



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**PERFIL PROTEÔMICO DE LINHAGEM CELULAR DO ADENOCARCINOMA
DUCTAL PANCREÁTICO HUMANO (MIA PACA-2)**

CAMILA EDUARDA ALVES MARTINS

Foz do Iguaçu
2022

**PERFIL PROTEÔMICO DE LINHAGEM CELULAR DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO
HUMANO (MIA PACA-2)**

CAMILA EDUARDA ALVES MARTINS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Foz do Iguaçu
2022

CAMILA EDUARDA ALVES MARTINS

**PERFIL PROTEÔMICO DE LINHAGEM CELULAR DO ADENOCARCINOMA DUCTAL
PANCREÁTICO HUMANO (MIA PACA-2)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Jessica Moraes Malheiros
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Prof. Dra. Tathianne Pastana de Souza Poltronieri
UNILA

Foz do Iguaçu, 28 de novembro de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Camila Eduarda Alves Martins

Curso: Biotecnologia

| | Tipo de Documento |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo |
| <input type="checkbox"/> especialização | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado | <input type="checkbox"/> monografia |
| <input type="checkbox"/> doutorado | <input type="checkbox"/> dissertação |
| | <input type="checkbox"/> tese |
| | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais |
| | <input type="checkbox"/> _____ |

Título do trabalho acadêmico: Perfil Proteômico de Linhagem Celular do Adenocarcinoma Ductal Pancreático Humano (MIA PaCa-2)

Nome da orientadora: Jessica Moraes Malheiros

Nome do co-orientador: Jorge Luis Maria Ruiz

Data da Defesa: 28/11/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 28 de novembro de 2022.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho à minha mãe, Marilene,
e ao meu pai, Paulo.

Dedico também à minha tia, Maria, e ao meu
padrinho, Sandro, que não estão mais aqui,
mas estariam superfelizes e orgulhosos de
mim.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar agradeço à minha família por ter me apoiado e me incentivado durante toda a minha graduação. Especialmente minha mãe, Marilene, e meu pai, Paulo, por ouvirem todos os meus surtos de pesquisa, por terem me sustentado financeiramente e por terem permitido que eu focasse apenas nos meus estudos.

Agradeço a minha professora orientadora, prof.^a Jessica, não só pela constante orientação neste trabalho, mas por ter acreditado no meu projeto e por realizar diversas parcerias que tornassem possível a realização do meu trabalho. Ao meu professor coorientador, prof. Jorge Ruiz, por ter me auxiliado no meu projeto e me salvado em todas as vezes que estava dando errado.

Agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) por ter fornecido os recursos necessários para eu conseguir realizar a pesquisa e por ter financiado minha viagem à Botucatu.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu-SP por ter permitido que grande parte experimental do meu TCC fosse possível, ao prof. Pedro Padilha, ao Laboratório de Bionalítica e Metaloproteômica - LBM e em especial ao prof. José Cavalcante, por ter me acompanhado por duas semanas, sempre me orientando e me ensinando sobre como o processo estava sendo executado.

Agradeço também ao meu namorado, Davi, por estar sempre comigo me apoiando nesse trabalho, sempre acreditando que iria dar certo e por ter me ajudado em todas as vezes a simplificar todo o trabalho que eu teria.

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.

Marie Curie

RESUMO

O câncer de pâncreas é um tipo de doença extremamente agressiva e de difícil diagnóstico. Essa enfermidade apresenta como único tratamento definitivo a cirurgia de retirada do tumor. No entanto, devido ao diagnóstico tardio, menos de 5% dos pacientes conseguem realizar a cirurgia de forma efetiva. Desse modo, se tornam necessários estudos que abordem a temática câncer no intuito de obter o diagnóstico precoce da doença. Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo obter o perfil proteômico da linhagem celular de adenocarcinoma ductal pancreático (MIA PaCa-2) e linhagem de fibroblasto pulmonar (MRC-5). As linhagens celulares foram obtidas através do cultivo em 37 °C a 5% CO por 24 e 48h em meio DMEM completo. Posteriormente, foi realizada a extração das proteínas, separação em primeira dimensão por meio da focalização isoelétrica e a segunda dimensão em um gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Os géis foram escaneados e a análise dos *spots* proteicos foi performada no *software* ImageMaster Platinum 7.0 (GE Healthcare). O cultivo celular de ambas as linhagens (MIA PaCa-2 e MRC-5) apresentaram os mesmos 13 *spots* de proteínas no tempo 24h. No entanto, dois *spots* foram específicos de cada linhagem nesse tempo de cultivo. O cultivo celular de 48h demonstrou maior número de *spots* proteicos, onde foram observados 77 e 72 *spots* para MIA PaCa-2 e MRC-5, respectivamente. Dos 77 *spots* identificados na MIA PaCa-2, 7 merecem destaques, sendo 5, 1 e 1 sendo abundantes 3x, 3,5x e 4,5x, respectivamente. Dessa forma, 18 *spots* proteicos podem ser considerados como potenciais biomarcadores no diagnóstico do adenocarcinoma ductal pancreático.

Palavras-chave: 2D-PAGE; proteômica; MIA PaCa-2; biomarcadores; câncer de pâncreas.

RESUMEN

El cáncer de páncreas es una enfermedad extremadamente agresiva y difícil de diagnosticar. El único tratamiento definitivo para esta enfermedad es la cirugía para extirpar el tumor. Sin embargo, debido al diagnóstico tardío, menos del 5% de los pacientes pueden someterse a la cirugía de forma efectiva. Por lo tanto, es necesario estudiar el tema del cáncer para obtener un diagnóstico temprano de la enfermedad. En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo obtener el perfil proteómico de la línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático (MIA PaCa-2) y de la línea celular de fibroblastos pulmonares (MRC-5). Las líneas celulares se obtuvieron por cultivo a 37 °C al 5% de CO₂ durante 24 y 48h en medio DMEM completo. Posteriormente, se realizó la extracción de proteínas, la separación en la primera dimensión por enfoque isoeléctrico y la segunda dimensión en un gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Los geles se escanearon y el análisis de las manchas de proteínas se realizó en el software ImageMaster Platinum 7.0 (GE Healthcare). Los cultivos celulares de ambas líneas celulares (MIA PaCa-2 y MRC-5) mostraron las mismas 13 manchas de proteínas a las 24 horas. Sin embargo, dos manchas fueron específicas de cada linaje en este tiempo de cultivo. El cultivo celular de 48 horas demostró el mayor número de manchas de proteínas, donde se observaron 77 y 72 manchas para MIA PaCa-2 y MRC-5, respectivamente. De las 77 manchas identificadas en el AIM PaCa-2, 7 merecen ser destacadas, siendo 5, 1 y 1 de ellas 3x, 3,5x y 4,5x abundantes, respectivamente. Por lo tanto, 18 manchas de proteínas pueden considerarse como potenciales biomarcadores en el diagnóstico del adenocarcinoma ductal pancreático.

Palabras clave: 2D-PAGE; proteómica; MIA PaCa-2; biomarcadores; cáncer de páncreas.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is an extremely aggressive disease that is difficult to diagnose. The only definitive treatment for this disease is surgery to remove the tumor. However, due to late diagnosis, less than 5% of patients are able to undergo the surgery effectively. Thus, studies that address the issue of cancer are necessary in order to obtain an early diagnosis of the disease. In this context, this research aimed to obtain the proteomic profile of pancreatic ductal adenocarcinoma cell line (MIA PaCa-2) and lung fibroblast cell line (MRC-5). The cell lines were obtained by culturing at 37 °C at 5% CO for 24 and 48 h in complete DMEM medium. Subsequently, protein extraction, separation in the first dimension by isoelectric focusing, and the second dimension on a polyacrylamide gel (2D-PAGE) were performed. The gels were scanned and the analysis of the protein spots was performed in ImageMaster Platinum 7.0 software (GE Healthcare). Cell culture of both cell lines (MIA PaCa-2 and MRC-5) showed the same 13 protein spots at 24h. However, two spots were lineage-specific at this culture time. The 48h cell culture demonstrated the highest number of protein spots, where 77 and 72 spots were observed for MIA PaCa-2 and MRC-5, respectively. Of the 77 spots identified in MIA PaCa-2, 7 are noteworthy, with 5, 1 and 1 being 3x, 3.5x and 4.5x abundant, respectively. Thus, 18 protein spots can be considered as potential biomarkers in the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Key words: 2D-PAGE; proteomics; MIA PaCa-2; biomarkers; pancreatic cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mutação genética em série a partir de uma célula saudável até se transformar numa célula neoplásica e se replicar 13
- Figura 2** - Passos do processo de carcinogênese: início por mutação em proto-oncogenes, promoção da mutação através da replicação da célula e progressão do tumor através da multiplicação descontrolada da célula 14
- Figura 3** - Cultivo celular de MIA PaCa-2: na imagem de baixa densidade é possível observar pouca confluência no cultivo, com os focos de células espalhadas pelo ambiente; na imagem de alta densidade é possível observar alta confluência no cultivo, com as células aglomeradas em quase todo o espaço disponível 17
- Figura 4** – Cultivo celular de MRC-5: na imagem de baixa densidade é possível observar as células de fibroblastos alongadas, aderentes, com os núcleos ovoides e distanciadas entre si; na imagem de alta densidade é possível observar as células de fibroblastos bem alongadas, aderentes, núcleos também ovoides mas muito pouco espaço entre elas 19
- Figura 5** – Técnicas de eletroforese a. Representação da técnica de SDS-PAGE sendo o marcador presente no primeiro poço b. Representação da técnica de 2D-PAGE com a fita do foco isoelétrico sendo representada em dois momentos 20
- Figura 6** - Microscopia invertida das linhagens celulares cultivadas: a. Linhagem MIA PaCa-2 após cultivo por 24h b. Linhagem MIA PaCa-2 após cultivo por 48h c. Linhagem MRC-5 após cultivo por 24h d. Linhagem MRC-5 após cultivo de 48h 25
- Figura 7**- Pellet de células em soluções a. Tubo 1 com pellet de MRC-5 24h de cultivo e tubo 2 com pellet de MIA PaCa-2 24h de cultivo em RNAlater b. Tubo 3 com pellet de MRC-5 48h de cultivo e tubo 4 com pellet de MIA PaCa-2 48h de cultivo em RNA

| | |
|--|----|
| later c. Tubos contendo solução de lise, pellet de células e beads de vidro | 26 |
| Figura 8 - Eppendorfs após precipitação das proteínas a. MRC-5 24h b. MRC-5 48h c. MIA PaCa-2 24h d. MIA PaCa-2 48h | 27 |
| Figura 9 – Focalização isoeétrica a. Fitas reidratadas com solução tampão (ureia 8 mol/l, CHAPS 0,5%, tampão IPG 0,2%, DDT 15mM, azul de bromofenol 0,002% (p/v)) mais amostra b. Resultado da focalização em três pontos | 28 |
| Figura 10 - Eletroforese 2D a. Início da corrida b. Fase intermediária da corrida c. Término da corrida | 29 |
| Figura 11 - Géis de eletroforese bidimensional de linhagens cultivados por 24h com spots proteicos circulos em vermelho e enumerados de acordo com a presença comparada a linhagem MIA PaCa-2 a. Linhagem MIA PaCa-2 cultivada por 24h b. Linhagem MRC-5 cultivada por 24h | 30 |
| Figura 12 - Géis de eletroforese bidimensional de linhagens cultivadas por 48h com spots proteicos circulos em vermelho e enumerados de acordo com a presença comparada a linhagem MIA PaCa-2 a. Linhagem MIA PaCa-2 cultivada por 48h b. Linhagem MRC-5 cultivada por 48h | 31 |

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Spots proteicos encontrados apenas na linhagem MIA PaCa-2 em 48h. Nas fotos, o spot correspondente está circulado em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho. A numeração dos spots corresponde apenas à linhagem MIA PaCa-2, visto que a linhagem MRC-5 não apresenta esses spots 36
- Quadro 2** – Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho. Os spots de numeração 05, 19, 25, 41 e 49 mostraram aumento de 3x; o spot 04 aumento de 3,5 e o spot 02 aumento de até 4,5x 38
- Quadro 3** – Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 1,5x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho 46
- Quadro 4** – Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 2x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho 47
- Quadro 5** – Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 2,5x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ELISA | Ensaio de Imunoabsorção Enzimática |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| CA19-9 | Antígeno de Câncer 19-9 |
| CEA | Antígeno Carcinoembrionário |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) |
| 2D-PAGE | Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) |
| ESI-MS/MS | Espectrometria de Massa em Tandem de Ionização por Eletrospray |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” |
| USP | Universidade de São Paulo |
| DDT | Ditiotreitol |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato |
| BSA | Albumina de Soro Bovino |
| IPG | Gradiente de pH Imobilizado |
| IEF | Focalização Isoelétrica |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminometano |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| DMEM | Meio modificado Dulbecco's Eagle |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PDAC | Adenocarcinoma Ductal Pancreático |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 DESENVOLVIMENTO | 13 |
| 2.1 CÂNCER | 133 |
| 2.2 O CÂNCER DE PÂNCREAS | 144 |
| 2.3 CULTIVO CELULAR | 155 |
| 2.4 LINHAGEM TUMORAL PANCREÁTICA: MIA PaCa-2 | 166 |
| 2.5 LINHAGEM FIBROBLASTO PULMONAR (MRC-5) | 18 |
| 2.6 PROTEÔMICA | 19 |
| 2.6.1 Eletroforese bidimensional | 2020 |
| 2.6.2 Proteômica do câncer | 211 |
| 3 OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 22 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 4 METODOLOGIA | 22 |
| 4.1 CULTIVO DE LINHAGEM CELULAR DO CÂNCER DE PÂNCREAS | 22 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS LINHAGENS ESTUDADAS | 23 |
| 4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS LINHAGENS ESTUDADAS | 24 |
| 4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE) | 25 |
| 4.5 ANÁLISE DOS DADOS | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 5.1 LINHAGEM CELULAR EM TEMPO DE CULTIVOS DIFERENTES | 28 |
| 5.2 DIFERENTES LINHAGENS NO MESMO TEMPO DE CULTIVO | 30 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 36 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| ANEXO A – SPOTS PROTEICOS 3D | 42 |

1 INTRODUÇÃO

Um tumor, seja ele benigno ou maligno, se forma a partir de uma sequência de mutações genéticas aleatórias em proto-oncogenes. A partir do momento que o tumor adquire características malignas, o paciente é diagnosticado com câncer (Instituto Nacional de Câncer, 2011). Como essas mutações podem acontecer em qualquer célula do corpo, há diversos tipos de câncer, os quais são classificados de acordo com a localização do início do tumor (Instituto Nacional de Câncer, 2022). No entanto, alguns tipos de câncer são mais agressivos comparado a outros, seja pela capacidade da célula em adquirir alta de replicação ou por ser um tumor silencioso que só apresenta sintomas quando já se encontra em estado metastático (Oncoguia, 2020). O câncer de pâncreas é um exemplo de câncer agressivo, o qual é muito difícil de ser diagnosticado, não apresentando sintomas no início da formação do tumor e ainda não possui biomarcadores de rastreamento capazes de realizar o diagnóstico precoce (Kleeff, et al, 2016). Além disso, este câncer apresenta uma taxa de letalidade muito alta, sendo responsável por aproximadamente 4% das mortes causadas por câncer no Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Uma das formas de se estudar o câncer de pâncreas é a partir de linhagens celulares imortalizadas do tumor. No estudo de Gradiz, et al. (2016), os autores utilizaram duas linhagens específicas do adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC): a MIA PaCa-2 e a PANC-1, eles realizaram a caracterização genética e morfológica no intuito de aplicar em futuras terapias. Essas linhagens celulares, por possuírem mutações genéticas que alterem sua morfologia e fisiologia, apresentam abundância de proteínas diferentes de células saudáveis do pâncreas, tornando possível o estudo proteômico sobre o PDAC. No entanto, de acordo com a literatura, o perfil proteômico da linhagem celular pancreática MIA PaCa-2 até o presente momento ainda é desconhecida. Diferente do estudo genômico, que proporciona apenas informações geradas pelas mutações no material genético, não diferenciando tecido ou célula (Garcia, 2006), um estudo proteômico fornece informações específicas da célula tumoral, sendo possível quantificar a abundância das proteínas de determinada linhagem (Emídio, et al, 2015) e identificar possíveis biomarcadores.

Desse modo, ao se utilizar da técnica de eletroforese bidimensional, ao invés de técnicas específicas de identificação de proteínas, como Western-Blott e ELISA, se torna possível observar um perfil proteômico para a linhagem MIA PaCa-2, utilizando como controle a linhagem de fibroblasto pulmonar MRC-5. Além disso, a análise desses perfis pode contribuir na observação de proteínas abundantes de forma diferenciada e que

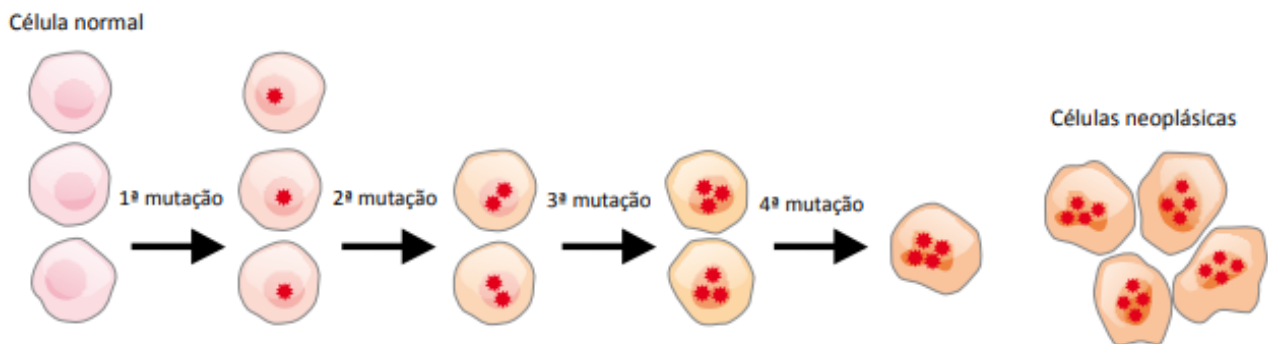
possam ser classificadas como potenciais biomarcadores para o PDAC.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 CÂNCER

Apesar de existirem diversos tipos e classificações para o câncer, esta doença apresenta na maioria dos casos o mesmo princípio de formação. O câncer é uma mutação genética em um gene proto-oncogênico de uma célula que se multiplica e produz células modificadas, essa mutação desencadeia uma série de novas mutações em outros genes, até acabar se tornando uma célula neoplásica (Figura 1) (Instituto Nacional de Câncer, 2021). Essas células sofrem alterações a cada ciclo da divisão celular, transformam o microambiente e originam um tumor (Instituto Nacional de Câncer, 2021).

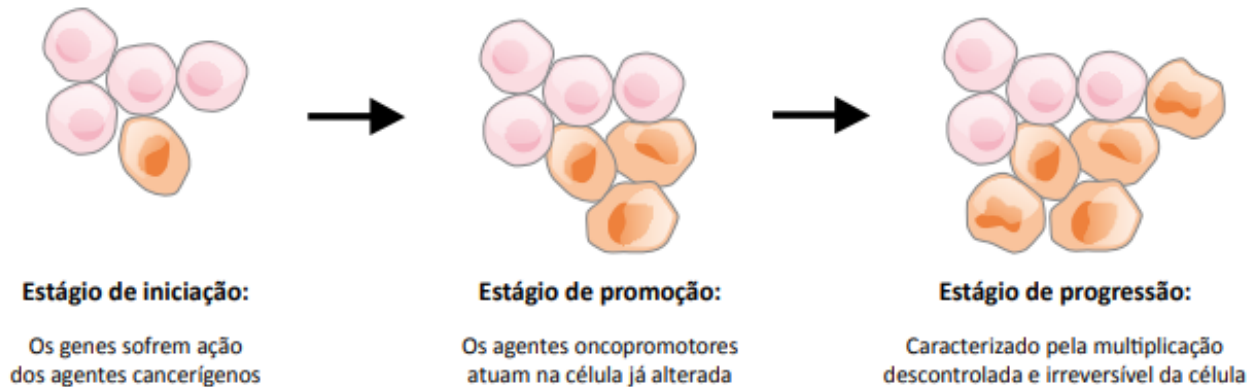
Figura 1 – Mutação genética em série a partir de uma célula saudável até se transformar numa célula neoplásica e se replicar.



Fonte: ABC do câncer (INCA, 2011).

A célula neoplásica perde a habilidade em controlar a sua própria divisão celular, o que gera uma proliferação anormal de células, originando um tumor (Figura 2). Esse tumor pode ser caracterizado como benigno, se o contorno for bem definido e seu crescimento for lento, o que permite a sua remoção. No entanto, também pode ser classificado como maligno, se o contorno for indefinido, e seu crescimento for rápido e possuir a habilidade de invadir outras estruturas orgânicas. Nesse caso, é considerado metastático e não pode ser removido cirurgicamente (Instituto Nacional de Câncer, 2021).

Figura 2 - Passos do processo de carcinogênese: início por mutação em proto-oncogenes, promoção da mutação através da replicação da célula e progressão do tumor através da multiplicação descontrolada da célula.



Fonte: ABC do câncer (INCA, 2011).

2.2 O CÂNCER DE PÂNCREAS

O câncer de pâncreas no Brasil é responsável por aproximadamente 2% dentre todos os tipos de câncer diagnosticados. Esse número aumenta para aproximadamente 4% quando se trata de letalidade, sendo bem raro antes dos 30 anos, porém mais comum após os 60 anos. O fator genético apresenta pouca influência nos números de casos, chegando a apenas 10% nos estudos (Instituto Nacional de Câncer, 2021; McGuigan et al., 2018; Kleff et al., 2016), enquanto a porcentagem de casos de câncer de pâncreas devido ao tabagismo varia de 25% a 34% (Kleff et al., 2016). No entanto, a probabilidade de desenvolver a doença diminui com os anos de remissão, tendo uma redução de 48% após 10 anos de abstinência (Fuchs et al., 1996). Outros fatores de risco que podem influenciar no desenvolvimento de um câncer de pâncreas são o álcool, obesidade, diabetes e pancreatite crônica (McGuigan et al., 2018).

O câncer de pâncreas pode ser extremamente difícil de ser diagnosticado na fase inicial. No entanto, algumas proteínas como o CA19-9 (antígeno de câncer 19-9) e CEA (antígeno carcinoembrionário) podem ser observados no sangue, respiração e suco pancreático e auxiliam no controle de progressão da doença. Apesar disso, essas proteínas podem apresentar uma baixa taxa no início da doença, e nem todos os pacientes conseguem produzi-los, mesmo possuindo diagnóstico positivo para a doença (Zhang, 2018; McGuigan et al., 2018). Dessa forma, apenas 9,7% dos casos, quando diagnosticados, estão relacionados com câncer de pâncreas (Zhang, 2018).

O CA19-9 é uma proteína produzida em baixas concentrações pelas células ductais normais do pâncreas humano, sendo sintetizada de forma exagerada quando há algum distúrbio. No entanto, nem todos conseguem produzi-la, por distúrbios genéticos, ela apenas é utilizada como forma de monitoramento da doença, se está regredindo ou avançando, e não como biomarcador de rastreamento (Scara et al., 2015).

O CEA é uma proteína de membrana que também é encontrada no soro, sendo sintetizada de forma exagerada em alguns tipos de câncer, mas também apresenta um aumento por doenças benignas e por conta do envelhecimento, não sendo eficaz como forma de rastreamento, mas utilizada no monitoramento. Atualmente, a ressecção cirúrgica é o único tratamento indicado, porém menos que 20% dos casos são candidatos a realizar a pancreatectomia (Zhang, 2018). Desse modo, se torna necessário encontrar biomarcadores que sejam capazes de identificar o PDAC enquanto ele ainda está em fase inicial e não tenha se desenvolvido para outros órgãos ou tenha encontrado algum tecido vital.

2.3 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular começou de forma rudimentar no começo dos anos 1900, através de experimentos realizados com tecidos em uma matriz específica. Em 1951 foi estabelecida a primeira linhagem tumoral humana, HeLa, utilizada até os dias atuais (Alves et al., 2010). Para entender melhor, é necessário lembrar que existem três tipos de cultivo celular, o cultivo celular primário, a linhagem contínua e a linhagem transformada (Freshney, 2015).

O cultivo celular primário é o estágio da cultura que ocorre logo após o isolamento das células, mas antes da primeira subcultura. Na subcultura a linhagem celular é estabelecida e pode sofrer modificações genéticas, impossibilitando a senescência, apesar de ainda carregar características do seu tecido original, sendo agora identificadas como linhagem contínua. No entanto, se a linhagem celular se modificar, a mesma perde suas características morfológicas e genéticas do tecido de origem e passa a ser chamada de linhagem transformada (Freshney et al., 2005).

A transformação da linhagem pode acontecer de forma espontânea ou induzida e está diretamente relacionada à instabilidade genética. Após várias divisões celulares, o telômero terá encurtado, sendo incapaz de proteger os dados presentes na

região mais próxima a ele, de forma a fazer com que o cromossomo não tenha mais alguns genes. Além de estar relacionado a outras características como, imortalização, capacidade de se dividir sem entrar na senescência, ao crescimento aberrante descontrolado, perda da inibição por contato e limitação do crescimento por densidade, e à malignidade, capacidade de gerar tumores invasivos se implantados *in vivo* (Freshney, 2010).

2.4 LINHAGEM TUMORAL PANCREÁTICA: MIA PACA-2

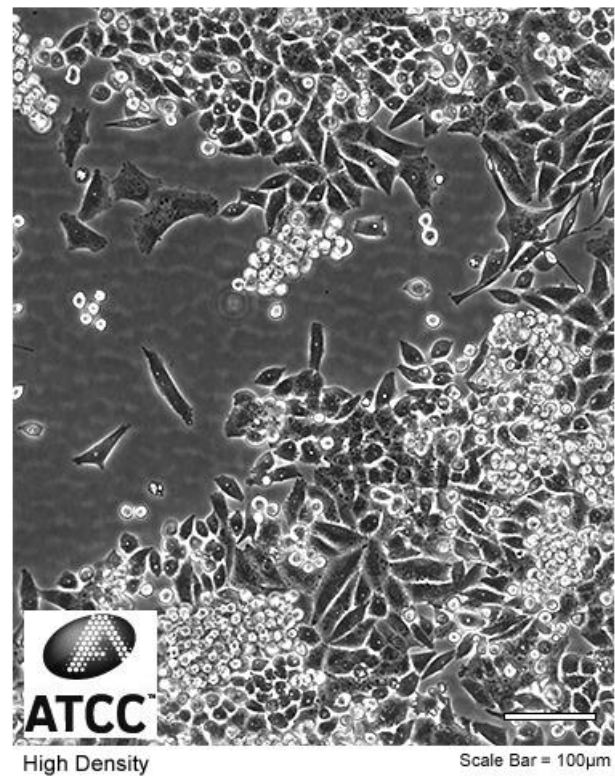
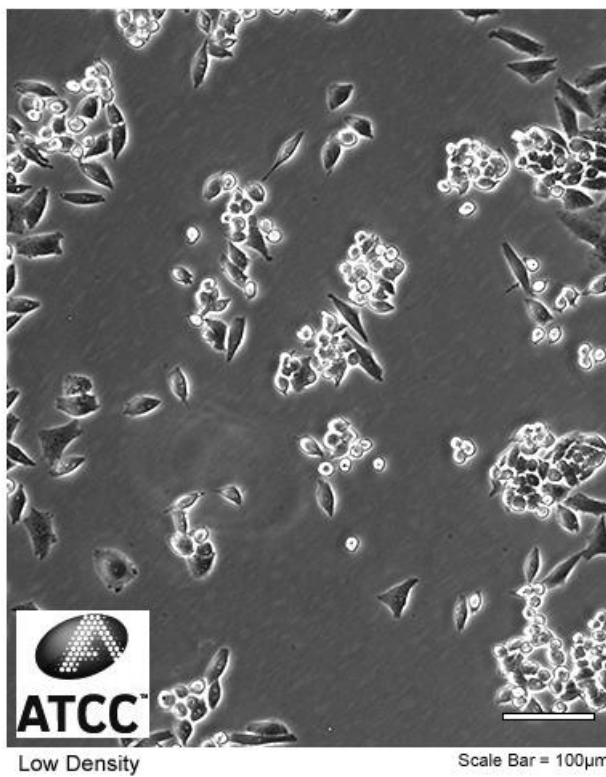
A linhagem MIA PaCa-2 foi estabelecida em 1975 através de biópsias realizadas em um homem branco com 65 anos. Após a cirurgia foi observado um tumor que cobria a cauda e o corpo do pâncreas do paciente. Deste modo, por meio do cultivo das células, algumas informações importantes sobre a linhagem estabelecida foram descobertas. Essa linhagem apresenta tempo de duplicação de 40h, as células são grandes e possuem um citoplasma abundante (Figura 3), possuem aneuploidia com variação entre 58 e 71 cromossomos, além revelar uma tendência de crescimento celular uma sobre a outra até atingirem a suspensão (Yunis et al., 1977).

A linhagem tumoral pancreática MIA PaCa-2 é uma linhagem imortalizada de PDAC (Yunis et al., 1977; Gradiz et al., 2016). Essa linhagem apresenta mutações morfológicas e genéticas que torna possível o estudo *in vitro* para caracterização do microambiente tumoral, analisando a forma como o tumor cresce e quais as moléculas que ele libera para o meio. Dessa forma, ao se comparar as proteínas sintetizadas por elas e por linhagens saudáveis de pâncreas, observou-se algumas diferenças e diversos potenciais biomarcadores que poderiam ser utilizados na forma de rastreio da doença, entre eles os receptores CK5.6, AE1/AE3, E-caderina, vimentina, cromogranina A, sinaptofisina, SSTR2 e NTR1 (Gradiz et al., 2016). Porém, apenas técnicas específicas de análise de proteínas foram feitas, como Western-Blott, ELISA e análise em espectrometria de massas; Oliveira et al (2020) realizou um estudo de meta-análise de proteoma e secretoma que possibilitou a identificação de 39 proteínas, com potencial de biomarcador do PDAC, sendo elas ACTB, ALDOA, ANXA5, APOE, ARHDIA, CALR, CFL1, CLIC1, CTSD, ENO1, ENO2, FLNA, FN1, GSN, GSTP1, LDHA, LGALS1, LGALS3, LGALS3BP, MSN, NME, PARK7, PGAM1, PGK1, PKM, PPIA, SFN, TAGLN2, THBS1, TIMP1, TPI1, ACTA1, ALM, PRSS1, AHSG, EEF1A1, TF, P4HB, TKT além de traçarem uma relação com a expressão gênica

responsável por essas proteínas e a taxa de sobrevivência dos pacientes. Sasaki et al (2020) realizou uma pesquisa acerca do potencial metastático da linhagem, ele determinou através de qRT-PCR que células em estado flutuante apresentam níveis de integrinas e transportadores de ligação a ATP em menores quantidades, também apresentam baixa capacidade em aderir novamente em cultivo e são mais suscetíveis a morte em ensaios com drogas anti-neoplásicas. Outro estudo realizado com a linhagem MIA PaCa-2 descobriu miRNAs capazes de atuar no combate ao PDAC, nessa pesquisa, três miRNAs (miR-7-5p, let-7d e miR-135b-5p) foram identificados na atuação de supressão em células tronco cancerígenas, sendo considerados como potenciais agentes terapêuticos (Shen et al., 2019).

Figura 3 - Cultivo celular de MIA PaCa-2: na imagem de baixa densidade é possível observar pouca confluência no cultivo, com os focos de células espalhados pelo ambiente; na imagem de alta densidade é possível observar alta confluência no cultivo, com as células aglomeradas em quase todo o espaço disponível

ATCC Number: **CRL-1420™**
Designation: **MIA PaCa-2**



Fonte: MIA PaCa-2 - ATCC, 2021.

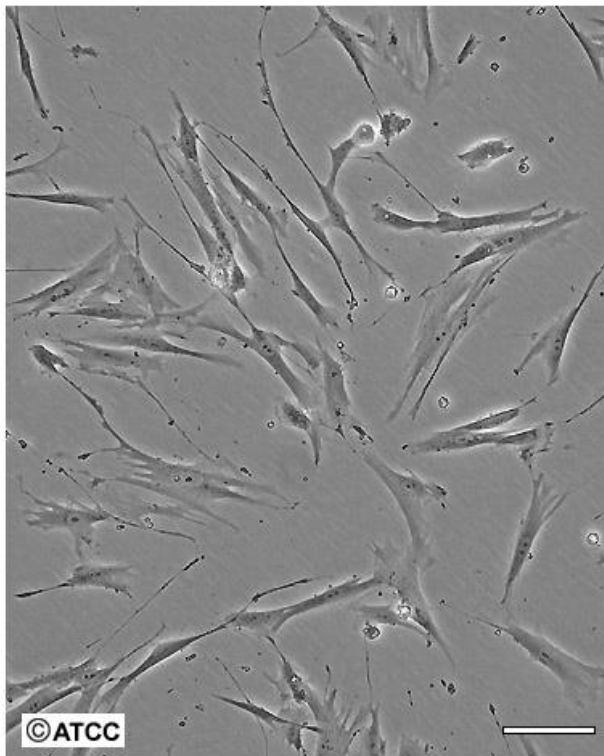
2.5 LINHAGEM DE FIBROBLASTO PULMONAR (MRC-5)

A linhagem MRC-5 foi estabelecida em 1970 derivada de tecido pulmonar de um embrião masculino com 14 semanas de desenvolvimento que precisou ser retirado por questões psicológicas, a mãe não apresentava sinais de neoplasias e apresentava histórico genético normal. Através do cultivo dessas células foi possível obter informações importantes da linhagem para futuros estudos. A MRC-5 apresenta tempo de duplicação de aproximadamente 48h e possui capacidade de duplicação de 42 a 46 populações antes de iniciar o processo de senescência, são células aderentes de fibroblasto, com citoplasma prolongado e núcleos ovoides (Figura 4), ela possui caráter diploide com 46 cromossomos, apresentando 3,6% de taxa de poliploidia (Jacobs et al., 1970).

A linhagem de fibroblasto foi inicialmente estudada para ser utilizada em metodologias de vacinas antivirais para uso em humanos. Jacobs et al. (1970) realizou uma pesquisa do cariótipo da linhagem celular e determinou que ela apresenta a diploidia necessária para estudos nessa área, apresentando efeitos citopáticos quando infectado pelo vírus da rubéola. Diversos outros estudos já analisaram a fundo a linhagem MRC-5, na biotecnologia é utilizada na produção de vacina de células diploides humanas contra a raiva, vacinas contra a hepatite A, vacina viva contra o vírus da varicela e vacina viva contra o zoster, foi testada também para produção de vacina contra o coronavírus SARS 2 (SARS-CoV-2) mas não foi suscetível à infecção (Wurtz et al., 2021). Em relação a pesquisas sobre as ciências ômicas, a linhagem possui análise profunda de RNAseq, análise de metilação do DNA, glicoesfingolipídios, proteoma comparativo e transcriptoma.

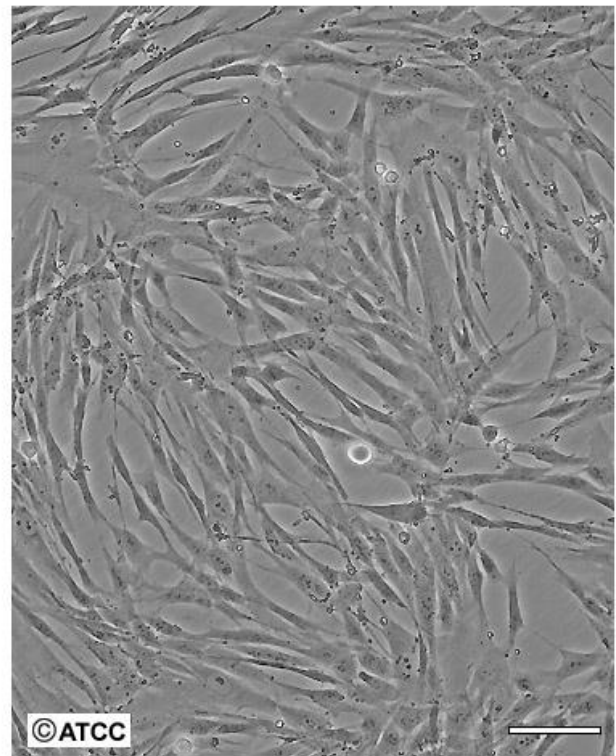
Figura 4 – Cultivo celular de MRC-5: na imagem de baixa densidade é possível observar as células de fibroblastos alongadas, aderentes, com os núcleos ovoides e distanciadas entre si; na imagem de alta densidade é possível observar as células de fibroblastos bem alongadas, aderentes, núcleos também ovoides mas muito pouco espaço entre elas.

ATCC Number: **CCL-171**
Designation: **MRC-5**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Fonte: MRC-5 - ATCC, 2022.

2.6 PROTEÔMICA

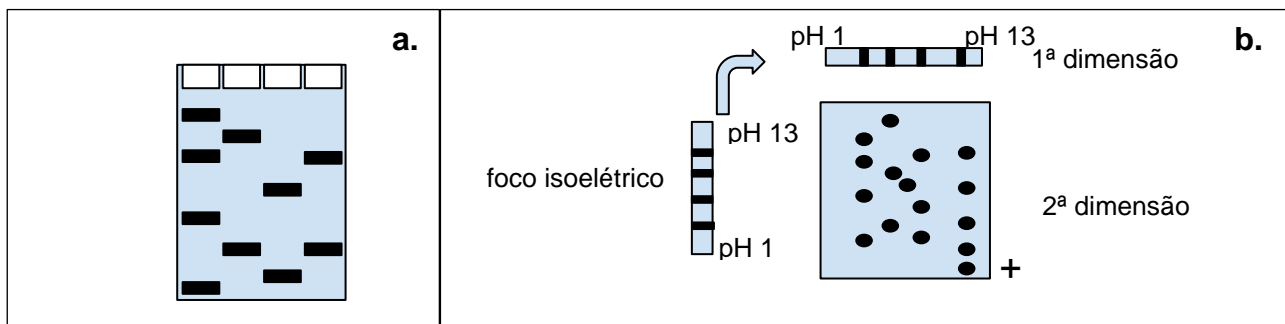
Em uma análise do proteoma do tecido é possível obter um perfil proteômico do tecido, quantificar as proteínas e observar quais mudanças pós transcricionais foram realizadas no momento que foi retirada a amostra (Emídio, et al, 2015). Ao se trabalhar com proteômica ao invés de outras ômicas, como a genômica e transcriptômica, é possível realizar uma análise comparativa entre tecidos mutagênicos e tecidos saudáveis de um mesmo tecido, comparar quantitativamente as proteínas, identificar proteínas diferencialmente abundantes e caracterizá-las como possíveis biomarcadores para diagnóstico do câncer. Em uma análise proteômica, técnicas de eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas, juntamente com análises de

bioinformática, podem ser utilizadas para conseguir observar toda uma gama de proteínas existentes no tecido, ou seja, o proteoma. Em uma análise do genoma do organismo é possível apenas saber quais genes estão presentes e possuem potencial para serem traduzidos em proteínas, não diferenciando em quais células e tecidos são sintetizados (Garcia, 2006).

2.6.1 Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS) se baseia na utilização de uma corrente elétrica passando pelo gel, colocando uma amostra como referencial no primeiro poço e a amostra a ser analisada nos demais poços. A corrente elétrica é ligada e torna-se possível identificar as proteínas presentes a partir de seu peso molecular. As partículas são atraídas do polo negativo para o polo positivo, onde as proteínas com maior peso molecular permanecem na parte superior do gel e as de menor peso molecular conseguem “correr” mais facilmente pela malha do gel (Figura 5a) (Azevedo, et al, 2003).

Figura 5 – Técnicas de eletroforese a. Representação da técnica de SDS-PAGE sendo o marcador presente no primeiro poço b. Representação da técnica de 2D-PAGE com a fita do foco isoeletrico sendo representada em dois momentos.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Na técnica de eletroforese bidimensional (2D) além de se utilizar o gel como método de separação das partículas, antes é utilizada uma fita perpendicular que divide as moléculas em grupos de acordo com seu ponto isoeletrico; assim, a resolução e a quantidade de proteínas identificadas é maior. A técnica 2D-PAGE (Figura 5b), utiliza da separação pelo pH e posterior separação por peso molecular para estudar de uma só vez

inúmeras proteínas e observar sua abundância na amostra retirada do tecido analisado (Isaaq et al., 2018).

2.6.2 Proteômica do câncer

Como o início da formação do tumor se dá por uma sequência de modificações genéticas aleatórias que vão induzindo outras modificações, dificilmente um tumor cancerígeno terá as mesmas características de outro tumor, mesmo se seu início for em tecidos similares (Graham e Sottoriva, 2016). Outro ponto importante a se lembrar é que o câncer é uma doença heterogênea, ou seja, suas células sintetizam proteínas de formas diferentes. Ferramentas genômicas acabaram se tornando adequadas para sequenciar diversos tipos de câncer, porém mesmo assim não foi possível relacionar a expressão genética com as proteínas sintetizadas pelo microambiente tumoral. Além disso, ainda não foram encontradas proteínas que são sintetizadas especificamente por células cancerígenas, os biomarcadores atuais são proteínas que também podem ser expressas em células não tumorais em níveis elevados (Oncoguia, 2022)

Ao realizar a montagem de um perfil proteômico, como por exemplo do PDAC, é importante já possuir dados de um outro perfil proteômico para comparação de seus dados. Esse segundo perfil pode ser de um tecido saudável retirado de um voluntário, pode ser de um tecido tumoral, porém em outro estágio da doença, pode ser de um tecido tumoral localizado em outro órgão ou local diferente do pâncreas, ou pode até mesmo ser de um tecido tumoral semelhante ao estudado.

Um estudo de revisão realizado por Oliveira et al. (2020) demonstrou as tentativas em se obter uma visão acerca da abundância das proteínas observadas em células cancerígenas, seja a partir de estudos com secreção, tecido retirado de um paciente com câncer já diagnosticado ou com culturas de células imortalizadas. Porém, ao se utilizar apenas técnicas de identificação, como o ELISA e o Western-Blott, que usam de anticorpos monoclonais para a detecção da proteína, foi possível apenas relacionar proteínas já conhecidas de acordo com a sua abundância em relação ao tecido saudável de pâncreas humano, classificando 39 proteínas como possíveis biomarcadores na detecção do PDAC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar as diferenças entre o perfil proteômico da linhagem imortalizada do adenocarcinoma ductal pancreático (MIA PaCa-2) e a linhagem de fibroblasto pulmonar (MRC-5) por meio da técnica de eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração das proteínas, separação isoeletrica e eletroforese bidimensional.
- Realizar a análise de quantificação dos *spots* proteicos.

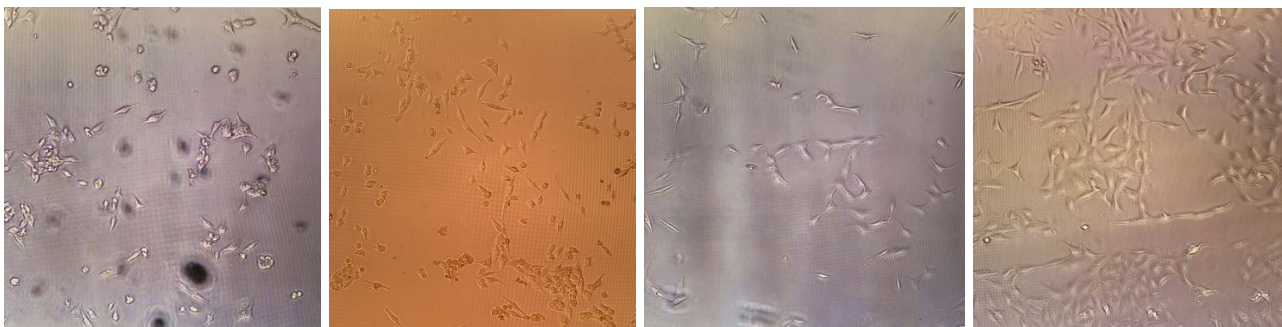
4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO DE LINHAGEM CELULAR DO CÂNCER DE PÂNCREAS

Para cultivar a linhagem celular MIA PaCa-2, seguiu-se a metodologia segundo ATCC (American Type Culture Collection), sendo que as células foram obtidas a partir de repique de cultivo em laboratório.

A cultura foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂ em frasco de 25 cm² até atingir a confluência, observada através de microscópio invertido, de 80%, o meio utilizado foi o meio modificado Dulbecco's Eagle DMEM completo com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, a cultura foi transferida para o frasco de 75 cm², e, para essa transferência, foi realizada a tripsinização da cultura com tripsina 0,25% e EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,53 mM. Para avaliação de diferença de abundância, foram analisados cultivo de 24 e 48h. O cultivo controle foi obtido de forma similar com linhagem celular não cancerígena, células fibroblasto originadas no pulmão, MRC-5 (Figura 6).

Figura 6 Microscopia invertida das linhagens celulares cultivadas: a. Linhagem MIA PaCa-2 após cultivo por 24h b. Linhagem MIA PaCa-2 após cultivo por 48h c. Linhagem MRC-5 após cultivo por 24h d. Linhagem MRC-5 após cultivo de 48h.



Fonte: Autoria própria, 2022.

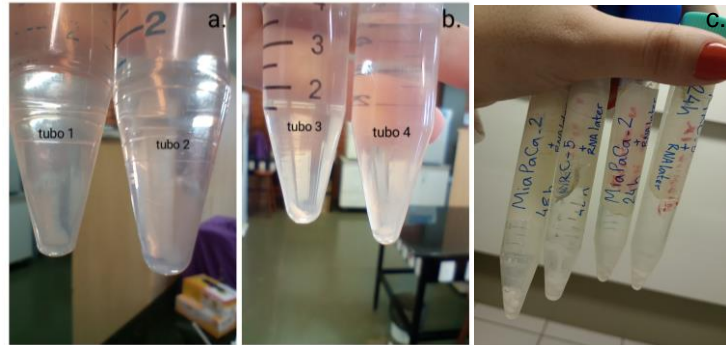
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS LINHAGENS CELULARES

As etapas de extração, purificação e identificação das proteínas diferencialmente abundantes foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP.

O cultivo celular da linhagem cancerígena pancreática (MIA PaCa-2) e linhagem de fibroblasto pulmonar (MRC-5) foram realizados durante 24 e 48h. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado, adicionou-se 5 ml de tampão fosfato-salino (PBS), as células foram soltas manualmente do frasco e realizada a centrifugação a 125 rpm por 10 minutos para formar o *pellet* celular. O sobrenadante foi descartado e se adicionou 2 ml do reagente RNAlater, para ser possível realizar o transporte das amostras para o laboratório no Departamento de Química e Bioquímica da UNESP, Botucatu-SP. O cultivo celular de 24h permaneceu no RNAlater por aproximadamente 70h, já o cultivo de 48h ficou imerso no reagente por aproximadamente 45h (Figura 7a, b). As amostras foram transportadas para o laboratório e adicionou 2 ml de tampão fosfato-salino (PBS) gelado, realizada a centrifugação a 1200 rpm por 20 min para recuperar o *pellet* de células e remoção do RNAlater.

Para extração das proteínas foi utilizado o protocolo segundo Cory et al. (2016), com adaptações. Resumidamente, 50 μ l do tampão de lise contendo ureia 7M, tiourea 2M, ditiotretol 40 nM (DDT) e 4 beads de vidro 1 mm foram adicionados no *pellet* celular (Figura 7c). As amostras foram passadas no vórtex em três ciclos de 1 minuto e pausa em gelo por 30 segundos.

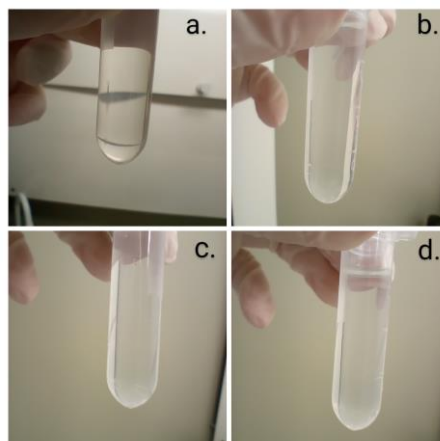
Figura 7- Pellet de células em soluções a. Tubo 1 com pellet de MRC-5 24h de cultivo e tubo 2 com pellet de MIA PaCa-2 24h de cultivo em RNAlater b. Tubo 3 com pellet de MRC-5 48h de cultivo e tubo 4 com pellet de MIA PaCa-2 48h de cultivo em RNA later c. Tubos contendo solução de lise, pellet de células e beads de vidro



Fonte: autoria própria, 2022.

Para realizar a purificação das proteínas, foi utilizado o protocolo do laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP, Botucatu-SP, sendo necessário adicionar acetona 80% 1:1 e deixar na geladeira por 2h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 1h a 11050 rpm a 4 °C e descartado o sobrenadante. Na Figura 8 é possível observar os microtubos com as proteínas já precipitadas.

Figura 8 - Eppendorfs após precipitação das proteínas a. MRC-5 24h b. MRC-5 48h c. MIA PaCa-2 24h d. MIA PaCa-2 48h.



Fonte: autoria própria, 2022.

4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

Os *pellets* proteicos foram ressuspensos em 250 μ L de tampão de reidratação (ureia 8 mol/l, CHAPS 0,5%, tampão IPG 0,2%, DDT 15mM, azul de bromofenol 0,002% (p/v)) e adicionados a tiras de focalização isoeletrica (IEF) não lineares de 7 cm contendo gel de poliacrilamida com anfólitos imobilizado em pH 3–10 por 16 h de reidratação passiva em temperatura ambiente. As tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo e cobertas com óleo mineral (Figura 9).

Figura 9 – Focalização isoeletrica a. Fitas reidratadas com solução tampão (ureia 8 mol/l, CHAPS 0,5%, tampão IPG 0,2%, DDT 15mM, azul de bromofenol 0,002% (p/v)) mais amostra b. Resultado da focalização em três pontos



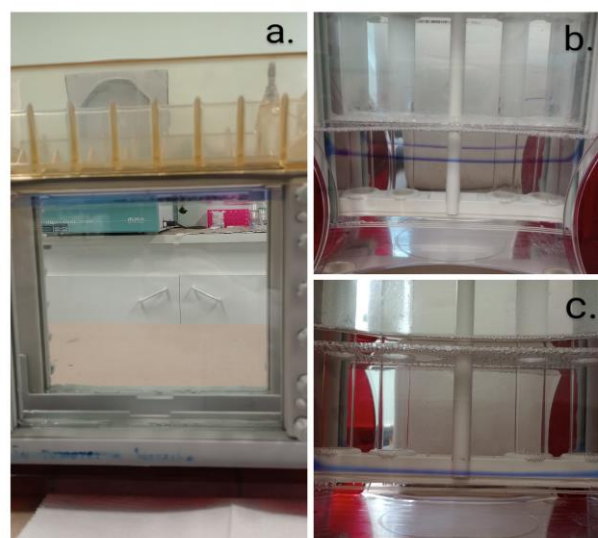
Fonte: autoria própria, 2022.

A IEF foi realizada com focalização em três etapas 500 Vhr, 1000 Vhr e 8000 Vhr, totalizando 18000 Vhr, pelo programa Ettan IPGphor 3 (Figura 9b). Após essa etapa, as tiras foram reequilibradas em 5 ml de solução de equilíbrio contendo ureia 6 M, glicerol 30% (p/v), SDS 2%, Tris-HCl 50mM pH 8,8 e azul de bromofenol 0,002% duas vezes em 15 min; na primeira etapa foi adicionado 50 mg de DDT e na segunda etapa foi adicionado 125 mg de iodoacetamida.

A segunda dimensão foi realizada em um gel de poliacrilamida 12,5% composto por 4,2 ml de solução de acrilamida, 2,6 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%, 3,2 ml água, 6 μ l TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 70 μ l persulfato de amônio 10% e adicionado n-butanol para eliminar bolhas e deixar secar. O n-butanol foi retirado e o sistema lavado com água destilada, então foi adicionado a fita reidrata juntamente com um pedaço de papel de filtro contendo 5 μ L de um padrão de peso molecular (14–97 kDa).

Após a presente etapa, realizou-se a sobreposição da tira com 0,4% de agarose contendo 0,01% de azul de bromofenol e os géis receberam corrente elétrica e as proteínas migraram do polo negativo para o polo positivo, os primeiros 30 minutos numa voltagem de 100 V e por 3h40 voltagem de 180 V (Figura 10). Em seguida, as proteínas nos géis foram fixadas com solução D-stain (10% ácido acético e 40% etanol) por 72h com solução Comassie Blue (40% metanol, 20% ácido acético, 0,5% Comassie Brilliant Blue R-250) e os géis foram lavados com água ultrapura para retirada do corante.

Figura 10 - Eletroforese 2D a. Início da corrida b. Fase intermediária da corrida c. Término da corrida



Fonte: autoria própria, 2022.

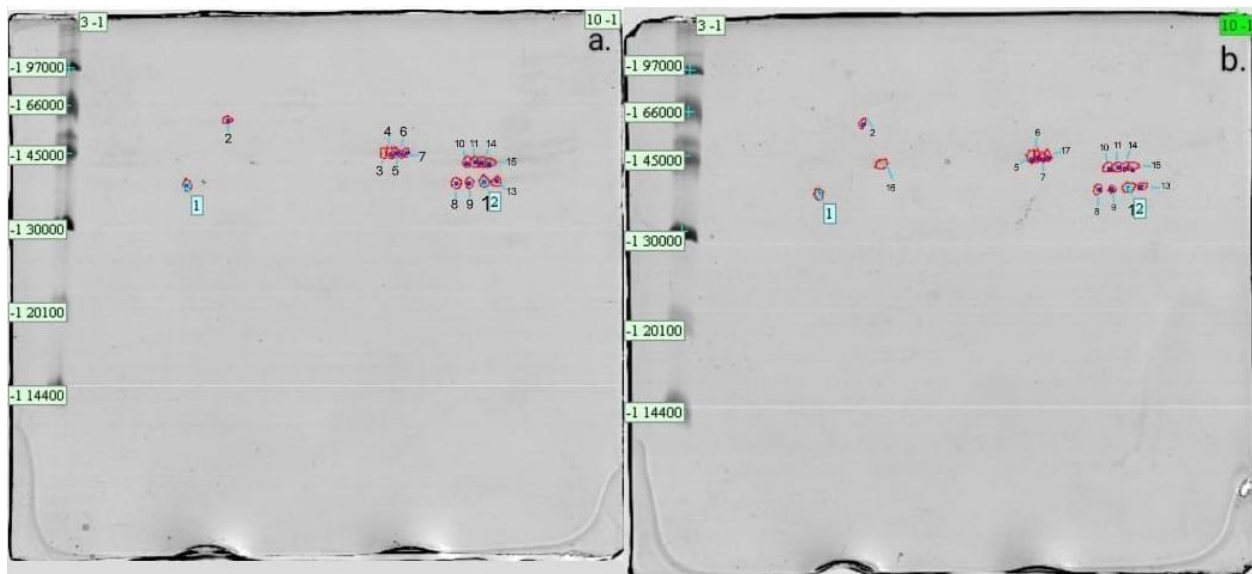
4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os géis foram escaneados com ImageScanner III (GE Healthcare) e posteriormente foi realizada a detecção dos *spots* de proteínas, quantificação e análise de abundância diferencial entre os grupos experimentais por meio do *software* ImageMaster Platinum 7.0 (GE Healthcare). O *software* permitiu estabelecer correspondências entre os géis. Esse pareamento foi realizado com base na equivalência entre os *spots* em cada tratamento, em que a distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico e massa molecular dos *spots* foram comparados por meio de regressão linear. A análise estatística comparativa de todas os *spots* com base no volume normalizado (%V) (Kang et al., 2009), o qual permitiu a detecção de manchas diferencialmente abundantes entre as células cultivadas. Os *spots* foram enumerados com intensidade diferencial.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

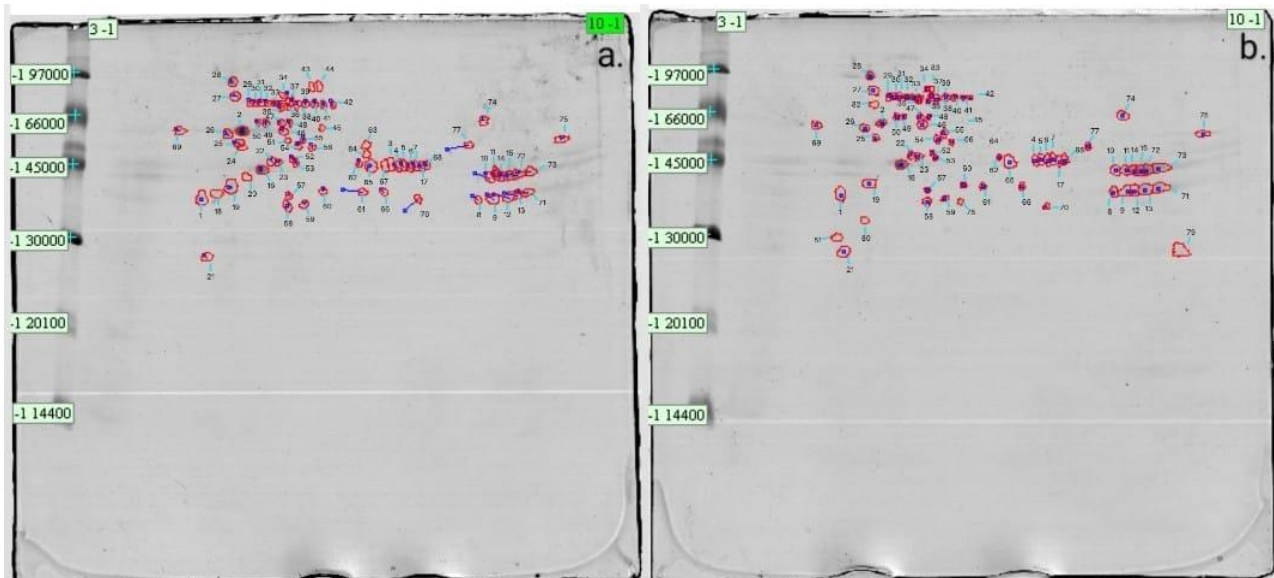
O proteoma das linhagens celulares MIA PaCa-2 e MRC-5 de 24 e 48h foram obtidos por meio da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). A distribuição da diversidade de *spots* de proteína em ambas as linhagens celulares no tempo de 24h foram homogêneas e os *spots* se concentraram entre 30 e 66 kDa e pI 4,3 a 8,6 (Figura 11). A posição dos *spots* nas linhagens avaliadas em 48h centralizaram entre 25 a 88 kDa e pI 4,0 a 9,5 (Figura 12). Além disso, os dados obtidos foram separados em duas etapas. 1) comparação entre a mesma linhagem em tempo de cultivo distintos (24 e 48h); 2) comparação de diferentes (MIA PaCa-2 e MRC-5) no mesmo tempo de cultivo.

Figura 11 - Géis de eletroforese bidimensional de linhagens cultivadas por 24h com spots proteicos circulos em vermelho e enumerados de acordo com a presença comparada a linhagem MIA PaCa-2 a. Linhagem MIA PaCa-2 cultivada por 24h b. Linhagem MRC-5 cultivada por 24h



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 12 - Géis de eletroforese bidimensional de linhagens cultivadas por 48h com spots proteicos circulos em vermelho e enumerados de acordo com a presença comparada a linhagem MIA PaCa-2 a. Linhagem MIA PaCa-2 cultivada por 48h b. Linhagem MRC-5 cultivada por 48h



Fonte: autoria própria, 2022.

5.1 LINHAGEM CELULAR EM TEMPO DE CULTIVO DISTINTOS

Os géis em distintos tempos de cultivo foram comparados (24 e 48h). Foi possível observar 15 *spots* de proteínas presentes na linhagem MIA PaCa-2 no tempo 24h, os quais também foram observados no tempo de 48h de cultivo. No entanto, no tempo 48h para essa linhagem o número de *spots* encontrados aumentou para 77. Da mesma maneira, na linhagem MRC-5 foram observados 15 *spots* no cultivo de 24h, os mesmos também estavam presentes no cultivo de 48h, porém nesse tempo o número aumentou para 72 *spots* (Tabela 1). Desse modo, o aumento do tempo de cultivo independente da linhagem proporcionou um aumento no número de *spots* proteicos. Como os estudos de Yunis et al. (1977) e Jacobs et al. (1970) demonstraram, o tempo de duplicação das linhagens celulares de MIA PaCa-2 e MRC-5 é de 40 e 48h, respectivamente, assim, ao utilizar um cultivo de apenas 24h e outro completados 48h, o esperado é que se encontre mais células nos cultivos de 48h, sendo a maioria dos *spots* proteicos compartilhados entre as duas linhagens com abundância distintas, sendo apenas 11 exclusivos da linhagem MIA PaCa-2. Como não foi possível realizar a quantificação das proteínas antes da análise de eletroforese por conta da quantidade pequena de amostra disponível, é possível que essa diferença de *spots* proteicos entre os cultivos de 24 e 48h se dê por conta da diferença da quantidade de amostra disponível, pois com um número maior de células e, conseqüentemente, mais proteína disponível, a corrida bidimensional em gel de eletroforese apresenta maior precisão de análise.

Tabela 1. Identificação dos *spots* de proteína das linhagens celulares de PDAC (MIA PaCa-2) e fibroblasto pulmonar (MRC-5) em dois tempos de cultivo (24 e 48h).

| | Cultivo por 24h | | | | | | Cultivo por 48h | | | | | |
|---------|-----------------|--------|-------|-------|--------|------|-----------------|--------|------|-------|--------|------|
| | MIA PaCa-2 | | | MRC-5 | | | MIA PaCa-2 | | | MRC-5 | | |
| | pl | MM | %Vol | pl | MM | %Vol | pl | MM | %Vol | pl | MM | %Vol |
| Spot 01 | 4,376 | 37,283 | 3,61 | 4,449 | 36,626 | 6,79 | 4,454 | 37,218 | 1,62 | 4,495 | 37,093 | 0,96 |
| Spot 02 | 4,936 | 58,809 | 1,73 | 5,031 | 60,277 | 4,12 | 5,021 | 57,563 | 16,0 | 5,060 | 60,045 | 3,77 |
| Spot 03 | 7,098 | 45,627 | 2,71 | . | . | . | 6,987 | 44,282 | 0,86 | . | . | . |
| Spot 04 | 7,184 | 44,564 | 4,07 | . | . | . | 7,067 | 44,568 | 1,04 | 7,168 | 45,000 | 0,34 |
| Spot 05 | 7,262 | 44,854 | 5,57 | 7,248 | 44,854 | 7,70 | 7,171 | 43,988 | 1,26 | 7,263 | 45,213 | 0,47 |
| Spot 06 | 7,332 | 44,564 | 4,18 | 7,341 | 45,685 | 7,69 | 7,275 | 44,282 | 1,09 | 7,382 | 44,716 | 0,77 |
| Spot 07 | 7,410 | 44,854 | 5,33 | 7,410 | 44,574 | 6,55 | 7,434 | 44,568 | 2,01 | 7,414 | 45,213 | 0,90 |
| Spot 08 | 8,086 | 37,769 | 2,69 | 8,147 | 37,925 | 3,84 | 8,250 | 37,218 | 0,64 | 8,242 | 37,566 | 1,12 |
| Spot 09 | 8,273 | 37,769 | 5,23 | 8,333 | 37,925 | 2,83 | 8,457 | 37,218 | 0,89 | 8,425 | 37,925 | 1,49 |
| Spot 10 | 8,218 | 42,448 | 5,44 | 8,294 | 42,238 | 4,71 | 8,425 | 41,924 | 0,96 | 8,257 | 42,506 | 0,90 |
| Spot 11 | 8,335 | 42,724 | 10,3 | 8,395 | 42,506 | 6,07 | 8,529 | 43,018 | 2,39 | 8,401 | 42,372 | 1,76 |
| Spot 12 | 8,483 | 38,015 | 8,14 | 8,558 | 38,166 | 8,27 | 8,697 | 37,218 | 1,37 | 8,528 | 38,046 | 1,41 |
| Spot 13 | 8,646 | 38,263 | 4,66 | 8,744 | 38,408 | 4,48 | 8,825 | 37,701 | 0,63 | 8,695 | 38,530 | 3,29 |
| Spot 14 | 8,452 | 42,448 | 18,2 | 8,511 | 42,506 | 8,44 | 8,617 | 41,655 | 2,44 | 8,520 | 42,105 | 3,37 |
| Spot 15 | 8,553 | 42,45 | 18,30 | 8,627 | 42,506 | 8,74 | 8,681 | 41,655 | 2,97 | 8,607 | 42,641 | 5,30 |
| Spot 16 | . | . | . | 5,271 | 43,322 | 13,6 | 5,301 | 43,435 | 7,62 | 5,322 | 43,874 | 13,0 |
| Spot 17 | . | . | . | 7,496 | 45,227 | 6,15 | 7,506 | 44,282 | 1,22 | 7,510 | 44,574 | 1,29 |
| Spot 18 | . | . | . | . | . | . | 4,678 | 38,559 | 0,74 | . | . | . |
| Spot 19 | . | . | . | . | . | . | 4,869 | 39,565 | 2,38 | 4,893 | 39,394 | 0,92 |
| Spot 20 | . | . | . | . | . | . | 5,093 | 41,655 | 0,57 | . | . | . |
| Spot 21 | . | . | . | . | . | . | 4,542 | 27,404 | 0,74 | 4,551 | 27,880 | 1,15 |
| Spot 22 | . | . | . | . | . | . | 5,405 | 45,412 | 0,91 | 5,473 | 46,735 | 0,96 |
| Spot 23 | . | . | . | . | . | . | 5,525 | 45,412 | 1,13 | 5,569 | 46,077 | 0,50 |
| Spot 24 | . | . | . | . | . | . | 5,005 | 50,433 | 0,39 | . | . | . |
| Spot 25 | . | . | . | . | . | . | 4,973 | 53,027 | 1,75 | 4,980 | 53,857 | 0,59 |
| Spot 26 | . | . | . | . | . | . | 4,813 | 57,563 | 1,92 | 4,845 | 57,816 | 1,79 |
| Spot 27 | . | . | . | . | . | . | 4,917 | 77,316 | 1,06 | 4,972 | 80,012 | 0,69 |
| Spot 28 | . | . | . | . | . | . | 4,901 | 88,681 | 3,74 | 4,909 | 91,604 | 5,82 |
| Spot 29 | . | . | . | . | . | . | 5,125 | 73,343 | 0,36 | 5,163 | 75,561 | 0,25 |
| Spot 30 | . | . | . | . | . | . | 5,213 | 73,343 | 0,27 | 5,235 | 75,561 | 0,35 |
| Spot 31 | . | . | . | . | . | . | 5,285 | 74,121 | 0,29 | 5,314 | 75,956 | 0,37 |
| Spot 32 | . | . | . | . | . | . | 5,389 | 72,574 | 0,63 | 5,410 | 75,561 | 1,11 |
| Spot 33 | . | . | . | . | . | . | 5,477 | 72,957 | 2,03 | 5,497 | 74,799 | 4,88 |
| Spot 34 | . | . | . | . | . | . | 5,597 | 77,725 | 0,25 | 5,688 | 80,430 | 0,16 |
| Spot 35 | . | . | . | . | . | . | 5,581 | 72,574 | 0,33 | 5,609 | 75,561 | 0,70 |
| Spot 36 | . | . | . | . | . | . | 5,573 | 69,575 | 0,22 | 5,696 | 72,859 | 1,76 |
| Spot 37 | . | . | . | . | . | . | 5,716 | 73,731 | 0,57 | 5,744 | 76,352 | 0,27 |
| Spot 38 | . | . | . | . | . | . | 5,804 | 71,812 | 0,62 | 5,823 | 73,239 | 0,62 |
| Spot 39 | . | . | . | . | . | . | 5,916 | 72,957 | 0,96 | 5,943 | 75,169 | 0,57 |
| Spot 40 | . | . | . | . | . | . | 6,012 | 71,812 | 1,50 | 6,062 | 75,169 | 0,70 |
| Spot 41 | . | . | . | . | . | . | 6,148 | 71,812 | 2,32 | 6,181 | 75,169 | 0,85 |

| | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|-------|--------|------|-------|--------|------|
| Spot 42 | . | . | . | . | . | 6,276 | 72,574 | 1,27 | 6,277 | 75,169 | 0,58 |
| Spot 43 | . | . | . | . | . | 5,980 | 84,569 | 0,26 | . | . | . |
| Spot 44 | . | . | . | . | . | 6,092 | 85,016 | 0,45 | . | . | . |
| Spot 45 | . | . | . | . | . | 6,124 | 59,159 | 0,42 | . | . | . |
| Spot 46 | . | . | . | . | . | 5,613 | 58,090 | 0,83 | 5,656 | 59,480 | 0,62 |
| Spot 47 | . | . | . | . | . | 5,573 | 61,637 | 0,27 | 5,601 | 63,851 | 0,29 |
| Spot 48 | . | . | . | . | . | 5,676 | 61,637 | 0,41 | 5,720 | 64,154 | 0,55 |
| Spot 49 | . | . | . | . | . | 5,349 | 61,637 | 1,72 | 5,386 | 64,154 | 0,68 |
| Spot 50 | . | . | . | . | . | 5,245 | 61,637 | 0,71 | 5,282 | 63,851 | 0,33 |
| Spot 51 | . | . | . | . | . | 5,652 | 54,250 | 0,35 | . | . | . |
| Spot 52 | . | . | . | . | . | 5,716 | 46,459 | 0,30 | 5,752 | 47,853 | 0,18 |
| Spot 53 | . | . | . | . | . | 5,764 | 45,412 | 0,39 | 5,831 | 45,643 | 0,39 |
| Spot 54 | . | . | . | . | . | 5,788 | 51,361 | 0,50 | 5,831 | 53,099 | 0,48 |
| Spot 55 | . | . | . | . | . | 5,860 | 53,757 | 1,25 | 5,911 | 56,199 | 1,49 |
| Spot 56 | . | . | . | . | . | 5,996 | 50,895 | 0,15 | 6,030 | 52,351 | 0,20 |
| Spot 57 | . | . | . | . | . | 5,660 | 37,579 | 0,32 | 5,688 | 38,166 | 0,22 |
| Spot 58 | . | . | . | . | . | 5,652 | 35,579 | 0,92 | 5,696 | 36,165 | 0,63 |
| Spot 59 | . | . | . | . | . | 5,884 | 35,809 | 0,44 | 5,935 | 36,510 | 0,39 |
| Spot 60 | . | . | . | . | . | 6,132 | 38,684 | 0,29 | 6,181 | 39,145 | 0,24 |
| Spot 61 | . | . | . | . | . | 6,691 | 38,436 | 0,31 | 6,444 | 38,898 | 0,37 |
| Spot 62 | . | . | . | . | . | 6,635 | 44,711 | 1,04 | 6,675 | 45,643 | 0,42 |
| Spot 63 | . | . | . | . | . | 6,723 | 52,069 | 0,40 | . | . | . |
| Spot 64 | . | . | . | . | . | 6,739 | 48,185 | 0,29 | . | . | . |
| Spot 65 | . | . | . | . | . | 6,827 | 44,282 | 1,80 | 6,842 | 43,874 | 1,02 |
| Spot 66 | . | . | . | . | . | 6,979 | 38,312 | 0,36 | 6,990 | 39,022 | 0,32 |
| Spot 67 | . | . | . | . | . | 7,003 | 44,282 | 0,86 | . | . | . |
| Spot 68 | . | . | . | . | . | 7,570 | 44,282 | 1,39 | 7,581 | 44,716 | 1,01 |
| Spot 69 | . | . | . | . | . | 4,134 | 58,622 | 1,08 | 4,177 | 58,642 | 0,66 |
| Spot 70 | . | . | . | . | . | 7,442 | 36,980 | 0,29 | 7,344 | 35,037 | 0,18 |
| Spot 71 | . | . | . | . | . | 8,937 | 38,189 | 1,52 | 8,902 | 38,898 | 4,03 |
| Spot 72 | . | . | . | . | . | 8,825 | 42,195 | 3,80 | 8,727 | 42,641 | 6,93 |
| Spot 73 | . | . | . | . | . | 9,001 | 42,742 | 1,74 | 8,902 | 43,185 | 5,45 |
| Spot 74 | . | . | . | . | . | 8,353 | 62,202 | 0,98 | 8,377 | 63,851 | 0,78 |
| Spot 75 | . | . | . | . | . | 9,432 | 53,757 | 0,56 | 9,459 | 54,886 | 1,77 |
| Spot 76 | . | . | . | . | . | 5,668 | 69,943 | 0,29 | 5,704 | 72,480 | 1,76 |
| Spot 77 | . | . | . | . | . | 8,146 | 51,832 | 0,55 | 7,892 | 50,408 | 0,34 |
| Spot 78 | . | . | . | . | . | . | . | . | 6,142 | 35,823 | 0,88 |
| Spot 79 | . | . | . | . | . | . | . | . | 9,180 | 28,173 | 2,06 |
| Spot 80 | . | . | . | . | . | . | . | . | 4,821 | 32,267 | 0,54 |
| Spot 81 | . | . | . | . | . | . | . | . | 4,439 | 29,455 | 0,72 |
| Spot 82 | . | . | . | . | . | . | . | . | 4,956 | 70,253 | 0,49 |
| Spot 83 | . | . | . | . | . | . | . | . | 5,768 | 80,430 | 0,42 |

Fonte: Autoria própria, 2022.

5.2 DIFERENTES LINHAGENS NO MESMO TEMPO DE CULTIVO

Na comparação dos géis de eletroforese bidimensional referentes às linhagens MIA PaCa-2 e MRC-5 cultivados por 24h foi possível observar a presença dos *spots* 3 e 4 apenas na linhagem MIA PaCa-2 e os *spots* 16 e 17 somente na linhagem MRC-5. Os demais, 13 *spots*, estavam presentes em ambas as linhagens.

Na proteômica comparativa, usualmente utiliza-se da massa total das proteínas para a avaliação do perfil das amostras, como no estudo de Nusinow et al. (2020) que estabeleceu relações quantitativas entre proteínas e genes expressos em centenas de linhagens celulares cancerígenas ou na pesquisa de Gonçalves et al. (2022) que também utilizou de dados quantitativos para traçar mapas proteômicos de quase 1000 linhagens celulares humanas, evidenciando proteínas alvo para tratamento com drogas ou proteínas com potencial para biomarcadores. Porém, como não foi possível quantificar as proteínas por conta da quantidade pequena de amostra disponível, as comparações quantitativas do trabalho foram feitas através da porcentagem de volume de cada *spot* proteico. Os *spots* foram comparados para verificar a diferença de abundância das proteínas de acordo com a %Vol no cultivo de 24 e 48h (Tabela 2). O %Vol dos *spots* 09, 10, 11, 14 e 15 nos cultivos de 24h apresentaram maior valor no cultivo de MIA PaCa-2 comparado ao MRC-5. O estudo também observou a relação do %Vol das linhagens em 48h, sendo uma novidade até o presente momento por não ter dados na literatura, os quais foram separados em seis grupos de acordo com o aumento de 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x e 4,5x.

Tabela 2 – Relação da porcentagem de volume (%Vol) dos cultivos de MIA PaCa-2 por MRC-5 nos tempos de 24 e 48h de cultivo.

| | %Vol MIA PaCa-2 / MRC-5 - 24h | %Vol MIA PaCa-2 / MRC-5 - 48h |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|
| Spot 01 | 53% | 168,75% |
| Spot 02 | 42% | 424,40% |
| Spot 03 | . | * |
| Spot 04 | . | 305,88% |
| Spot 05 | 72% | 268,09% |
| Spot 06 | 54% | 141,56% |
| Spot 07 | 81% | 223,33% |
| Spot 08 | 70% | 57,14% |
| Spot 09 | 185% | 59,73% |
| Spot 10 | 115% | 106,67% |
| Spot 11 | 170% | 135,80% |
| Spot 12 | 98% | 97,16% |
| Spot 13 | 104% | 19,15% |
| Spot 14 | 216% | 72,40% |
| Spot 15 | 209% | 56,04% |

| | | |
|---------|---|---------|
| Spot 16 | . | 58,62% |
| Spot 17 | . | 94,57% |
| Spot 18 | . | * |
| Spot 19 | . | 258,70% |
| Spot 20 | . | * |
| Spot 21 | . | 64,35% |
| Spot 22 | . | 94,79% |
| Spot 23 | . | 226,00% |
| Spot 24 | . | * |
| Spot 25 | . | 296,61% |
| Spot 26 | . | 107,26% |
| Spot 27 | . | 153,62% |
| Spot 28 | . | 64,26% |
| Spot 29 | . | 144,00% |
| Spot 30 | . | 77,14% |
| Spot 31 | . | 78,38% |
| Spot 32 | . | 56,76% |
| Spot 33 | . | 41,60% |
| Spot 34 | . | 156,25% |
| Spot 35 | . | 47,14% |
| Spot 36 | . | 12,50% |
| Spot 37 | . | 211,11% |
| Spot 38 | . | 100,00% |
| Spot 39 | . | 168,42% |
| Spot 40 | . | 214,29% |
| Spot 41 | . | 272,94% |
| Spot 42 | . | 218,97% |
| Spot 43 | . | * |
| Spot 44 | . | * |
| Spot 45 | . | * |
| Spot 46 | . | 133,87% |
| Spot 47 | . | 93,10% |
| Spot 48 | . | 74,55% |
| Spot 49 | . | 252,94% |
| Spot 50 | . | 215,15% |
| Spot 51 | . | * |
| Spot 52 | . | 166,67% |
| Spot 53 | . | 100,00% |
| Spot 54 | . | 104,17% |
| Spot 55 | . | 83,89% |
| Spot 56 | . | 75,00% |
| Spot 57 | . | 145,45% |
| Spot 58 | . | 146,03% |
| Spot 59 | . | 112,82% |
| Spot 60 | . | 120,83% |
| Spot 61 | . | 83,78% |

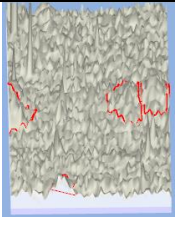
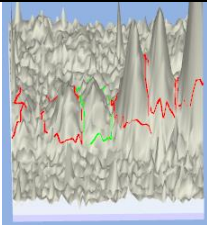
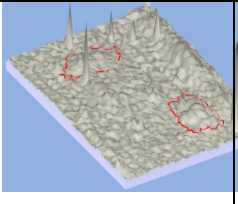
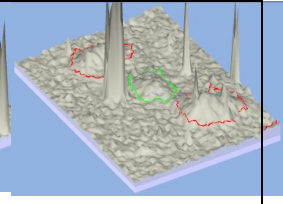
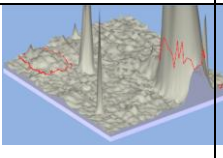
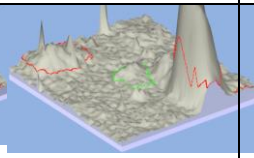
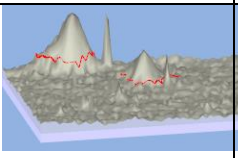
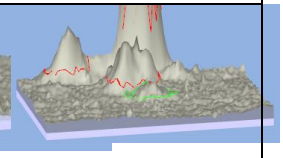


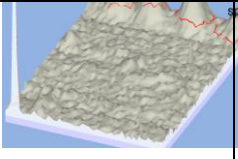
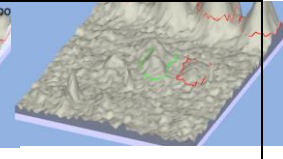
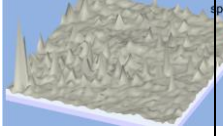
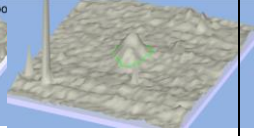
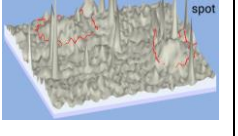
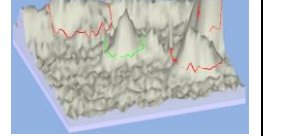
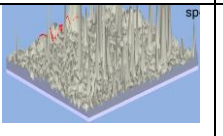
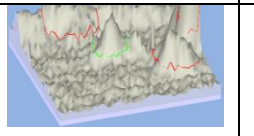
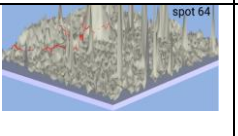
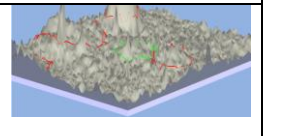
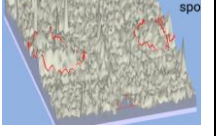
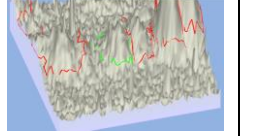
| | | |
|---------|---|---------|
| Spot 62 | . | 247,62% |
| Spot 63 | . | * |
| Spot 64 | . | * |
| Spot 65 | . | 176,47% |
| Spot 66 | . | 112,50% |
| Spot 67 | . | * |
| Spot 68 | . | 137,62% |
| Spot 69 | . | 163,64% |
| Spot 70 | . | 161,11% |
| Spot 71 | . | 37,72% |
| Spot 72 | . | 54,83% |
| Spot 73 | . | 31,93% |
| Spot 74 | . | 125,64% |
| Spot 75 | . | 31,64% |
| Spot 76 | . | 16,48% |
| Spot 77 | . | 161,76% |

. = spot não observado; * = spot presente apenas na linhagem MIA PaCa-2.

A comparação das linhagens cultivados por 48h também foi realizada. A linhagem MIA PaCa-2 apresentou 77 *spots* enquanto que a da linhagem MRC-5 mostrou 72 *spots*. Desse modo, 11 *spots* proteicos foram observados apenas no cultivo da MIA PaCa-2 (*spots* 03, 18, 20, 24, 43, 44, 45, 51, 63, 64 e 67). Por se tratar de uma linhagem não cancerígena, a MRC-5 é amplamente utilizada como linhagem controle em trabalhos brasileiros de análise de efeitos citotóxicos para células tumorais não relacionadas ao tecido pulmonar, como os estudos de Moura, 2017 e Delgado et al., 2020. Dessa forma, ao encontrar *spots* abundantes apenas na linhagem MIA PaCa-2, entende-se que eles correspondem a proteínas relacionadas ao adenocarcinoma ductal pancreático. No entanto, se torna necessário outras abordagens para compreensão desses *spots* proteicos no intuito de possivelmente identificá-los como biomarcadores no diagnóstico do câncer de pâncreas. No Quadro 1, observa-se as diferenças dos *spots* proteicos, comparando o formato 3D da MIA PaCa-2 cultivado por 48h com o local correspondente do gel da MRC-5 também cultivada por 48h. Em vista disso, nota-se a ausência dos *spots* na linhagem MRC-5, provavelmente por conta da diferença das linhagens.

Quadro 1 - Spots proteicos encontrados apenas na linhagem MIA PaCa-2 em 48h. Nas fotos, o spot correspondente está circulado em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho. A numeração dos spots corresponde apenas à linhagem MIA PaCa-2, visto que a linhagem MRC-5 não apresenta esses spots.

| | | | | | |
|--|-------|------------|--|-------|------------|
| | MRC-5 | MIA PaCa-2 | | MRC-5 | MIA PaCa-2 |
|--|-------|------------|--|-------|------------|

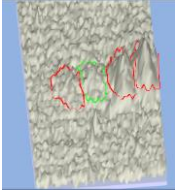
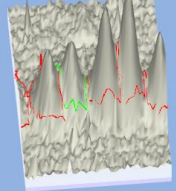
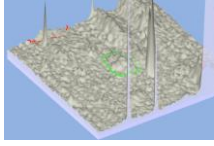
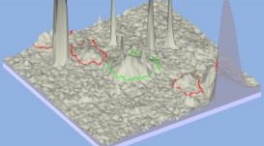
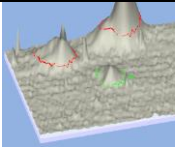
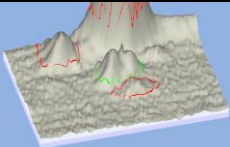
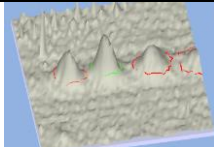
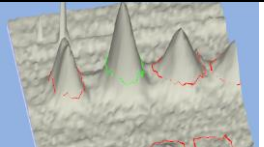
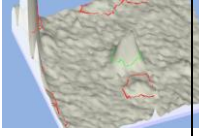
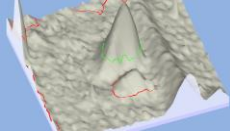
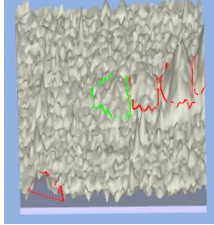
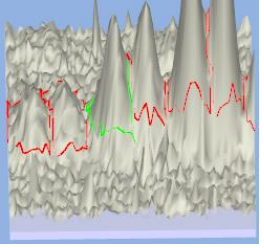
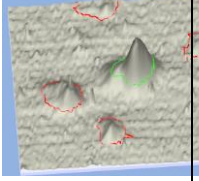
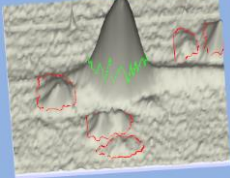
| | | | | | |
|---------|---|---|---------|---|--|
| Spot 03 |  |  | Spot 18 |  |  |
| Spot 20 |  |  | Spot 24 |  |  |
| Spot 43 |  |  | Spot 44 |  |  |
| Spot 45 |  |  | Spot 51 |  |  |
| Spot 63 |  |  | Spot 64 |  |  |
| Spot 67 |  |  | | | |

Fonte: Autoria própria, 2022.

Os *spots* 06, 11, 46, 57, 58, 59, 60, 66, 68 e 74 apresentaram maior abundância de 1,5x. Os *spots* 01, 27, 34, 39, 52, 65, 69, 70 e 77 mostraram aumento de 2x. Os que tiveram aumento de 2,5x foram os 7, 23, 37, 40, 42, 50 e 62. Apenas 5, *spots* mostraram aumento de 3x (5, 19, 25, 41 e 49), 1 *spot* 3,5x (*spot* 4) e 1 *spot* 4,5x (*spot* 2), respectivamente (Quadro 2). Esses *spots*, por estarem presentes tanto na linhagem MIA PaCa-2 quanto na linhagem MRC-5, representam proteínas presentes normalmente numa célula saudável, porém ao estarem presentes em maior abundância na célula cancerígena demonstra uma regulação diferenciada em relação à célula saudável. Estudos como o de Terazona et al., 2021, além de identificar proteínas diferencialmente abundantes de amostras de sangue em relação a células saudáveis, relaciona quantitativamente em relação a taxa de sobrevivência de pacientes já diagnosticados com adenocarcinoma ductal pancreático (PDCA). Desse modo, *spots* identificados nesse estudo como 5, 19, 25, 41, 49, 4 e 2, que foram diferencialmente abundantes são possíveis biomarcadores proteicos capazes de realizar o diagnóstico do câncer de pâncreas, sem a necessidade de realizar

exames de imagens ou invasivos.

Quadro 2 – Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2. Os spots correspondentes estão circulos em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulos em vermelho. Os spots de numeração 05, 19, 25, 41 e 49 mostraram aumento de 3x; o spot 04 aumento de 3,5 e o spot 02 aumento de até 4,5x.

| | MRC-5 | MIA PaCa-2 | | MRC-5 | MIA PaCa-2 |
|---------|---|---|---------|--|---|
| Spot 05 |  |  | Spot 19 |  |  |
| Spot 25 |  |  | Spot 41 |  |  |
| Spot 49 |  |  | Spot 04 |  |  |
| Spot 02 |  |  | | | |

Fonte: Autoria própria, 2022.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo proteômico realizado no presente estudo indica fatores-chave na compreensão da MIA PaCa-2. Os perfis indicaram que o tempo de cultivo altera o número de *spots* proteicos independente da linhagem celular. Além disso, 11 *spots* foram observados apenas na linhagem MIA PaCa-2, sugerindo que eles sejam próprios de câncer de pâncreas. Nossos resultados fornecem informações importantes sobre possíveis biomarcadores para MIA PaCa-2, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico do câncer de pâncreas.

Encontrar novas formas de diagnosticar o adenocarcinoma ductal pancreático é um grande desafio para a biotecnologia. Com a ausência de biomarcadores capazes de realizar o diagnóstico, apenas exames de imagens e métodos invasivos são utilizados atualmente, desse modo, o presente estudo teve como finalidade encontrar possíveis biomarcadores que possibilitasse o diagnóstico precoce de pacientes com PDAC.

Ao utilizar a metodologia de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, a pesquisa conseguiu identificar perfis proteômicos para a linhagem do adenocarcinoma ductal pancreático, MIA PaCa-2, e para a linhagem controle de fibroblasto pulmonar, MRC-5. Esses perfis indicaram 11 *spots* proteicos presentes apenas na linhagem MIA PaCa-2, sugerindo que eles sejam próprios de câncer de pâncreas e possíveis biomarcadores, e indicaram diversos outros *spots* com abundância na linhagem MIA PaCa-2 em relação a linhagem controle, o que também sugere que podem ser utilizados como biomarcadores para diagnóstico da doença.

REFERÊNCIAS

Alves, E. A.; Guimarães, A. C. R.. Cultivo celular - Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - volume 2, 2010. p. 215-253. [volume 2_ze_4.pmd \(fiocruz.br\)](#) 01 de fevereiro de 2022

Azevedo, M. de O. et al. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. p. 175-186

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. v.72. p.248-254, 1976. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>>.

Delgado, G. Y. S. et al. COMPOSTOS QUIMIOTERÁPICOS DE OURO: UMA VISÃO GERAL DOS COMPLEXOS ANTICÂNCER DE Au(I/III) EM RELAÇÃO À ESTRUTURA DO LIGANTE. Quim. Nova, Vol. 43, No. 8, 1104-1124, 2020
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170566>

Emidio, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações HU Revista, Juiz de Fora, v. 41, n. 3 e 4, p. 101-111, jul./dez. 2015
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/09/1808/2482-14380-1-pb.pdf>

Freshney, R. I. CULTURE OF ANIMAL CELLS A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS Seventh Edition. Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Inc., Publication: 2015. capítulo 1

Freshney, R. I.; Vunjak-Novakovic, G. CULTURE OF CELLS for Tissue Engineering Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Inc., Publication: 2005. capítulo 1

Freshney, R. I. CULTURE OF ANIMAL CELLS A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS Sixth Edition. Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Inc., Publication: 2010. capítulo 11, 17

Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., Hunter, D. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E. (28 de Outubro de 1996). Um estudo prospectivo sobre o tabagismo e o

risco de câncer de pâncreas. Arch Intern Med. Fonte: JAMA Network: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/articleabstract/62256> 20 de agosto de 2021

GARCIA, E.S. Genômica e proteômica. In: Genes: fatos e fantasias [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006, pp. 13-49. ISBN: 978- 65-5708-102-0. <https://doi.org/10.7476/9786557081020.0003>.

Gonçalves, E. et al. Mapa proteômico pan-cancerígeno de 949 linhagens celulares humanas [Célula cancerosa](#). 8 de agosto de 2022; 40(8): 835–849.e8. DOI:10.1016/j.ccell.2022.06.010

Gradiz, R. et al. MIA PaCa-2 and PANC-1 – pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. Scientific Reports | 6:21648 | DOI: 10.1038/srep21648 17 February 2016

Graham, T. A.; A. Sottoriva. Medindo a evolução do câncer a partir do genoma. Revista de Patologia J Pathol 2017; 241:183–191 Publicado online em 18 de novembro de 2016 na Wiley Online Library(wileyonlinelibrary.com)DOI:10.1002/caminho.4

Hao, C. et al. Capítulo Onze - Níveis de CEA sérico em 49 tipos diferentes de câncer e doenças não cancerígenas. Progresso em Biologia Molecular e Ciência Translacional. Volume 162, 2019, Páginas 213-227 <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.12.011>

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p. : il [abc do cancer.pdf \(saude.gov.br\)](#) 31 de janeiro de 2022

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (04 de Agosto de 2021). Câncer: Como surge o câncer. Fonte: INCA: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (22 de Julho de 2022). Tipos de Câncer. Fonte: INCA: <[Tipos de Câncer — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](#)>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (20 de Agosto de 2021). Tipos de Câncer: Cancer de pancreas. Fonte: INCA: <<https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-pancreas>>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (18 de Julho de 2022). Tipos de Câncer: Cancer de pancreas. Fonte: INCA: <[Câncer de pâncreas — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](https://www.inca.gov.br/cancer-de-pancreas)>.

Issaq, H. J.; Veenstra, T. D. Eletroforese de gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): avanços e perspectivas BioTechniques BIOTECNOLOGIA VOL. 44, Nº 5 MINI-REVISÃO 16 Maio 2018 <https://doi.org/10.2144/000112823>

Jacobs J.P., Jones C.M., Baille J.P. Características de uma célula diploide humana designada MRC-5. Natureza 227:168-170(1970)

Kleeff, J. et al. Pancreatic cancer. NATURE REVIEWS | DISEASE PRIMERS VOLUME 2 | 2016 | 1

Lieber, M. et al (1975). *Estabelecimento de uma linha de células tumorais contínuas (PANC-1) a partir de um carcinoma humano do pâncreas exócrino.*
doi:10.1002/ijc.2910150505

McGuigan, A. et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes [Câncer de pâncreas: Revisão do diagnóstico clínico, epidemiologia, tratamento e desfechos \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444444/) 6 de dezembro de 2021.

Moura, H. M. M. de. Avaliação in vitro da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO ESCOLA DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. Escola de Farmácia Ouro Preto - 2017

Nusinow, D. P. et al. Proteômica Quantitativa da Enciclopédia De Linhas Celulares De Câncer [Célula](https://doi.org/10.1016/J.Cell.2019.12.023). Manuscrito Do Autor; Disponível Em Pmc 2021 Jan 23. *Publicado Em Forma Editada Final Como: [Célula. 2020 23 De Janeiro; 180\(2\): 387–402.E16.](https://doi.org/10.1016/J.Cell.2019.12.023)*
Doi:[10.1016/J.Cell.2019.12.023](https://doi.org/10.1016/J.Cell.2019.12.023)

Oliveira, G. de et al. An Integrated Meta-Analysis of Secretome and Proteome Identify Potential Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancers 2020, 12, 716; doi:10.3390/cancers12030716

Oncoguia. Câncer avançado, metástase e metástase óssea. (21/01/2020) Fonte: <[Câncer avançado, metástase e metástase óssea - Instituto Oncoguia](#)>.

Oncoguia. Exames de sangue para diagnóstico do câncer de pâncreas. (08/06/2022).
Fonte: < [Exames de sangue para diagnóstico do câncer de pâncreas - Instituto Oncoguia](#)>.

SASAKI, N. et al. Caracterização Do Potencial Metastático Do Componente Celular Flutuante Da Mia Paca-2, Uma Linhagem Celular De Câncer De Pâncreas Humano. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Fev 19;522(4):881-888. DOI:[10.1016/j.bbrc.2019.11.120](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.120)

Scarà, S. et al (2015). CA 19-9: Aspectos Bioquímicos e Clínicos. In: Scatena, R. (eds) Avanços em Biomarcadores de Câncer. Avanços em Medicina Experimental e Biologia, vol 867. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_15

SHEN, Y. ET AL. MicroRNAs diferencialmente expressos em MIA PaCa-2 e panc-1 linhas celulares de adenocarcinoma ductal do pâncreas estão envolvidas na regulação de células-tronco cancerígenas. *int. j. mol. sci.* 2019, 20(18), 4473; <https://doi.org/10.3390/ijms20184473>

Terazona, J. G. R. et al. Proteínas Mir-203a-3p e Mmp-2 São Altamente Expressas em Células Tumorais Circulantes de Pacientes com Carcinoma Pancreático. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2021;34(2):e1581

Timóteo, A. R. de S. Proteômica Comparativa de Linhagens Celulares Humanas Expostas a Estresse Oxidativo induzido por riboflavina fotossensibilizada. [Proteômica Comparativa Linhagens Timóteo 2011.pdf \(ufrn.br\)](#)

Wurtz N., Penant G., Jardot P., Duclos N., La Scola B. Cultura de SARS-CoV-2 em um painel de linhagens celulares de laboratório, permissividade e diferenças no perfil de crescimento. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infetar. Dis.* 40:477-484(2021) DOI=[10.1007/s10096-020-04106-0](https://doi.org/10.1007/s10096-020-04106-0)

Yunis, A. A. et al (1977). *Carcinoma pancreático humano (mia paca-2) na cultura contínua: Sensibilidade à asparaginase.* , 19(1), 128-135. doi:10.1002/ijc.2910190118 [Carcinoma pancreático humano \(MIA PaCa-2\) em cultura contínua: sensibilidade à asparaginase - PubMed \(nih.gov\)](#)

Zhang, L.; S. S. (21 de Maio de 2018). Desafios no diagnóstico do câncer de pâncreas. *Mundo J Gastroenterol*, p. 25. 20 de agosto de 2021

[MIA PaCa-2 - CRL-1420 | ATCC 1](#)

<https://www.atcc.org/products/ccl-171>

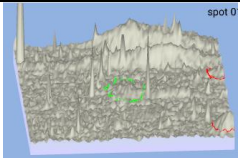
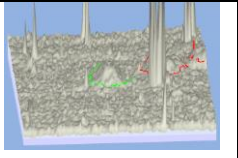
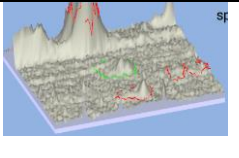
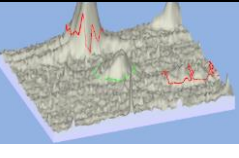
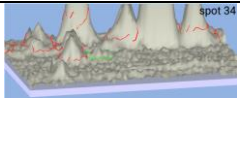
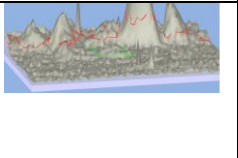
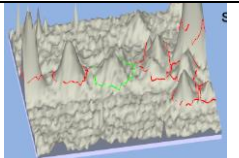
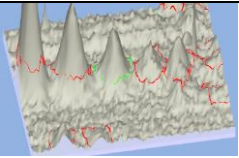
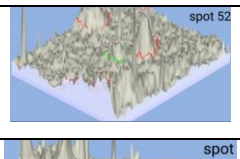
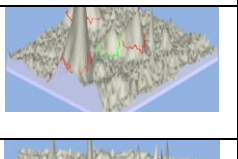
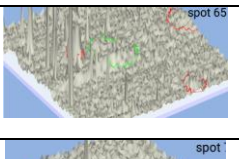
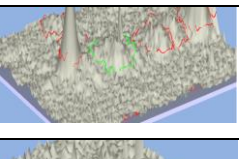
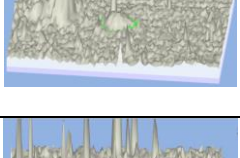
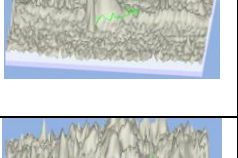


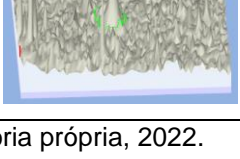

ANEXO A - SPOTS PROTEICOS 3D

Quadro 3 - Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 1,5x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho.

| | MRC-5 | MIA PaCa-2 | | MRC-5 | MIA PaCa-2 |
|---------|-------|------------|---------|-------|------------|
| Spot 06 | | | Spot 11 | | |
| Spot 29 | | | Spot 46 | | |
| Spot 57 | | | Spot 58 | | |
| Spot 59 | | | Spot 60 | | |
| Spot 66 | | | Spot 68 | | |
| Spot 74 | | | | | |

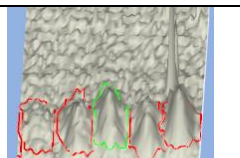
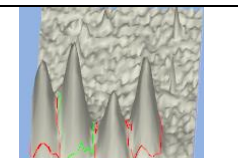
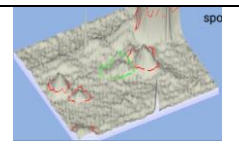
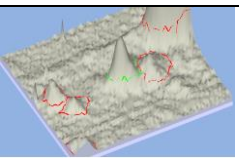
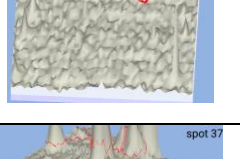
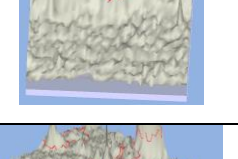

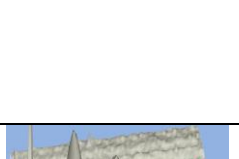
Fonte: Autoria própria, 2022.

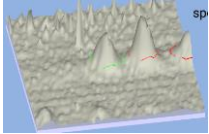
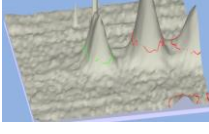
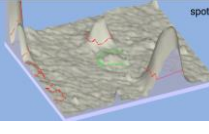
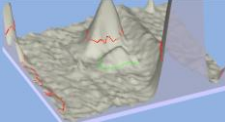
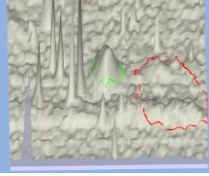
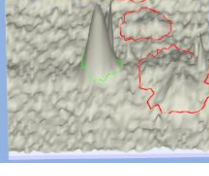
Quadro 4 - Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 2x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho.

| | MRC-5 | MIA PaCa-2 | | MRC-5 | MIA PaCa-2 |
|---------|---|---|---------|---|--|
| Spot 01 |  |  | Spot 27 |  |  |
| Spot 34 |  |  | Spot 39 |  |  |
| Spot 52 |  |  | Spot 65 |  |  |
| Spot 69 |  |  | Spot 70 |  |  |
| Spot 77 |  |  | . | . | . |

Fonte: Autoria própria, 2022.

Quadro 5 - Spots proteicos abundantemente diferenciais entre a linhagem MRC-5 e MIA PaCa-2 em até 2,5x. Os spots correspondentes estão circulados em verde claro enquanto os spots ao redor estão circulados em vermelho.

| | MRC-5 | MIA PaCa-2 | | MRC-5 | MIA PaCa-2 |
|---------|---|---|---------|--|---|
| Spot 07 |  |  | Spot 23 |  |  |
| Spot 37 |  |  | Spot 40 |  |  |

| | | | | | |
|--------------------|---|---|--------------------|--|---|
| <p>Spot 42</p> |  |  | <p>Spot 50</p> |  |  |
| <p>Spot 62</p> |  |  | <p>.</p> | <p>.</p> | <p>.</p> |

Fonte: Autoria própria, 2022.