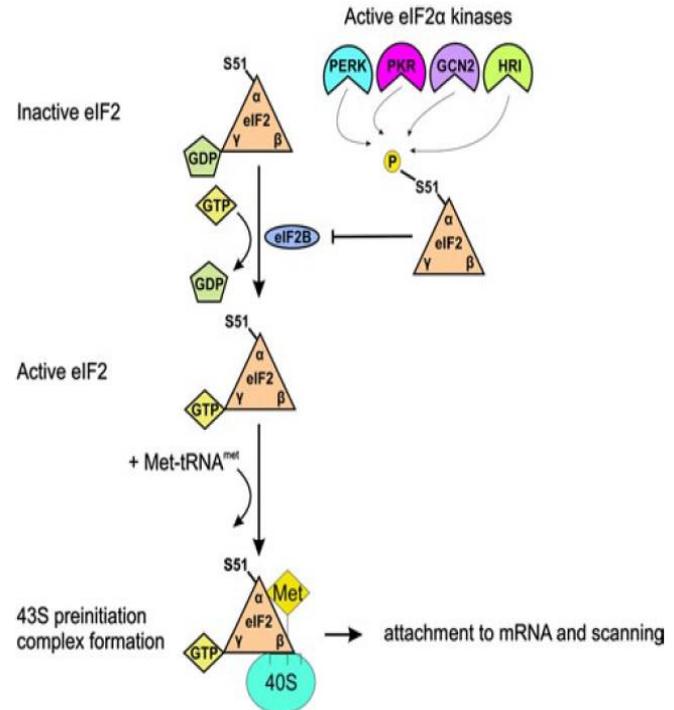


Figura 5. Modelo do processo de fosforilação do eIF2 $\alpha$  <sup>(16)</sup>

acionadas pela fosforilação do eIF2 $\alpha$  e tradução de mRNA específicos que não são favorecidos no processo de tradução principal, podendo dessa forma crescer e se proliferar.

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  é mediada por quatro proteínas kinases em mamíferos: PKR (responde aos RNAs dupla fita resultantes de infecção viral), GCN2 (responde à falta de aminoácidos, tRNAs descarregados <sup>(14)</sup>, inibição do proteassoma e irradiação UV), HRI (resposta à falta de heme) e PERK (relacionada com a detecção de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático) <sup>(11 e 15)</sup>.

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  por GCN2 em resposta a falta de aminoácidos, infecção viral ou radiação UV <sup>(16, 26)</sup>, requer a ligação de GCN2 com a proteína GCN1, através de um domínio RWD <sup>(21 e 22)</sup>. Um dos mecanismos de controle da atividade de GNC2 foi descrito pelo nosso grupo. A união de GCN2 a GCN1, necessária para sua ativação, pode ser competida pela proteína IMPACT <sup>(15, 17 e 23)</sup> (Figura 6).

O nome IMPACT (IMPrinted and AnCienT) provém do gene *Impact* ser impresso (“imprinted”) em camundongos <sup>(24)</sup> e de apresentar sua região C-terminal extremamente conservada, que contém o domínio “Ancient Domain”, presente em proteínas bacterianas e com função de endonuclease <sup>(37)</sup>. Na porção N-terminal de IMPACT, existe um domínio RWD altamente homólogo àquele presente em GCN2, que apresenta uma região chamada de GI e que é a principal responsável pela ligação de ambas as proteínas com GCN1 <sup>(21)</sup>. Assim, IMPACT é capaz de interagir com a proteína GCN1, o que sugere um modelo no qual IMPACT seria capaz de competir com GCN2 pela união a GCN1, resultando na incapacidade de ativação de GCN2<sup>(22)</sup>.

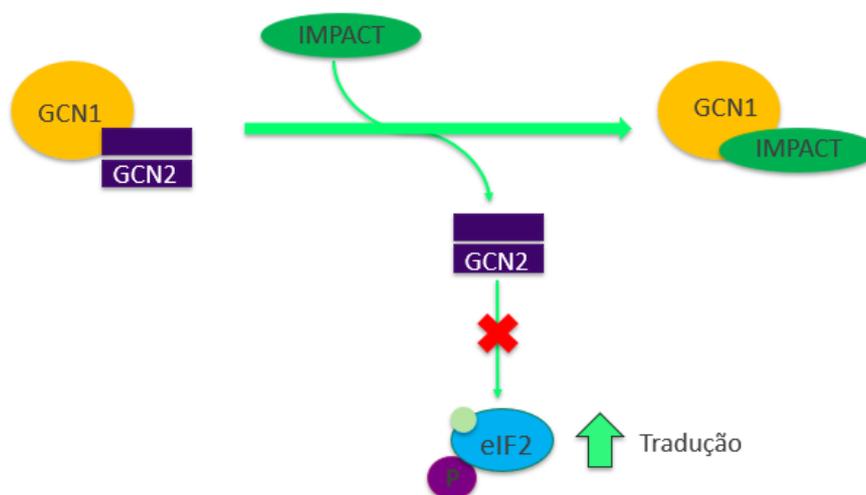


Figura 6: Ilustração explicando o a relação entre IMPACT, GCN1 e GCN2 e a ação dessas proteínas no processo do início de tradução.

De fato, foi demonstrado que a superexpressão de IMPACT é capaz de inibir a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e a sua resposta “downstream”. Trabalhos anteriores mostraram que a superexpressão de IMPACT em fibroblastos de camundongos (MEFs) inibem a atividade do GCN2 em condições de falta de leucina, podendo promover a tradução pela manutenção de baixos níveis de GCN2 ativa, resultando em níveis mais baixos de fosforilação do eIF2 $\alpha$  e conseqüentemente aumentando o início da tradução <sup>(17)</sup>.

Em camundongos nocaute para a proteína IMPACT houve aumento da fosforilação de GCN2 e conseqüentemente do seu substrato eIF2 $\alpha$ , já em camundongos nocautes para GCN2 a fosforilação de eIF2 $\alpha$  se tornou muito menor do que camundongos normais <sup>(17 e 45)</sup>, mostrando que IMPACT apresenta uma função de inibidora nesta via. Dessa forma, mesmo em condições de estresse por falta de aminoácidos, a presença de IMPACT pode manter o processo traducional ativo.

Além da função na via de GCN2, IMPACT também apresenta outras atividades independentes de GCN2. Em leveduras, a falta de Yih1 sua homóloga, fez com que as células se acumulassem na fase G2/M do ciclo celular, além de ser precipitada juntamente com Cdc28, a única Cdk responsável pelo controle do ciclo celular em leveduras e ortólogo a CDK1 em mamíferos. Interessantemente IMPACT também foi imuno-precipitada juntamente com CDK1 estando ligado ao seu domínio RWD <sup>(46)</sup>.

Preferencialmente expressa no sistema nervoso, principalmente na região do hipotálamo, IMPACT apresenta uma função importante na regulação da homeostase, camundongos nocautes para IMPACT apresentaram diminuição da fosforilação STAT3 nesta região do cérebro de forma independente de GCN2, sugerindo que IMPACT esteja envolvido na sensibilidade do cérebro a mudanças nos níveis de leptina, responsável por ativar a via de STAT3 <sup>(45)</sup>.

IMPACT também foi relatado apresentando a função de nuclease, mais especificamente DNase, a qual depende da presença de íons metálicos para exercer essa função, uma vez que foi sugerido que o domínio Ancient é similar ao domínio RNase PH conhecido por se ligar a ácidos nucléicos, portanto pode ser considerado uma proteína com atividade enzimática <sup>(48)</sup>. Além disso, Yih1, em leveduras apresenta atividade relacionada com proteínas do citoesqueleto, uma actina monomérica que auxilia no seu desempenho em impedir que GCN1 se ligue a GCN2 <sup>(47 e 54)</sup>, quando associada a actina, se torna inativa e não pode competir com GCN2, quando está livre da ligação

com a actina monomérica passa a ser ativada e capaz de se ligar a GCN1, impedindo a fosforilação de eIF2 <sup>(47 e 54)</sup>.

Por outro lado, foi demonstrado que GCN2 pode ser localizado tanto no citoplasma quando no nucléolo de forma independente da sua relação com eIF2, demonstrando que esta proteína pode apresentar funções diferentes daquelas descritas até o momento. Sabe-se que a região nucleolar apresenta uma função importante no monitoramento de resposta à estresse por meio da ativação da via de p53. Em condições nas quais há falta de GCN2, foi observado um aumento na expressão de p53, sem serem observadas alterações nos níveis de mRNA dessa proteína, indicando que a regulação da expressão de p53 pode ocorrer de forma pós transcricional e mostrando que a perda de GCN2 ativa a via de p53 por indução de estresse nucleolar <sup>(31)</sup>.

Uma vez que a ativação de GCN2 acontece com a ligação de GCN1, e IMPACT está intimamente relacionada com esse processo, uma alteração nos níveis da proteína IMPACT poderia gerar também mudanças no processo de resposta a estresse pela via de p53 e p21 (de forma direta ou indireta a via de p53).

Recentemente Ching e seu grupo <sup>(36)</sup> realizaram uma análise bioinformática de dados de sequenciamento de RNA provenientes do TCGA (The Cancer Genome Atlas) para amostras oncológicas e do GTEx (Genotype-Tissue Expression Project) para amostras não oncológicas. Em tumores de próstata a expressão de *IMPACT* apresentou alta correlação com vários genes relacionados a via de resposta a falta de aminoácidos como *EIF2AK4* (GCN2), o que eu já era esperado pelo fato de IMPACT estar relacionada com a ativação de GCN2 através da sua ligação com GCN1. Interessantemente, a expressão de *MTOR* e *RPS6KB1* também se apresentaram correlacionadas com a expressão de *IMPACT*, o que não pode ser observado em amostras normais de tecido da próstata. Portanto, IMPACT pode apresentar alguma relação funcional mais direta com a via de mTORC ainda não descoberta, ou essa relação pode ser estabelecida de forma indireta, uma vez que a expressão de *IMPACT* também se apresentou inversamente proporcional a expressão de genes relacionados a resposta de estresse como *ATF4* e *DDIT3*, já que a expressão desses genes é um resultado da fosforilação de eIF2 <sup>(36)</sup>.

Como a ativação de mTORC, após o estresse se dá devido a expressão prejudicada de ATF4 e outros genes relacionados a essa resposta ao estresse <sup>(71)</sup>, IMPACT poderia estar atuando indiretamente na atuação da via de mTORC impedindo a fosforilação de eIF2 e o desencadeamento de uma resposta ao estresse.

Realizando uma pesquisa no portal cBioPortal sobre alterações gênicas (deleções profundas, ampliações ou mutações) em *IMPACT*, *GCN1* e *GCN2* e observamos que o adenocarcinoma de pâncreas aparece em primeiro lugar no número de alterações apresentadas. Este fato é observado em dois bancos de dados diferentes, do TCGA e da UT Southwestern. No banco de dados proveniente da UT Southwestern Medical Center, 14% dos casos apresentam alterações em um ou mais destes genes. As principais alterações encontradas são a deleção (8,3%) ou amplificação (6,4%) do gene de *IMPACT*. No banco de dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA) foi observada uma taxa de amplificação gênica de *IMPACT* em 8,3% dos casos (Figura 7). Como o Adenocarcinoma de Pâncreas foi o tipo tumoral que mais apresentou alterações genéticas em *IMPACT*, escolhemos este tipo de tumor para trabalhar.

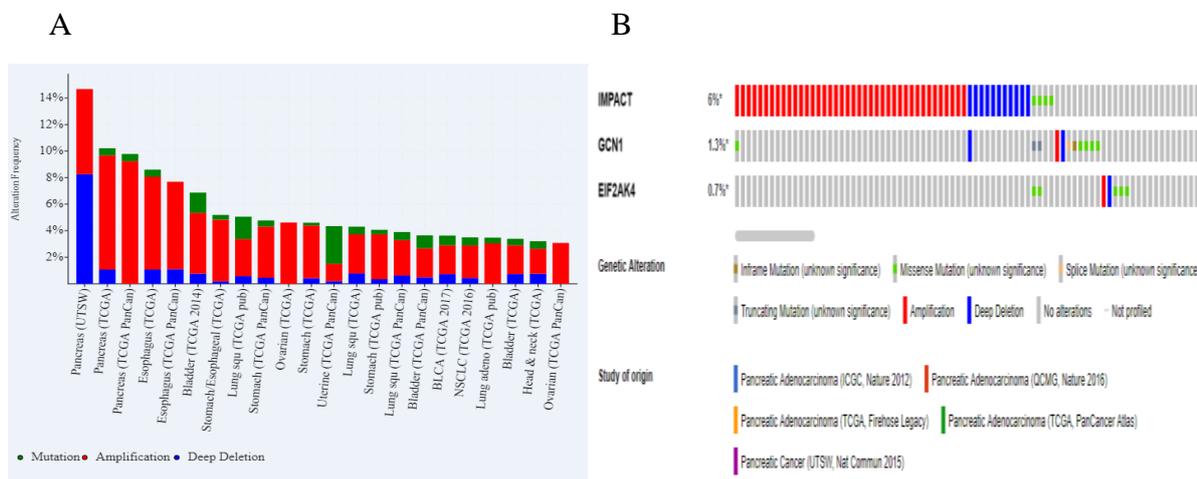


Figura 7. Gráfico apresentando o resultado da busca de alterações gênicas em *IMPACT*, *GCN1* e *GCN2* no cBioPortal. A) Porcentagem de casos em que foram encontradas alterações gênicas de *IMPACT* em diversos tipos tumorais. O adenocarcinoma de pâncreas aparece em primeiro lugar, considerando ainda dois bancos de dados independentes. B) Detalhamento das alterações gênicas encontradas dos dois bancos de dados. Pancreatic adenocarcinoma UTSW Pancreatic adenocarcinoma TCGA.

Uma alteração gênica em um destes três genes poderia levar a um desbalanço no controle traducional que afetaria vários outros processos fisiológicos. Por exemplo, uma amplificação de *IMPACT* poderia levar a uma diminuição na ativação de *GCN2*, impedindo o bloqueio traducional causado pela fosforilação de *eIF2 $\alpha$* . Deste modo este projeto tem o objetivo de avaliar se podem ser observadas alterações na expressão proteica de *IMPACT*, em adenocarcinomas de pâncreas e qual o impacto funcional dessas alterações para o processo de tumorigênese do pâncreas.

Além disso, recentemente um estudo demonstrou por análise de dados de bioinformática provenientes de bancos de dados que a proteína *IMPACT* pode estar relacionada com mecanismos

de resistência adaptativa de diversos tumores abordados na meta análise, permitindo que células tumorais se tornem capazes de enfrentar ambientes estressantes já que se encontra associado a vias de resposta ao estresse como a via ativada por GCN2 <sup>(36)</sup> portanto, desvendar as interações e o modo de ação da proteína também se apresentam como um objetivo promissor neste trabalho.

Durante o doutorado, o trabalho que havíamos proposto inicialmente se desdobrou em duas grandes vertentes de estudo. Uma delas, que já estava sendo realizada, relacionada a experimentos que caracterizariam o comportamento das linhagens celulares alteradas geneticamente para avaliar a função de IMPACT na célula tumoral e outra relacionada a localização subcelular da nossa proteína de interesse. Por esse motivo, esta tese foi escrita separando essas duas vertentes.

Primeiramente vamos expor os tópicos de material e métodos e resultados referentes as alterações moleculares que induzimos nas linhagens celulares e os ensaios funcionais. Em um segundo momento os mesmos tópicos serão abordados para mostrar nossos achados referentes a co-localização de IMPACT com outras proteínas. Esperamos que essa abordagem facilite a leitura e a compreensão do caminho que percorremos até aqui.

## 2. Objetivo

Este projeto tem o objetivo de avaliar se podem ser observadas alterações na expressão proteica de IMPACT no adenocarcinoma de pâncreas e as consequências funcionais de alterações de expressão dessa proteína no processo de tumorigênese do pâncreas.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Verificar em modelos celulares como a expressão de IMPACT afeta a tradução de mRNAs e outros processos fundamentais da tumorigênese como proliferação celular, apoptose, migração, invasão e formação de colônias;
- Avaliar in vivo as diferenças no processo de formação tumoral das linhagens nocautes para a proteína IMPACT em comparação com a linhagem controle;
- Organizar uma coorte de casos de adenocarcinoma de pâncreas cujo tecido tumoral parafinado estivesse disponível na instituição;

- Determinar a expressão de IMPACT, nestes casos de adenocarcinoma pancreático;
- Avaliar a localização subcelular de IMPACT em linhagens celulares de adenocarcinoma de pâncreas e nos tecidos tumorais parafinados disponíveis na instituição;
- Avaliar a colocalização de IMPACT com outras proteínas relacionadas a formação de grânulos tanto no núcleo quanto no citoplasma.

## **3. Material e Métodos e Resultados**

### **3.1 Parte I - Experimentos funcionais em linhagens celulares**

#### **3.1.1 Material e Métodos**

##### **3.1.1.1 Cultura celular**

A partir das linhagens celulares de adenocarcinoma de pâncreas disponíveis na instituição, estão sendo utilizadas neste projeto as linhagens comerciais ASPC-1, proveniente de uma metástase (ascite) de uma mulher de 67 anos de idade e Mia PaCa-2, proveniente de um carcinoma de pâncreas de um homem de 65 anos. Ambas as células utilizam meio RPMI 10% soro fetal bovino e para a linhagem Mia PaCa-2 foi utilizada um acréscimo de 2,5% de soro de cavalo como recomendado pela fabricante.

##### **3.1.1.2 Comparação dos níveis de IMPACT nas linhagens celulares**

Foram plaqueadas  $1,5 \times 10^5$  células de ambas as linhagens em placas de 35mm, após os devidos tratamentos as células foram lisadas e os níveis proteicos de IMPACT foram acessados através da técnica de Western Blot. As amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE em amperagem controlada. Após a corrida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi bloqueada com TBST com 5% de leite por 1 hora. O anticorpo primário de escolha foi colocado overnight, após esse processo foi colocado o anticorpo secundário acoplado a peroxidase (GE Healthcare) por 1 hora e a membrana foi revelada com kit de quimiluminescência no equipamento (Uvitec Cambridge – Alliance LD2).



importante mencionarmos que, neste trabalho, utilizamos o sistema CRISPR-Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes*, que necessita de uma sequência PAM (do inglês, *protospacer adjacent motif*) imediatamente posterior à sequência de DNA alvo, caracterizada, nesse sistema, pela sequência 5'-NGG. Dessa forma, os sgRNAs utilizados no estudo foram gerados a partir da ferramenta disponível online em <http://crispr.mit.edu/>. Nele, como entrada, é inserida a sequência de nucleotídeos de DNA da região do genoma que vai ser editada. A ferramenta fornece, então, uma lista de possíveis RNAs guias a partir da sequência de entrada, com valores de especificidade (notas, ou scores), que refletem os efeitos off target da guia no genoma humano, sendo esta nota o critério utilizado para a escolha das melhores guias (quanto maior a maior score, menores as chances de que o sistema CRISPR/Cas9 altere sequências off target). Para o gene IMPACT foram feitas as guias nomeadas de TOP (CACCGGGACGCAGGGAGCGACCAG) e BOT (AAACCTGGTCGCTCCCTGCGTCCCC).

Os plasmídeos confeccionados foram transfectados nas células ASPC-1 e Mia PaCa-2 utilizando-se Lipofectamina 3000® – Invitrogen (5µg de DNA, 5 µl de lipoamfetamina e 10 µl de reagente em 1,5 mL de meio Opti-MEM®).

Foram desenhadas as seguintes condições de transfecção:

1. Sem plasmídeo, controle de seleção com puromicina;
2. Plasmídeo vazio, ou controle sem sgRNA;
3. Plasmídeo alterado, contendo as sgRNA para localização do gene IMPACT

A transfecção foi realizada de acordo com o protocolo do reagente e o meio de cultura foi trocado no dia seguinte. Decorridas 24h, as células da linhagem Mia PaCa-2 foram tratadas com 2,5µl de puromicina (1 mg/mL) e as células da linhagem ASPC-1 foram tratadas com 3µl de puromicina (1 mg/mL) para seleção das células contendo o plasmídeo. O tempo total de seleção foi de 6 dias, sendo o meio contendo antibiótico trocado a cada 2 dias. Após a seleção com puromicina, as células foram cultivadas por 24h em meio normal de cultivo para recuperação e, então, 500 células de cada condição foram plaqueadas em uma placa de 100 mm, que foi deixada em estufa úmida a 37°C até que se formassem colônias derivadas de uma única célula (clone). Após o crescimento das colônias por aproximadamente 10 dias, as colônias individuais foram coletadas e transferidas para uma placa de 24 micropoços com o auxílio de uma micropipeta. Assim que cada colônia atingiu 80% de confluência, os clones foram expandidos em placas cada

vez maiores até que se atingisse quantidade suficiente de material para realização de um extrato proteico, utilizado para detectar os níveis de IMPACT por western blot.

Em paralelo, as células estavam sendo submetidas a protocolo de seleção com puromicina para estabelecimento da sensibilidade ao antibiótico, que seria utilizado nos experimentos de seleção após a transfecção com o plasmídeo de interesse. Para a linhagem ASPC-1 padronizamos a utilização de 3µl de puromicina e para a Mia PaCa-2 2, 5µl, ambas à 1mg/ml.

#### **3.1.1.4 Determinação da fosforilação da subunidade $\alpha$ de eIF2**

Para determinar a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 nas linhagens celulares, as células foram submetidas à 2 tipos diferentes de tratamento:

- Estresse por irradiação de UV:

1,5x 10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em placas de 35 mm. No dia seguinte o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas 2x com PBS 1x, o PBS foi retirado e as células foram submetidas a 40 J de UV. Após o tratamento, o meio de cultura convencional foi colocado e após 30 minutos de recuperação <sup>(62)</sup> o extrato foi feito para Western Blotting.

- Estresse por falta de leucina:

1,5x 10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em placas de 35 mm. No dia seguinte o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x e o meio de cultura RPMI sem leucina com 10% de soro fetal bovino dialisado foi adicionado. Após os tempos de 3h e 6h os extratos para Western Blotting foram feitos.

#### **3.1.1.5 Curva de crescimento**

Foram plaqueadas 8000 células de cada uma das linhagens celulares Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio e ASPC-1 IMPACT ko e Vazio em placas de 35 mm suficientes para serem contadas em duplicata por 5 dias seguidos. Após 72 horas do plaqueamento iniciou-se o primeiro dia de contagem que foi realizada utilizando a câmara de Neubauer, uma média da quantidade de células de cada campo foi feita e o valor foi ajustado para o volume no qual as células foram ressuspensas. Os valores finais foram normalizados pelo valor inicial plaqueado. O resultado foi analisado pelo software GraphPad Prism.

### 3.1.1.6 Ensaio de formação de colônia - Soft ágar

Para determinar o crescimento de colônias independentemente de ancoragem as células foram plaqueadas sobre agarose ultrapura (Invitrogen). O plaqueamento das células alteradas e seus respectivos controles foram feitos simultaneamente.

Primeiramente foi feito o revestimento da camada inferior com uma mistura de agarose 1% com meio de cultura concentrado 2X (adicionado de Soro Fetal Bovino a 10% para a linhagem ASPC-1 e Soro Fetal Bovino 10% + Soro de Cavalo 2,5% para a linhagem celular Mia PaCa-2), na proporção 1:1. Após a deposição em placa 35mm de 1,5 ml dessa mistura de forma a minimizar o depósito de bolhas na agarose, as placas foram fechadas e deixadas à temperatura ambiente para a solidificação da agarose. Após o revestimento da camada inferior, foi iniciada a preparação da camada superior na qual as células foram inseridas.

As células foram tripsinizadas, filtradas e contadas. Como o volume utilizado para o revestimento superior também foi de 1,5 ml de uma mistura de meio de cultura concentrado 2X (adicionado de Soro Fetal Bovino a 10% para a linhagem ASPC-1 e Soro Fetal Bovino 10% + Soro de Cavalo 2,5% para a linhagem celular Mia PaCa-2) com agarose ultrapura 0,6%, cada poço recebeu 0,75ml de meio de cultura contendo as células e 0,75 ml de agarose, portanto a concentração de células foi diluída em uma proporção de 1:2. Neste caso para o plaqueamento do número correto de células foi realizado um cálculo de ajuste. Para a linhagem celular Mia PaCa-2 foram plaqueadas 1500 células e para a linhagem celular ASPC-1 foram plaqueadas 3000 células de modo a minimizar a deposição de bolhas na mistura. Após o procedimento as placas foram fechadas para que a camada superior se solidificasse em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a solidificação, 1 ml de meio de cultura concentrado 1x (adicionado de Soro Fetal Bovino a 10% para a linhagem ASPC-1 e Soro Fetal Bovino 10% + Soro de Cavalo 2,5% para a linhagem celular Mia PaCa-2) foi adicionado sobre o revestimento de agarose para impedir o ressecamento da agarose e foi trocado semanalmente.

Após 21 dias, quando as colônias chegaram ao tamanho adequado, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 300µl da solução de tetrazólio de nitro-azul por poço para corar as colônias. As placas foram incubadas durante a noite à 37°C e no dia seguinte os poços foram fotografados.

### 3.1.1.7 Modelo Xenotransplante Ectópico

Para este estudo, foram utilizados 3 camundongos NUDES para cada uma das linhagens celulares pré-estabelecidas: ASPC-1 IMPACT ko e Vazio, Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio, totalizando 12 animais de ambos os sexos. Os animais foram produzidos e fornecidos pelo biotério do A.C.Camargo Cancer Center.

Após as células terem alcançado a confluência total, foram contadas e ressuspensas em alíquotas de 100ul de solução PBS 1X estéril. Para cada animal foram utilizadas  $1 \times 10^6$ <sup>(14,15 e 16)</sup> células implantadas ectopicamente no flanco dos animais. Após o implante, os animais foram monitorados periodicamente para a observação do crescimento tumoral. Quando os tumores alcançaram um crescimento equivalente a  $1 \text{cm}^3$ , os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia, e os tumores foram removidos, mensurados e processados para análise histológica. Os dados de tamanho do tumor e peso dos animais foram coletados semanalmente. As laminas histológicas do tumor foram coradas com Hematoxilina-Eosina para confirmar o tipo de tecido. O extrato do tecido tumoral foi feito e as amostras foram testadas em Western Blott para garantir a linhagem celular injetada em cada animal.

### 3.1.1.8 Ensaio de migração celular

Para realizar o ensaio de migração celular, as variações nocautes e vazias das linhagens ASPC-1 e Mia Paca-2 foram tripsinizadas, contadas, e  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 24 mm para garantir uma confluência maior do que 80%. No dia seguinte as células foram submetidas a um tratamento com mitomicina na concentração de  $50 \mu\text{g/ml}$  para a linhagem Mia PaCa-2 e  $60 \mu\text{g/ml}$  para a linhagem ASPC-1 pelo período de 4 horas, para inibir o processo de divisão celular e garantir que a observação final será resultante do processo de migração e não do processo de duplicação celular, após as 4h horas de tratamento, o meio de cultura convencional foi adicionado as células. Após o tratamento, utilizando uma ponteira de 200  $\mu\text{l}$  com a ponta perpendicular ao fundo da placa, foi realizado um risco de forma a retirar a camada de células presente no local onde a ponta da ponteira foi passada. Neste mesmo dia, a região riscada, foi marcada e fotografada e as células da linhagem Mia PaCa-2 foram mantidas por 48 horas e as células da linhagem ASPC-1 foram mantidas por 24 horas, ambas à  $37^\circ\text{C}$ . Após estes períodos, as mesmas regiões foram fotografadas novamente para avaliar a movimentação das células.

O ensaio descrito acima também foi realizado em condições de estresse para ambas as linhagens celulares e suas distintas condições (vazio e nocaute para a proteína IMPACT). Neste

caso o ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas no parágrafo acima, entretanto ao invés do meio de cultura convencional contendo 10% de soro fetal bovino, o meio de cultura utilizado foi RPMI sem leucina (Meio RPMI 1640 sem leucina - Cultilab) e soro fetal bovino dialisado (Gibco – Ref: 26400-044). No momento do plaqueamento as células estavam em meio de cultura convencional. No dia seguinte após terem aderido na placa o meio de cultura foi trocado pelo sem leucina e a mitomicina foi adicionada de acordo com a linhagem celular. A partir deste momento todo o ensaio foi realizado utilizando o meio de cultura sem leucina com soro fetal bovino dialisado.

Utilizando o programa ImageJ, as áreas foram quantificadas, a quantificação foi normalizada utilizando o controle como referência.

### **3.1.1.9 Ensaio de viabilidade celular por MTT**

O teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção *deformazan* reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Para isso, 10.000 células de cada uma das linhagens pré-estabelecidas foram plaqueadas em placas de 96-wells (Corning), em quintuplicatas. Para que o tratamento com radiação UV pudesse ser realizado no mesmo dia do plaqueamento, a placa foi tratada anteriormente com polilisina por meia hora para facilitar a adesão das células.

Cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1x e as células foram tratadas com diferentes intensidades de radiação UV (56J, 84J, 168J e 258J). No dia seguinte foi adicionado a cada poço 20µl de MTT à 5 mg/mL. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 200µl de solvente de MTT. As placas foram cobertas com papel alumínio e permaneceram em agitação no *orbital shaker* por 15 minutos. Em seguida, foram lidas as absorbâncias através de em um comprimento de onda de 590nm com filtro de referência em 620nm, a fim de avaliar viabilidade celular após o tratamento com estas diferentes condições propostas.

Os resultados obtidos foram armazenados em um banco de dados em Excel para Microsoft® e, posteriormente, transferidos para o software GraphPad Prism para a realização das análises estatísticas e elaboração dos gráficos.

### **3.1.1.10 Ensaio de formação de esferoides**

Para avaliar um segundo aspecto do processo de transição epitélio mesênquima, realizamos o ensaio de adesão celular a partir da elaboração de esferoides de ambas as linhagens celulares.

Para a linhagem ASPC-1 IMPACT ko e Vazio utilizamos a metodologia de Hanging Drop enquanto para a linhagem Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio utilizamos a metodologia por magnetização de células com NanoShuttle (Kit Biosciences):

- **Hanging Drop:** Uma placa de 96 well com fundo em U foi preparada com a mistura de agarose 1% na proporção de 1:1 com meio de cultura RPMI 2X. Para cada poço 50µl desta mistura foi adicionado de forma que o a mistura adquirisse o formato em U do poço. Após a polimerização, 100µl de meio de cultura foi adicionado a cada poço. As células foram tripsinizadas e para cada poço,  $3 \times 10^5$  células foram ressuspensas em 10µl de meio de cultura RPMI adicionado de 10% de SFB. Cada suspensão de 10µl foi aplicada na tampa da placa, sendo uma gota por poço e cuidadosamente invertida para fechar a placa. A placa foi incubada por 24h à 37°C. No dia seguinte, a placa foi submetida ao shaker (300 rpm) por 2 horas. Após este período, a placa foi centrifugada a 500 rpm por 5 minutos e incubada por 48 horas à 37°C. Após as 48 horas os esferoides foram plaqueados, e após 48 horas foram fixados com Paraformaldeído (4%) e corados com hematoxilina para serem fotografados.
- **NanoShuttle:** As células foram tripsinizadas, ressuspensas e contadas.  $10^5$  células foram misturadas e incubadas por 1h no shaker, à 37°C para que a mistura fosse homogeneizada. Após esse período, a mistura foi centrifugada e ressuspensa em 300µl de meio de cultura RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino e 2,5% de soro de cavalo, e colocado em uma placa com superfície de baixa adesão celular. Uma placa contendo ímãs (Concentrating Drive) foi acoplada na parte inferior da placa e foi incubada à 37°C por 48h. Após esse período, outra placa contendo ímãs foi acoplada na parte superior da placa (substituindo a tampa) (Levitating Drive) para manter os esferoides em levitação no meio de cultura. A placa foi novamente incubada à 37°C

por 48 h. Os esferoides foram plaqueados e após 48 h foram fixados com Paraformaldeído (4%) e corados com hematoxilina para serem fotografados.

### **3.1.1.11 Ensaio de adesão celular**

Para avaliar a capacidade de adesão celular das linhagens estudadas nesse projeto realizamos o ensaio de adesão. O ensaio foi realizado em uma placa de 24 well que foi anteriormente tratada da seguinte forma:

- Sem tratamento
- BSA: 40 mg/ml
- Fibronectina: 5 µg/ml
- Laminina: 5 µg/ml
- Colágeno I: 5 µg/ml

Os substratos foram diluídos para a concentração final utilizando PBS 1X, 200 µl de cada um dos substratos foi adicionado em poços de 48 well em triplicata para cada tipo celular e incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período a placa foi invertida para retirada dos substratos e foi lavada 2 x com PBS 1X. Após esse processo a placa foi bloqueada utilizando-se o meio de cultura da célula adicionados de 10% de soro fetal bovino e a placa foi incubada por 30 minutos a 37º C. A solução de bloqueio foi retirada e os poços foram lavados uma vez com PBS 1X e foi adicionado 200 µl de meio de cultura.

As células foram tripsinizadas, ressuspensas, contadas e um total de 100 mil células foi adicionada por poço após a tripsina ser retirada, completando o volume do poço para 300 µl. Após essa etapa, as células foram incubadas por 30 minutos a 37º C.

Após esse período as células foram lavadas duas vezes de 300 µl com PBS ++ gelado. Após a lavagem, as células foram fixadas em metanol gelado por 10 minutos em temperatura ambiente e foram lavadas uma vez com PBS 1X. 100 µl da solução de violeta cristal (0,5% w/v de violeta cristal em 20 % de etanol) foi adicionado em cada poço e a placa foi submetida por agitação por 10 minutos. O excesso de cristal violeta foi retirado por imersão da placa em água destilada três vezes de 1 minuto cada, sendo gentilmente agitadas. Em cada poço foi adicionado 200 µl de metanol 100% e a placa foi incubada sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. 100 µl foram retirados da solução final e foram transferidos para uma placa de 96 well e a leitura foi feita por uma absorbância de 595 nm.

### 3.1.1.12 Avaliação da relação de IMPACT com a via de mTORC1

Embora a proteína IMPACT esteja relacionada com o processo de início de tradução por uma via diferente da via de mTORC, resolvemos avaliar se de alguma forma a proteína IMPACT poderia estar relacionada com a via de mTORC, além disso, nos sentimos ainda mais viesados a testar essas possibilidades após as análises bioinformáticas realizadas pelo grupo de Ching <sup>(77)</sup> que correlacionou IMPACT à via de mTORC após análises ao banco de dados do TCGA em adenocarcinoma de pâncreas.

Para isso  $1,5 \times 10^5$  células de ambas as linhagens nocauteadas (ASPC-1 e Mia PaCa-2) foram plaqueadas. No dia seguinte foram submetidas a 4 condições:

- Condição 1: carenciadas por 48 horas
- Condição 2: carenciada por 48 horas e tratada posteriormente com soro por 2 horas
- Condição 3: carenciadas por 48 horas, tratadas com rapamicina (40 nM) por 30 minutos e depois tratada com soro por 2 horas
- Condição 4: sem tratamento

Após os tratamentos o extrato foi feito e as amostras foram submetidas ao experimento de Western Blot para avaliação das proteínas de interesse.

As proteínas escolhidas para avaliação da via foram a proteína ribossomal S6 e 4EBP que estão downstream na via de mTORC1. Os anticorpos utilizados foram:

Anticorpo	Catálogo	Titulação
RPS6 total	Cell Signaling #23175S	1:1000
Fosfo - RPS6	Cell Signaling #4856S	1:1000
4EBP total	Cell Signaling #9452S	1:1000
Fosfo - 4EBP	Cell Signaling #2855S	1:1000

### 3.1.1.13 Perfil Polissomal

O perfil polissomal é uma técnica que nos permite estudar o translato, ou seja, a parte dos mRNAs que estão sendo efetivamente traduzidos. No processo traducional, um mesmo mRNA pode ser traduzido simultaneamente por mais de um ribossomo, formando os polissomos

(75). Através dessa técnica podemos avaliar o perfil desses polissomos em relação ao ribossomo 80S, ou seja, que não está traduzindo e estabelecer níveis traducionais para células e tecidos.

Após submetermos as amostras, provenientes de extratos do citoplasma a um gradiente linear de sacarose na proporção de 5%-50%, um gráfico cromatograma é gerado, no qual podemos diferenciar nos picos a porção correspondente as subunidades 40S, 60S, ao ribossomo 80S e os picos correspondentes aos polissomos (Figura 8).

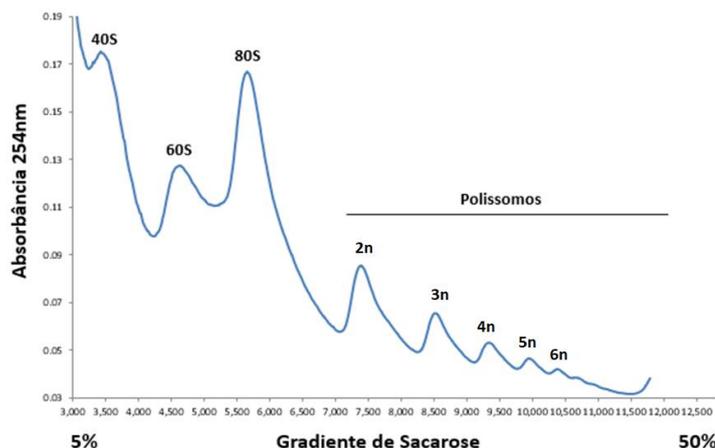


Figura 9: Representação do cromatograma gerado a partir da absorbância de 254nm. No gráfico podemos observar os picos correspondentes as subunidades ribossomais 40S, 60S e 80S e os picos correspondentes a quantidade de ribossomos que estão traduzindo um mesmo mRNA. A partir do pico 3n considerando que o processo de tradução está ocorrendo de forma eficientemente ativa, enquanto os picos 1n e 2n se encontram em início e final do processo traducional.

Os primeiros 2 picos polissomais não são considerados por estarem relacionados com mRNAs em início ou final do processo de tradução, portanto consideramos somente a partir do terceiro pico que corresponde aos mRNAs que estão sendo traduzidos de forma efetiva (Figura 9).

Este experimento nos permite separar os mRNA que estão sendo traduzidos e conseqüentemente aqueles associados a ribossomos formando os polissomos. Desta forma podemos calcular a taxa de tradução de extratos provenientes de células e tecidos e posteriormente os mRNAs associados aos ribossomos podem ser isolados a fim de avaliar quais deles estão sendo preferencialmente traduzidos. Dessa forma, podemos chegar ao conhecimento de alterações que podem estar ocorrendo a partir de diferentes tratamentos, no caso das células, e em diferentes tecidos, além de ser uma técnica que nos permite avaliar a taxa traducional de cada amostra.

Após a obtenção do cromatograma, as áreas abaixo do gráfico são quantificadas e podemos chegar a taxa traducional fazendo a relação entre a área abaixo do gráfico correspondente aos picos polissomais a partir do pico 3n e a área correspondente ao pico 80S:

$$\text{Taxa traducional} = \frac{\text{Área pico dos polissomos}}{\text{Área pico 80S}}$$

Neste trabalho o perfil polissomal foi feito tanto nas linhagens IMPACT ko quanto nas Vazio. Os tratamentos foram:

1. Carenciadas por 48h
2. Carenciadas por 48h e tratadas com soro por 2h
3. Carenciadas por 48h, 30 m com Rapamicina (40nM) e 2 h com soro
4. Carenciadas por 48h, 40 J de UV e 30 m com soro

Após tratamento das células nas condições desejadas, as mesmas foram tratadas com 100 µg/µl de ciclohexamida (CHX) (Sigma-Aldrich) por 7 min. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado + CHX 100 µg/µl e as células foram lisadas com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma-Aldrich), 100 mM KCl (Sigma-Aldrich), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich), 100 µg/mL ciclohexamida (Sigma-Aldrich), inibidor de protease (Promega) e Ribonucleoside Vanadyl Complex (Biolabs). As amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos após adição do tampão de lise, centrifugadas a 14.000 RPM por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a separação polissomal. Uma parte do sobrenadante foi recolhido para a análise do RNA total (50 µl).

Os extratos obtidos a partir das linhagens celulares foram aplicados em gradiente linear com concentrações de 5% a 50% de sacarose, os quais foram preparados em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT. O fracionamento das amostras de linhagens celulares e tecidos congelados ocorreu após ultracentrifugação a 39.000 RPM por 2 h a 4°C no rotor SW41Ti (Beckman Coulter – Catálogo: 331362). Essa centrifugação permite que mRNAs associados a ribossomos sejam separados dos mRNAs livres ou associados a poucos ribossomos sendo possível, dessa forma, isolar mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos.

### 3.1.2 Resultados

#### 3.1.2.1 Níveis de IMPACT nas linhagens celulares e seleção do modelo de estudo

Para iniciar nosso trabalho, investigamos a expressão da proteína de interesse em linhagens comerciais de adenocarcinoma de pâncreas disponíveis no laboratório. Foram feitos 6 ensaios de Western Blotting utilizando o anticorpo anti-IMPACT (Sigma HPA041045) e feitas as médias para determinar a quantidade endógena da proteína IMPACT em cada linhagem celular disponível (Figura 10):

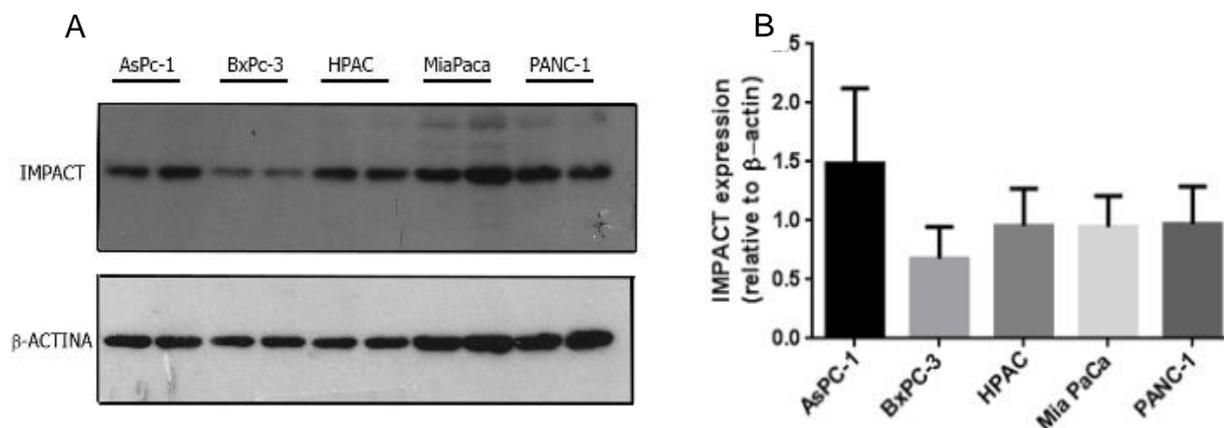


Figura 10. A. Western Blotting para a proteína IMPACT nas linhagens celulares de Adenocarcinoma de Pâncreas disponíveis na instituição. B. Quantificação da proteína IMPACT em relação a proteína β-actina. Foram utilizados os dados 6 ensaios realizados.

A partir destes experimentos, as linhagens celulares escolhidas foram ASPC-1, que apresenta o maior nível endógeno da proteína IMPACT e a linhagem Mia PaCa-2, uma vez que a linhagem BxPC-3 que seria escolhida por apresentar a menor quantidade endógena de IMPACT apresentou níveis muito baixos de transfecção e a linhagem PANC-1 necessitava de quantidades muito altas de puromicina para o processo de seleção das colônias após a transfecção com o plasmídeo, o que poderia causar alterações nas respostas posteriores.

Para avaliar se as linhagens escolhidas teriam um nível satisfatório de transfecção para serem utilizadas no protocolo que gerariam células nocaute, nós fizemos um teste de transfecção com um plasmídeo contendo apenas GFP (o que permitiria a avaliação pelo microscópio de fluorescência).

Como apresentado na figura 10 tanto a linhagem ASPC-1 quanto a linhagem Mia PaCa-2 apresentaram resultados satisfatórios com aproximadamente 50% das células expressando fluorescência.

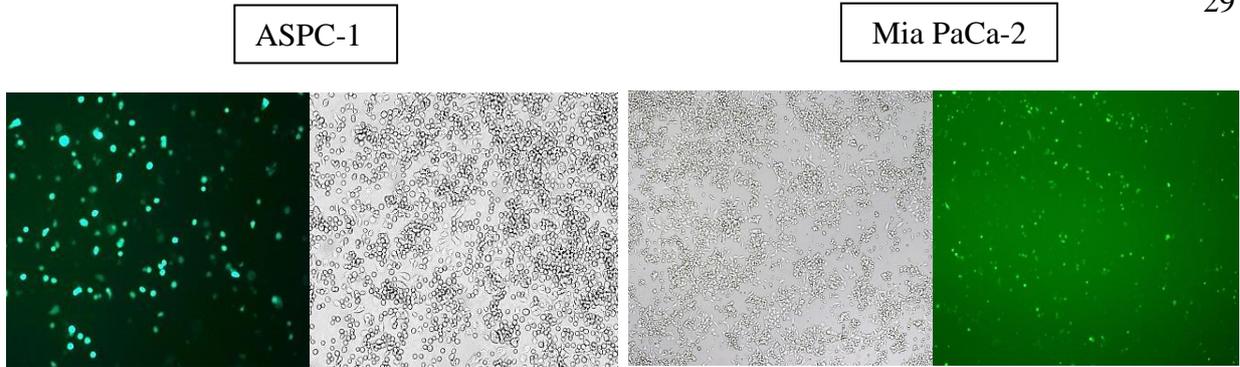


Figura 11. Teste de transfecção com plasmídeo contendo apenas GFP para as linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2, demonstrando que o protocolo foi eficiente em ambas as linhagens celulares.

Portanto, ambas as linhagens foram selecionadas para serem submetidas a metodologia de CRISPR-CAS9 para nocaute da proteína IMPACT.

### 3.1.2.2 Geração de linhagens nocautes para IMPACT

Após a escolha das linhagens mais adequadas ao estudo, realizamos o processo de silenciamento de IMPACT utilizando a técnica de CRISPR/Cas9. Para isso, o vetor Px330 foi modificado inserindo-se as guias TOP (CACCGGGACGCAGGGAGCGACCAG) e BOT (AAACCTGGTCGCTCCCTGCGTCCCC) no sítio de corte da enzima BBSI, Figura 12.

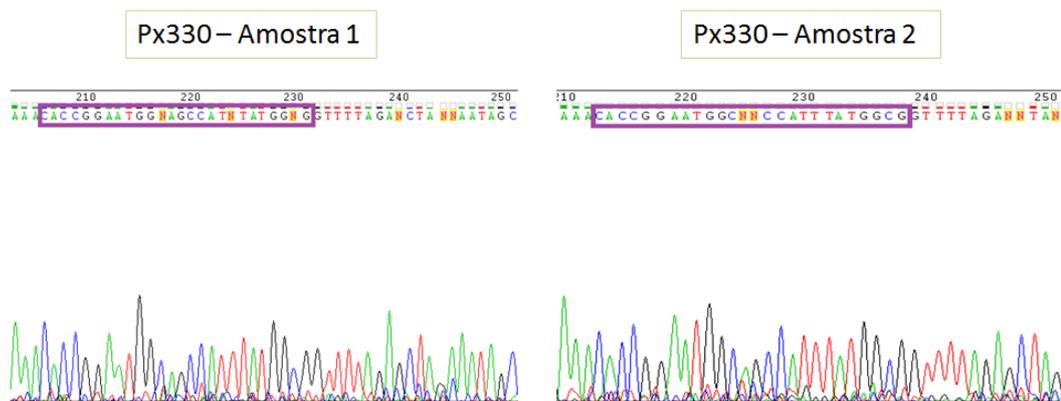


Figura 12. Sequenciamento realizado após o procedimento de inserção das guias TOP e BOT no plasmídeo PX330, mostrando que ambas as guias foram inseridas com sucesso.

Após a construção dos vetores, as células Mia PaCa-2 e ASPC-1 foram transfectadas com o vetor vazio ou o vetor contendo as guias para o gene IMPACT e selecionadas com puromicina pelo período de 6 dias. Aproximadamente 70 colônias originadas cada uma por uma única célula foram selecionadas e cultivadas até atingirem quantidade suficiente para cobrir uma placa de 24 mm.

A expressão de IMPACT em cada clone foi testada por Western Blot e foram escolhidos 7 clones para a linhagem ASPC-1 e 6 clones para a linhagem Mia PaCa-2, que não apresentaram bandas para a proteína de interesse mesmo quando submetidas à uma superexposição. Para evitar trabalhar com um clone, o que poderia levar a obtenção de resultados artefatuais devido à presença de alterações gênicas inespecíficas geradas durante o processo de seleção, optou-se por trabalhar com um pool de clones de cada célula, gerando dessa forma uma sub-linhagem com população única.

Depois deste procedimento, um novo Western Blotting foi realizado para garantir que o pool estivesse nocaute da proteína IMPACT (Figura 13)

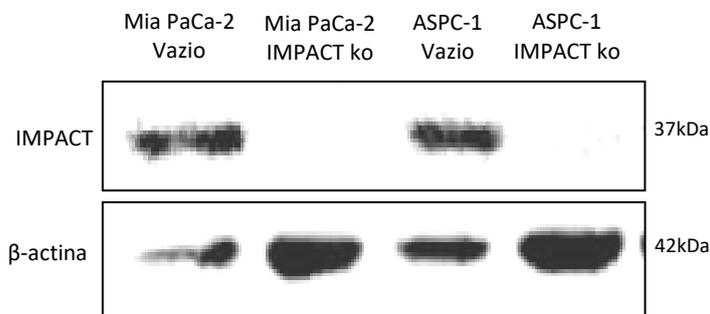


Figura 13. Western Blotting das sub-linhagens ASPC-1 Vazio e IMPACT ko e Mia PaCa-2 Vazio e IMPACT ko demonstrando que pool das colônias nocautes também se apresentou nocaute para a proteína IMPACT.

### 3.1.2.3 Determinação da fosforilação da subunidade $\alpha$ de eIF2

Primeiramente, realizamos experimentos para determinar se a ausência de IMPACT estaria levando a um efeito esperado na resposta ao estresse, e se poderíamos encontrar diferenças entre as linhagens nocaute e vazia para essa resposta.

Na ausência de IMPACT, é esperado que ocorra um aumento da atividade de GCN2, levando a um aumento na fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2. Para avaliar se as linhagens apresentariam a resposta de fosforilação esperada quando confrontadas com o estresse, as células foram submetidas a dois tipos de estresse relacionados com a fosforilação de eIF2 via ativação de GCN2: falta de leucina e exposição à radiação UV <sup>(26)</sup>.

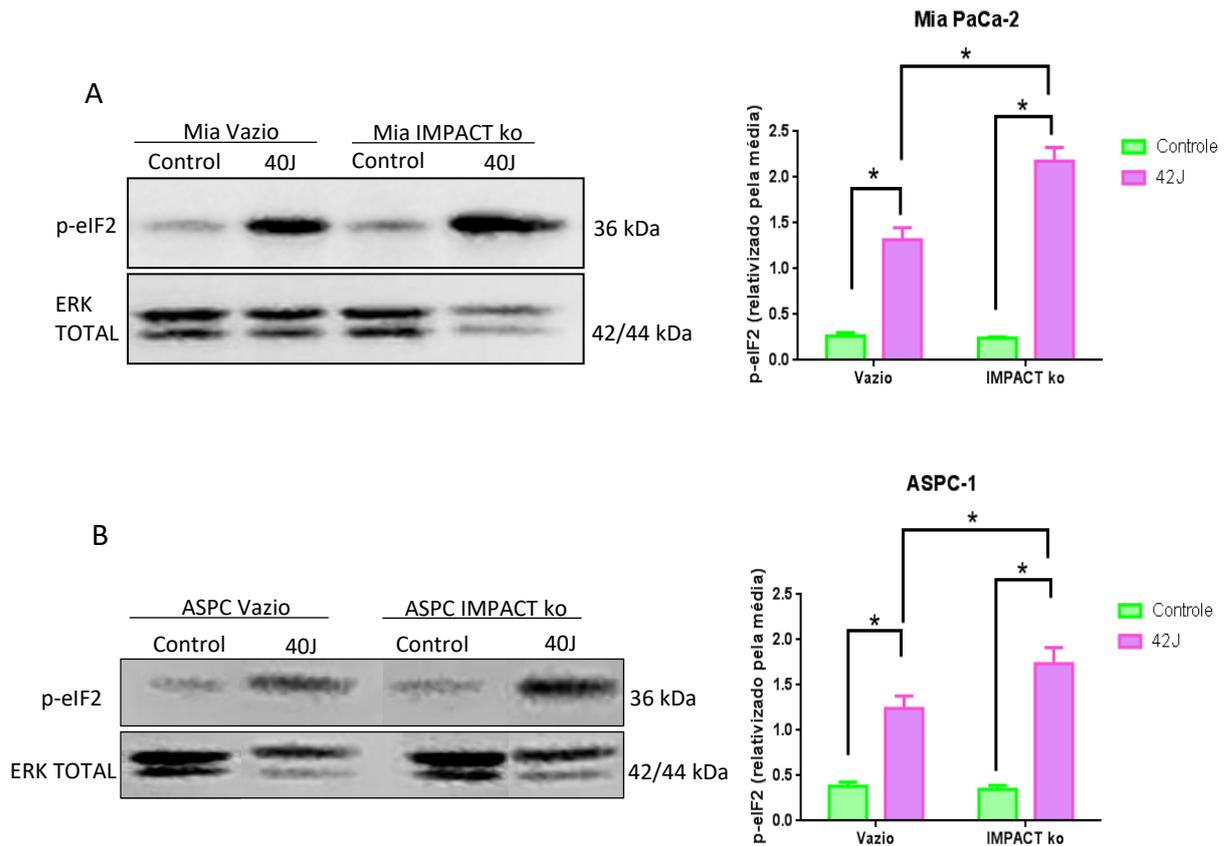


Figura 14. Western Blot e quantificação da fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 para as linhagens Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio (A) e ASPC-1 IMPACT ko e Vazio (B) após tratamento com 40 J de luz UV, demonstrando que o estímulo com UV fosforila a subunidade  $\alpha$  de eIF2 e que em células nocautes essa fosforilação é maior do que em células controles como o esperado. 2way ANOVA  $p=0,0024$  (Mia PaCa-2) e  $p=0,042$  (ASPC-1).

Em relação ao estresse por exposição à radiação UV, podemos observar que o tratamento foi efetivo (Figura 14), ou seja, houve a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 para ambas as linhagens celulares. Além disso, as linhagens nocautes de ambas as células apresentaram maior nível de fosforilação quando comparadas com as linhagens controles, mostrando que a falta da proteína IMPACT gera um aumento da fosforilação em condições de estresse, uma vez que, não se apresenta como um competidor para a ligação entre GCN1/GCN2.

Em relação ao estresse por falta de leucina (Figura 15) podemos observar que o tratamento também foi efetivo, ou seja, houve a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 para ambas as linhagens celulares. Entretanto, ao compararmos os níveis de fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 das linhagens nocautes com seus controles, não é possível observar uma diferença significativa, indicando que a presença ou ausência da proteína IMPACT não interfere na resposta ao estresse por falta de leucina nas linhagens estudadas, diferentemente nos resultados encontrados nos

experimentos com estresse por radiação UV. Entretanto, talvez se nos testássemos outros tempos poderíamos observar alguma resposta a esse tratamento.

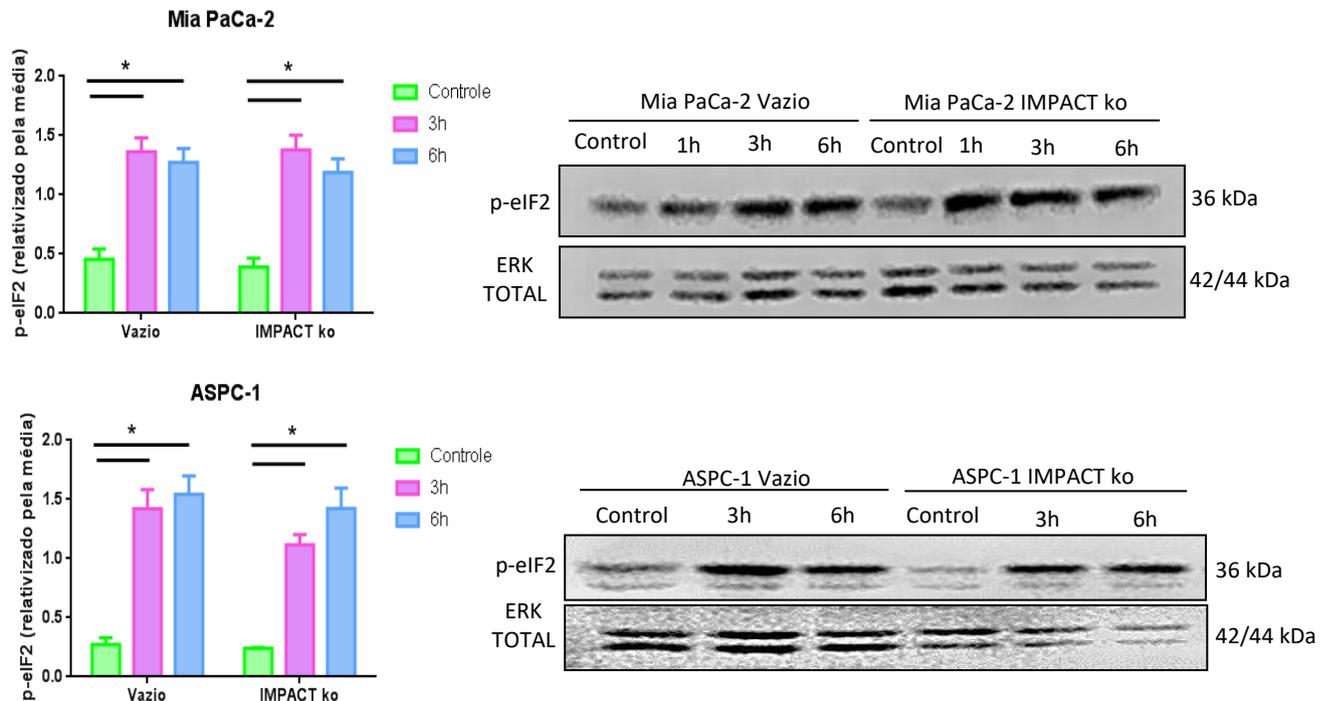


Figura 15. Western Blot e quantificação da fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 para as sub-linhagens sub-linhagens Mia PaCa-2 Vazio, Mia PaCa-2 IMPACT ko, ASPC-1 Vazio e ASPC-1 IMPACT ko após tratamento com meio de cultura sem leucina, demonstrando que o estímulo fosforila a subunidade de eIF2 e que em células nocautes essa fosforilação é maior do que em células controles. 2way ANOVA  $p=0,88$  (Mia PaCa-2) e  $p=0,53$  (ASPC-1).

Como explanado anteriormente, GCN2 está relacionada com a resposta aos 2 tipos de estresse, falta de aminoácidos no meio e danos gerados por radiação UV. De acordo com os resultados obtidos, podemos levantar a possibilidade de que os mecanismos envolvendo essas duas respostas não sejam exatamente os mesmos e possam apresentar variações, uma vez que a falta de IMPACT altera os níveis de fosforilação de eIF2 no caso de estresse por radiação UV e não gera alteração quando as células são submetidas a estresse por falta de leucina. Como GCN2 não responde tão bem a falta de leucina <sup>(49)</sup> seria interessante testar essas células na ausência de outro aminoácido. Recentemente Gaurav e seu grupo demonstraram que a falta de asparagina no meio pode ativar GCN2 por estresse por falta de aminoácidos, fosforilando eIF2 e ativando a transcrição de genes relacionados a resposta ao estresse por intermédio de ATF4 <sup>(74)</sup>. Portanto, testar essas células em situação de estresse a outros aminoácidos pode nos trazer um resultado diferente

daquele observado a partir da privação por leucina. No entanto, infelizmente não houve tempo viável neste projeto para realizar este tipo de estresse.

### 3.1.2.4 Crescimento não é alterado pela falta de IMPACT

Após a verificação da resposta das células no que diz respeito à fosforilação de eIF2 $\alpha$ , fomos observar se a ausência de IMPACT apresentava algum efeito sobre diversas propriedades biológicas relacionadas à tumorigênese.

Para determinar se existe diferença entre a proliferação das células nocauteadas em comparação com as células controles optamos por realizar a curva de crescimento dessas duas linhagens (Figura 16).

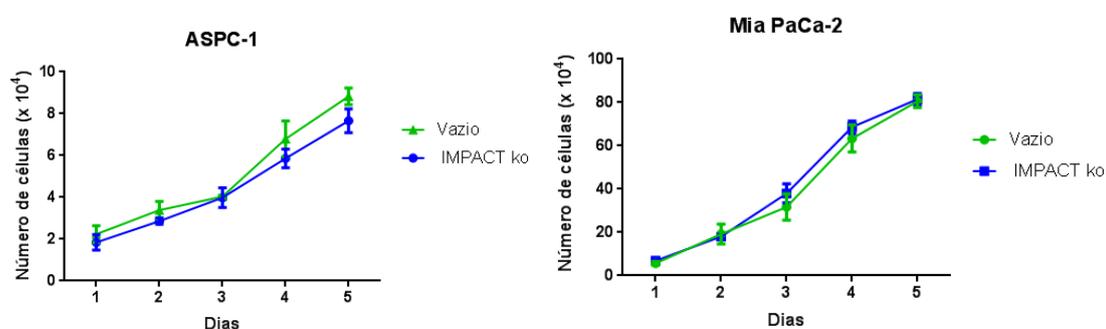


Figura 16. Curva de crescimento das sub- linhagens ASPC-1 IMPACT ko em comparação com ASPC-1 Vazio e Mia PaCa -2 IMPACT ko em comparação com a Mia PaCa-2 Vazio. 2way ANOVA  $p=0,18$  (ASPC-1) e  $p=0,57$  (Mia PaCa-2)

A proliferação das linhagens nocauteadas quando comparadas com suas respectivas linhagens controles não apresentou diferenças significativas, indicando que a proteína IMPACT quando nocauteada não gera nenhuma alteração no processo de crescimento celular em condições normais de crescimento. Tentamos avaliar também o crescimento em condições de estresse, como ausência de leucina, no entanto, as células não se mantiveram viáveis nestas condições pelo período necessário de 7 dias e o experimento não pode ser realizado.

### 3.1.2.5 Células IMPACT ko geram menos colônias *in vitro* e *in vivo*

Como não observamos diferenças nas taxas de proliferação, optamos por avaliar a seguir a capacidade de formação de colônias independentemente de ancoragem, que é uma característica que está relacionada com o processo de metástase uma vez que a célula se torna capaz de gerar colônias independentemente de estar ligada a uma lâmina basal. Para avaliar essa característica foi realizado o ensaio de formação de colônias em soft ágar (Figuras 17 e 18).

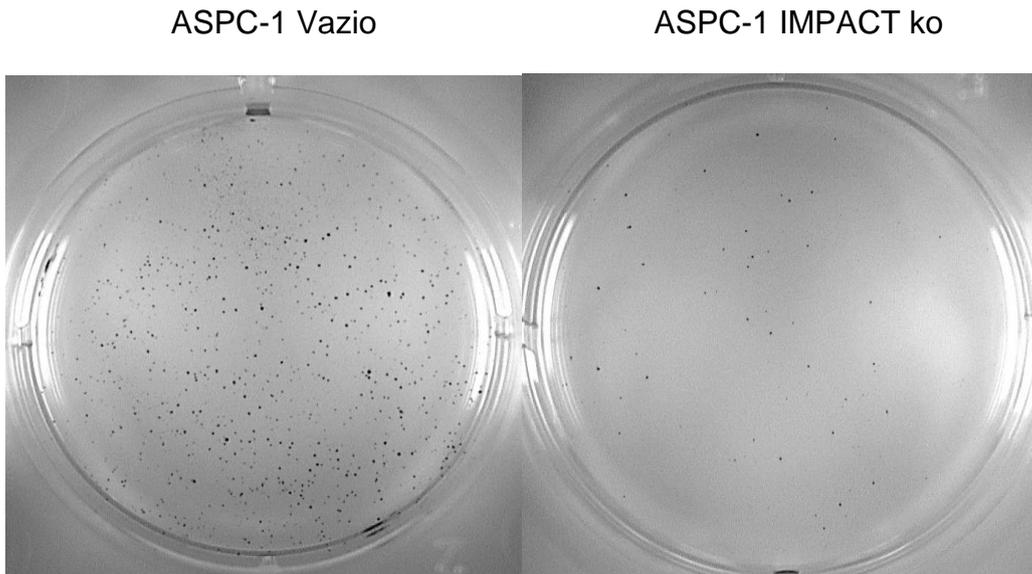


Figura 18. A: formação de colônias da linhagem Mia PaCa-2 Vazio, B: formação de colônias da linhagem Mia PaCa-2 KO para a proteína IMPACT. Ambas as placas foram cultivadas por 21 dias e coradas com tetrazólio de nitro-azul.

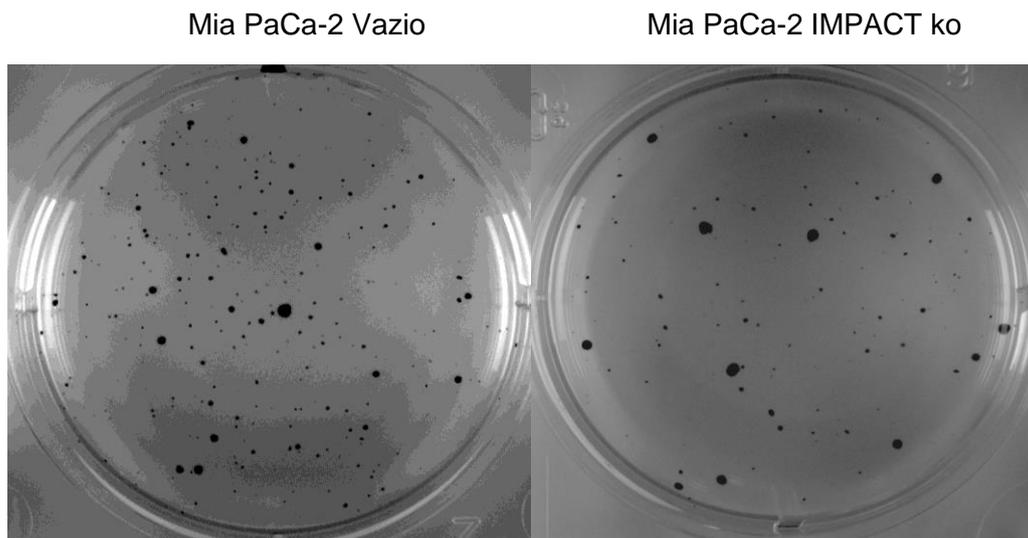


Figura 17. A: formação de colônias da linhagem ASPC-1 Vazio, B: formação de colônias da linhagem ASPC-1 IMPACT ko para a proteína IMPACT. Ambas as placas foram cultivadas por 21 dias e coradas com tetrazólio de nitro-azul

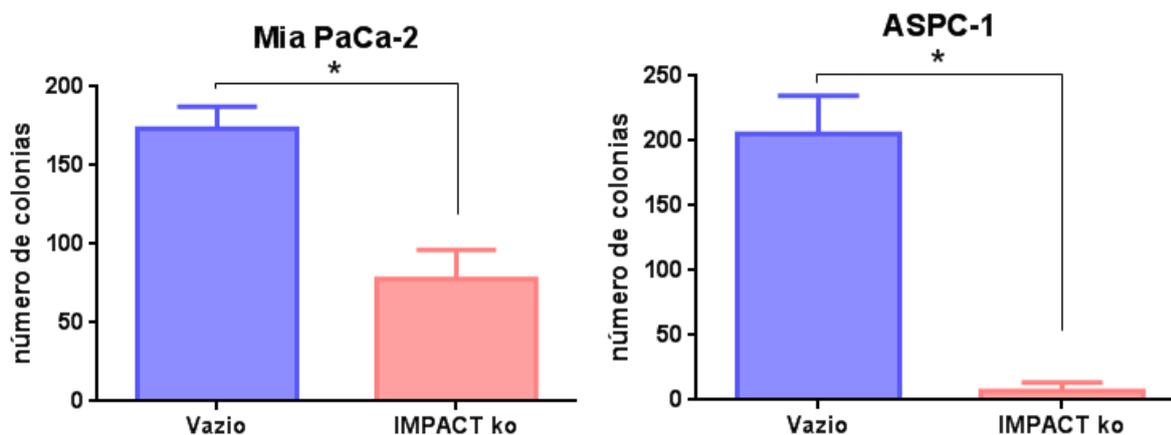


Figura 19. Quantificação das colônias para as linhagens ASPC-1 (Vazio e IMPACT ko) ( $p=0,0003$ ) e Mia PaCa-2 (Vazio e IMPACT ko) ( $p=0,002$ ) mostrando que as células nocaute de ambas as linhagens geram menor quantidade de colônias. Teste T não pareado,  $p=0,0003$  (ASPC-1) e  $p=0,002$  (Mia PaCa-2)

De acordo com os gráficos acima (Figura 19) e com os resultados estatísticos ( $p=0,0003$  para a linhagem ASPC-1 e  $p=0,002$  para a linhagem Mia PaCa-2) podemos observar que as linhagens nocautes apresentam menor capacidade de gerar colônias independente de ancoragem quando comparadas com as linhagens controles. Células normais quando dissociadas do substrato entram em estado apoptótico e morrem <sup>(32)</sup>, entretanto células transformadas adquirem a capacidade de formar colônias e se manterem vivas independente da ancoragem em substratos. Portanto, o fato de células nocauteadas para a proteína IMPACT apresentarem menor formação de colônias quando colocadas em condições em que não podem utilizar um substrato para se fixarem indica que a proteína de interesse desse estudo pode estar relacionada com o perfil de maior agressividade tumoral dessas células.

Para confirmar a possibilidade de que as células que não expressam IMPACT possuam menor grau de agressividade tumoral, realizamos ensaios *in vivo* de crescimento tumoral subcutâneo em camundongos imunodeficientes. De maneira semelhante ao observado no ensaio de soft ágar (Figuras 17 a 19), as células da linhagem ASPC-1 IMPACT ko e Mia PaCa-2 IMPACT ko e apresentam menor crescimento *in vivo* do que as células Vazio, demonstrando menor agressividade (Figura 20), resultado que está de acordo com o ensaio de soft ágar.

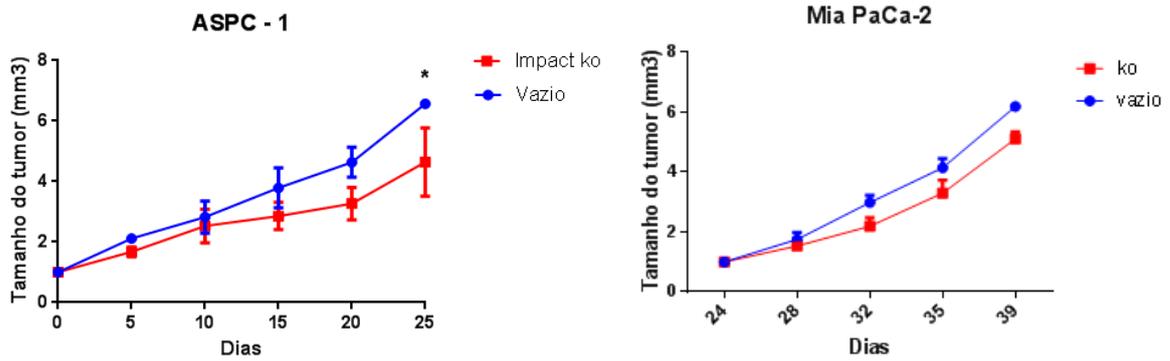


Figura 20. Curva de crescimento tumoral após injeção das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 vazio e IMPACT ko em camundongos nude mostrando que células nocautes apresentam menor crescimento tumoral quando comparadas com células controles. 2way ANOVA  $p=0,039$  (ASPC-1) e  $p<0,0001$  (Mia PaCa-2).

### 3.1.2.6 Falta de IMPACT não altera viabilidade celular

Para avaliar se havia diferença no nível de morte celular nas linhagens celulares de adenocarcinoma de pâncreas realizamos o ensaio de morte celular comparando as linhagens nocautes para a proteína IMPACT com seus controles. A comparação foi realizada após o tratamento com diferentes doses de radiação UV que foi utilizado como condição de estresse, uma vez que as linhagens celulares nocauteadas para a proteína de interesse apresentaram maior fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2.

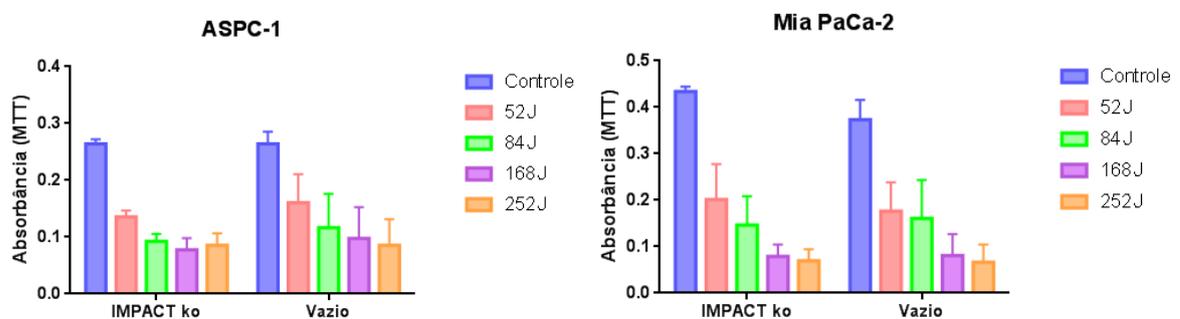


Figura 21: Níveis de viabilidade celular comparadas entre as linhagens celulares Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio e ASPC-1 IMPACT ko e Vazio sob estresse de UV. Foram usadas diversas doses de radiação: 52J, 84J, 168J e 252J. Não houve diferença significativa entre os grupos. 2way ANOVA  $p=0,94$  (ASPC-1) e  $p=0,75$  (Mia PaCa-2).

Como é possível observar nos gráficos apresentados acima (Figura 21), as linhagens nocauteadas para a proteína IMPACT tanto para a linhagem ASPC-1 quanto para a linhagem Mia PaCa-2 não apresentam diferença significativa nos níveis de morte celular quando comparadas com suas respectivas linhagens controles, mostrando que provavelmente a atuação da proteína IMPACT não esteja ligada ao processo de morte celular deflagrado por dano ao DNA, uma vez que

sua ausência não apresentou uma alteração significativa na morte das células em situação de estresse.

Entretanto, estas duas linhagens celulares não apresentam a proteína p53 tipo-selvagem. Foi previamente descrita na literatura a relação entre a ativação de GCN2 e a presença de p53 onde em células nocauteadas para GCN2, foi visto um aumento da expressão de p53, embora a quantidade de mRNAs dessa proteína não estivesse alterada, indicando que essa regulação se dá por um evento pós transcricional. Além disso, os mRNAs correspondentes aos genes alvos de p53, como p21 também apresentaram um aumento. Por esse motivo, acreditamos que talvez em linhagens p53 selvagem possa existir alguma diferença de viabilidade entre as linhagens ko e as linhagens Vazio para IMPACT. Infelizmente não houve tempo hábil neste projeto para o estabelecimento de linhagens nocaute para IMPACT que apresentassem p53 tipo-selvagem.

### **3.1.2.7 Migração parece não estar relacionada com IMPACT**

Para verificar mais um aspecto do grau de agressividade dessas células optamos por avaliar a migração celular, uma das características celulares ligada aos processos de invasão, metástase e transição epitélio-mesênquima, que a célula tumoral deve adquirir para sair da região do tumor primário e se dirigir ao sítio metastático <sup>(7)</sup>.

Para avaliar a capacidade de migração, realizamos um ensaio de wound healing. Nesse ensaio, as células foram plaqueadas em quantidade suficiente para a formação de uma monocamada. A seguir, foi realizado um risco removendo parte das células deixando uma “ferida”. Após 24/48 horas, foi avaliada a capacidade das células de migrar fechando a “ferida”. É importante ressaltar que as células foram tratadas com mitomicina para bloquear a capacidade de proliferação, de modo que este aspecto não interferisse no resultado de migração.

Os gráficos da Figura 22 apresentam a diferença de migração das linhagens nocautes em comparação com suas linhagens controles. Ambas as linhagens foram submetidas a condições normais e condições de estresse por falta de leucina. Não foi possível realizar esse ensaio submetendo as células à estresse por UV pois após o estímulo, boa parte das células morrem e a monocamada formada para gerar a ferida se desfaz.

Tanto em condições normais quanto em condições de estresse, a ausência de IMPACT não parece alterar de forma significativa o padrão de migração das células para a linhagem ASPC-1, entretanto para a linhagem Mia PaCa-2 podemos observar uma diferença significativa ( $p=0,0286$ ).

No entanto, como este fenômeno não foi observado nas duas linhagens, existe a possibilidade de que seja um efeito inespecífico criado na construção da linhagem.

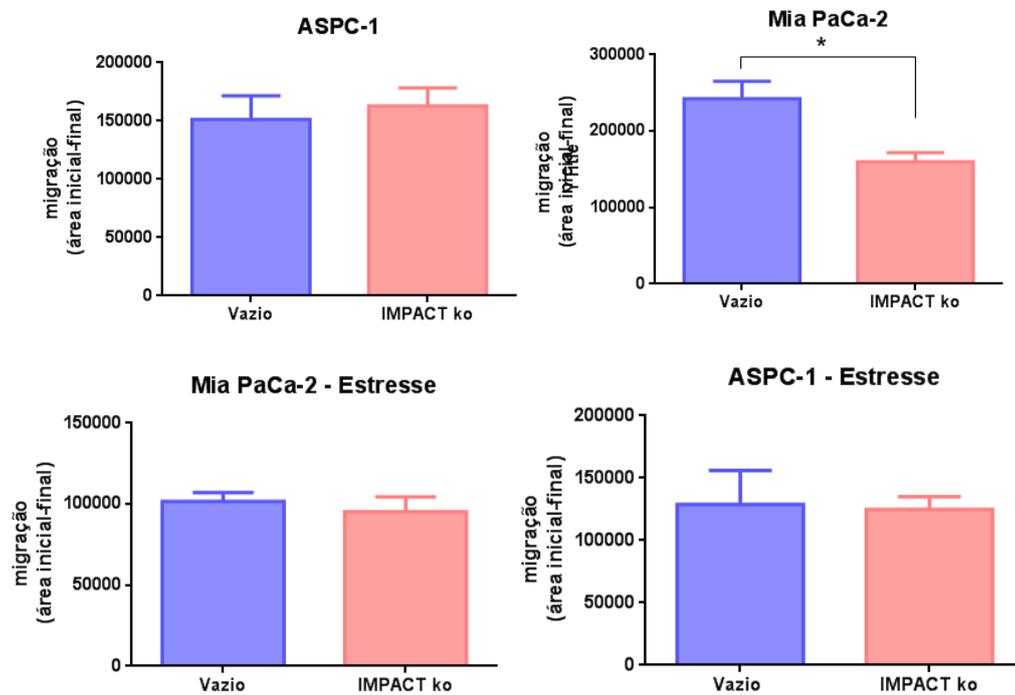


Figura 22. Quantificação da migração em área das linhagens ASPC-1 (Vazio e IMPACT ko) e Mia PaCa-2 (Vazio e IMPACT ko). Teste de Mann-Whitney,  $p=0,48$  (ASPC-1),  $p=0,028$  (Mia PaCa-2),  $p=0,65$  (ASPC-1 – Estresse) e  $p=0,82$  (Mia PaCa-2 – Estresse).

Deste modo, optamos por avaliar as propriedades de adesão célula-célula e célula-substrato em ensaios de formação de esferoides e adesão.

### 3.1.2.8 Células nocautes geram menos esferoides

Para avaliar um segundo aspecto do processo de transição epitélio mesênquima, realizamos o ensaio de elaboração de esferoides de ambas as linhagens celulares. As células da linhagem ASPC-1 tiveram seus esferoides feitos pela metodologia de hanging drop enquanto, as células da linhagem Mia PaCa-2 tiveram seus esferoides feitos pela metodologia de nanoshuttle. Os esferoides foram formados e plaqueados para avaliar o halo de células formado ao redor dos esferoides.

Para cada linhagem celular foram quantificados no mínimo 7 esferoides para os nocautes e 7 esferoides para a linhagem controle. De acordo com o gráfico abaixo (Figura 24) gerado a partir das imagens (Figura 23) pudemos observar que os esferoides gerados a partir de células nocautes apresentam maior área em comparação aos originados de células controles que

apresentam IMPACT, indicando que talvez essas células apresentem menor capacidade de adesão célula a célula, ou maior afinidade pelo substrato.

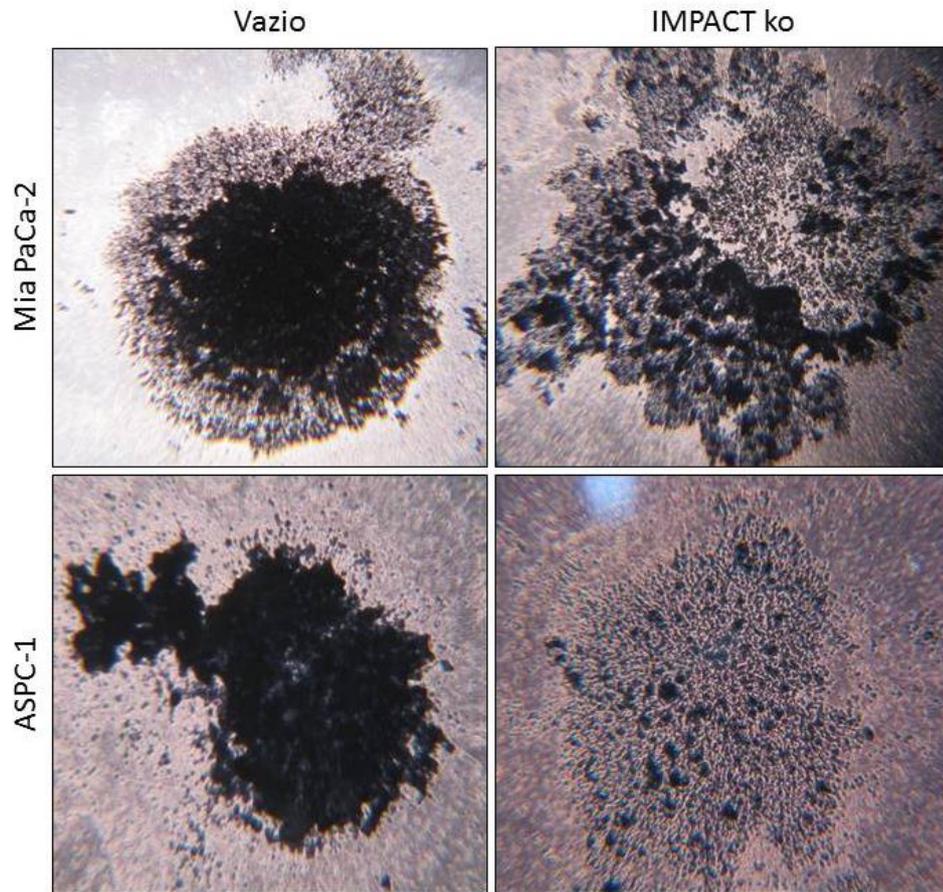


Figura 23: Imagens dos esferoides formados pelas linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio (aumento de 20X). Podemos observar as diferenças na formação e manutenção das estruturas de esferoides entre as linhagens nocautes que agregam menos as células e vazias que mantém mais facilmente o formato agregado, o que resulta em um aumento da área, representada na Figura 24 em forma de gráfico.

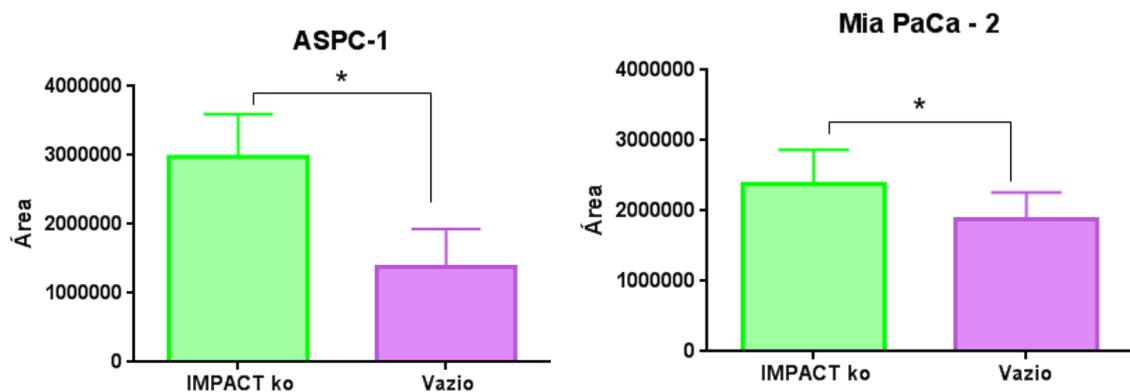


Figura 24: Gráficos mostrando a diferença das áreas entre as linhagens nocautes e controles. Tanto para a linhagem ASPC-1 quanto para a linhagem Mia PaCa-2 as células nocautes apresentam maior área de esferoides, mostrando que esses esferoides se desfazem mais facilmente após o plaqueamento. Teste Mann -Whitney,  $p=0,0002$  (ASPC-1) e  $p=0,0156$  (Mia PaCa-2).

### 3.1.2.9 IMPACT não altera a adesão celular

Com o intuito de determinar se as células apresentam diferenças na capacidade de adesão, realizamos o ensaio com diversos tipos de substrato e para ambas as linhagens celulares. Segundo esse resultado (Figura 25), não podemos observar diferenças significativas de capacidade de adesão entre as linhagens nocautes e as linhagens controles, em nenhum tipo de substrato utilizado.

Analisando o resultado obtido no ensaio de formações de esferoides (Figura 24) nós nos questionamos o que estaria fazendo com que os esferoides das linhagens nocautes se desfizessem com maior facilidade. Duas hipóteses foram levantadas para explicar essa condição: as diferenças poderiam ser encontradas no grau de capacidade dessas células de aderir ao substrato ou na capacidade de adesão célula-a-célula.

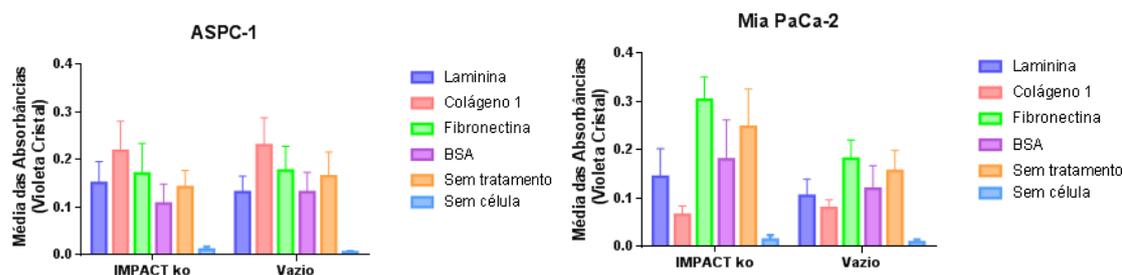


Figura 25: Ensaio de adesão celular. Foram utilizados como substratos Laminina, Fibronectina, Colágeno I e BSA, além dos controles sem tratamento e sem célula. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, 2way ANOVA,  $p=0,996$  (ASPC-1) e  $p=0,694$  (Mia PaCa-2).

Observando esse novo resultado obtido após o ensaio de adesão, como não foram encontradas diferenças na capacidade de adesão ao substrato acreditamos que a capacidade de adesão célula-a-célula das linhagens nocautes possam estar alteradas.

### 3.1.2.10 Avaliação da relação de IMPACT com a via de mTORC1

Em uma publicação recente de Ching e seu grupo <sup>(36)</sup> foi apresentada a partir de meta-análises de bioinformática com dados do TCGA para amostras tumorais e GTEx para amostras não tumorais de sequenciamento de RNA a correlação diretamente proporcional de expressão de *IMPACT* com genes relacionados a via de mTORC1 como *MTOR* e *RPS6KB1*, enquanto apresentou uma correlação inversamente proporcional com a expressão de genes relacionado a resposta ao

estresse como *ATF4* e *DDIT3*. Para avaliar se essa relação de expressão de IMPACT com genes da via de mTORC1 está diretamente ou indiretamente relacionada nós utilizamos as linhagens celulares nocauteadas a fim de descobrir se há alteração na resposta fosforilativa das proteínas da via de mTORC1 na ausência de IMPACT.

As células foram submetidas a tratamento com rapamicina por 30 minutos e posteriormente tratadas com soro para estimular a tradução. Para avaliar a atuação de mTORC1 nós avaliamos as proteínas RPS6 e 4eBP, que se encontram downstream na via.

De acordo tanto com a figura 26 quanto com a figura 27 não foram observadas alterações na fosforilação das proteínas avaliadas comparando-se as linhagens nocautes e as linhagens controles. A partir desse resultado, podemos dizer que a falta da proteína IMPACT não altera a funcionalidade da via de mTORC em situações normais, já que em ambos os casos (células nocautes e vazias) a fosforilação de 4E-BP e S6 não se alteram. Neste caso, portanto, a relação diretamente proporcional de expressão das proteínas da via de mTORC (*MTOR* e *RPS6KB1*) com a expressão de *IMPACT* encontradas por Ching <sup>(36)</sup> e seu grupo podem ser, até o momento associadas com a resposta da via de ATF4 que é ativada pela fosforilação de eIF2. Entretanto, Ching e seu grupo, utilizaram a metodologia de meta análise, enquanto nós realizamos um ensaio funcional, como as diferenças metodológicas precisam ser consideradas, a partir de novos estudos ainda podem ser avaliadas interações mais próximas entre IMPACT e a via de mTORC1.

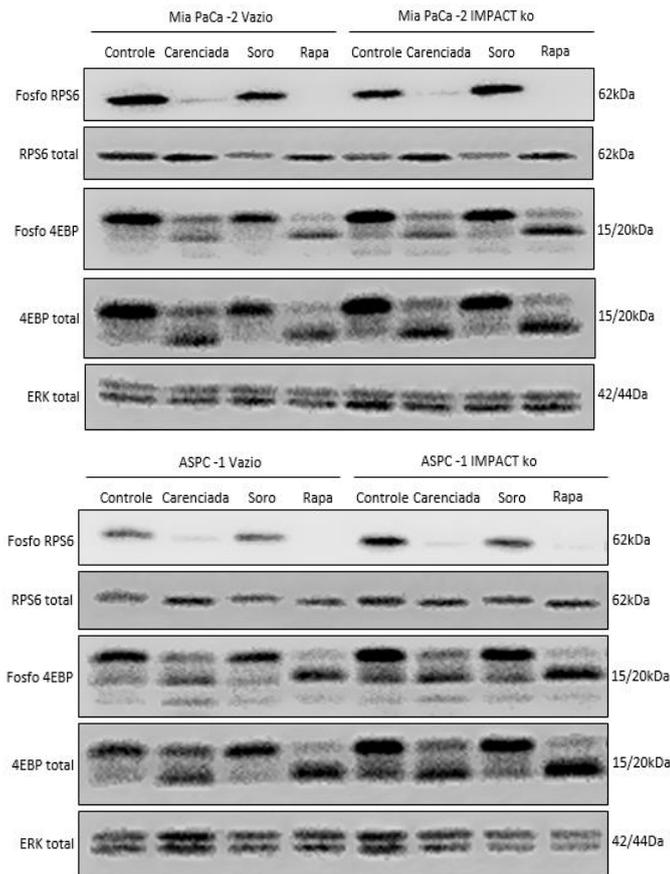


Figura 26: Western blot mostrando as proteínas downstream a mTORC e suas fosforilações tanto nas linhagens IMPACT ko quanto nas linhagens Vazio de ambas as células de adenocarcinoma de pâncreas. Não podemos observar diferença significativa entre as linhagens nocautes e seus respectivos controles.

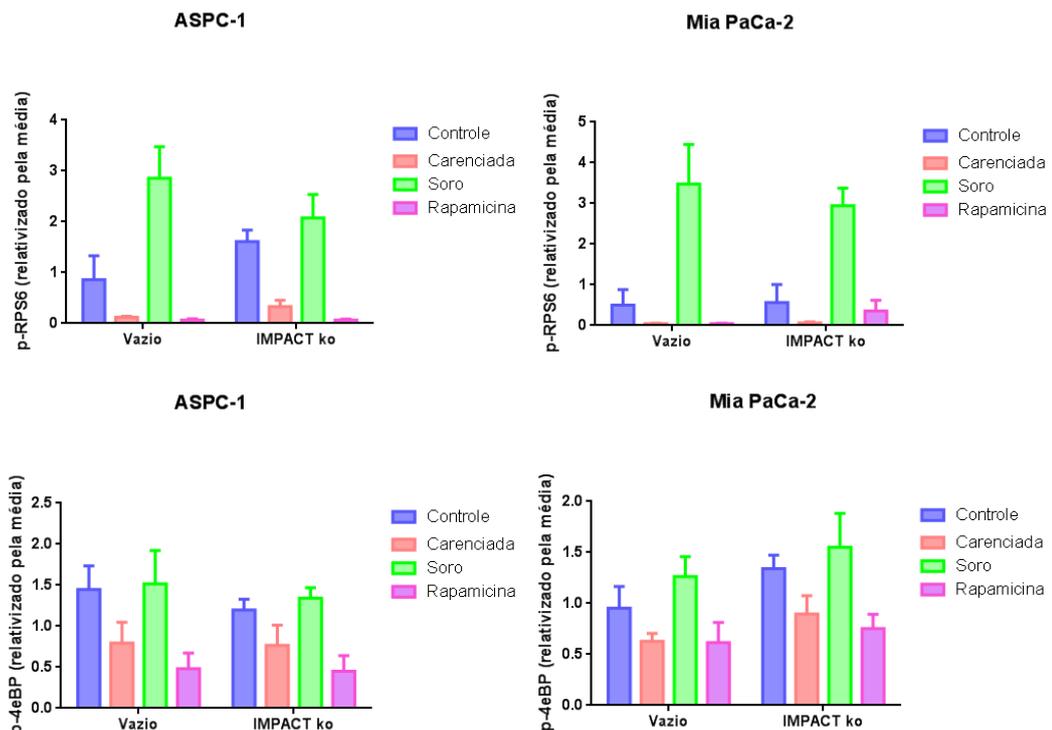


Figura 27: Quantificação dos experimentos de Western Blot para avaliar as diferenças de expressão e fosforilação das proteínas RPS6 e 4eBP, relacionadas com a via de mTORC. Não podem ser identificadas diferenças significativas na fosforilação dessas proteínas quando comparamos as linhagens IMPACT ko com as vazias. 2way ANOVA,  $p=0,182$  (ASPC-1 – RPS6),  $p=0,959$  (ASPC-1 - 4eBP),  $p=0,801$ (Mia PaCa-2 - RPS6) e  $p=0,936$  (Mia PaCa-2 - 4eBP).

### 3.1.2.11 IMPACT diminui as diferenças entre as taxas de tradução

Como IMPACT afeta o controle traducional, e esperado que sua ausência afete os níveis de tradução da célula. Para avaliar esse aspecto foi realizado um ensaio de perfil polissomal. Este experimento foi realizado para avaliar a taxa de tradução das linhagens celulares e posteriormente avaliar os mRNAs preferencialmente traduzidos. Desta forma podemos diferenciar os picos das subunidades ribossomais 40S, 60S, 80S e os picos de polissomos de acordo com o número de ribossomos associados ao mRNA.

Dois milhões de células foram plaqueadas em placas 150mm e foram incubadas por 3 dias. No quarto dia, as células foram carenciadas por 48 horas e após o tratamento (carenciada, soro, rapamicina, UV) o extrato foi feito. Após a preparação do gradiente de sacarose nas concentrações de 5% e 50% as amostras foram aplicadas no gradiente e centrifugadas por 2h à 39000 RPM e depois o gráfico cromatograma foi gerado e posteriormente normalizado pela média dos valores que compreendem a região de interesse (Figura 28).

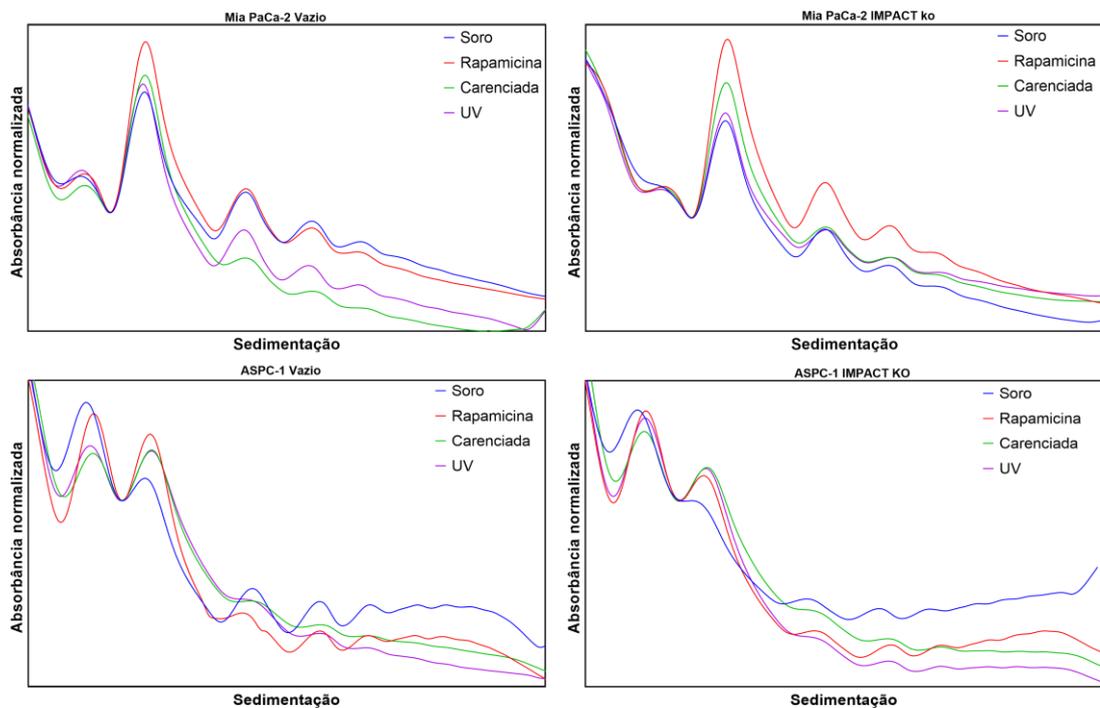


Figura 28: Cromatograma gerado a partir dos valores de absorvância normalizados. Podemos observar no gráfico os picos referentes as unidades ribossomais 40S, 60S e 80S e os picos dos polissomos logo em seguida. Para avaliar a taxa de tradução, a relação **área dos picos do polissomos/área do pico de 80** é realizada.

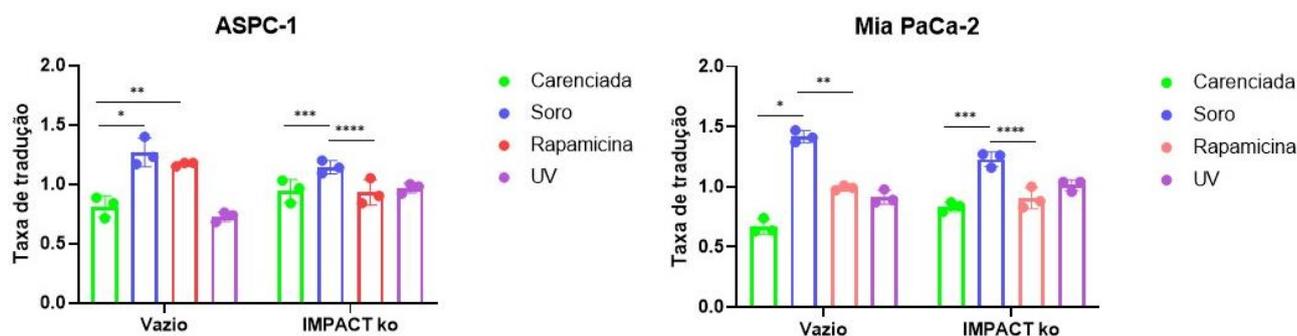


Figura 29. Gráficos apresentando a taxa de tradução das linhagens ASPC-1 IMPACT ko e Vazio e Mia PaCa-2 IMPACT ko e Vazio com diversos tratamentos: Soro, Carenciada, Rapamicina e UV. Teste utilizado, Two Way Anova. Para a linhagem ASPC-1 as diferenças estatisticamente significativas ocorreram para as seguintes condições: ASPC-1: \*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p = 0,0003$ , \*\*\*  $p = 0,0432$ , \*\*\*\*  $p = 0,0267$ . Mia PaCa-2: \*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Ao olharmos os gráficos acima, podemos observar primeiramente que para ambas as células, ASPC-1 e Mia PaCa-2 as diferenças entre as taxas de tradução dos tratamentos carenciados e soro são maiores nas células Vazio quando comparadas com as células IMPACT ko. Essa diferença nos mostra que a ausência de IMPACT na célula provavelmente por manter GCN2 sempre livre para se associar a GCN1 diminui os níveis de tradução, uma vez que a ativação da via de GCN2 inibe a atuação da via de mTORC1 <sup>(71 e 72)</sup>.

Para os tratamentos com rapamicina, as células ASPC-1 e Mia PaCa-2 responderam de forma diferente. Enquanto que as células Mia PaCa-2 responderam ao tratamento com rapamicina, diminuindo as taxas de tradução tanto nas linhagens Vazio quanto das linhagens IMPACT ko, as células ASPC-1 Vazio não responderam ao tratamento enquanto as células IMPACT ko sim, o que difere dos resultados encontrados em outros trabalhos da literatura <sup>(76 e 77)</sup>, onde as células ASPC-1 selvagens respondem ao tratamento com rapamicina, diminuindo a proliferação celular em concentrações de Rapamicina muito inferiores das utilizadas por nós. Essa resposta, provavelmente esta relacionada a variabilidade celular da linhagem utilizada por nós, já que ao longo das passagens as células podem ter acumulado outras alterações que podem ter influenciado os resultados.

Já com o tratamento com UV as células ASPC-1 mantiveram as taxas de tradução similares aquelas células que foram carenciadas. Enquanto nas células Mia PaCa-2 as taxas de tradução

tradadas com soro se mantiveram acima daquelas que foram somente carenciadas. Segundo a literatura, após o tratamento com UV, há a diminuição do processo de tradução na célula <sup>(79, 80 e 81)</sup>, em alguns casos abaixo dos níveis basais <sup>(78)</sup>. Embora nossas células não tenham tido a diminuição da taxa de tradução abaixo dos níveis basais, em comparação com o tratamento de soro houve uma diminuição. Entretanto, após o tratamento com UV, nossas células receberam o estímulo de 30 minutos com soro (protocolo utilizado desde o início para avaliar a eficácia da UV nas nossas células) enquanto o nosso controle de soro utilizado nesse experimento foi um tratamento de 2 h com soro após o carenciamento, o que não nos permite fazer uma comparação das nossas células tratadas com UV e aquelas tratadas somente com soro. Para responder se o tratamento de UV foi eficaz em diminuir as taxas de tradução em relação ao tratamento de soro, deveríamos ter utilizado um controle com tratamento de soro por 30 minutos.

Observando os gráficos de forma geral, tanto para as células ASPC-1 quanto Mia PaCa-2, a falta de IMPACT parece diminuir as diferenças entre as taxas de tradução. Provavelmente isso se deve porque com a falta de IMPACT, e a liberação de GCN2, há provavelmente uma maior ativação da via de eIF2 e conseqüentemente diminuição da tradução por mTORC1.

## **3.2 Parte II - Localização subcelular**

### **3.2.1 Material e Métodos**

#### **3.2.1.1 Tissue Micro Array (TMA) e casuística**

Foi construído um TMA contendo tecidos de adenocarcinoma de pâncreas de pacientes da instituição. Os dados clínicos e patológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos. Foi verificada a existência de material de biópsia ou cirurgia preservados em parafina, para os quais o diagnóstico histológico foi revisado por patologista. Nos casos em que os pacientes foram submetidos a quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante foi utilizado tecido proveniente de biópsia. Nos casos em que não tenha sido realizada neoadjuvância o tecido proveniente da cirurgia foi utilizado. Os critérios de inclusão utilizados foram: pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pâncreas entre 2003 e 2015, com informações suficientes no prontuário e amostra preservada em parafina onde houve representação adequada da neoplasia.

A construção do TMA foi realizada após ser escolhida e identificada, por um patologista, a área adequada na neoplasia através de uma marcação circular em cada nova lâmina de vidro na

região mais representativa do tumor e correspondente ao bloco de parafina escolhido. Usando o tissue microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) a área de interesse foi retirada com um “core” de 0,6mm de cada bloco doador e transferido para um outro bloco chamado de receptor. O TMA foi montado com amostras em duplicata. A partir desse novo bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4µm.

### 3.2.1.2 Imunohistoquímica

Desparafinização: As lâminas foram deixadas na estufa à 60°C overnight para que o excesso de parafina pudesse ser derretido. No dia seguinte, foram submetidas pela série de xilol 100% por 3 vezes, imergindo os cortes completamente por 10 minutos em cada cuba. Este processo foi suficiente para retirar o conteúdo de parafina presente na lâmina. Após esse processo as lâminas foram submetidas pela série de etanol (EtOH) absoluto por 4 vezes, imergindo por 1 minuto em cada cuba, para reidratação dos cortes e foram mantidas em água deionizada até o momento da recuperação antigênica.

Recuperação antigênica: As lâminas foram lavadas duas vezes de 5 minutos, com tampão PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O q.s.p.) pH 7,2. Após as lavagens as lâminas foram submersas em tampão de base Tris (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) recentemente feito, na concentração de 10 mM, pH 9,0 em panela de pressão por 40 minutos.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente e lavadas em água deionizada 2 vezes por 5 minutos, seguindo de uma lavagem com solução PBS 1X pH 7,2 por 5 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada utilizando solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) 10V, lavando a lâmina 4 vezes por 5 minutos.

Anticorpo primário: Após o bloqueio da peroxidase endógena o anticorpo primário anti-IMPACT (Sigma HPA041045) foi colocado overnight a 4°C diluído em Tris-HCl (50 mM) pH 7,5 + 1% BSA, na titulação de 1:50

Revelação (Kit Dako® - Liquid DAB + Substrate Chromogen System – K3468): No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução PBS 1X pH 7,2 por 5 minutos e o reagente HRP link (Dako® - K4068) foi aplicado 1 vez por 30 minutos em temperatura ambiente dentro de câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes com solução PBS 1X pH 7,2 por 5 minutos e o reagente HRP enzyme (Dako® - K4068) foi aplicado 1 vez por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas uma vez com solução PBS 1X pH 7,2 por 5 minutos e aplicar o reagente DAB na

proporção de 1:50, conforme recomendações do fabricante para revelação. A reação foi parada colocando as lâminas em cuba com H<sub>2</sub>O deionizada e posteriormente coradas com hematoxilina por 5 minutos. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem aquoso (Dako® - S3025) seguindo recomendações do fabricante.

A quantificação da proteína no tecido foi realizada pelo programa Aperio ImageScope - Pathology Slide Viewing Softwar e utilizando o algoritmo para identificação de proteínas de citoplasma.

### 3.2.1.3 Imunofluorescência

Para avaliar a disposição da proteína IMPACT nas linhagens celulares de adenocarcinoma de pâncreas realizamos o ensaio de imunofluorescência e o seguinte protocolo foi utilizado:

$3 \times 10^5$  células foram plaqueadas sobre lamínulas dispostas em placas 60 mm. No dia seguinte, as células foram fixadas com Methanol 100% durante 3 minutos, lavadas 3 x com PBS, e permeabilizadas e bloqueadas adicionando a cada lamínula PBS + 0,5% Triton por 5 minutos e PBS + 5% BSA por 1 hora. Foi adicionado 50µl do anticorpo 1° diluído em PBS + 1% BSA, por 1 hora para cada lamínula, posteriormente a lamínula foi novamente lavada 3 x com PBS, e 50µl do anticorpo 2° (anti-rabbit alexa fluor-488 (Invitrogen, A11001), anti-mouse alexa fluor-546 (Invitrogen, A-11003 e anti-goat alexa fluor-546 Invitrogen). diluído em PBS+ 1% BSA + DRAQ5 (Cell Singnaling, 40845-50, 1:250) foi adicionado por 1 hora. Após esse período as lamínulas foram novamente lavadas 3 x com PBS e por fim, a visualização foi feita em microscópio confocal. Neste projeto, até o momento, foram utilizados os seguintes anticorpos:

Anticorpo	Catálogo	Titulação
<b>Anti-Pelo</b>	Santa Cruz sc393448	1:10
<b>Anti-Tia-1</b>	Santa Cruz 1751	1:10
<b>Anti-FMRP</b>	Santa Cruz 293156	1:10
<b>Anti-B23</b>	Santa Cruz 47725	1:10
<b>Anti-GCN2</b>	Santa Cruz 374609	1:10
<b>Anti-IMPACT</b>	Sigma HPA041045	1:10

### 3.2.1.4 Imunohistoquímica Multiplex - Kit OPAL

Para a realização da imunohistoquímica de fluorescência foi utilizado o Kit Opal™ 4-Color Manual IHC Kit 50 slides – Perken (NEL810001KT) e as seguintes etapas foram seguidas:

**Desparafinização:** As lâminas foram deixadas na estufa à 60°C overnight para que o excesso de parafina pudesse ser derretido. No dia seguinte, foram submetidas pela série de xilol 100% por 3 vezes, imergindo os cortes completamente por 10 minutos em cada cuba. Este processo foi suficiente para retirar o conteúdo de parafina presente na lâmina. Após esse processo as lâminas foram submetidas pela série de etanol (ETOH) absoluto por 4 vezes, imergindo por 1 minuto em cada cuba, para reidratação dos cortes e foram mantidas em água miliq até o momento da recuperação antigênica.

**Recuperação antigênica:** As lâminas foram lavadas 5 vezes de 1 minuto, com água miliq. Após as lavagens as lâminas foram submersas em tampão AR6 do kit utilizado diluídos na proporção de 1:10 em água miliq autoclavada, e foram colocados em micro-ondas por 45 segundos em potência de 100% e depois por 25 minutos em potência de 20%.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos para esfriarem e foram lavadas em água miliq 1 vez por 2 minutos, seguindo de uma lavagem com solução TBST (25mM Tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,05% Tween® 20) por 2 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada utilizando solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) 10V, lavando a lâmina 4 vezes por 5 minutos.

**Bloqueio de ligações inespecíficas:** após o bloqueio da atividade da peroxidase endógena as lâminas foram lavadas em água miliq 5 vezes por 1 minuto cada. Para o bloqueio de possíveis ligações inespecíficas foi utilizado Protein Block Serum-Free – Dako (X0909) por 20 minutos. Após esse o processo de bloqueio as lâminas foram submetidas a uma lavagem de 1 minuto em água miliq. Anticorpo primário: os anticorpos primários e suas respectivas titulações, apresentados na tabela abaixo, foram colocados overnight a 4°C diluído em Tris-HCl (50mM) pH 7,5 + 1% BSA.

Anticorpo	Catálogo	Titulação
<b>Anti-IMPACT</b>	Sigma HPA041045	1:100
<b>Anti-TIA</b>	Santa Cruz sc34739	1:50
<b>Anti-GCN2</b>	Santa Cruz sc374609	1:100
<b>Anti-FMRP</b>	Millipore MAB2160	1:100
<b>Anti-P53</b>	Santa Cruz sc-126	1:500

Revelação (Kit Dako® - Liquid DAB + Substrate Chromogen System – K3468): No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com solução TBST por 2 minutos e o reagente HRP link (Dako® - K4068) foi aplicado 1 vez por 30 minutos em temperatura ambiente dentro de câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes com solução TBST por 2 minutos e o reagente HRP enzyme (Dako® - K4068) foi aplicado 1 vez por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas três vezes com solução TBST por 2 minutos. O excesso de tampão foi drenado e o fluoróforo do kit (Opal Working Solution) diluído na proporção de 1:1000 em 1x Amplification Diluent foi aplicado e as lâminas foram incubadas por 10 minutos.

Após esse processo as lâminas foram novamente submetidas ao processo de recuperação antigênica descrita anteriormente. Para a realização da marcação multiplex as lâminas foram submetidas novamente ao protocolo a partir do bloqueio da atividade de peroxidase endógena até que as 3 proteínas de interesse tenham sido marcadas.

Para finalizar a coloração das amostras reagente Draq 5 (Thermo Fisher - 65- 0880-92) na proporção de 1:250 (PBS-BSA 5%) por 30 minutos. Após este período as lâminas foram lavadas em TBST 3 vezes de 2 minutos. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem aquoso (FluorSave - 345789) seguindo recomendações do fabricante.

### **3.2.2 Resultados**

#### **3.2.2.1 Imuno-histoquímica, Tissue MicroArray (TMA) e casuística**

Como nosso projeto se baseou no dado de que IMPACT possa estar tendo sua expressão alterada em uma parte dos casos de adenocarcinoma de pâncreas, devido a uma amplificação ou deleção gênica, é importante avaliar se, de fato, existe mesmo alguma alteração proteica.

Para isso, foi construído um Tissue MicroArray (TMA) contendo 67 casos de Adenocarcinoma de Pâncreas. Para determinar um perfil dos pacientes inclusos no TMA utilizado neste estudo foram avaliados os prontuários clínicos dos pacientes. O material correspondente a 67 pacientes foi incluído no TMA, sendo 31 deles do sexo masculino e 36 pacientes do sexo feminino. A idade média dos pacientes no momento da coleta era de 59 anos, entretanto a idade mínima foi de 28 anos enquanto a idade máxima foi de 87 anos, mostrando que a doença pode acometer tanto indivíduos mais jovens quanto indivíduos mais idosos.

Foram testados, por meio de Western Blotting, 2 anticorpos para a realização do protocolo de imuno-histoquímica no TMA. Como apresentado na figura abaixo (Figura 30), um dos anticorpos

(HPA041045) se apresentou adequado e foi utilizado no procedimento enquanto o outro (HPA041968) foi considerado inadequado por apresentar reação inespecífica e não foi utilizado.

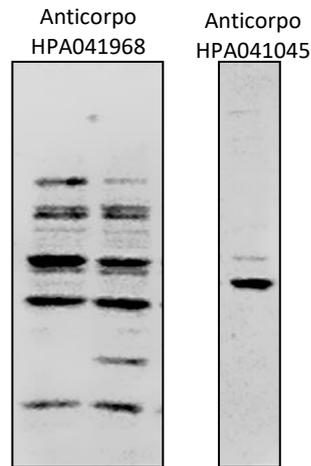


Figura 30. Western Blot dos extrato das células Mia PaCa-2 Vazio para comparação entre o anticorpo descartado (HPA041968) para utilização na imunohistoquímica e o anticorpo utilizado no procedimento (HPA041045).

Para avaliar a localização e a quantidade da proteína IMPACT no tecido tumoral dos pacientes da instituição, realizamos reação de imuno-histoquímica no TMA. Podemos observar que em alguns casos a proteína apresenta-se em quantidade bastante acentuada na região tumoral enquanto em outros casos a marcação se apresenta quase que nula. Em tecidos normais, a proteína IMPACT é preferencialmente expressa em neurônios <sup>(15)</sup> e se apresenta em estruturas granulares associadas aos polissomos <sup>(70)</sup>. Na figura 31 podemos observar também formações granulares da proteína na região tumoral, indicando que a proteína IMPACT pode estar ativada em grandes quantidades em células tumorais transformadas gerando alteração no processo de tradução. Além disso, a reação nos revelou a presença de IMPACT não somente na região citoplasmática, como era esperado, mas também na região nuclear.

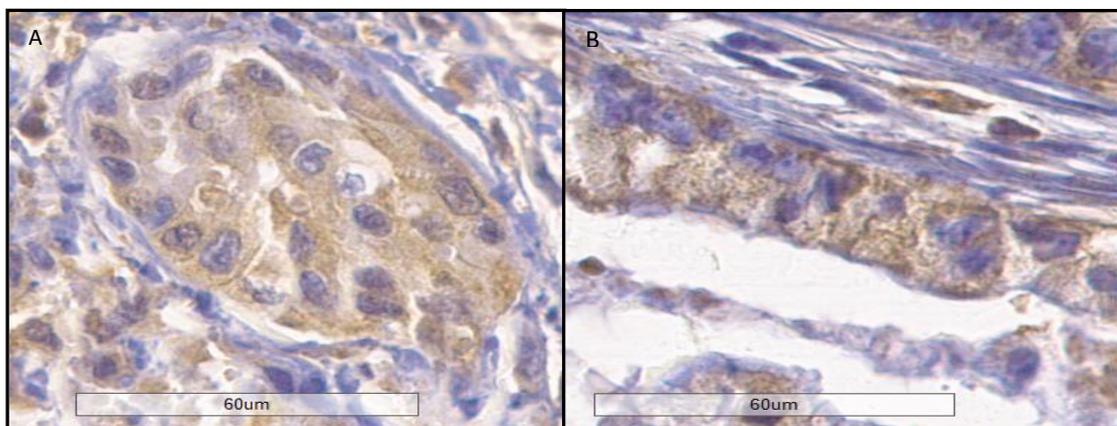


Figura 31. Reação de imuno-histoquímica para a proteína IMPACT no tecido de Adenocarcinoma de Pâncreas mostrando a presença de estruturas granulares na região citoplasmática e nuclear das células no tecido.

A expressão de IMPACT nos tecidos tumorais foi avaliada quantitativamente através da quantificação pelo programa Aperio Imagescope. Para isso, somente a área tumoral foi selecionada em cada spot. A seleção correta da área tumoral foi conferida por um patologista com vasta experiência na área. Como comparação, tecidos não-tumorais provenientes de bordas de tumor, e metástases linfonodais foram incluídas no TMA. Pudemos observar que a expressão de IMPACT foi significativamente maior no tecido tumoral quanto comparado ao tecido normal ou metástase linfonodal (Figura 32). Realizamos também uma análise pareada, em que somente os casos que apresentassem tecido normal e tumoral provenientes do mesmo paciente (Figura 33) e tecido tumoral e metastático provenientes do mesmo paciente (Figura 33) foram avaliados. Nesta análise, pudemos observar uma diferença significativa ( $p=0,0186$ ) entre os tecidos normais e tumorais e uma diferença significativa entre tecidos tumorais e metastáticos ( $p=0,0005$ ). Indicando que IMPACT pode possivelmente ter dois papéis no processo de progressão tumoral.

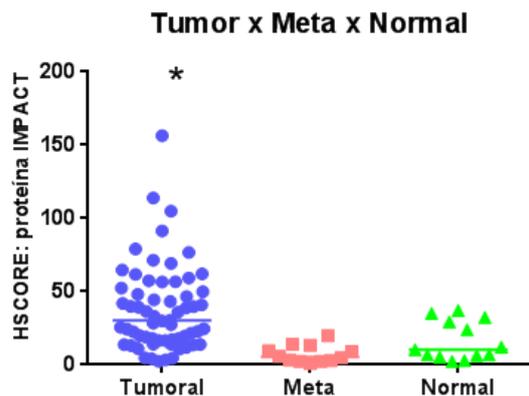


Figura 32. Comparação da quantidade de IMPACT presente nos tecidos tumorais, tecidos de metástase linfonodal e tecidos normais. One-way ANOVA  $P=0,0002$ .

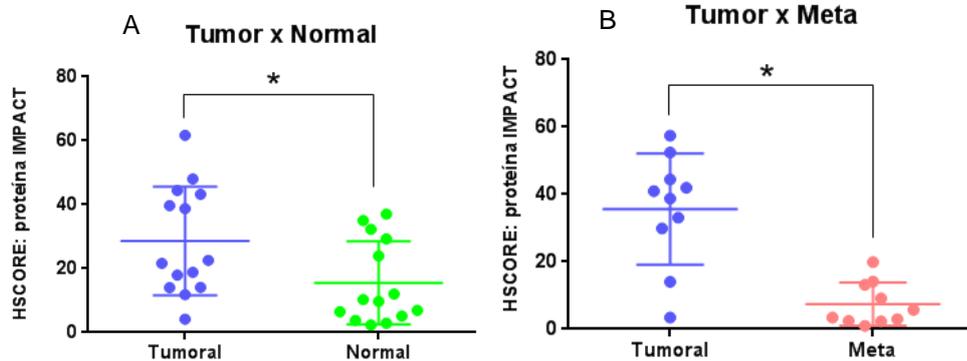


Figura 33. A. Comparação da quantidade de IMPACT presente nos tecidos tumorais e nos tecidos normais. Foram utilizados somente os dados dos pacientes que apresentaram amostra de tecido tumoral e tecido normal, N=14. Teste Mann-Whitney P=0,0186. B. Comparação da quantidade de IMPACT presente nos tecidos tumorais e metastáticos. Foram utilizados somente dados dos pacientes que apresentaram amostra de tecido tumoral e também tecido metastático, N=10. Teste Mann-Whitney P=0,0005.

Realizamos também uma análise pareada, em que somente os casos que apresentassem tecido normal e tumoral provenientes do mesmo paciente e tecido tumoral e metastático provenientes do mesmo paciente foram avaliados. Nesta análise, pudemos observar uma diferença significativa ( $p=0,0186$ ) entre os tecidos normais e tumorais e uma diferença significativa entre tecidos tumorais e metastáticos ( $p=0,0005$ ), nas quais tanto o tecido normal quanto o tecido metastático apresentam menor quantidade de proteína quando comparado com o tecido tumoral.

Por outro lado, foi possível observar uma separação dos casos por nível de expressão tanto no tecido normal quanto no tecido tumoral, revelando um grupo com maior expressão de IMPACT e outro com menor expressão de IMPACT. Entretanto, independentemente da quantidade basal de IMPACT, quase todos os casos apresentam aumento na quantidade dessa proteína no tecido tumoral indicando que talvez uma maior quantidade dessa proteína promova certa vantagem para as células tumorais.

Após essa avaliação inicial, correlacionamos a quantidade de proteína IMPACT com os dados clínicos disponíveis, os resultados estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 3: Correlações dos dados clínicos com a quantidade de IMPACT no tecido tumoral.

		<b>Mediana da expressão</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Sexo</b>	Feminino	39,91	0,6111
	Masculino	35,89	
<b>Diferenciação</b>	Pouco	11,86	0,3294
	Muito	36,13	
	Não diferenciado	33,16	
<b>Acometimento ganglionar</b>	Acometido	36,42	0,8885
	Não acometido	25,5	
<b>Invasão Vascular</b>	Sim	33,08	0,9805
	Não	36,17	
<b>Invasão Neuronal</b>	Sim	21,63	0,2507

	Não	34,46	
<b>Estadio</b>	1a	18,34	0,1486
	1b	44,46	
	2a	19,93	
	2b	34,46	
	3	36,52	
		<b>Valor de R</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Idade</b>		0,2865	0,0278 *
<b>Tamanho do tumor</b>		-0,1131	0,3938

Em nenhum dos dados clínicos considerados, foi observada alguma diferença significativa, indicando que embora a quantidade de IMPACT seja maior quando comparada nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais, essa diferença não aparenta ser relevante na evolução clínica dos pacientes, sendo demonstrada pela curva de sobrevida (Figura 34).

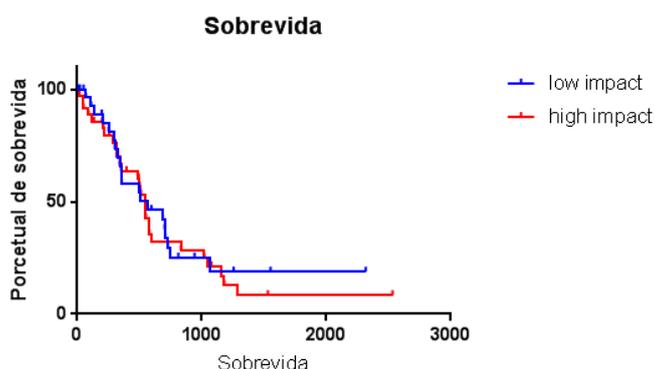


Figura 34: Sobrevida dos pacientes correlacionadas com os casos com altos níveis de IMPACT e baixos níveis de IMPACT. Teste Log-rank (Mantel-Cox)  $p=0,6940$ . Cutoff = media: 37,59.

### 3.2.2.2 Localização Subcelular de IMPACT em células e tecidos.

Após a observação de que IMPACT apresentava aspecto granular nos tecidos tumorais humanos (Figura 31), decidimos avaliar a distribuição subcelular da proteína nas linhagens celulares e nos tecidos tumorais do TMA e para isso realizou-se o ensaio de imunofluorescência contra IMPACT.

Como foi observado no experimento de Imuno-histoquímica IMPACT formando estruturas granulares no citoplasma, nós optamos por tratar parte de nossas células com Arsenito de Sódio afim de induzir a formação de grânulos de estresse, uma vez que esse composto favorece a formação de estruturas granulares por gerar estresse oxidativo <sup>(73)</sup>, para poder avaliar melhor a

colocalização de IMPACT com outras proteínas que já são conhecidas como componentes de grânulos de estresse na célula.

As células não tratadas com Arsenito de Sódio IMPACT não apresenta a formação de grânulos (Figura 36), se apresentando de forma mais difusa, já quando as células são tratadas, a proteína IMPACT formou grânulos na região do citoplasma em ambas as linhagens celulares (Figura 35), indicando que esses grânulos podem estar associados a grânulos de estresse. Já na região nuclear encontramos IMPACT em duas conformações distintas: uma forma mais espalhada (Figura 36) que se apresentou em praticamente todas as células e em grânulos mais acentuados (Figura 35) que embora pudesse ser encontrada tanto em células tratadas com arsenito quanto nas não tratadas não puderam ser detectadas com frequência, indicando que provavelmente essa condição é transitória.

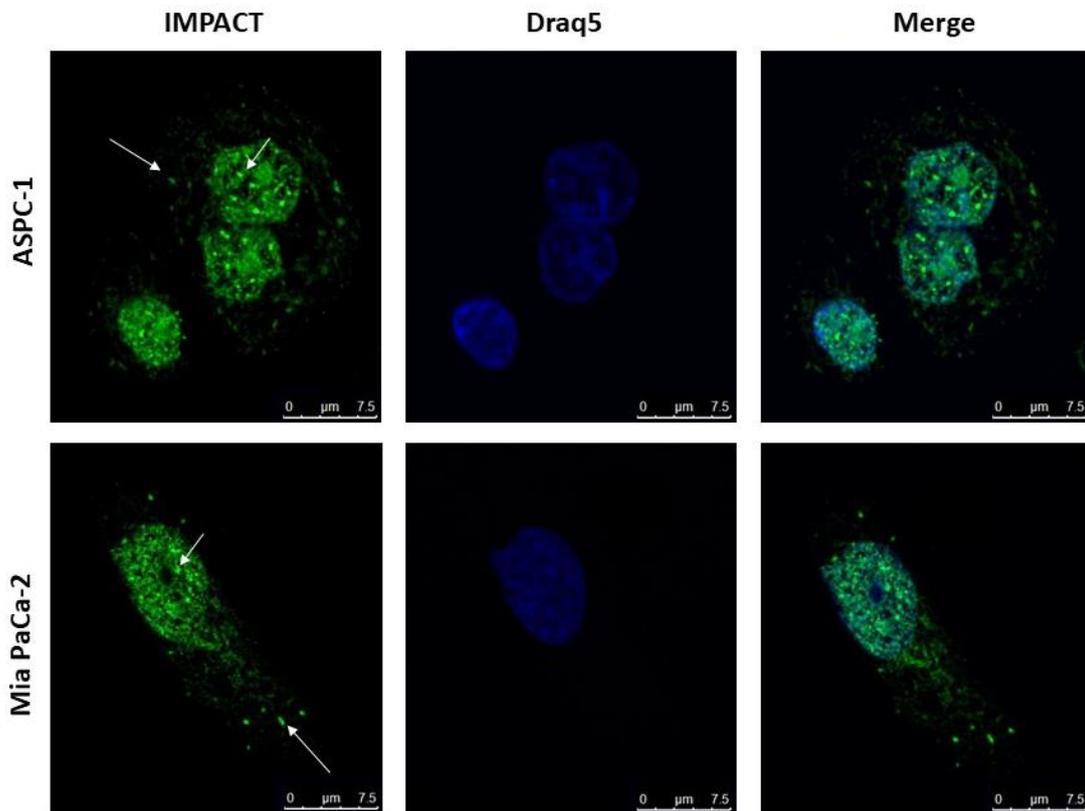


Figura 35: Imunofluorescência das linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2, tratadas com Arsenito de Sódio. Em verde a marcação de IMPACT e em azul a marcação nuclear com DraQ5. Podemos observar a formação de grânulos (setas brancas) tanto na região do núcleo quanto no citoplasma.

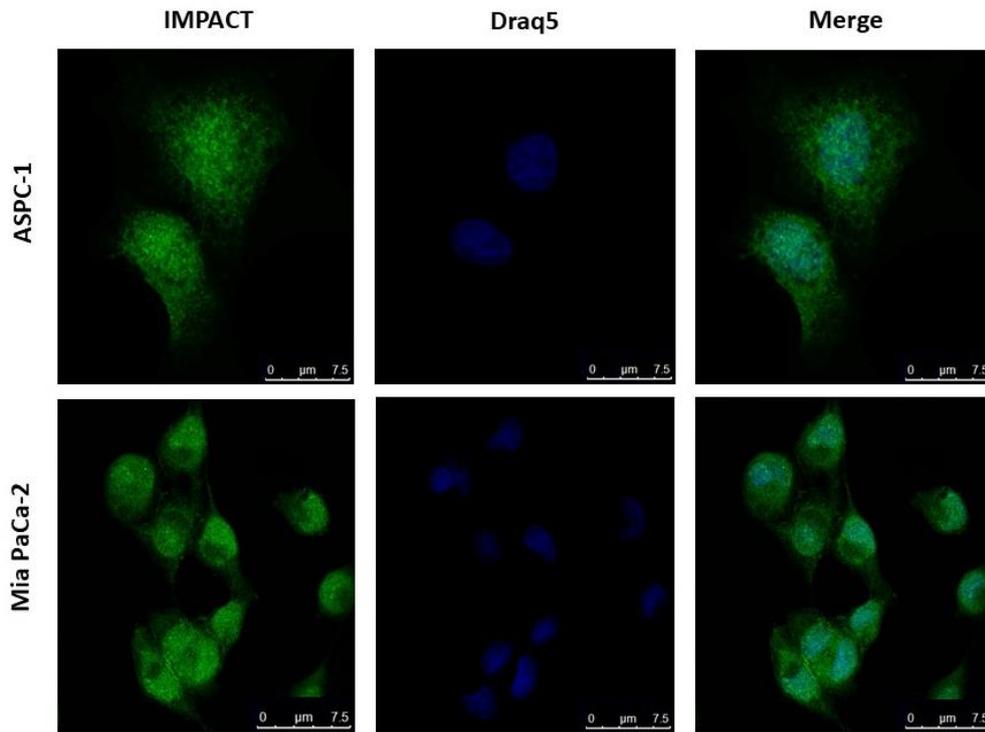


Figura 36: Imunofluorescência das linhagens ASPC-1 e Mia PaCa-2, sem o tratamento com Arsenito de Sódio. Em verde a marcação de IMPACT e em azul a marcação nuclear com Draq5. Podemos observar que não há a formação de grânulos principalmente na região do citoplasma.

Os grânulos de IMPACT também puderam ser observados pela técnica de Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral tanto na região citoplasmática quanto no núcleo (Figura 37), corroborando com o achado nas linhagens celulares. Na imagem a seguir, as setas indicam a localização de IMPACT em ambas as regiões.

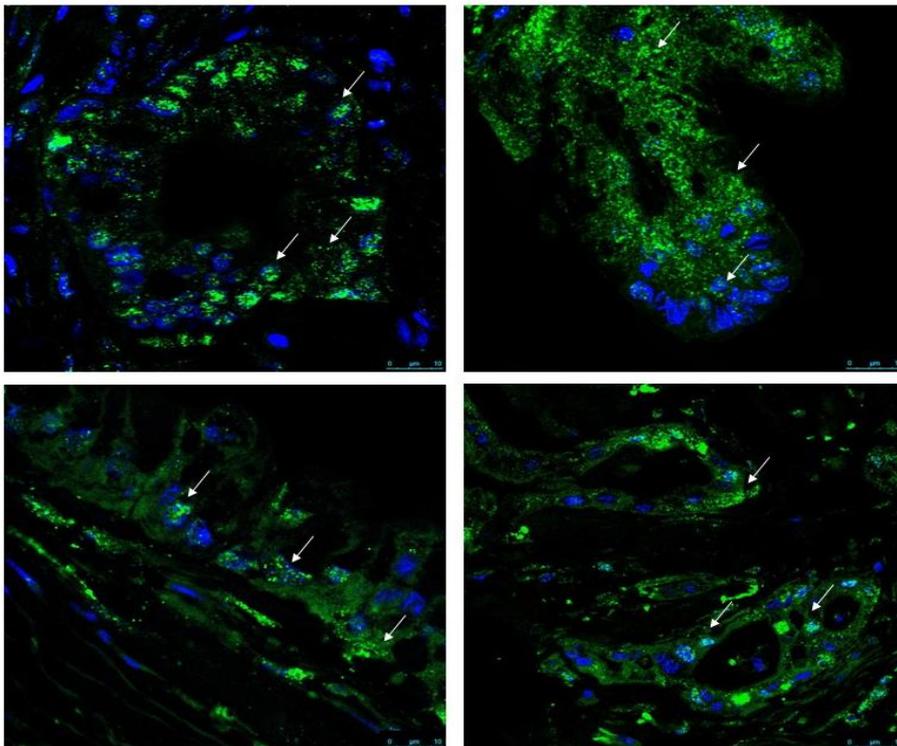


Figura 37: Imunofluorescência multiplex do tecido tumoral, mostrando, a presença de IMPACT, em verde, na região nuclear, marcada em azul, e citoplasmática em forma de grânulos (setas brancas).

Na tentativa de caracterizar os grânulos de IMPACT, realizamos ensaios de co-localização com diversas proteínas tanto citoplasmáticas quanto nucleares. Os ensaios foram realizados tanto no TMA quanto em linhagens celulares.

Nos ensaios envolvendo as linhagens celulares nós realizamos a co-localização de IMPACT com as seguintes proteínas: FMRP, GCN2, TIA1, B23 e PELO, e para o TMA a co-localização foi feita com GCN2, FMRP, TIA1 e P53. FMRP e TIA1 foram escolhidas porque estão relacionadas com a formação de grânulos de estresse no citoplasma. GCN2 por ser uma proteína relacionada com a resposta ao estresse e por estar relacionada com a via de IMPACT, B23 por estar associada ao núcleo, principalmente com o processo de biogênese do ribossomo e PELO por estar associada tanto com processos do ciclo celular no núcleo quanto com o processo de parada do ribossomo no citoplasma.

FMRP é uma proteína multifuncional associada ao controle traducional que se encontra associada a polissomos, se ligando ao RNA, tem um papel importante no desenvolvimento neuronal além do envolvimento com diversas outras vias importantes para o desenvolvimento celular como resposta ao estresse e na dinâmica do citoesqueleto <sup>(57 e 58)</sup>. Pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo. Nas linhagens celulares, com a exposição ao Arsenito de Sódio, os grânulos formados no citoplasma por FMRP e IMPACT parecem colocalizar (Figura 38) apenas em alguns momentos quando os grânulos se apresentam maiores, e pouco também quando ambas as proteínas não estão formando grânulos.

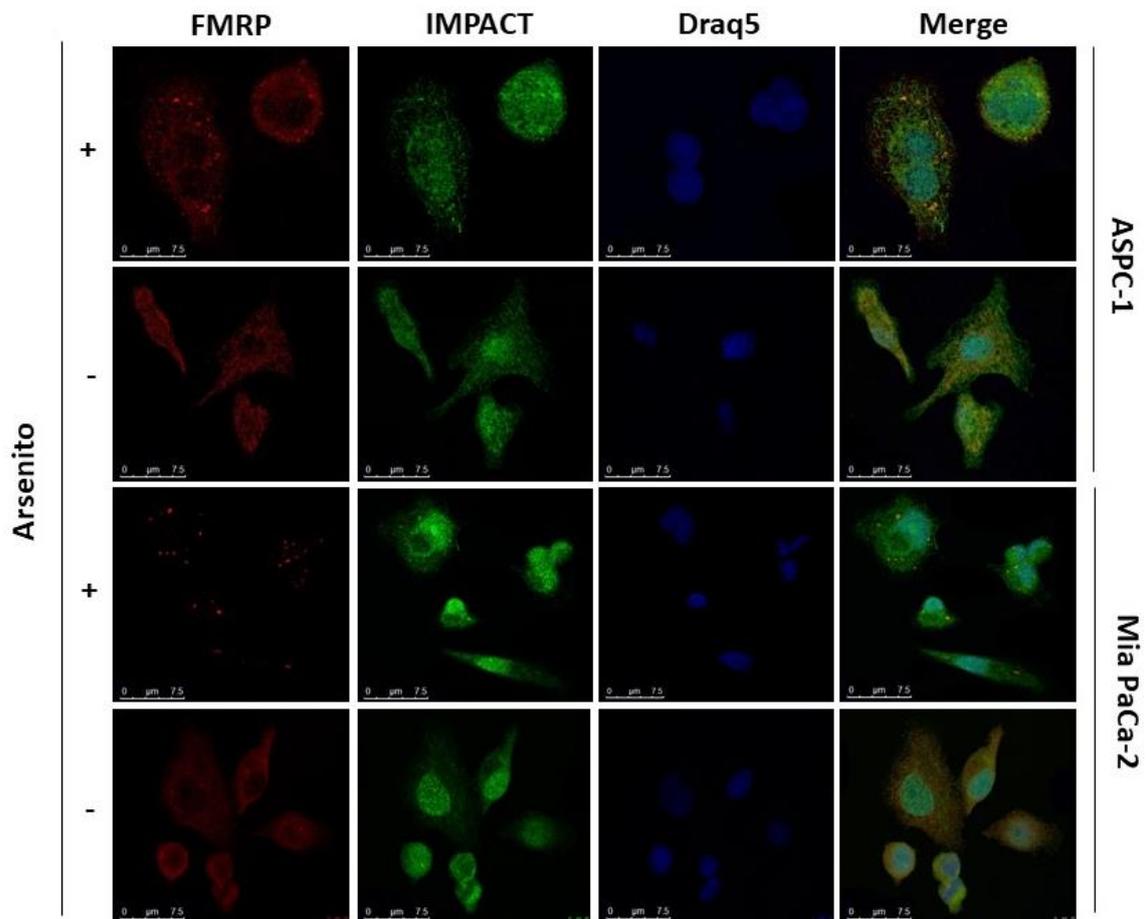


Figura 38: Imunofluorescência das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio. FMRP, em vermelho, IMPACT em verde, o núcleo em azul e a sobreposição das imagens (merge). Podemos observar a presença de grânulos citoplasmáticos formados tanto em FMRP quanto de IMPACT após o tratamento com Arsenito de Sódio e que se colocalizam em alguns pontos e a ausência dessas formações granulares nas células sem tratamento, mas com pouca co-localização no citoplasma.

No tecido tumoral (Figura 39), IMPACT também apresenta co-localização com FMRP, mas também de forma moderada, comparadas com outras proteínas discutidas mais à frente. Além disso, a co-localização não se apresenta de forma tão homogênea como nas linhagens celulares. Isso porque o tumor é muito mais heterogêneo quando comparado com linhagens celulares em cultura, e dessa forma temos variação de expressão e co-localização dentro de um mesmo corte tecidual, ou seja, de um mesmo paciente, e também em um mesmo tumor, como podemos ver nas imagens abaixo.

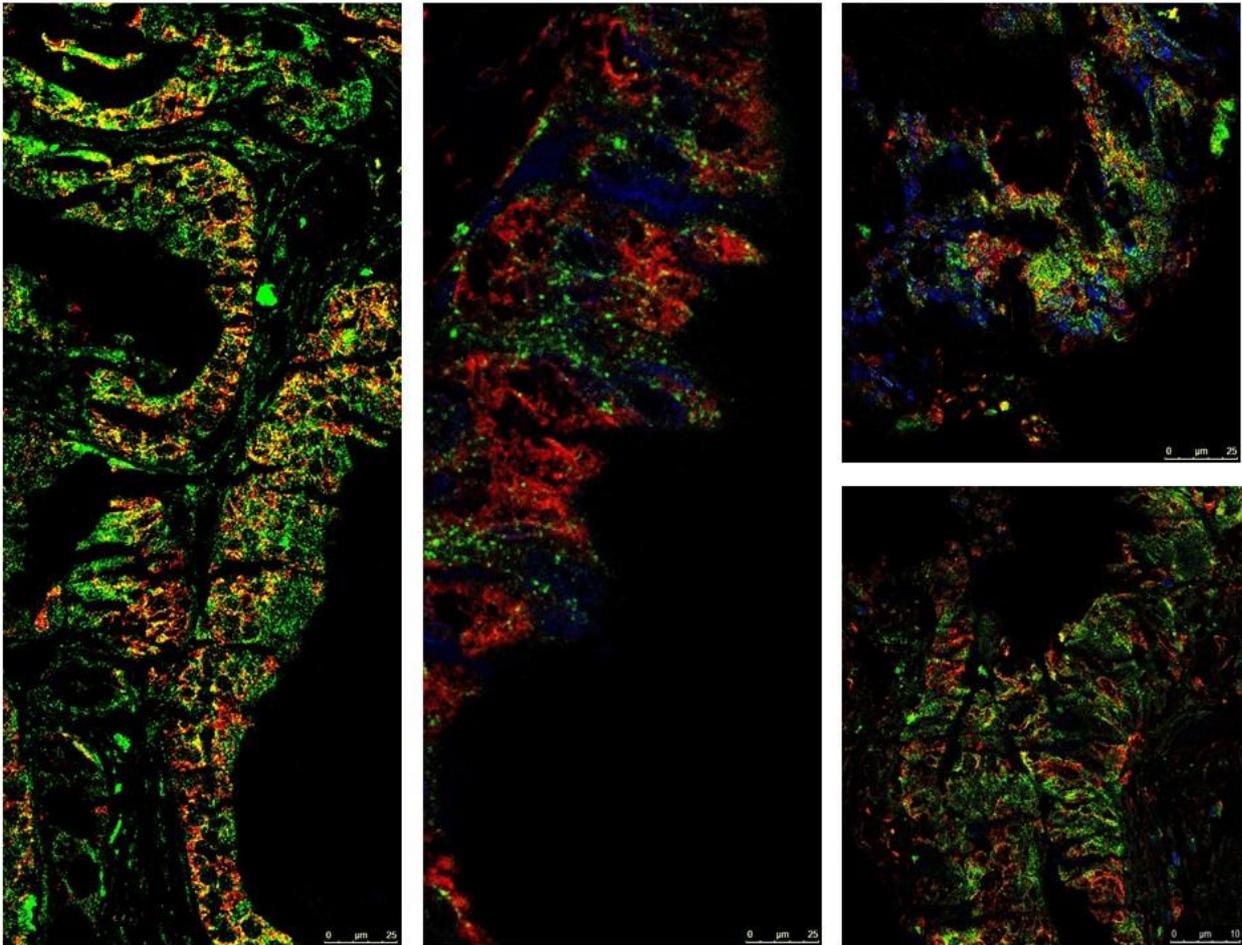


Figura 39: Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização de FMRP e IMPACT (marcação em amarelo). FMRP em vermelho, IMPACT em verde e núcleo em azul.

Além disso, realizamos a quantificação das imagens obtidas no TMA e analisamos a correlação entre as proteínas estudadas. Para isso realizamos análise dos dados de duas formas: (1) como o tumor se apresenta de forma heterogênea, optamos por realizar as análises fazendo a média dos dados de todas as imagens de um mesmo corte tecidual, ou (2) de cada imagem separadamente. Essa abordagem nos permitiu avaliar se poderíamos utilizar esse parâmetro posteriormente como uma característica do paciente ou não. Após as análises observamos que os dados se comportam da mesma maneira, sendo analisados de forma conjunta (tirando a média das imagens de um mesmo spot) ou de forma individual. Por esse motivo, os gráficos apresentados de agora em diante, que tenham correlação com a co-localização de proteínas apresentarão os dados de forma individual, uma vez que o comportamento observado não está associado ao paciente em si, mas sim a um comportamento biológico das proteínas no processo tumoral.

Sendo assim, optamos por avaliar primeiramente, se a co-localização se apresentava de forma diferente no tecido tumoral, metastático e normal. Observando de forma superficial a distribuição dos dados, já podemos perceber que tanto existem amostras com maior nível de co-localização como amostras em que a co-localização se apresenta de forma muito tímida, mostrando um amplo espectro de possibilidades. E de forma muito interessante, podemos observar que o tecido tumoral apresenta menor quantidade de co-localização quando comparado com os tecidos metastáticos e normal.

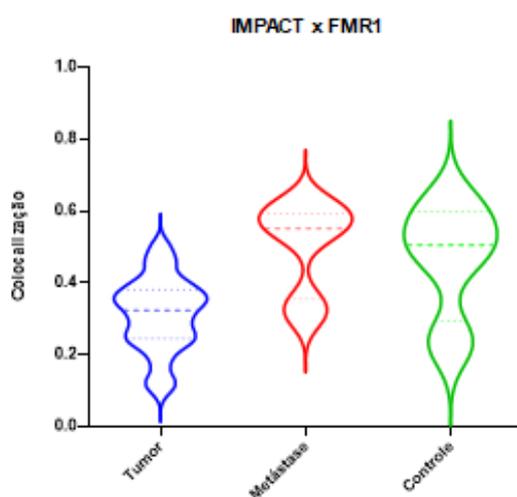


Figura 40: Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e FMRP no tecido tumoral, metastático e normal. Diferença significativamente estatística entre o tecido tumoral em comparação com os tecidos metastáticos ( $p < 0,0001$ ) e normais ( $p = 0,0134$ ). Teste One-Way Anova.

Neste caso, sendo FMRP uma proteína encontrada normalmente em associação com ribossomos, e IMPACT já tendo sido encontrado em associação com ribossomos também <sup>(21 e 48)</sup>, uma diminuição da co-localização dessas duas proteínas pode significar algum tipo de alteração nos grânulos formados a partir dos ribossomos, que pode gerar um favorecimento do processo tumoral. Entretanto, os casos contendo metástase e normais que apresentassem tecido para a realização das imagens é muito pequeno, e por isso, acredito que seria ainda mais interessante no futuro uma comparação com mais casos normais e metastáticos para que possamos responder essa hipótese com mais clareza.

Além disso, buscamos avaliar se os níveis de co-localização estavam sendo influenciados pela quantidade de proteína encontrada nas amostras, para avaliar esse ponto de forma justa, nós quantificamos as proteínas a partir das imagens e normalizamos essas quantidades pelas áreas quantificadas, que corresponderam somente as áreas de interesse.

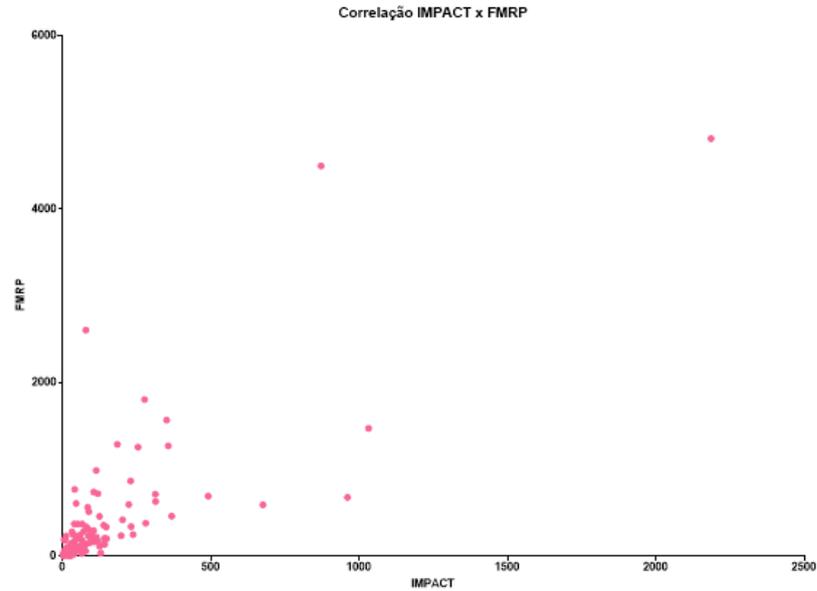


Figura 41: Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e FMRP. Apresenta diferença significativamente estatística. Correlação de Pearson,  $p < 0,0001$ , valor de  $r = 0,7784$

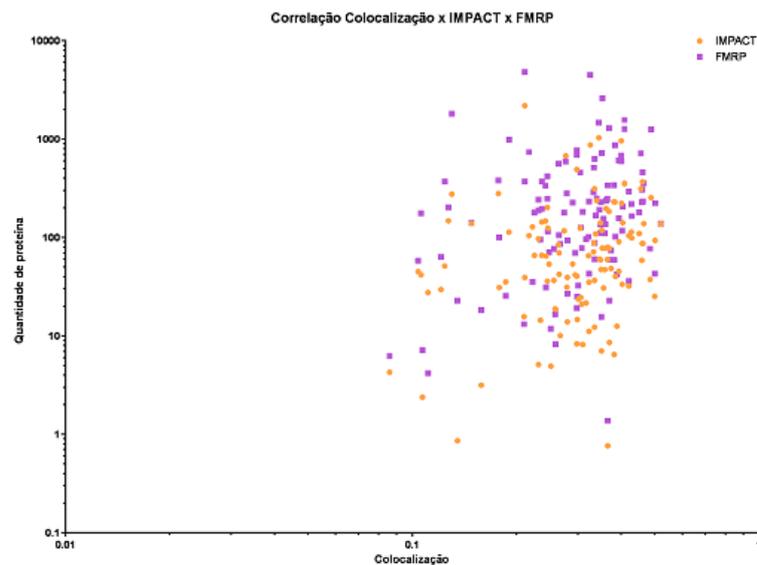


Figura 42: Gráfico, mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e FMRP com a co-localização dessas proteínas. Correlação entre as proteínas e a co-localização é fraca. Teste Correlação de Pearson, valor de  $r$  IMPACT x Co-localização = 0,04681, valor de  $r$  FMRP x Co-localização = 0,3654.

Embora as quantidades de proteínas estejam relacionadas entre si, a co-localização dessas proteínas não varia de acordo com suas quantidades (Figura 41). Portanto podemos concluir que essa variação se dá por uma característica biológica do tumor em relação ao tecido metastático e normal (Figura 42).

GCN2 já descrito anteriormente também está associada a outros processos celulares e se apresentou raramente em formas granulares quando as células foram tratadas com Arsenito de Sódio. Embora esteja normalmente associada as regiões citoplasmáticas, Nakamura, A., & Kimura,

H. (2017) recentemente observaram formações granulares contendo GCN2 associadas ao nucléolo e sua relação com a via de ativação de p53. Em células onde GCN2 foi silenciado, foi observado um aumento nos níveis de p53 embora não tenha sido observado o aumento na transcrição do mRNA, indicando que a falta de GCN2 regula os níveis de p53 de forma pós-transcricional por resposta a estresse nucleolar <sup>(31)</sup>. Sendo IMPACT intimamente relacionada com a ativação de GCN2, sua localização em regiões próximas ao núcleo poderia estar relacionada a esta atuação de GCN2.

A partir da imunofluorescência nas linhagens celulares, GCN2 se apresenta colocalizado com IMPACT principalmente na região citoplasmática de uma maneira muito interessante ao redor do núcleo independente do tratamento com Arsenito de Sódio, isso acontece em ambas as linhagens embora de forma mais discreta na linhagem Mia PaCa-2, o que provavelmente podemos considerar como uma variação característica das linhagens celulares. Essa localização subcelular de ambas as proteínas pode estar associada a uma de suas funções relacionadas ao início do processo de tradução.

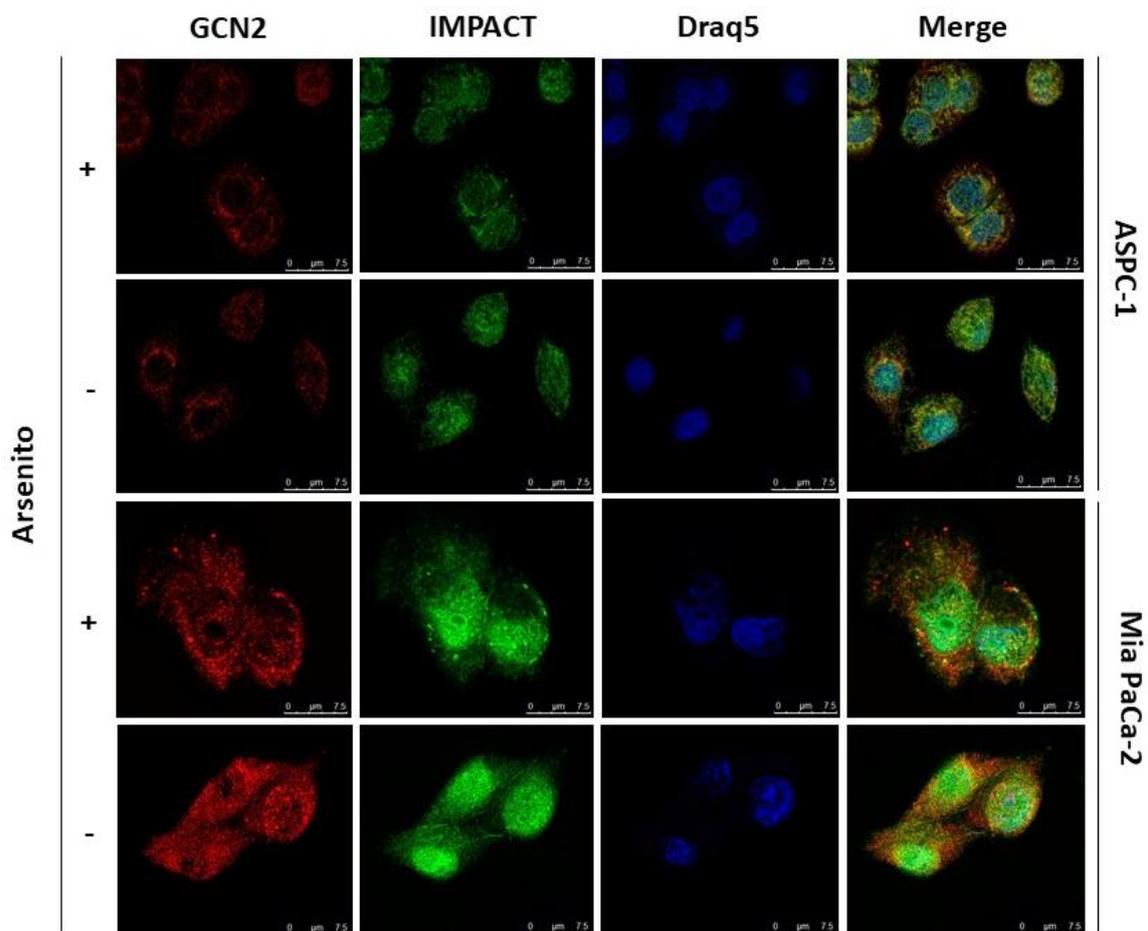


Figura 43: Imunofluorescência das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio. GCN2, em vermelho, IMPACT em verde, o núcleo em azul e a sobreposição das imagens (merge). Podemos observar a presença de grânulos

citoplasmáticos formados principalmente pela proteína IMPACT após o tratamento com Arsenito de Sódio e a co-localização de IMPACT com GCN2 ao redor do núcleo das células.

Assim como nas linhagens celulares, no tecido tumoral, a co-localização também acontece, entretanto, a heterogeneidade se confirma novamente no tecido. Neste caso, assim como com a proteína FMRP, a co-localização de GCN2 com IMPACT também acontece de forma desigual em um mesmo corte de tecido, indicando a diferença entre diferentes regiões de um mesmo tumor. (Figura 44).

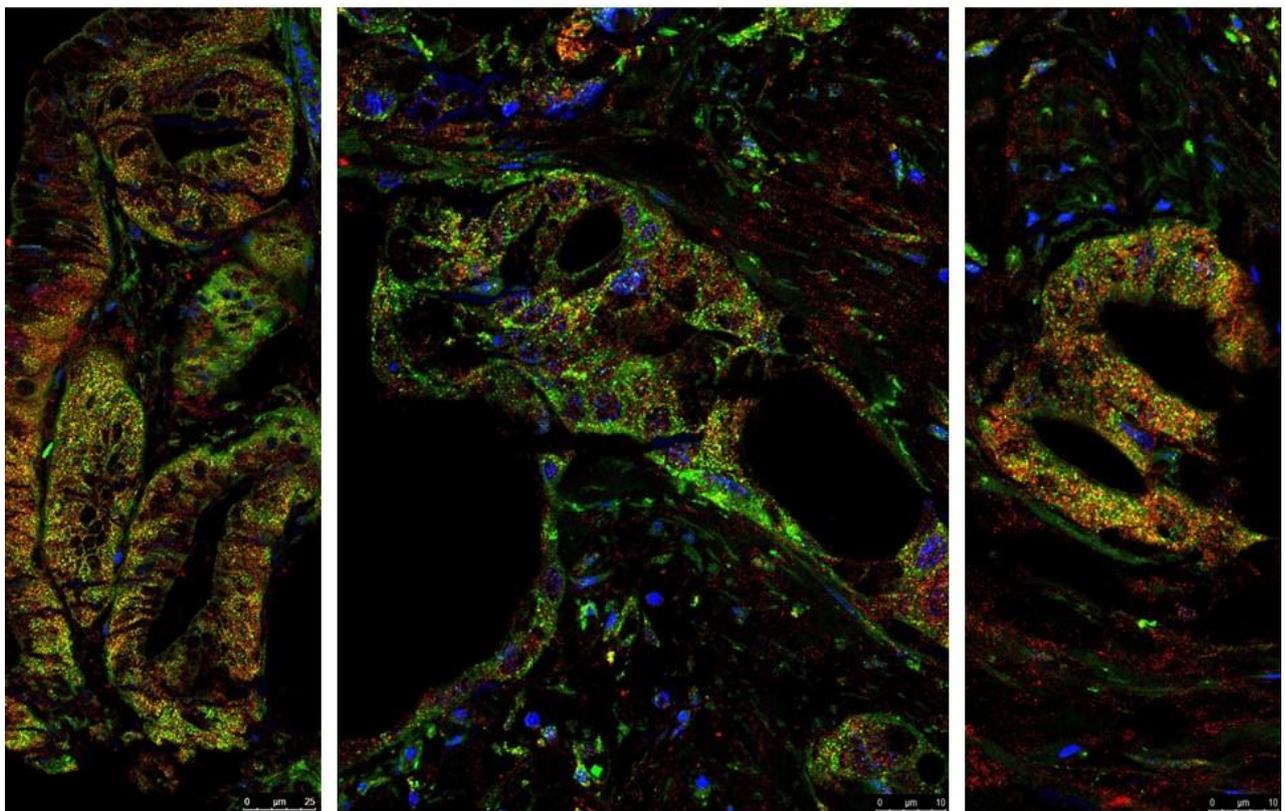


Figura 44: Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização de GCN2 e IMPACT (marcação em amarelo). GCN2 em vermelho, IMPACT em verde e núcleo em azul.

Para essa proteína também, nós realizamos as mesmas análises de dados que foram feitas para a proteína FMRP, e assim como ela, os dados analisados juntos e separados se comportaram da mesma forma. A co-localização de IMPACT com GCN2 também apresentou um espectro bastante amplo, tendo tumores com baixo nível de co-localização e outros com alto nível de co-localização, embora a grande maioria se encontre em uma situação intermediária. Observando o gráfico o grupo tumoral se apresenta estatisticamente diferente dos outros grupos, com sua

média inferior tanto do grupo metastático quanto o normal. Similarmente a outra correlação, o tecido tumoral apresenta menor co-localização de IMPACT com GCN2, indicando que talvez a função biológica dessas proteínas, agindo em conjunto, estejam diminuídas.

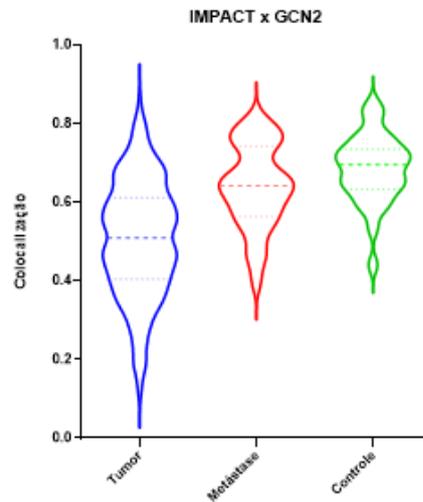


Figura 45: Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e GCN2 no tecido tumoral, metastático e normal. Diferença significativamente estatística entre o tecido tumoral em comparação com os tecidos metastáticos e normais. Teste One-Way Anova,  $p < 0,0001$ .

Correlacionando IMPACT com GCN2, a quantidade de proteínas apresenta-se levemente correlacionada (Figura 46) mas as quantidades de proteínas não apresentam correlação com a co-localização, indicando que esta está relacionada a um processo biológico (Figura 47).

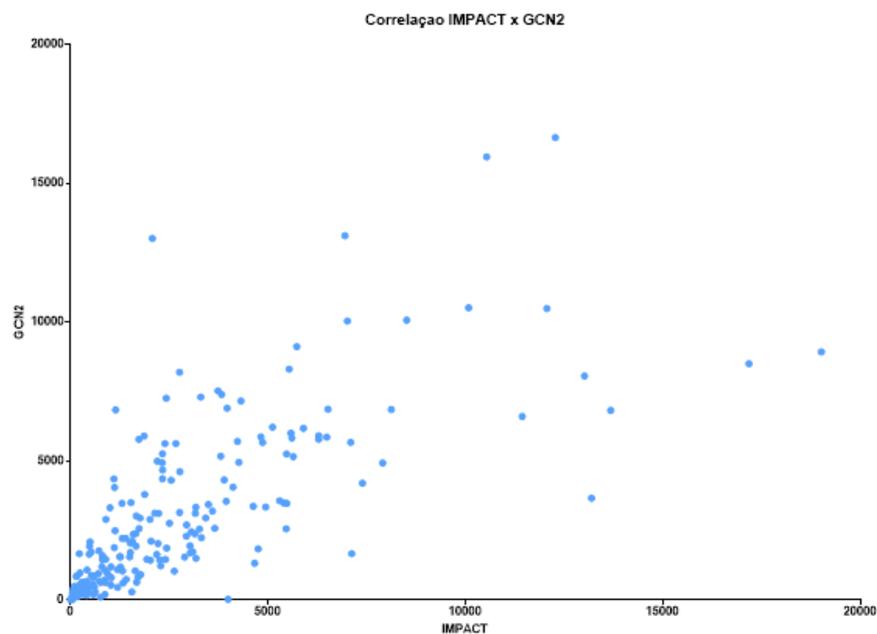


Figura 46: Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e GCN2. Apresenta diferença estatística. Correlação de Pearson,  $p < 0,0001$ , valor de  $r = 0,7643$ .

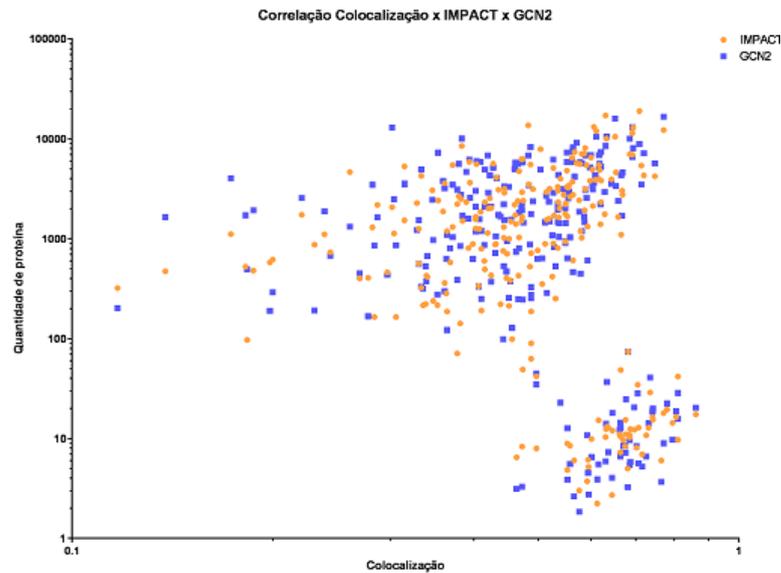


Figura 47: Gráfico, mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e GCN2 com a co-localização dessas proteínas. Correlação entre as proteínas e a co-localização é fraca. Teste Correlação de Pearson, valor de  $r$  IMPACT x Co-localização = 0,1559, valor de  $r$  GCN2 x Co-localização = 0,07441.

TIA1 é um componente já conhecido de grânulos de estresse <sup>(34)</sup> além disso já foi descrita também em associação a mRNAs por se ligarem a elementos ricos em AU, localizados na região 3`UTR. Além das suas funções relacionadas a formação dos grânulos de estresse, esta proteína apresenta diversas funções no metabolismo de mRNAs como splicing alternativo, e inibição traducional e silenciamento de mRNAs, portanto pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo <sup>(82)</sup>,

Os grânulos formados por TIA1 a partir do tratamento com Arsenito de Sódio parecem colocalizar fortemente com os grânulos citoplasmáticos de IMPACT, indicando que provavelmente IMPACT possa estar ligado a alguma das duas funções descritas acima para essa proteína. Além disso, assim como GCN2 essa co-localização acontece também em alguns casos ao redor do núcleo que independem do tratamento com Arsenito, além dos grânulos citoplasmáticos que aparecem apenas após o tratamento (Figura 48). Com essa sublocalização celular, podemos sugerir que IMPACT participe fortemente de alguns processos celulares que também envolvem a proteína TIA1 e que estão relacionados tanto a resposta ao estresse com formação de grânulos citoplasmáticos quanto por exemplo na atuação junto aos mRNAs que podem possivelmente terem sido transportados ao citoplasma recentemente e ainda estejam próximos ao núcleo. Além disso, a co-localização de IMPACT próxima ao núcleo já foi apresentada anteriormente associada a

GCN2, portanto a associação de IMPACT com TIA1 próximo ao núcleo também pode estar ligada com a atuação de GCN2 em relação a esses mRNAs, como já foi apresentado anteriormente.

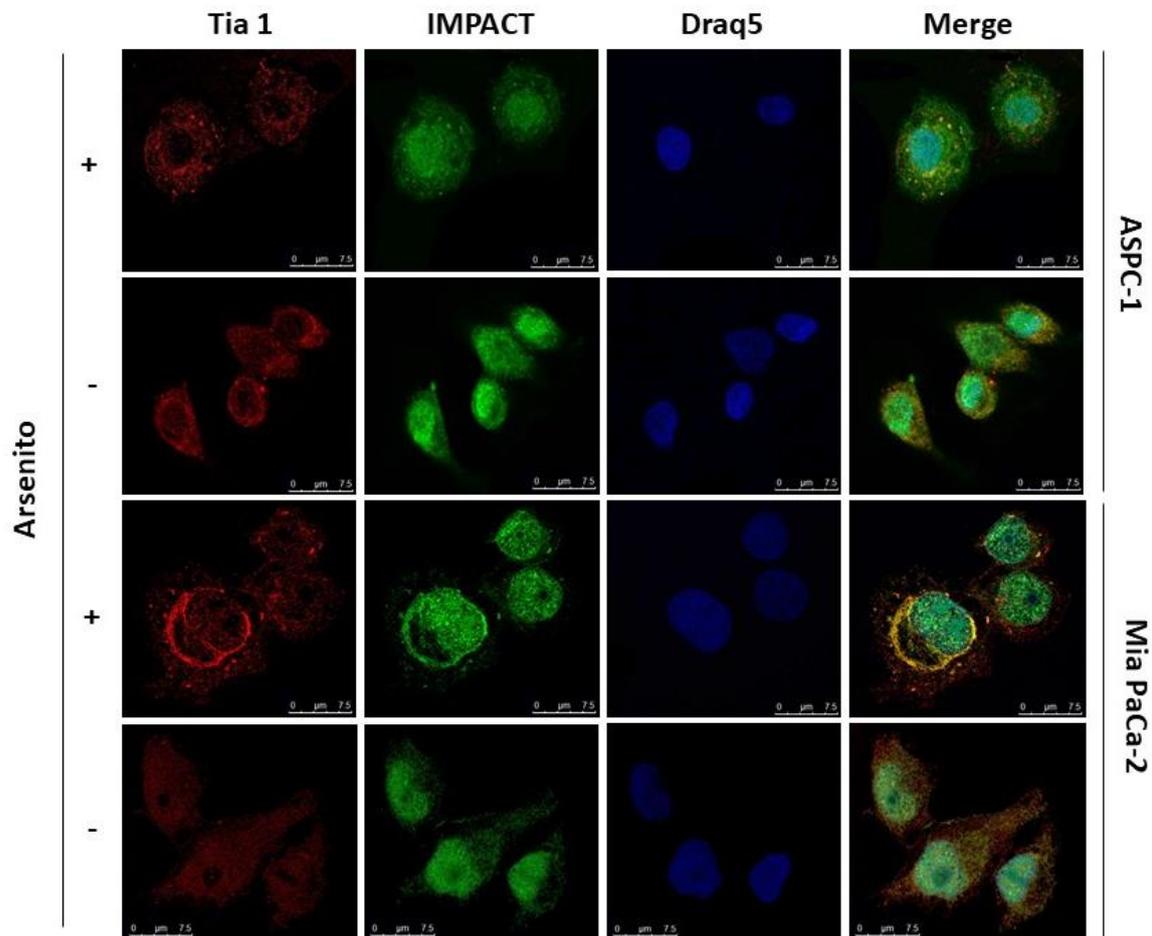


Figura 48: Imunofluorescência das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio. TIA1, em vermelho, IMPACT em verde, o núcleo em azul e a sobreposição das imagens (merge). Podemos observar a presença de grânulos citoplasmáticos formados tanto pela proteína TIA1 quanto por IMPACT após o tratamento com Arsenito de Sódio e a co-localização das proteínas, mesmo que de forma discreta próximo ao núcleo.

Quando olhamos para os tecidos tumorais, também conseguimos distinguir diversos pontos onde a co-localização se apresenta muito forte e locais dos tumores onde a co-localização não se apresenta de forma tão acentuada, indicando novamente como o tumor pode ser heterogêneo não só na expressão das proteínas que compõe tanto o citoplasma quanto o núcleo, como também na interação dessas proteínas que podem se encontrar preservadas, ou pouco representadas.

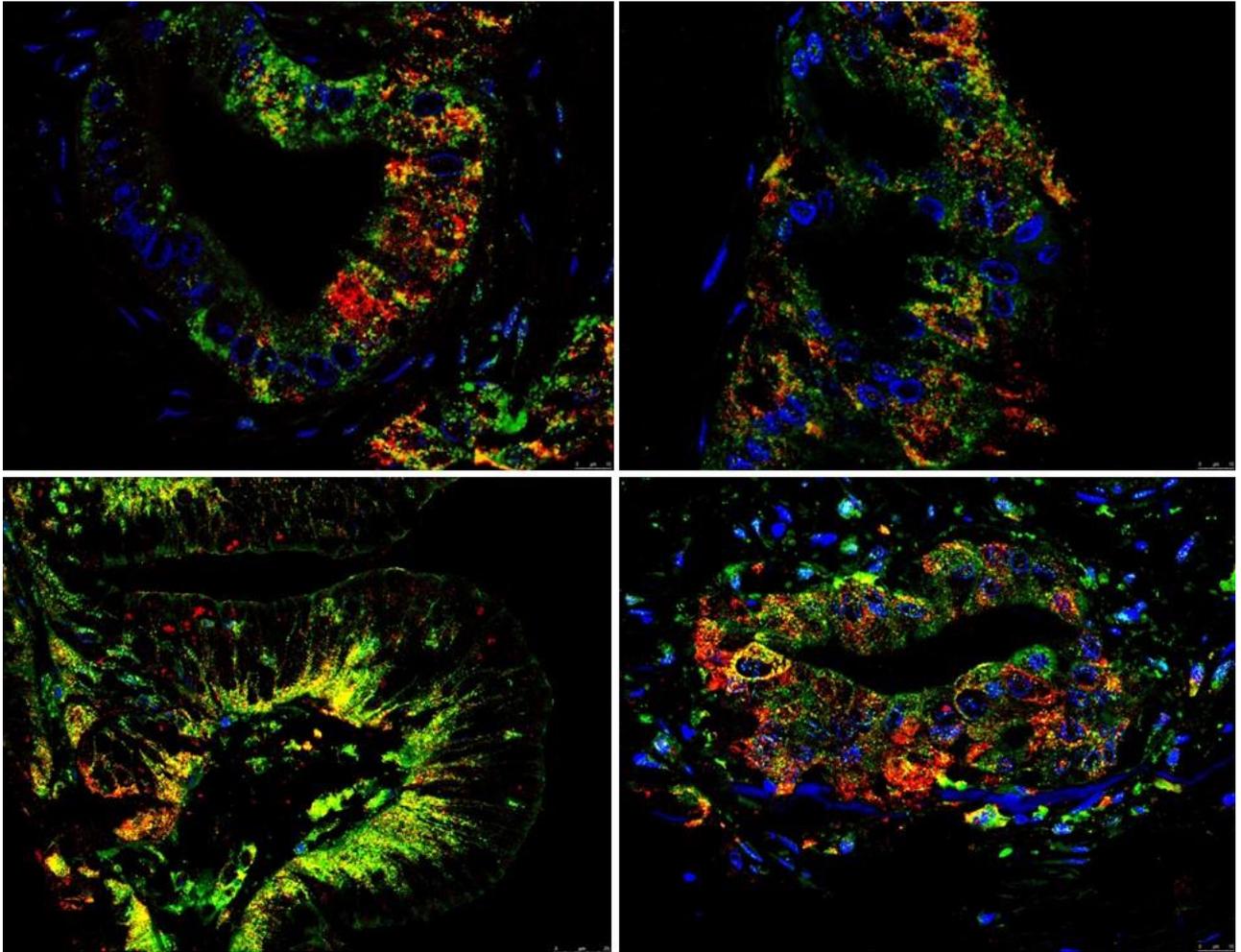


Figura 49: Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de Pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização de TIA1 e IMPACT (marcação em amarelo). GCN2 em vermelho, IMPACT em verde e núcleo em azul

Quando comparamos os níveis de co-localização nos tecidos tumorais, metastáticos e normais podemos observar um padrão diferente daqueles observados anteriormente com FMRP e GCN2. Diferentemente das outras proteínas, as amostras normais apresentam menor nível de co-localização quando comparadas com os tecidos metastáticos e tumorais. Sendo TIA1 uma proteína ligada principalmente a resposta ao estresse, seria muito coerente que em um tecido normal, que apresenta um microambiente com menos fatores estressantes, encontremos menor quantidade de grânulos de estresse, assim como nas células que não foram tratadas com Arsenito de Sódio.

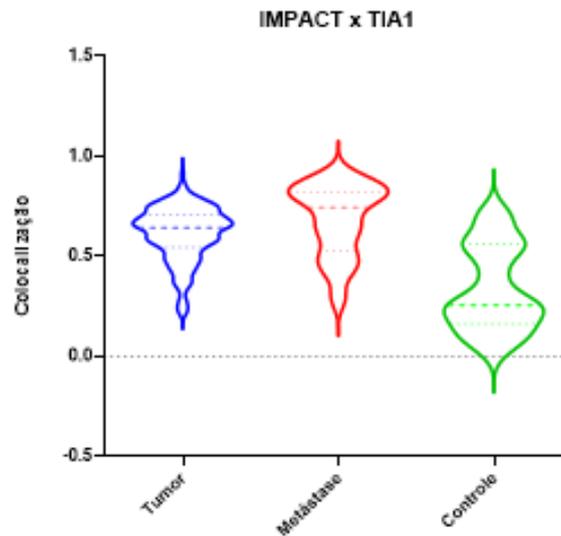


Figura 50: Gráfico apresentando a quantificação da co-localização entre IMPACT e TIA1 no tecido tumoral, metastático e normal. Diferença significativamente estatística entre o tecido tumoral e metastático em comparação com o tecido normais. Teste One-Way Anova,  $p < 0,0001$ .

Analisando a correlação entre as quantidades de ambas as proteínas podemos observar alta correlação entre IMPACT e TIA1 (Figura 51). Entretanto, a quantidade das proteínas não se correlaciona com a colocalização, indicando que assim como os outros, a colocalização é derivada de um processo biológico e não varia de acordo com as quantidades de proteínas.

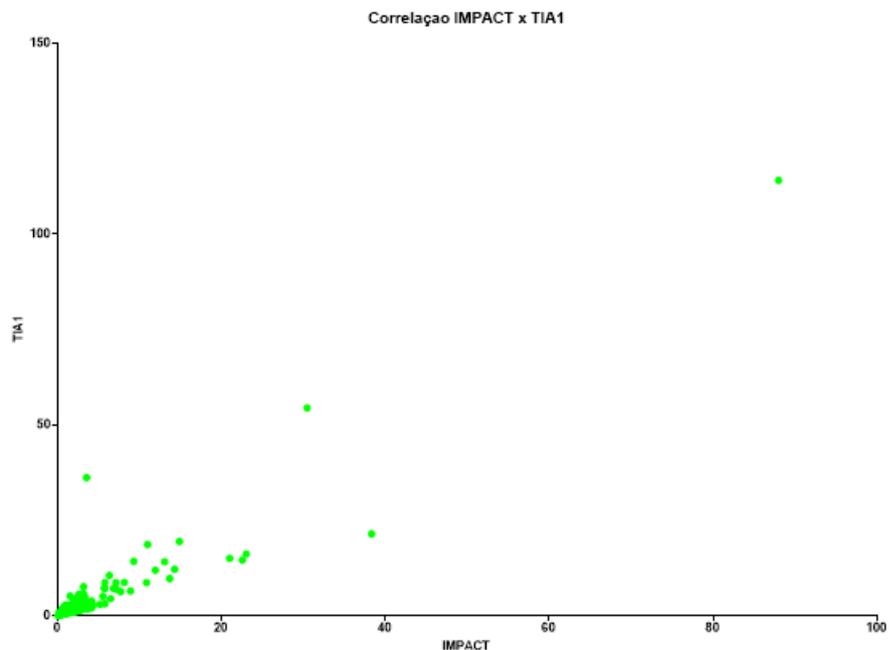


Figura 51: Gráfico correlacionando a quantidade das proteínas IMPACT e TIA1. Apresenta diferença significativamente estatística. Correlação de Pearson,  $p < 0,0001$  valor de  $R = 0,9225$ .

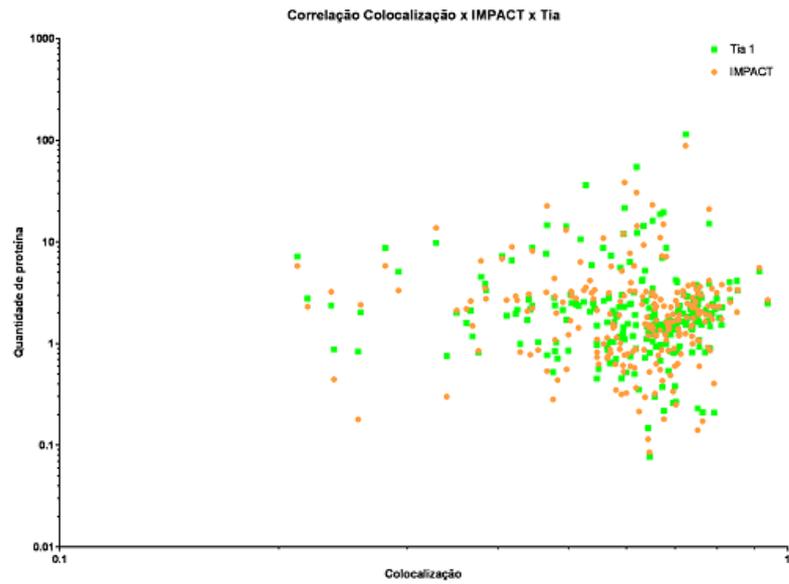


Figura 52: Gráfico, mostrando a correlação da quantidade das proteínas IMPACT e TIA1 com a co-localização dessas proteínas. Correlação entre as proteínas e a co-localização é fraca. Teste Correlação de Pearson, valor de  $r$  IMPACT x Co-localização =  $-0,005582$ , valor de  $r$  TIA1 x Co-localização =  $-0,007984$ .

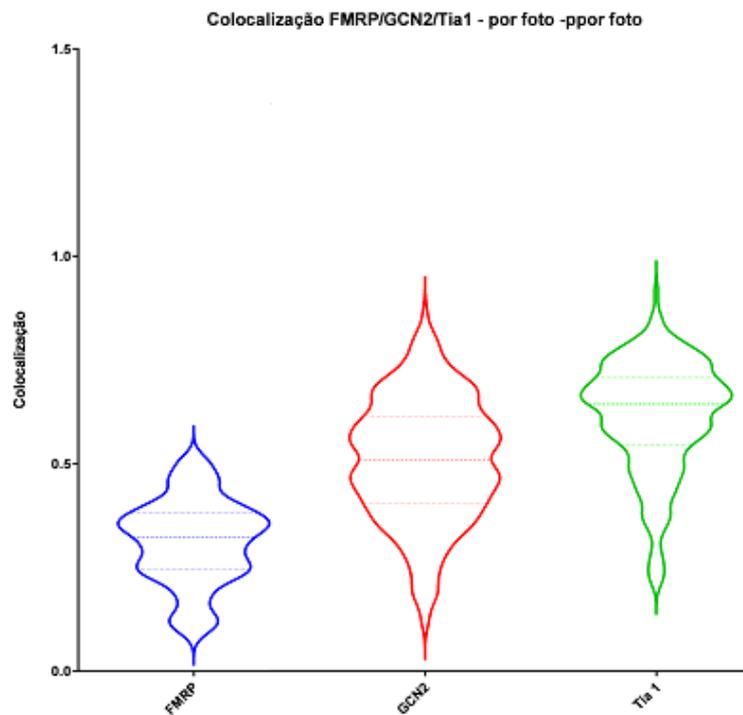


Figura 53: Gráfico comparando a colocalização de IMPACT com FMRP, GCN2 e TIA1. A média grupos apresenta uma diferença significativa onde FMRP colocaliza menos com IMPACT quando comparado com as outras proteínas e TIA1 colocalizando mais do que as outras proteínas. One Way Anova  $p < 0,0001$ .

Comparando a co-localização com IMPACT de cada proteína estudada no TMA, podemos observar que existe uma diferença significativa no grau de co-localização dessas proteínas. TIA1 apresenta maior nível de co-localização com IMPACT enquanto FMR1 apresenta o menor nível. Esse resultado pode estar refletindo o nível de interação dessas proteínas no âmbito funcional, uma vez que IMPACT pode estar muito mais relacionada com o aspecto funcional de TIA1 do que de FMRP. Já GCN2 se encontra em uma posição intermediária, mas mais próxima de TIA1 do que de FMRP. Como já sabemos a interação de IMPACT na via de ativação de GCN2, além de ambas as proteínas estarem ligadas também na mesma estrutura, o ribossomo <sup>(47 e 55)</sup> provavelmente esse seja o motivo de co-localização dessas proteínas.

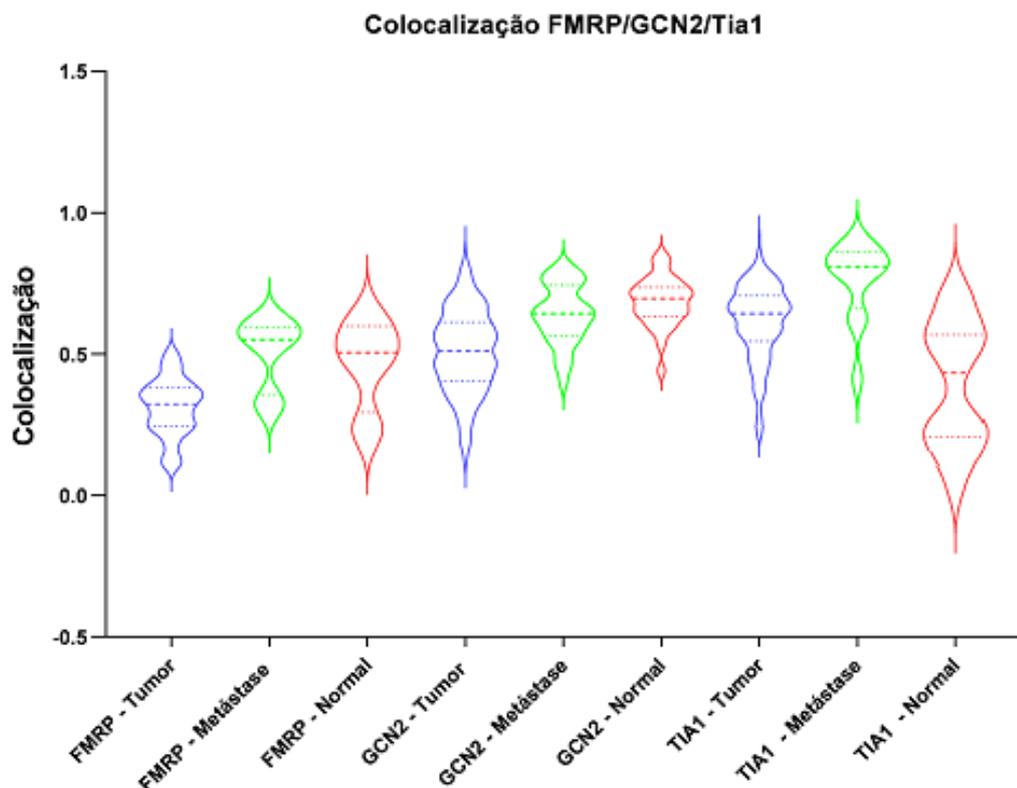


Figura 54: Comparação da co-localização de IMPACT com TIA1, GCN2 e FMRP no tecido tumoral, metastático e normal. Teste One Way Anova. Valores de p: **IMPACT x TIA1**: Tumor x controle  $p < 0,0001$ , Tumor x Metástase  $p = 0,4627$ , Metástase x Controle  $p < 0,0001$ ; **IMPACT x GCN2**: Tumor x controle  $p < 0,0001$ , Tumor x Metástase  $p < 0,0001$ , Metástase x Controle  $p = 0,9312$ ; **IMPACT x FMRP**: Tumor x controle  $p = 0,3966$ , Tumor x Metástase  $p < 0,0001$ , Metástase x Controle  $p = 0,9999$ .

Tabela 4: Mediana dos tecidos tumoral, metastático e normal, para as colocalizações de IMPACT com TIA1, IMPACT com GCN2 e IMPACT com FMRP.

	IMPACT x TIA1			IMPACT x GCN2			IMPACT x FMRP		
	Tumor	Metástase	Normal	Tumor	Metástase	Normal	Tumor	Metástase	Normal
<b>Mediana</b>	0,6134	0,6842	0,3374	0,5071	0,6401	0,6856	0,3124	0,5051	0,4660

Observando o gráfico acima (Figura 54) a co-localização da proteína TIA1 e IMPACT se apresenta em menor quantidade no tecido normal quando comparado com os tecidos tumorais e metastáticos que se assemelham entre si. Essa alta quantidade de co-localização entre essas duas proteínas pode estar refletindo a resposta ao maior estresse que os tecidos tumorais estão sujeitos, com a geração de grânulos de estresse, o que não é observado no tecido normal que está menos sujeito a situações de estresse e provavelmente apresenta menos formação desses grânulos.

No caso da relação de IMPACT com GCN2, temos uma diferença entre o tumor, que apresenta menor quantidade de co-localização, e os tecidos metastático e normal que apresentam maior quantidade de co-localização. Parece que nesse caso a diminuição da co-localização de IMPACT com GCN2 favorece a formação tumoral, ou pode ser um resultado dessa formação, mas não interfere no processo metastático já que este apresenta a quantidade de co-localização próxima dos padrões observados no tecido normal.

Para FMRP, o tecido tumoral, com menor quantidade de co-localização se apresenta diferente do tecido metastático, com maior quantidade de co-localização mas não apresenta diferenças do tecido normal. Para essa proteína, parece que a perda co-localização pode favorecer o crescimento tumoral, enquanto um aumento da co-localização pode favorecer a formação metastática.

Ao correlacionar a co-localização das proteínas com as características clínicas, apresentadas na tabela abaixo, não podemos observar nenhuma relação estatisticamente significativa para nenhuma das características, indicando que provavelmente a relação dessas proteínas nas células se dá provavelmente pela característica funcional das proteínas no ambiente celular e não interfere nas características clínicas normalmente avaliadas para determinar a gravidade tumoral.

Tabela 5: Correlações entre dados clínicos e colocalizações entre IMPACT, TIA1, GCN2 e FMRP.

		IMPACT x TIA 1		IMPACT x GCN2		IMPACT x FMRP	
		Mediana	Valor de P	Mediana	Valor de P	Mediana	Valor de P
<b>Sexo</b>	Feminino	0,6560	0,6377	0,5000	0,6832	0,3350	0,0896
	Masculino	0,6145		0,4840		0,3010	
<b>Diferenciação</b>	Pouco	0,7480	0,3796	0,3890	0,1980	0,3250	0,6409
	Muito	0,6770		0,5130		0,3490	
	Não diferenciado	0,6200		0,4645		0,3010	
<b>Acometimento ganglionar</b>	Acometido	0,6230	0,5703	0,4935	0,3512	0,3085	0,7456
	Não acometido	0,6560		0,4220		0,3235	
<b>Invasão Vascular</b>	Sim	0,6420	0,4579	0,4905	0,3864	0,2900	0,0633
	Não	0,6380		0,4870		0,3250	
<b>Invasão Neuronal</b>	Sim	0,6325	0,3513	0,4835	0,5501	0,3220	0,8440
	Não	0,6830		0,5320		0,3040	
<b>Estadio</b>	1a	0,4530	0,0859	0,3895	0,0194	0,2680	0,4362
	1b	0,7390		0,5990		0,3640	
	2a	0,6520		0,3945		0,3100	
	2b	0,6185		0,4935		0,3030	
	3	0,5510		0,3750		0,3465	
		<b>Valor de R</b>	<b>Valor de P</b>	<b>Valor de R</b>	<b>Valor de P</b>	<b>Valor de R</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Idade</b>		0,2060	0,1053	0,2492	0,0508	-0,1687	0,2415
<b>Tamanho do tumor</b>		-0,03155	0,8061	0,05087	0,6946	0,003040	0,9833

Além das proteínas citadas até o momento, que foram exploradas na intenção de desvendar as possíveis possibilidades para os grânulos citoplasmáticos de IMPACT, também optamos por investigar a formação de IMPACT na região nuclear, já que ela se apresenta tanto de forma difusa quanto em forma de grânulos. B23 e PELO foram exploradas somente nas linhagens celulares, portanto não teremos a quantificação dos níveis de co-localização para essas proteínas.

B23 é uma proteína encontrada de forma mais abundante em células que estão em proliferação. É uma proteína multifuncional envolvida em diversos processos celulares, como biogênese e exportação do ribossomo para o citoplasma, processamento de RNA, regulação de supressores tumorais como P53 e ARF, além de processos relacionados a conformação da cromatina, duplicação do centrômero e também pode ser encontrada associada a DNA e RNA. Embora seja encontrada principalmente no núcleo, mais especificamente no nucléolo onde colocaliza com RPS10, também pode ser encontrada no citoplasma <sup>(60)</sup>. Pode ser translocada rapidamente do núcleo para o citoplasma já que apresenta sinalizações tanto para permanecer no núcleo quanto para ser exportada para o citoplasma <sup>(60)</sup>. É uma proteína que interage com diversas

proteínas sendo algumas delas, proteínas envolvidas com as vias nas quais IMPACT está relacionado, como GCN2 e a subunidade  $\beta$  de eIF2.

Nas células utilizadas nesse estudo também pudemos observar essa proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 55) embora em poucas células. Na região nuclear, B23 parece colocalizar com IMPACT, mas não todas as vezes e nas poucas vezes em que foi vista no citoplasma não foi observada co-localização com IMPACT. A sua co-localização parece não sofrer alteração nas condições com ou sem Arsenito de Sódio, entretanto a sua conformação dentro do núcleo parece apresentar dois padrões, um deles seria o formato normalmente circular e preenchido, observado normalmente nas células que não sofreram estresse por Arsenito e o outro uma circunferência vazia, onde somente a borda do círculo seria marcada. Esta conformação peculiar é encontrada na maior parte das células observadas, com algumas poucas exceções e pode estar associada as atividades relacionadas ao ciclo celular e conformação de cromatina, que provavelmente são alteradas em células em situação de estresse. Yih1, homólogo de IMPACT foi associado ao processo de regulação do ciclo celular <sup>(46)</sup> e IMPACT, relatado como uma proteína que também apresenta uma característica de nuclease <sup>(37 e 48)</sup>, e DNase <sup>(37)</sup> pode em alguns momentos do ciclo celular estar colocalizada com B23 no núcleo, como observado nas imagens abaixo.

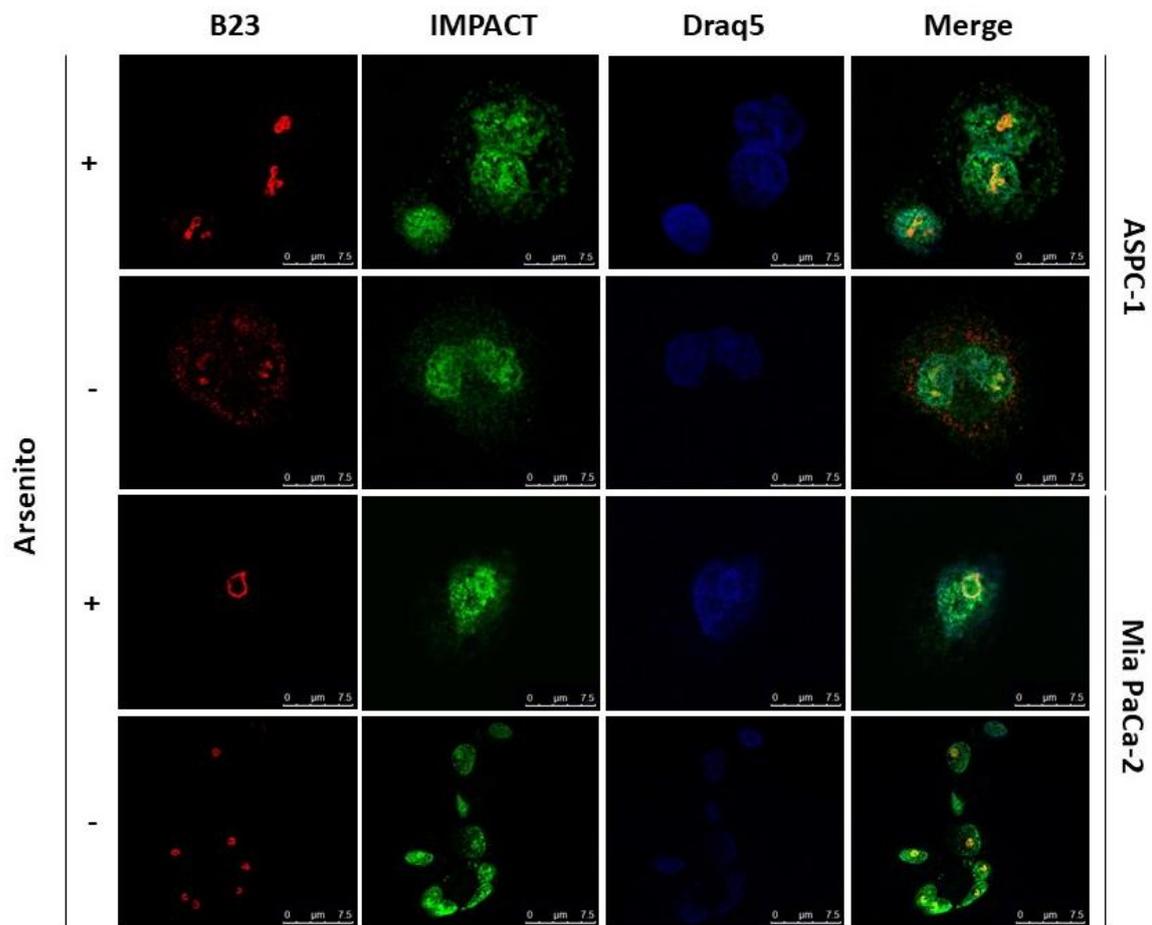


Figura 55: Imunofluorescência das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio. B23, em vermelho, IMPACT em verde, o núcleo em azul e a sobreposição das imagens (merge). Podemos observar um padrão diferenciado na proteína B23 quando comparamos as células tratadas com as não tratadas, na primeira condição temos círculos vazados enquanto na segunda, círculos preenchidos. Neste caso a co-localização parece ser mais intensa nas células sem tratamento de arsenito do que aquelas submetidas ao tratamento.

Já a proteína PELO está relacionada com a parada do ribossomo durante o processo de tradução. Sua atuação no processo de parada do ribossomo induz a dissociação do complexo de alongação da tradução suprimindo a clivagem sequencial endonucleolítica <sup>(63)</sup>. Além disso, também apresenta envolvimento com o ciclo celular e o processo de mitose <sup>(64 e 65)</sup>. PELO Apresentou marcações nucleares (Figura 55) em forma de grânulos que colocam com IMPACT. Essas estruturas formadas pela proteína PELO não são encontradas em todas as células e foram encontradas somente nas células sem tratamento de arsenito enquanto as mesmas estruturas marcadas com IMPACT embora também sejam encontradas em poucas células, aparecem tanto nas células tratadas quanto nas células não tratadas com arsenito de sódio (Figura 55). Além disso, quando submetidas ao tratamento, a marcação nuclear de PELO parece se apresentar de forma

difusa. Essa conformação pode estar relacionada com a função no processo de divisão celular que provavelmente é interrompido em situações de estresse celular.

Já foi relatado na literatura, diversas proteínas relacionadas com o processo de tradução atuando associadas ao citoesqueleto, o que que facilitaria o transporte desses elementos pelo citosol, favorecendo um bom funcionamento do processo de formação de novas proteínas <sup>(62 e 66)</sup>. PELO também apresenta associação com filamentos de actina além de apresentar associação com o fator de início de tradução 3G (eIF3G) <sup>(54)</sup>. Independente do tratamento de Arsenito de Sódio, os pequenos grânulos identificados pela proteína PELO no citoplasma não apresentaram co-localização com IMPACT.

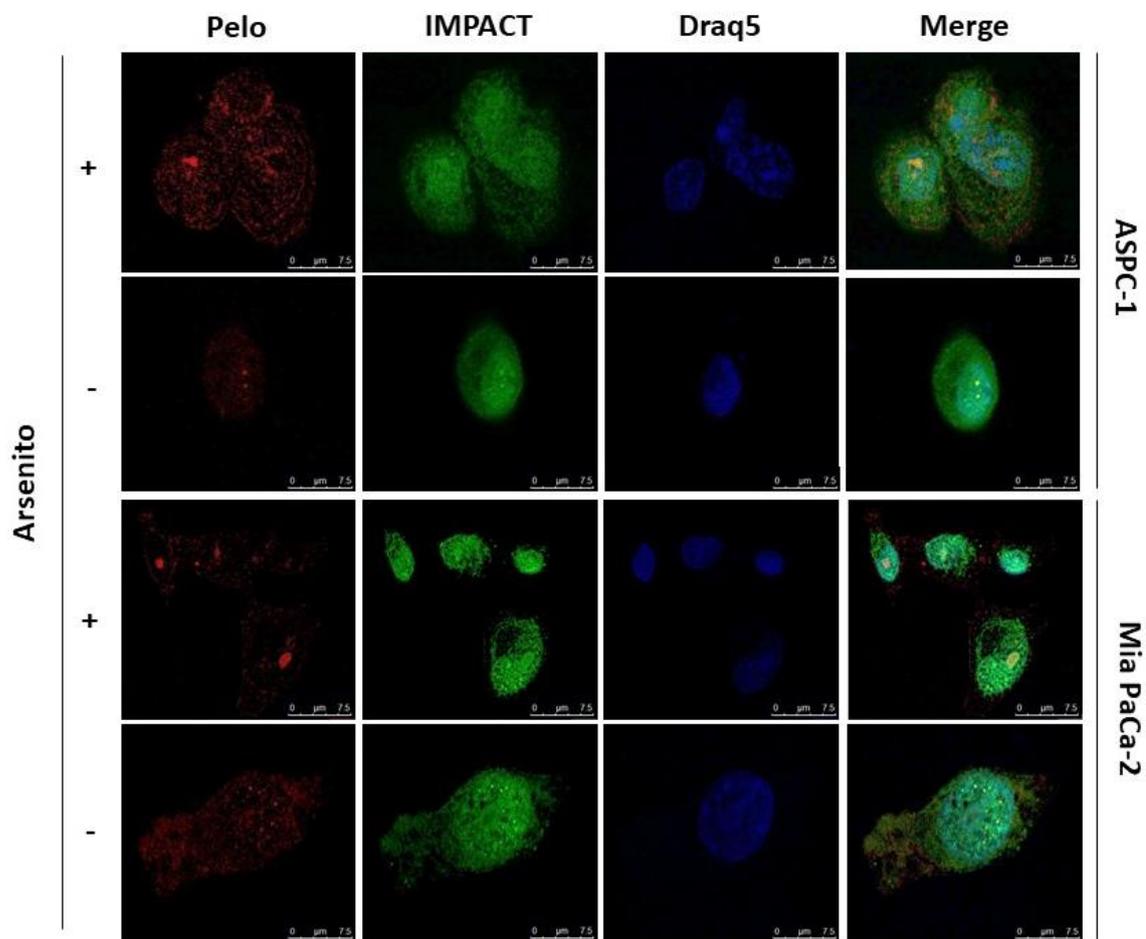


Figura 56: Imunofluorescência das células ASPC-1 e Mia PaCa-2 tratadas e não tratadas com Arsenito de Sódio. PELO, em vermelho, IMPACT em verde, o núcleo em azul e a sobreposição das imagens (merge). Podemos observar um padrão de marcação tanto nuclear, com formação de grânulos que colocalizam com IMPACT quanto marcação citoplasmática que não apresenta colocalização com IMPACT.

Todas as proteínas analisadas no tecido tumoral, apresentaram algum nível de co-localização com IMPACT. Como IMPACT foi encontrada no interior do núcleo tanto nas linhagens celulares

quanto no tecido tumoral, e como GCN2 já foi relatado em envolvimento com a regulação de P53 em atividade dentro do nucléolo, nós optamos por avaliar se P53 apresentaria co-localização com IMPACT dentro do núcleo.

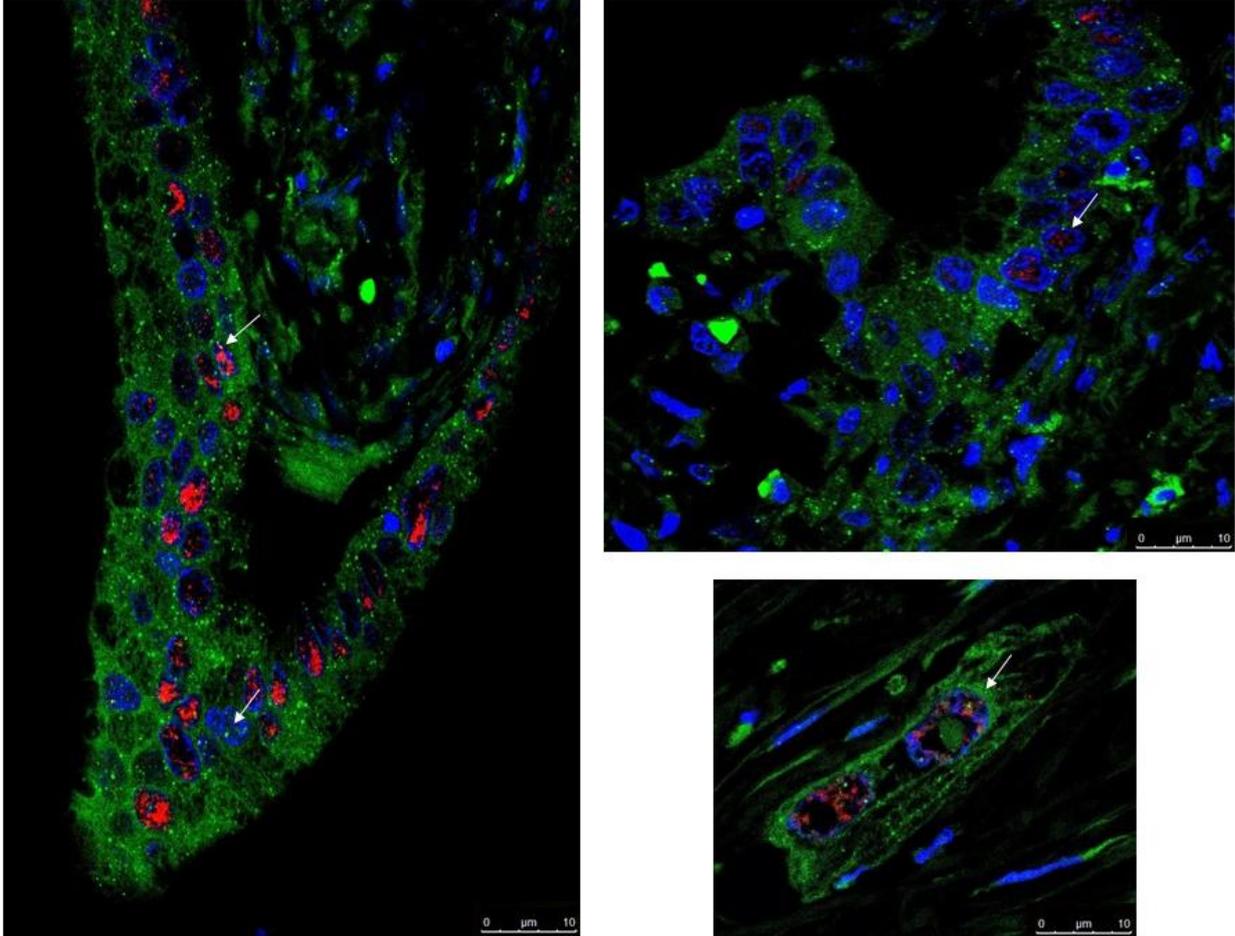


Figura 57: Imunofluorescência Multiplex no tecido tumoral de pâncreas apresentando diversos níveis de co-localização de P53 e IMPACT. P53 em vermelho, IMPACT em verde e núcleo em azul.

Observando a imagem acima, podemos concluir que não existe a co-localização entre P53 e IMPACT no interior do núcleo celular, enfraquecendo a nossa hipótese de que IMPACT pudesse agir juntamente com P53 de alguma forma. Entretanto, essa evidencia não exclui a possibilidade de associação de IMPACT com P53 por uma via indireta, uma vez que a interação cinética entre as proteínas pode estar restrita a um momento específico da célula, sendo portanto possível que IMPACT possa se associar a P53 em algum processo transitente no núcleo da célula e que não esteja sendo captado pelas imagens que fizemos. Além disso, para excluirmos totalmente essa possibilidade outros ensaios devem ser realizados envolvendo as proteínas em questão.

## 4. Discussão

Foram geradas linhagens celulares nocaute para a proteína IMPACT. Entretanto, essas linhagens não apresentam a resposta esperada para o estresse que normalmente está relacionado com a resposta de GCN2, estresse por falta de leucina. Essa resposta inesperada pode ter ocorrido porque o estresse por leucina pode não ter sido forte o suficiente para gerar a resposta esperada, uma vez que segundo a literatura, mesmo em condições de estresse os tRNA de leucina ainda permanecem carregados em aproximadamente 50% <sup>(49)</sup>. Seria, portanto, interessante testar a falta de outros aminoácidos nessas células. Além disso, cada célula apresenta uma resposta diferente e realizar uma curva de estresse por tempo poderiam mostrar uma diferença entre as linhagens ko a vazio.

Já para o estresse gerado por radiação UV, estas linhagens responderam como esperado, ou seja, células nocautes para IMPACT fosforilam mais a subunidade  $\alpha$  de eIF2 quando comparadas as linhagens controles que apresentam IMPACT preservado. Já foi relatado que GCN2 além de ser a cinase responsável por responder a falta de aminoácidos no meio, também responde ao estresse <sup>(11, 15, 16 e 26)</sup> gerado por radiação UV. Portanto, o esperado seria que as células nocautes pra IMPACT se comportassem exatamente como se comportaram, ativando mais a via de eIF2 por fosforilação da subunidade  $\alpha$ , em comparação com as linhagens que apresentam IMPACT, já que este compete com GCN2 pela ligação com GCN1 e sua presença diminui a quantidade de GCN1 disponível para se ligar a GCN2.

Além da função de GCN2 já muito bem descrita na literatura, atuando no início do processo de tradução, essa proteína já foi relatada atuando no nucléolo e associada a p53, via já correlacionada a resposta a estresse por radiação UV. Neste caso, com a diminuição da quantidade de GCN2 na célula há um aumento da quantidade de P53 independente da alteração na quantidade de mRNAs, indicando que essa regulação se apresenta de forma pós transcricional <sup>(31)</sup>. Portanto, a partir dessa informação houve a tentativa de estudar a relação entre IMPACT e P53 nas células já nocauteadas para IMPACT, como nossas células são desprovidas de P53 selvagem, a ideia inicial seria transfectar P53 em células já nocauteadas, gerando assim um sistema onde pudéssemos avaliar a resposta de P53 ao estresse por UV em uma situação na qual IMPACT estivesse ausente. Entretanto essa alternativa não se tornou eficiente, uma vez que, ao realizar a transfecção uma quantidade muito grande dessa proteína se tornava disponível, mascarando os possíveis resultados. Na tentativa de continuar, optamos por fazer o contrário, utilizar uma célula

com P53 selvagem e nocautear IMPACT pelo mesmo sistema já utilizado antes, CRISPR-CAS9. Entretanto, esbarramos na dificuldade de transfecção da linhagem escolhida que apresentava a adesão célula-a-célula muito forte impedindo a seleção dos clones transfectados que já não eram muitos. Além disso, o tempo para finalização deste projeto estava se esgotando e infelizmente não conseguimos adequar os padrões experimentais a tempo para obter um resultado satisfatório. Contudo, esse projeto mantém a possibilidade de exploração de IMPACT atuando em vias que antes se apresentavam desconhecidas, e seria muito interessante no futuro, descobrir se essa proteína está relacionada ao processo de resposta ao estresse por dano ao DNA associada a P53. Essa ideia, ainda assim não exclui a associação do resultado que obtivemos com a via de resposta canônica de GCN2 ao estresse, ativando a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 e parando o processo geral de tradução. Resultados de Darnell, A. et al (2018) mostram GCN2 tendo uma resposta robusta ao estresse gerado pela falta de aminoácidos, apesar de não haver a parada do início da tradução, sugerindo que a ativação de GCN2 pode estar em parte downstream da necessidade da pausa ribossomal gerada pela resposta ao estresse. Como GCN2 responde tanto ao estresse por falta de aminoácidos, detectando tRNAs vazios, quanto por exposição à radiação UV, a resposta a esses estresses pode não apresentar a mesma origem de sinalização upstream que ative GCN2, ou seja, GCN2 pode ser ativado a partir de vias de sinalização diferentes. Por esse motivo, podemos observar GCN2 respondendo de forma diferente a tipos de estresse diferentes.

Enquanto que GCN2 é ativado gerando a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 para que a célula possa responder ao estresse, a via de mTORC1 sofre uma parada para que a via canônica de produção de proteínas seja paralisada. Segundo Yoshiaki Kido e seu grupo, camundongos nocauteados para GCN2 ou ATF4, que apresentam menor resposta ao estresse com parada do processo de tradução apresentam a via de mTORC1 mais ativa. Essa condição se dá pelo feedback negativo que a expressão de ATF4 gera em mTORC1. Ao ser expresso, ATF4 é responsável por modular a expressão de diversos genes responsáveis pela resposta ao estresse <sup>(72)</sup>. Um desses genes codifica a proteína Sestrin 2 que apresenta sua expressão bastante reduzida em baixas expressões de ATF4, resultando em um aumento da atividade da via de mTORC1 <sup>(71)</sup>.

Com os experimentos referentes a fosforilação das proteínas da via de mTORC1, em células nocautes e vazias para IMPACT, buscávamos entender se a relação encontrada pelo grupo de Ching <sup>(36)</sup> onde o nível de expressão genica de IMPACT apresentou uma correlação diretamente proporcional com a expressão genica de proteínas da via de mTORC1 e inversamente proporcional

com a expressão de genes da via de ATF4, acontecia de forma direta ou indireta. Diante dos nossos resultados, onde a falta de IMPACT nas células não apresentou nenhuma alteração na fosforilação das proteínas 4E-BP e S6, podemos sugerir que IMPACT não atue diretamente na via de mTORC1, como havíamos imaginado inicialmente, mas sim de forma indireta. Essa ação pode ser devida a sua interação com GCN2. Como citado acima, camundongos nocautes para GCN2 apresentam menor expressão de ATF4 e conseqüentemente menor expressão de Sestrin2 que em menor quantidade está relacionada a um aumento da atividade da via de mTORC1 <sup>(72)</sup>. Sendo IMPACT responsável pela menor ativação de GCN2 ao competir com ele pela ligação com GCN1, a falta de IMPACT nas nossas células geraram um fenótipo onde GCN2 pode atuar livremente e fosforilar a subunidade  $\alpha$  de eIF2, mantendo os níveis normais de ATF4 que regulariam normalmente a via de mTORC1 em situação de estresse. Como escolhemos não submeter nossas células a estresse por falta de leucina porque em nossos ensaios para esse tipo de estresse não obtivemos alteração na fosforilação de eIF2 não foi possível avaliar uma resposta das células nocautes em condição de estresse. Entretanto células com superexpressão de IMPACT apresentam um fenótipo GCN2 <sup>-/-</sup> <sup>(67)</sup>, gerando uma diminuição na expressão de ATF4 e conseqüentemente na expressão de Sestrin2, resultando no aumento da ativação da via de mTORC1, portanto células com altos níveis de IMPACT provavelmente resultariam em alto grau de atividade de mTORC1 por impedir a fosforilação de eIF2 por GCN2 e diminuir nos níveis de ATF4.

Com o resultado obtido a partir dos perfis polissomais, podemos propor que a falta de IMPACT na célula, pode diminuir as diferenças entre os níveis das taxas de tradução das células IMPACT <sup>ko</sup> em relação àquelas que apresentam a proteína. A presença da proteína IMPACT, na célula, como já discutido anteriormente, promove menor fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2, diminuindo a parada do processo de tradução, podemos sugerir portanto que a diminuição das diferenças entre as taxas de tradução quando comparamos diferentes tratamentos de uma mesma linhagem IMPACT <sup>ko</sup> ocorra porque na ausência de IMPACT, GCN1 se encontra mais disponível para se ligar a GCN2 e seguir com a ativação da via de fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2, diminuindo portanto a ativação da via de mTORC1 e conseqüentemente o processo de tradução geral.

Já no caso do tratamento com UV, nas células ASPC-1, os níveis de tradução das células tratadas se igualou aos das carenciadas, já nas células Mia PaCa-2, esses níveis ficaram acima daqueles encontrados nas células carenciadas, o que não era esperado. Entretanto, com a falta de

um controle de soro adequado ao tratamento com UV, ou seja, tratamento com soro por 30 minutos, não podemos realizar uma comparação para avaliar se nessas células os níveis de tradução a partir dos tratamentos de UV, Soro e Carenciadas se comportaram de forma igual ou diferentes.

De acordo com a nossa hipótese inicial, a alteração na quantidade da proteína IMPACT poderia favorecer o processo tumorigênico. De forma muito interessante, com os resultados dos ensaios funcionais apresentados, podemos concluir que embora as células nocautes não apresentem diferenças na taxa de crescimento quando comparadas com as células controles, a diferença pode ser observada na capacidade de gerar colônias em condições independentes de ancoragem, o que significa que as células não fazem mais colônias porque crescem mais, mas porque a presença da proteína IMPACT permite que essas células cresçam independente do contato com a lamina basal, o que é uma característica importante para células tumorais que adquirem a condição metastática, neste caso a formação de colônias provavelmente se apoia no processo de adesão célula a célula, uma vez que as células não tem disponível um substrato que favoreceria a criação dessas colônias. Esta hipótese foi corroborada também pelos ensaios in vivo, onde as células nocaute para IMPACT apresentaram menor crescimento tumoral que as células controle, e também pelo ensaio de esferoides, onde as células nocautes geraram menos esferoides e com maior facilidade em se desfazerem quando comparadas com as células vazias, portanto IMPACT pode apresentar uma ação importante no processo metastático dessas células.

Em paralelo, os testes realizados comparando tecidos tumorais, metastáticos e normais, revelaram que a proteína IMPACT se apresenta em maior quantidade nos tecidos tumorais quando comparados com os tecidos normais e metastáticos. Correlacionando esses resultados com os resultados apresentados dos ensaios de formação de colônia, os ensaios de formação de esferoides e ensaios de adesão, nos quais as células nocauteadas não apresentaram diferenças na adesão celular em relação ao substrato, mas apresentaram diferenças na formação dos esferoides, que se desagregam com mais facilidade do que aqueles formados pelo controle. Podemos sugerir que provavelmente o processo de adesão célula a célula possa estar alterado com a ausência de IMPACT nas células tumorais, favorecendo o processo metastático.

Moléculas de adesão são encontradas normalmente associadas a processos de migração, proliferação, sinalização, desenvolvimento tecidual e reparo. Alterações nessas moléculas já foram relatadas como um dos fatores geradores de inflamação no parênquima pancreático e que podem

estar associados ao desenvolvimento de pancreatites que posteriormente podem resultar em Adenocarcinoma de Pâncreas <sup>(50)</sup>.

Existem diversos tipos de moléculas de adesão, e muitas estão associadas ao desenvolvimento de adenocarcinoma de pâncreas, como as Tricelulinas, que normalmente estão superexpressas, e também de pancreatites como as junções estreitas localizadas na região mais apical das células adjacentes; Ocludinas, as primeiras a serem degradadas em pancreatites agudas favorecendo a ruptura de outras moléculas de adesão; Claudinas, detectadas somente em células ductais de pâncreas normal, e a ausência dessas proteínas pode diminuir a adesão célula a célula, facilitando o processo de metastático <sup>(50)</sup>. Além dessas, existem outras e como o tecido pancreático se apresenta muito diferenciado na sua região tubular, essas proteínas são extremamente importantes para o desenvolvimento normal do pâncreas e alteração nas suas quantidades e estruturas podem auxiliar o processo e tumorigênese. A  $\alpha$ -catenina, em especial se apresenta como um componente citoplasmático que estabelece a ligação de caderinas aos filamentos de actina do citoesqueleto, além de regular de forma indireta a associação de outras moléculas de adesão, fazendo com que a composição do processo de adesão seja mais dinâmica do que se imaginava <sup>(51 e 52)</sup>. Está associada ao desenvolvimento de tumores em diversas espécies e promovendo o rompimento da adesão celular quando está mutada. A actina, ligada ao processo de junção de membranas atua de forma muito dinâmica no processo inicial da formação dos processos de adesão celular e nos processos finais de selamento das membranas em folhas epiteliais. Como IMPACT já foi relatada anteriormente em associação com actina <sup>(47 e 54)</sup>, talvez os resultados obtidos, que indicam alteração no processo de adesão célula-a-célula das células nocauteadas para IMPACT, podem estar indicando um caminho ainda não explorado para esta proteína em uma função relacionada ao citoesqueleto ou então ao bom funcionamento das proteínas relacionadas ao processo de adesão célula-a-célula como a  $\alpha$ -catenina.

Além disso, outro ponto onde a falta de IMPACT pode estar agindo seria na transcrição de genes relacionados com o processo de adesão células a célula, de forma mais indireta. Já foi descrito que a falta de IMPACT gera camundongos com defeito na via de STAT3, camundongos IMPACT ko apresentam menor fosforilação de STAT3 quando comparados com camundongos normais na presença de leptina. Quando fosforilado STAT3 é encaminhado para o núcleo onde regula a expressão de genes relacionado ao comportamento alimentar em diversos neurônios <sup>(45)</sup>, portanto IMPACT pode ter envolvimento com a regulação a transcrição desses genes Como os

nossos ensaios de formação de esferoides mostraram as diferenças entre células IMPACT ko e Vazio em situação sem estresse, provavelmente, se IMPACT estiver atuando de forma a impactar a tradução desses genes, pode ser independente da via em que ele está normalmente associado que seria a via de resposta ao estresse por fosforilação de eIF2.

Essas diferenças nos fazem sugerir que talvez IMPACT apresente dois papéis distintos no processo de tumorigênese: um primeiro momento no qual uma maior quantidade de IMPACT seria interessante para que o processo de tradução não fosse parado mesmo em situação de estresse, favorecendo a proliferação e desenvolvimento do tumor e um segundo momento onde a menor quantidade de IMPACT poderia favorecer o processo de metástase desse tumor diminuindo a adesão entre as células e facilitando a sua liberação para outros locais.

Outros experimentos funcionais foram realizados e as células nocaute para IMPACT não apresentam diferenças de migração em condições sem estresse e não parecem possuir maior sensibilidade à morte causada por dano ao DNA. No entanto, é necessário lembrar que estas células não possuem p53 tipo-selvagem. A reconstituição de p53 neste sistema pode alterar esta resposta.

Resultados anteriores do grupo e não publicados mostraram a proteína IMPACT envolvida em estruturas granulares em neurônios de camundongos <sup>(70)</sup>. Embora essa proteína seja preferencialmente expressa em tecido nervoso <sup>(67)</sup>, é bastante interessante observar o mesmo padrão de expressão em células transformadas e em amostras de tecido de adenocarcinoma de pâncreas. Muito interessante nós pudemos observar essa proteína não só presente no núcleo de células como no tecido também e o mais interessante, formando grânulos, em ambas as estruturas. A descoberta de uma provável função de endonuclease <sup>(37 e 48)</sup>, pode justificar a presença de IMPACT na região do núcleo observada nas nossas imunofluorescências podendo indicar que IMPACT esteja agindo com essa função.

De acordo com os resultados obtidos, embora IMPACT apresente um grau de co-localização diferente entre as proteínas, com FMRP apresentando menor quantidade de co-localização quando comparados com GCN2 e TIA1, quando olhamos as proteínas testadas no tecido tumoral, temos uma apresentação bastante heterogênea da co-localização, tanto dentro de um mesmo corte de tecido, ou seja, em um mesmo paciente, quanto muitas vezes dentro de um mesmo tumor. Esse tipo de apresentação nos mostra a versatilidade dessa proteína, já que aparentemente ela apresenta um padrão diferente dependendo da situação em que a célula se

encontra. Além disso, como já se sabe, o tecido tumoral apresenta diversas alterações na expressão de muitas proteínas, sendo assim, IMPACT não se apresenta isenta de estar super-representada em alguns pontos do tumor ou pouco representada em outros pontos do tumor.

Como o tecido tumoral se apresentou de forma tão heterogênea em relação a quantidade de co-localização embora a quantidade de proteínas não tenha sido um aspecto relevante para a presença ou ausência de co-localização, seria interessante avaliar se as proteínas estudadas estão em condição de super-expressão ou deleção nos tecidos tumorais. Esse tipo de alteração pode gerar um comportamento exagerado das proteínas no citoplasma, aumentando uma interação que ocorre, mas em uma magnitude menor. Sendo assim avaliar se os genes das proteínas estudadas estão superexpressos ou deletados podem nos dar maior informação sobre a magnitude de interação dessas proteínas.

A proteína FMRP, como dito anteriormente, é encontrada tanto no núcleo como no citoplasma, onde atua como um regulador traducional se ligando aos polissomos além de desenvolver outras atividades como resposta ao dano no DNA, envolvimento na dinâmica do citoesqueleto e também compõe grânulos de estresse <sup>(57, 58 e 59)</sup>. IMPACT apresentou nos tecidos uma co-localização mais discreta com FMRP em alguns casos e mais acentuada em outros. Nas células pudemos observar a co-localização de IMPACT com os grânulos formados por FMRP após o tratamento com arsenito de sódio. Analisando funcionalmente essa proteína, podemos traçar algumas relações com IMPACT, já que ambas se ligam ao ribossomo, ambas estão relacionadas ao citoesqueleto já que IMPACT foi relatada ligada a monômeros de actina e pode estar associada a formações do citoesqueleto, e ambas podem estar compondo grânulos de resposta ao estresse, já que colocalizam tanto no tecido quanto nos ensaios com células.

A proteína GCN2, como já apresentado, tem suas funções principais relacionadas a parada do processo de tradução. Embora nos experimentos com as linhagens celulares, os grânulos com GCN2 não tenham sido formados de forma representativa, e aqueles que se formaram não tenham apresentado co-localização com IMPACT, outro local de co-localização nos chamou muito a atenção. IMPACT pareceu se associar a GCN2 principalmente ao redor do núcleo, em ambas as linhagens, de forma mais ou menos intensa, uma vez que utilizamos dois tipos celulares diferentes. Além disso, vale lembrar que GCN2, como já foi dito anteriormente também foi encontrado no núcleo <sup>(70)</sup> e portando deve transitar entre o núcleo e o citoplasma, sendo então provável que se encontre ao redor dessa organela juntamente com IMPACT.

Outro fator interessante é que ambos já foram associados aos ribossomos <sup>(47 e 55)</sup>. A ligação de IMPACT com o ribossomo se apresentou independentemente da ligação de GCN2 ou GCN1 <sup>(47)</sup> que se ligam ao ribossomo para reconhecer tRNAs descarregados e iniciar a sua função no processo de parada da tradução geral <sup>(47)</sup>. Portanto, no citoplasma esses grânulos podem estar sendo formados pela captura dos ribossomos no processo de parada de tradução e dessa forma essas proteínas também passam a fazer parte desses grânulos, ou pelo fato de apresentarem uma função em comum no processo de tradução.

Existem diversos tipos de estruturas granulares relacionadas ao processo de tradução de mRNAs, como P-bodies, grânulos neuronais, grânulos de resposta a estresse entre outros <sup>(33)</sup>. Os grânulos de resposta a estresse são estruturas multimoleculares relacionadas com o processo de parada do início da tradução que leva ao sequestro de mRNAs não traduzidos com paradas dos complexos de iniciação. São compostos por mRNAs, fatores de início de tradução e outras proteínas relacionadas ao processo traducional da célula, no entanto, a composição específica é muito dinâmica e varia de acordo com o tipo de estresse percebido pela célula <sup>(33)</sup>. A formação desses grânulos é estimulada pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  <sup>(12, 13 e 14)</sup>. Duas proteínas principais são características dessas formações granulares: T-cell internal antigen 1 (TIA1) <sup>(34)</sup> e Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein 1 (G3BP1) <sup>(35)</sup>. Enquanto a célula não está exposta a uma situação de estresse que necessite dessa reação as proteínas responsáveis formam uma densa rede de interação e ficam prontas para apresentarem uma resposta rápida ao estresse <sup>(53)</sup>.

Uma vez que a formação de grânulos de estresse está intimamente relacionada com a parada do processo de início da tradução por fosforilação de eIF2, podemos traçar uma certa relação com a via de resposta a estresse por GCN2 que já foi relatada em *Trypanosoma Cruzi* <sup>(56)</sup> e conseqüentemente com a atuação da proteína IMPACT. Considerando essas relações, a alteração nos níveis de IMPACT na célula poderia influenciar a formação dos grânulos de resposta a estresse.

Ao observarmos a co-localização de IMPACT com a proteína TIA1 fica claro que IMPACT faz parte dos grânulos de resposta ao estresse formados por essa proteína. Além disso, IMPACT já foi associada aos ribossomos, que também são estruturas que compõem os grânulos de estresse <sup>(53 e 47)</sup>, portanto é coerente que IMPACT componha estes grânulos também. Além das formações granulares formadas a partir de um estresse, TIA1 também já foi encontrado em grânulos, juntamente com FMRP em células que não tinham sido estimuladas para resposta ao estresse <sup>(53)</sup>. Portanto podemos concluir que IMPACT sendo encontrada tanto em grânulos marcados com TIA1

quanto marcados com FMRP pode estar relacionado com a formação de grânulos independente de uma situação de estresse no microambiente celular.

Grânulos de estresse contendo mRNAs e o complexo ribossomal parados provenientes do processo de tradução podem tanto ter o destino de autofagia, onde os componentes desses grânulos serão degradados quanto os complexos ribossomais podem ser reativados e voltar a atividade de tradução <sup>(33)</sup>. Por fazer parte do complexo ribossomal, estando ligado ao ribossomo <sup>(47)</sup>, como já explanado anteriormente, IMPACT pode ter uma atuação passiva nestes grânulos, aguardando para que a atividade de tradução seja retomada, mas também pode estar atuando no processo de degradação naqueles grânulos que seguirão esse destino, uma vez que seu ancient domain pode apresentar a função de nuclease como seu homólogo em *Leishmania donovani* <sup>(48)</sup>.

No núcleo, pudemos observar IMPACT colocalizando com duas proteínas de forma diferentes, B23 e PELO. A co-localização com B23 se apresenta de forma mais amplas enquanto com PELO essa co-localização é bem mais pontual em grânulos localizados de forma mais ou menos organizadas. B23 está associada, além de outras funções, ao processamento de RNA, montagem e exportação do ribossomo para o citoplasma enquanto a proteína PELO está associada a maquinaria de tradução e é considerado um marcador de ribossomos parados uma vez que interagem com o 80S facilitando a dissociação das subunidades do ribossomo. Estando colocalizadas com essas proteínas, IMPACT pode estar relacionada com essas atividades, quando está ligada ao ribossomo. Além disso, a presença de PELO no núcleo está relacionada com o processo de ciclo celular, já descrito anteriormente na literatura, associado principalmente a fase G2/M na espermatogênese de *Drosófilas*, sendo localizada no núcleo <sup>(83)</sup>. Desta forma, sendo Yhi1, homóloga de IMPACT já correlacionada com o ciclo celular <sup>(46)</sup>, inclusive na fase G2/M, pode ser que a colocalização com PELO na região nuclear nesses grânulos muito pontuais esteja correlacionada com essa fase de divisão celular, uma vez que se apresentam em poucas células observadas, devendo assim ser transitória.

Como IMPACT não se associa aos pequenos grânulos formados por PELO no citoplasma, provavelmente não se encontra associada ao processo de parada dos ribossomos. Entretanto se associa muito bem a proteínas relacionadas a formação de grânulos de estresse, indicando que sua atuação pode estar relacionada a uma etapa depois do processo de parada.

Além de avaliar como a proteína IMPACT se comporta em células transformadas onde diversas vias podem estar alteradas, seria interessante avaliar nossa proteína de interesse e suas

colocalizações também em células não transformadas para avaliar se o padrão de co-localização permanece o mesmo, como uma característica de atuação da proteína ou se em células normais IMPACT se comporta de outra forma.

## 5. Conclusão

Com a realização deste trabalho, conseguimos chegar a três conclusões principais e levantar uma hipótese para atuação de IMPACT no quadro geral do desenvolvimento tumoral.

A nossa primeira conclusão está relacionada a formação de grânulos de estresse. Esses grânulos, como já explanado anteriormente, são estruturas que participam de uma classe de grânulos categorizados como grânulos de RNA, sendo sua formação intimamente relacionada com quantidade de mRNAs não traduzidos. Apresentam composição muito diversa dependendo do tipo de estresse pelo qual a célula está passando. As formações granulares de IMPACT, colocalizam com FMRP, GCN2 e TIA1, tanto nas linhagens celulares quanto nos tecidos tumorais, indicando que IMPACT está associada a grânulos de estresse.

Sendo IMPACT, uma proteína altamente conservada e seu homólogo em *Leishmania donovani* já descrita como uma proteína com ação de nuclease <sup>(48)</sup>, atividade correspondente ao seu ancient domain, existe a possibilidade de que sua função nos grânulos de estresse esteja associada a essa característica, ou que esteja associada à sua função ligada ao ribossomo.

No âmbito tumoral e experimentos funcionais, surpreendentemente a falta de IMPACT revelou um aumento na fragilidade no processo de adesão célula-a-célula, levando nossa proteína para um caminho ainda não desvendado no seu quadro de funções. Como recentemente, IMPACT foi associada a actina monomérica <sup>(47 e 54)</sup> embora os autores tenham relacionado essa ligação a uma forma de ativação da proteína em sua associação com ribossomos, essa relação abre portar para investigações em outros campos, relacionando essa proteína com o processo de formação tecidual e manutenção da estrutura de ligação das células.

O tecido pancreático, principalmente na sua região tubular, necessita de firmeza entre as adesões celulares e alterações em praticamente todas as estruturas que apresentam essa função já foram associadas tanto no desenvolvimento de adenocarcinoma de pâncreas como em pancreatites crônicas. Se IMPACT realmente estiver relacionada de alguma forma com o bom

funcionamento dessas estruturas, o fato de encontrarmos muitas alterações genéticas nessa proteína principalmente em amostras de câncer de pâncreas se torna muito esclarecedor.

Além disso, a falta de IMPACT também gerou a diminuição nas diferenças entre as taxas de tradução em uma mesma célula, mas com tratamentos diferentes, uma vez que a falta dela promove maior fosforilação de eIF2, o que inibe a ativação de via de mTORC1, já que disponibiliza GCN2 para atuar ao lado de GCN1.

Embora a quantidade de IMPACT não tenha sido um fator relevante na sobrevivência dos pacientes desse estudo as funções de IMPACT no processo de resposta ao estresse e também no processo de adesão célula a célula exploradas nesse trabalho proporcionam um diverso campo de estudo para a atuação de futuras estratégias de tratamento. Com esse estudo abrimos caminho para que IMPACT seja mais bem estudada no processo de metástase tumoral já que esta relacionada com a capacidade de adesão célula a célula e sua falta pode apresentar um fator facilitador da metástase.

Dessa forma, levantamos a hipótese de que IMPACT, possa estar associada de formas diferentes dependendo do estágio tumoral. Teríamos um primeiro momento em que uma maior quantidade de IMPACT favoreceria o crescimento tumoral, por inibição da via de resposta ao estresse ativada pela fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2, mantendo o processo de tradução geral mesmo em condições de estresse. E um segundo momento em que a falta de IMPACT poderia favorecer o processo de metástase interferindo no processo de adesão célula a célula.

Além disso, a localização de IMPACT na região subcelular abre caminho para possíveis descobertas de função dessa proteína na região nuclear além de corroborar a ideia de que a sua função de nucleasse, já proposta na literatura, possa atuar nos grânulos de estresse de forma ativa, além de estar presente por conta da sua ligação com o ribossomo.

Concluindo, a proteína IMPACT ainda necessita ser melhor estudada tanto no âmbito de suas funções na metástase celular quanto nas suas atividades subcelulares, para que possa ser cogitada como um alvo de tratamento para células tumorais.

## 6. Referencias

- 1 Cebrian Maria Jose Garcia, et al. Paradoxical Role of HMGB1 in Pancreatic Cancer: Tumor Suppressor or Tumor Promoter?. *Anticancer Research*. 2016; 36(9):4381-4389.
- 2 Yadav, Dhiraj, and Albert B. Lowenfels. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013; 144(6): 1252-1261.
- 3 Pâncreas [Internet]. [São Paulo]; 2016 [cited 2017 Mar 5]. Available from: [http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-ocancer/pancreas/7/?gclid=Cj0KEQjApqTCBRC77Hi9Ov8pkBEiQA5B\\_ipUd7nT6k7Fi6bSHMHincG53W-bepAUyZi8DDgbK4XSoaAmH18P8HAQ](http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-ocancer/pancreas/7/?gclid=Cj0KEQjApqTCBRC77Hi9Ov8pkBEiQA5B_ipUd7nT6k7Fi6bSHMHincG53W-bepAUyZi8DDgbK4XSoaAmH18P8HAQ).
- 4 Tipos de câncer [Internet] [Rio de Janeiro]; 2013 [cited 2017 Mar 5] Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>.
- 5 Cancer de Pancreas [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 5] Available from: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepancreas>.
- 6 Hessmann Elisabeth, et al. Epigenetic treatment of pancreatic cancer: is there a therapeutic perspective on the horizon?. *Gut*. 2016; 66: 168-179.
- 7 Roussos Evanthia T, Condeelis John S, Patsialou Antonia. Chemotaxis in cancer. *Nature review cancer*. 2011; 11(8):573–587.
- 8 Witkiewicz Agnieszka K., et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature communications*. 2015; 6.
- 9 Iacobuzio-Donahue, Christine A., et al. Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18(16): 4257-4265.
- 10 Ma Xiaojun Max, and John Blenis. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009; 10(5): 307-318.
- 11 Chu Jennifer, et al. Translation Initiation Factors: Reprogramming Protein Synthesis in Cancer. *Trends in Cell Biology*. 2016; 26(12): 918-933.
- 12 ALBERTS B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Artmed, 2007.
- 13 Rothenburg Stefan, Millie M. Georgiadis, and Ronald C. Wek. Evolution of eIF2 $\alpha$  Kinases: Adapting Translational Control to Diverse Stresses. "Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation". Springer International Publishing, 2016; 235: 26.
- 14 B'chir, Wafa, et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*. 2013; 41(16):7683–7699.
- 15 Pereira Cátia M., et al. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 280(31): 28316-28323.
- 16 Donnelly Neysan, et al. The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cellular and*

- molecular life sciences*.2013; 70(19): 3493-3511.
- 17 Roffé Martín, et al. IMPACT is a developmentally regulated protein in neurons that opposes the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 in the modulation of neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*.2013; 288(15): 10860-10869.
  - 18 Truitt Morgan L., and Davide Ruggero. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature Reviews Cancer*.2016; 16(5): 288-304.
  - 19 Teng Yan, et al. Inhibition of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatoma cells. *Cell death & disease*.2014; 5(2): e1060.
  - 20 Bhat Mamatha, et al. Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews Drug discovery*.2015 14(4): 261-278.
  - 21 Kubota H., Ota K., Sakaki Y., Ito T. Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *J Biol Chem*.2001; 276: 17591-17596.
  - 22 Sattlegger E., Hinnebusch A.G. Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation on amino acid-starved cells. *Embo J*.2000; 19: 6622-6633.
  - 23 Marton M.J., et al. Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of Eif2 $\alpha$  kinase GCN2. *Mol Cell Biol*.1997; 17: 4474-4489.
  - 24 Cambiaghi T. D. et al. Evolutionarily conserved IMPACT impairs various stress responses that require GCN1 for activating the eIF2 kinase GCN2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2014, 443: 592-597.
  - 25 Sander Jeffry D. and J. Keith Joung. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*. 2014; 32(4): 347.
  - 26 Deng Jing, et al. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Current Biology*.2002; 12(15): 1279-1286.
  - 27 Yachida S. & Iacobuzio-Donahue C. A. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2009; 133: 413–422.
  - 28 Detecção de diagnóstico [Internet]; 2016 [cited 2017 Mar 5]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>.
  - 29 Bardeesy Nabeel and Ronald A. DePinho. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*.2002; 2(12): 897.  
Makohon-Moore Alvin and Christine A. Iacobuzio-Donahue. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nature reviews Cancer*.2016; 16(9): 553.
  - 30 Nakamura Akito and Hiromichi Kimura. A new role of GCN2 in the nucleolus. *Biochemical and biophysical research communications*.2017; 485(2): 484-491.

- 31 Taddei M. L., et al. Anokis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of pathology*.2012; 226(2): 380-393.
- 32 Protter David SW and Roy Parker. Principles and properties of stress granules. *Trends in cell biology*.2016; 26(9): 668-679.
- 33 Loschi M. et al. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J. CellSci*.2009; 122 (57): 3973–3982.
- 34 Nadezhdina E.S. et al. Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* – Mol. Cell Res.2010; 1803: 361–371.
- 35 Tomek Petr, et al. Imprinted and ancient gene: a potential mediator of cancer cell survival during tryptophan deprivation. *Cell Communication and Signaling*.2018; 16(1): 88.
- 36 Sara Sara Zamora Caballero. Structural and functional characterization of IMPACT proteins: a novel nuclease family. Tese, Universidade de Salamanca, 2016.
- 37 Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open*. 2021;4(4):e214708.
- 38 Barbosa Isabelle Ribeiro, Santos Camila Alves dos and Souza Dyego Leandro Bezerra de. PANCREATIC CANCER IN BRAZIL: MORTALITY TRENDS AND PROJECTIONS UNTIL 2029. *Arquivos de Gastroenterologia* [online]. 2018; 55(03) 230-236.
- 39 Loc WS, Smith JP, Matters G, Kester M, Adair JH. Novel strategies for managing pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2014;20:14717.
- 40 Ansari D., et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future oncology*.2016; 12(16): 1929-1946.
- 41 Martin A. M., Adeva J., Martínez-Galán J., Reina J. J., & Hidalgo M.. Pancreatic ductal adenocarcinoma: metastatic disease. *Clinical and Translational Oncology*.2017; 19(12): 1423-1429.
- 42 Sahin I. H., Elias H., Chou J. F., Capanu, M., & O'Reilly, E. M. Pancreatic adenocarcinoma: insights into patterns of recurrence and disease behavior. *BMC cancer*.2018;18(1): 1-8.
- 43 Biancur D. E., & Kimmelman A. C. The plasticity of pancreatic cancer metabolism in tumor progression and therapeutic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*.2018; 1870(1): 67-75.
- 44 Pereira C. M., et al. The GCN2 inhibitor IMPACT contributes to diet-induced obesity and body temperature control. *Plos one*.2019;14(6): e0217287.

- 45 Silva R. C., Dautel M., Di Genova, B. M., Amberg, D. C., Castilho, B. A., & Sattlegger, E.. The Gcn2 Regulator Yih1 Interacts with the Cyclin Dependent Kinase Cdc28 and Promotes Cell Cycle Progression through G2/M in Budding Yeast. *PLoS one*.2015; *10*(7): e0131070.
- 46 T. Waller, S.J. Lee, E. Sattlegger. Evidence that Yih1 resides in a complex with ribosomes, *FEBS J*.2012;(279):1761–1776.
- 47 Rao S. J., et al. The Leishmania donovani IMPACT-like protein possesses non-specific nuclease activity. *International journal of biological macromolecules*.2018; *119*: 962-973.
- 48 Darnell A. M., Subramaniam A. R., & O’Shea E. K. Translational control through differential ribosome pausing during amino acid limitation in mammalian cells. *Molecular cell*.2018; *71*(2): 229-243.
- 49 Sato T., Shibata W., & Maeda S. Adhesion molecules and pancreatitis. *Journal of gastroenterology*.2019; *54*(2): 99-107.
- 50 Kobiela A., & Fuchs E.  $\alpha$ -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*.2004; *5*(8): 614-625.
- 51 Drees F., Pokutta, S. Yamada, S. Nelson, W. J. & Weis, W. I.  $\alpha$ -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*.2005; *123*(5): 903-915.
- 52 Markmiller S., et al.Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell*.2018;*172*(3): 590-604.
- 53 Burnicka-Turek O., et al. Pelota interacts with HAX1, EIF3G and SRPX and the resulting protein complexes are associated with the actin cytoskeleton. *BMC Cell Biology*.2010; *11*(1): 1-10.
- 54 Sattlegger E., & Hinnebusch A. G. Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 during amino acid starvation. *Journal of Biological Chemistry*.2005;*280*(16): 16514-16521.
- 55 Malvezzi A. M., et al. GCN2-like kinase modulates stress granule formation during nutritional stress in Trypanosoma cruzi. *Frontiers in cellular and infection microbiology*.2020;*10*: 149.
- 56 Mila M., Alvarez-Mora M. I., Madrigal I., & Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clinical genetics*.2018; *93*(2): 197-205.
- 57 Taha M. S., et al. Novel FMRP interaction networks linked to cellular stress. *The FEBS journal*.2021; *288*(3): 837-860.

- 58 Taha MS Nouri K, et al. Subcellular fractionation and localization studies reveal a direct interaction of the fragile X mental retardation protein (FMRP) with nucleolin. *PLoS One*.2014; 9: e91465.
- 59 Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *Journal of biochemistry*. 2008;143(4): 441-448.
- 60 Cela I., Di Matteo A., & Federici L. Nucleophosmin in its interaction with ligands. *International Journal of Molecular Sciences*.2020; 21(14): 4885.
- 61 Bassell G Singer RH: mRNA and cytoskeletal filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 1997, 9: 109-115.
- 62 Ikeuchi K., Yazaki E., Kudo K., & Inada T. Conserved functions of human Pelota in mRNA quality control of nonstop mRNA. *FEBS letters*.2016; 590(18): 3254-3263.
- 63 Davis L Engebrecht J: Yeast dom34 mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics*. 1998, 149: 45-56.
- 64 Adham IM, Sallam MA, Steding G, Korabiowska M, Brinck U, Hoyer-Fender S, Oh C, Engel W: Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2003, 23: 1470-1476.
- 65 Hesketh J: Translation and the cytoskeleton: a mechanism for targeted protein synthesis. *Mol Biol Rep*. 1994, 19: 233-243.
- 66 Pereira CM, Sattlegger E, Jiang HY, Longo BM, Jaqueta CB, Hinnebusch AG, Wek RC, Mello LE, Castilho BA. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *J Biol Chem*. 2005 Aug 5;280(31):28316-23. doi: 10.1074/jbc.M408571200. Epub 2005 Jun 2. PMID: 15937339.
- 67 Floridia, Giovanna, et al. Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in nonfunctioning endocrine pancreatic tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*.2005; 156.(1): 23-30.
- 68 Hoffmann AC, et al., High expression of HIF1a is a predictor of clinical outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA, VEGF and bFGF, Neoplasia. 2008; 10(7): 674-9.
- 69 Roffe Martin. Controle da síntese de proteínas em neurônios. Tese. 2011. Universidade Federal de São Paulo.
- 70 Kanno A, et al. GCN2 regulates pancreatic  $\beta$  cell mass by sensing intracellular amino acid levels. *JCI Insight*. 2020 May 7;5(9):e128820.

- 71 Kilberg Michael S., Jixiu Shan and Nan Su. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*.2009; 20(9): 436-443.
- 72 Samir A. E. Bashandy, Sally A. El Awdan, Hossam Ebaid, Ibrahim M. Alhazza. Antioxidant Potential of *Spirulina platensis* Mitigates Oxidative Stress and Reprotoxicity Induced by Sodium Arsenite in Male Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.2016; 2016: 7174351.
- 73 Pathria, Gaurav, et al. Translational reprogramming marks adaptation to asparagine restriction in cancer. *Nature cell biology*.2019; 21(12): 1590-1603.
- Piccirillo C., Bjur E., Topisirovic I. et al. Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nat Immunol*.2014; 15: 503–511.
- 74 Shen Y., et al. Antiproliferative and overadditive effects of rapamycin and FTY720 in pancreatic cancer cells in vitro. *Transplantation proceedings*.2008; 40(5).
- 75 Stephan Susann, et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer. *Clinical cancer research*,2004; 10(20): 6993-7000.
- Knutsen Jon Halvor Jonsrud, et al. Stress-induced inhibition of translation independently of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. *Journal of cell Science*.2015; 128(23): 4420-4427.
- 76 Iordanov Mihail S., et al. Ultraviolet radiation triggers the ribotoxic stress response in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*.1998; 273(25): 15794-15803.
- 77 Wu Shiyong, et al. Ultraviolet light inhibits translation through activation of the unfolded protein response kinase PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*.2002; 277(20): 18077-18083.
- 78 Powley Ian R., et al. Translational reprogramming following UVB irradiation is mediated by DNA-PKcs and allows selective recruitment to the polysomes of mRNAs encoding DNA repair enzymes. *Genes & development*.2009; 23(10): 1207-1220.
- 79 Rayman JB, Kandel ER. TIA-1 Is a Functional Prion-Like Protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(5):a030718. doi: 10.1101/cshperspect.a030718. PMID: 28003185; PMCID: PMC5411700.
- 80 Eerhart CG, Wasserman SA. The pelota locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in *Drosophila* spermatogenesis. *Development*. 1995 Oct;121(10):3477.

