

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação da Evolução Clonal de Marcadores de EMT na Resistência
ao Sotorasibe em Linhagem Tumoral de Pâncreas

Mariana Oliveira Matos Watanabe

Renato José da Silva Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2025**

W324a Watanabe, Mariana Oliveira Matos
 Avaliação da evolução clonal de marcadores de EMT na
 resistência ao sotorasibe em linhagem tumoral de
 pâncreas / Mariana Oliveira Matos Watanabe. --
 Botucatu, 2025
 27 p. : il., tabs.

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
 Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
 Instituto de Biociências, Botucatu
 Orientador: Renato José da Silva Oliveira

 1. Câncer. 2. Pâncreas. 3. Resistência a drogas. I. Título.

Mariana Oliveira Matos Watanabe

Avaliação da Evolução Clonal de Marcadores de EMT na Resistência ao Sotorasibe em Linhagem Tumoral de Pâncreas

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 18 de dezembro de 2025.
(9 de dezembro de 2025)

BANCA EXAMINADORA



Prof. Renato José da Silva Oliveira
Fundação Pio XII - Hospital de Amor de Barretos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo o incentivo e apoio ao longo da minha trajetória na graduação, especialmente por acreditarem em mim e nos meus objetivos. Agradeço também aos meus amigos, em especial a Vinicius Oliveira e à Me. Caroline Shibuya, por todo o apoio, consideração e por sempre estarem dispostos a me ouvir.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Renato José da Silva Oliveira, pela oportunidade, confiança e por acreditar que eu seria capaz de realizar este projeto. Agradeço igualmente ao Grupo de Pesquisa em Oncologia Pré-Clínica e a todos os colegas Maria Eduarda Souza, Me. Giulia Stringhetta, Me. Amanda Tejada, Carlos Souza, Me. Hanna Batistão, Pedro Resende, Aryel Bezerra e Raquel Megid, pela companhia e apoio ao longo deste ano. Em especial, agradeço ao Me. Abu-Bakr A. Ariwoola, que me orientou, acompanhou e ensinou tanto durante esse período e que, além de professor, foi também um companheiro e amigo.

Aos biólogos do CPOM, com especial destaque para a Dra. Izabela Faria, a Dra. Ana Carolina Laus e a Me. Cíntia Ramos, agradeço por toda ajuda e pelos conhecimentos importantes que compartilharam comigo. À Seção de Graduação, especialmente a Raquel Ornelas e Patrícia Pinheiro, agradeço por todo o apoio ao longo da graduação, em especial neste último ano, em que enfrentei diversos obstáculos, mas sempre encontrei nelas disponibilidade e acolhimento.

Por fim, agradeço à minha psicóloga, Lúcia Machado, pelo suporte, pela escuta atenta e pela ajuda fundamental durante todo esse período desafiador.

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

2.2. Objetivos Específicos

3. METODOLOGIA

3.1. Linhagens Celulares, Modelo de Resistência e Cultivo

3.2. Ensaio de Viabilidade Celular

3.3. RT-qPCR

3.4. Extração e Análise de Proteínas por Western Blot

3.5. Ensaio Fenotípicos

3.5.1. Ensaio de Migração

3.5.2. Ensaio de Adesão

3.6. Análise de Número de Cópias do Gene KRAS por ddPCR

3.7. Análise Estatística

4. RESULTADOS

4.1. Validação do modelo de resistência

4.2. Análise de expressão de marcadores da EMT por RT-qPCR

4.3. Análise de expressão de marcadores da EMT por Western Blot

4.4. Alterações fenotípicas de migração e adesão

4.5. Análise de número de cópias do gene KRAS por ddPCR

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RESUMO

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) apresenta altas taxas de mortalidade, com a mutação no gene KRAS sendo um evento driver em mais de 90% dos casos. Recentemente, o desenvolvimento do inibidor Sotorasibe, direcionado à variante KRAS G12C, representou um avanço terapêutico. No entanto, a resistência adquirida é um desafio significativo, frequentemente associada à transição epitélio-mesenquimal (EMT). Este trabalho investigou a evolução clonal de marcadores de EMT em um modelo in vitro de resistência ao Sotorasibe na linhagem MIA PaCa-2 (KRAS G12C+/+). Através de ensaios de RT-qPCR, Western Blot, migração, adesão e ddPCR, foi demonstrado que a resistência está associada a um estado híbrido de EMT, caracterizado por disparidades entre expressão gênica e proteica de E-caderina, coexpressão de marcadores epiteliais (Claudina-1, Beta-catenina) e mesenquimais (Snail), e heterogeneidade fenotípica entre clones. Os resultados sugerem que a resistência é sustentada por múltiplos mecanismos, destacando a plasticidade celular como um fator crucial na falha terapêutica.

Palavras-chave: Câncer de pâncreas, KRAS G12C, Sotorasibe, resistência, transição epitélio-mesenquimal.

1. INTRODUÇÃO

O gene KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) codifica uma pequena GTPase da família RAS, essencial para a regulação de vias de sinalização envolvidas no crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Sua ativação ocorre por meio da troca de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP), alternando entre um estado inativo (ligado ao GDP) e um estado ativo (ligado ao GTP) (24). Em sua forma ativa, a proteína KRAS recruta e ativa efetores-chave, com destaque para a via de sinalização RAS-MAPK (KRAS-MEK-ERK), uma cascata central que, quando ativada, promove a transcrição de genes relacionados à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (24) (Figura 1)

No câncer, o KRAS frequentemente sofre mutações que o tornam constitutivamente ativo, o que resulta na ativação contínua e desregulada das vias de crescimento e proliferação. Trata-se do oncogene mais comumente mutado em cânceres humanos (aproximadamente 20% dos casos), com alta prevalência em adenocarcinomas ductais pancreáticos (PDAC), adenocarcinomas colorretais (CCR) e carcinomas de pulmão de não pequenas células (CPNPC) (11). O PDAC é uma neoplasia de prognóstico desfavorável, com altas taxas de mortalidade e opções terapêuticas limitadas. Nesse contexto, a mutação no gene KRAS é um evento driver presente em mais de 90% dos casos (23). Dentre os diversos tipos de mutação, as mais frequentes são G12D, G12V e G12C. No PDAC, a G12D chega a atingir 42% dos casos, enquanto a G12C corresponde a apenas 1-2% (14).

Durante décadas, o advento de terapias dirigidas à proteína KRAS foi considerado impossível devido à sua alta afinidade pelo GTP e à ausência de sítios de ligação acessíveis para inibição direta (6). No entanto, a identificação de um bolsão alostérico na variante G12C possibilitou o desenvolvimento do Sotorasibe e do Adagrasibe, os primeiros inibidores covalentes de KRAS G12C aprovados pela FDA (17,27). O mecanismo de ação de ambos inibidores baseia-se em sua ligação seletiva à forma inativa (GDP-ligada) da proteína KRAS G12C, formando uma ligação covalente irreversível com o resíduo de cisteína presente apenas nessa variante. Essa interação estabiliza a proteína em seu estado inativo, bloqueando a troca de GDP por GTP e, conseqüentemente, impedindo a ativação da via de sinalização MAPK (17). Assim, mesmo representando uma pequena parcela dos casos de PDAC, pacientes com a mutação G12C podem se beneficiar do Sotorasibe, que constitui, até então, uma das únicas opções de tratamento direcionado disponível para KRAS mutado.

Apesar desse avanço terapêutico, estudos realizados a partir dos dados coletados de pacientes com tumores sólidos submetidos a tratamento com Sotorasibe ou Adagrasibe como

monoterapia (Codebreak 100 e KRYSTAL-1), reportaram a presença de resistência e escape da terapia após aproximadamente 12 semanas de tratamento (2). Ainda não se sabe ao certo quais fenômenos são responsáveis pela aquisição de resistência pelas células tumorais, porém, acredita-se que o aparecimento precoce desse fenótipo de resistência é consequência da ativação de outras vias, e ativação de mecanismos compensatórios que levaram a uma resposta transitória ou submáxima dos inibidores (25). Dentre os diversos mecanismos descritos, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) tem sido apontada como um dos principais mecanismos envolvidos nesse processo (16,1).

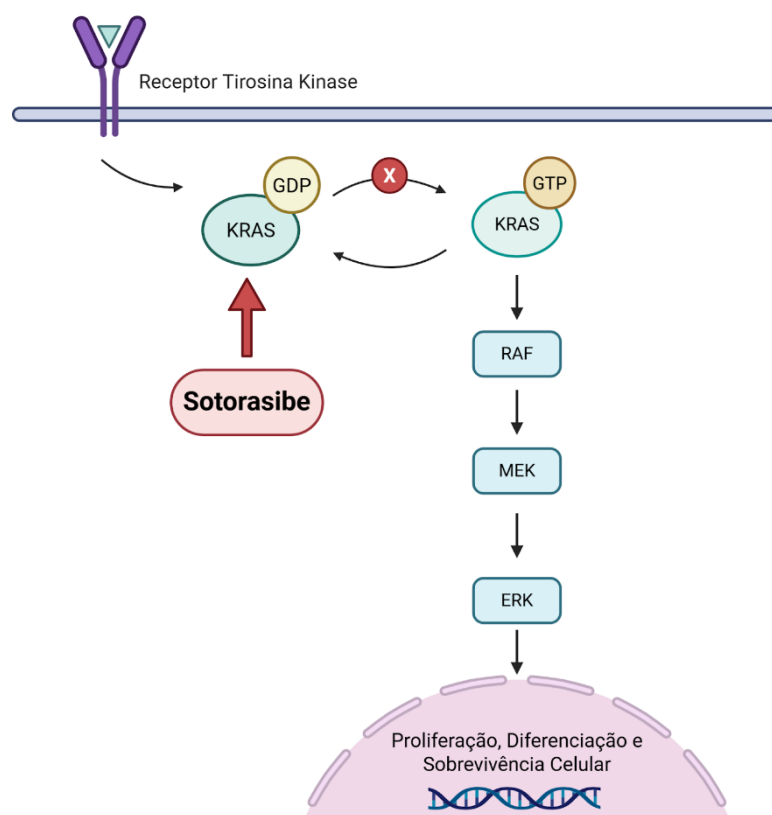


Figura 1: Esquema da via de sinalização da proteína KRAS e mecanismo de ação do inibidor Sotorasibe.

A Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT) é um processo dinâmico de plasticidade celular, altamente regulado e reversível, no qual células epiteliais perdem sua polaridade e adesão célula-célula, adquirindo um fenótipo mesenquimal com maior motilidade e capacidade invasiva (4) (Figura 2). Seu processo inverso, a Transição Mesenquimal-Epitelial (MET), é igualmente relevante em diversos contextos biológicos. A EMT ocorre tanto em processos fisiológicos, como no desenvolvimento embrionário, quanto em condições patológicas, destacando-se no câncer. Neste contexto, a EMT é crucial para a progressão tumoral e

metastática (12), podendo ainda conferir resistência a terapias através da ativação de vias de sinalização alternativas que contornam a dependência de KRAS, da expressão de bombas de efluxo de fármacos e da promoção de resistência à apoptose induzida por tratamentos (28).

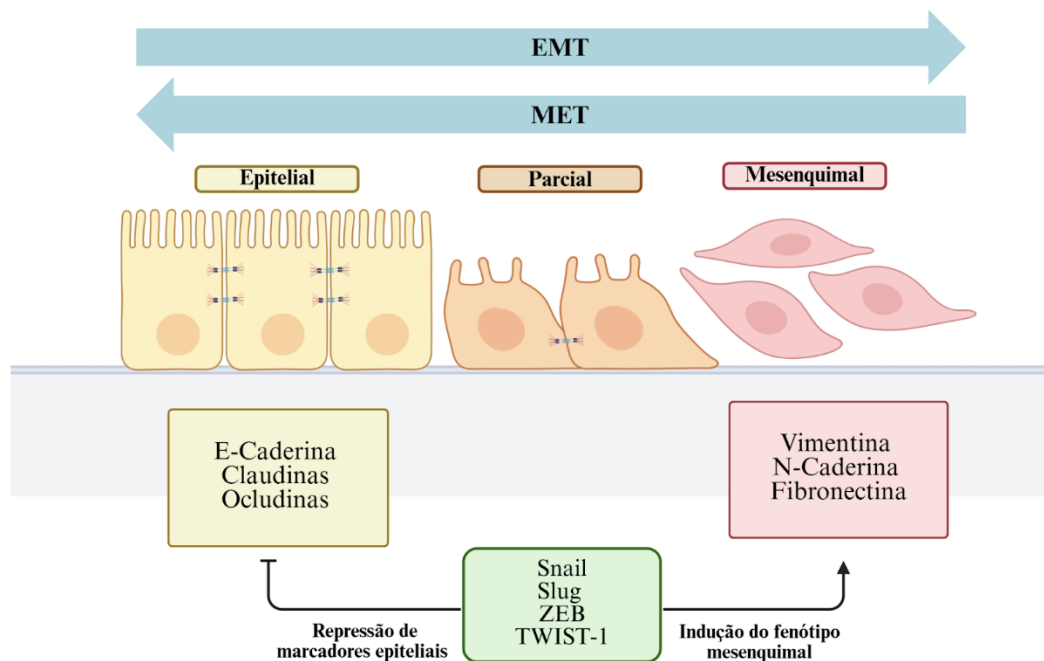


Figura 2: Esquema representativo do processo de transição epitélio-mesenquimal e seus principais marcadores associados.

Embora a associação entre EMT e resistência ao Sotorasibe seja estabelecida, o momento exato em que essa transição ocorre durante a aquisição da resistência permanece indefinido. Compreender se a EMT é um evento precoce, que impulsiona ativamente a resistência, ou tardio, como uma consequência adaptativa, é essencial para elucidar sua contribuição causal para a falha terapêutica e para orientar estratégias de tratamento combinado.

Para investigar essa questão, este estudo utilizou um modelo *in vitro* de resistência ao Sotorasibe, gerado em trabalho prévio do grupo de pesquisa, onde a linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2 (KRAS G12C+/+) foi exposta a concentrações gradualmente maiores (8 a 512 nM) do fármaco por um período de 12 semanas (16). Embora derivada de um adenocarcinoma, a linhagem MIA PaCa-2 exibe um fenótipo basal com características mesenquimais, associado a um perfil mais agressivo e resistente (22). Por meio da análise integrada de biomarcadores moleculares e funcionais, buscou-se rastrear a evolução da EMT ao longo de um gradiente de subpopulações celulares com resistência crescente ao fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho é avaliar a evolução da Transição Epitelial-Mesenquimal em um modelo de resistência ao Sotorasibe, investigando a dinâmica temporal desse processo durante o desenvolvimento da resistência em células de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2).

2.2. Objetivos Específicos

- Validar biomarcadores de EMT em modelo in vitro de câncer de pâncreas resistente ao Sotorasibe por RT-qPCR.
- Validar biomarcadores de EMT em modelo in vitro de câncer de pâncreas resistente ao Sotorasibe por Western Blot.
- Avaliar alterações fenotípicas por meio de ensaios de migração e adesão celular no modelo tumoral de pâncreas resistente ao Sotorasibe

3. METODOLOGIA

3.1. Linhagens Celulares, Modelo de Resistência e Cultivo

A linhagem celular MIA PaCa-2 (adenocarcinoma ductal pancreático), portadora da mutação homozigótica KRAS G12C, foi utilizada neste estudo. Os modelos de resistência ao Sotorasibe foram estabelecidos previamente no trabalho "Sotorasib resistance triggers epithelial-mesenchymal transition and activates AKT and P38-mediated signaling", mediante exposição progressiva das células a concentrações crescentes do fármaco, variando de 16 nM a 512 nM. Em cada etapa de seleção, uma alíquota da população celular foi criopreservada, enquanto a população remanescente foi exposta à concentração subsequente do inibidor. Ao final do processo, a linhagem resistente foi submetida a separação de clones únicos por citometria de fluxo (single-cell sorting). O clone E9 foi selecionado com base em seu maior IC50, nos níveis elevados de RAS-GTP ativo após exposição ao Sotorasibe e no perfil proteico indicativo de desvio da inibição de KRAS. Para a presente investigação, foram utilizadas as subpopulações criopreservadas durante as etapas de aquisição de resistência e o clone E9. Todas as células que foram utilizadas no estudo se encontram depositadas no Banco de Células do Hospital de Câncer de Barretos, e foram validadas quanto à sua autenticidade por teste de STR (Short Tandem Repeats) e se encontram livres de contaminação por micoplasma.

As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SBF (soro bovino fetal - Gibco), 1% de P/S (Penicilina/streptomomicina) em frascos de cultura e incubadas à 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Cada subpopulação de células resistentes foi rotineiramente re-exposta à concentração de Sotorasibe alcançada na referente etapa da aquisição de resistência, dessa forma, a linhagem denominada 16, foi exposta a concentração de 16 nM e assim sucessivamente. Entretanto, o fármaco fora retirado do meio de cultivo com pelo menos 24 horas antes de iniciarmos os experimentos. Após confluência, as células foram soltas, plaqueadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de caracterização biológica e de resposta terapêutica.

Adicionalmente, as linhagens MDA MB 231 e MCF-7 foram incluídas como controles positivos no Western Blot para verificar a eficiência do anticorpo, uma vez que expressam níveis elevados das proteínas de interesse.

3.2. Ensaio de Viabilidade Celular

Para a determinação da curva dose-resposta e confirmação de seus respectivos perfis de resistência, foram semeadas $1,0 \times 10^5$ células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações de Sotorasibe variando de 1 nM a 10.000 nM, além do controle com veículo (DMSO a 1% em DMEM com 0,5% de SFB). Após 72 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo reagente PrestoBlue, que mede a atividade metabólica mitocondrial através da redução de Resazurina (azul) em Resorufina (Rosa). A fluorometria foi quantificada no leitor Varioskan no comprimento de onda 590 nm, e os dados foram normalizados em relação ao controle com DMSO (1%).

3.3. RT-qPCR

A extração de RNA total foi realizada a partir de um pellet de, no mínimo, 5×10^5 células, utilizando o kit Invitrogen™ RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE, cujo princípio é baseado em purificação por coluna de afinidade. Após a eluição do RNA, sua concentração e pureza foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop. Com base nessa quantificação, o RNA foi diluído em água livre de nucleases para uma concentração final de 1000 ng em 10 μ L.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1000 ng de RNA, utilizando a enzima MultiScribe Reverse Transcriptase. A reação de transcrição reversa foi preparada em um volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L da amostra de RNA e 10 μ L do master mix de reação. Este foi composto por: 2 μ L de Buffer 10X, 0,8 μ L de dNTP Mix (25 mM), 2 μ L de Random Primers (10X), 1 μ L da transcriptase reversa e 4,2 μ L de água livre de nucleases. As reações foram conduzidas em termociclador sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e, finalmente, mantidas a 4°C. As amostras de cDNA foram então armazenadas a -20°C.

Para a reação de RT-qPCR, foi preparado um master mix contendo 10 μ L de SYBR Green Master Mix, 0,8 μ L de primer reverso (10 μ M), 0,8 μ L de primer direto (10 μ M), 0,2 μ L de Reference Dye (CXR) e 7,2 μ L de água livre de nucleases, totalizando 19 μ L por reação. Em seguida, 1 μ L de cDNA foi adicionado a cada poço, completando um volume final de 20 μ L.

O desenho experimental da placa incluiu a análise dos genes E-caderina, N-caderina, Vimentina, Snail, Slug e Beta Actina (controle endógeno), com as reações realizadas em duplicata e triplicata. As temperaturas de anelamento (T_m) otimizadas para os primers foram: 61°C para E-caderina, 64°C para N-caderina e 63°C para os demais genes. O protocolo de amplificação no equipamento PCR Biosystems consistiu em: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e T_m específica por 95 segundos (anelamento e extensão). Por fim, os dados de Ct (Cycle Threshold) exportados foram analisados, e a significância estatística foi determinada no software GraphPad Prism.

3.4. Extração e Análise de Proteínas por Western Blot

Para a análise proteica, foram semeadas pelo menos $1,0 \times 10^6$ células. Para avaliar o efeito agudo do fármaco, uma fração das culturas foi tratada com a dose respectiva de Sotorasibe, enquanto o controle recebeu DMSO (1% do volume total de meio com 0,5% de SFB) por 24h. Após o tratamento, as proteínas foram extraídas com tampão de lise contendo inibidores de protease (1ml de tampão para 40ul de coquetel de inibidores). A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de BSA e quantidades iguais de proteína (30uG por amostra), foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com percentual de 8-10% de acrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio com leite desnatado 5% em TBST por 1h, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários (Kit de Amostras de Anticorpos EMT nº 9782 da Cell Signaling Technology; diluição 1:1000): Beta catenina (#8480), Claudina-1 (#13255), E-Caderina (#3195), N-Caderina (#13116), Slug (#9585), Snail (#3879), Vimentina (#5741), ZEB-1 (#3396), ZO-1 (#8193). Beta-Actina (#4970; 1:1000) foi utilizada como controle de carga. A detecção foi realizada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase, (1:5000; todas anti-rabbit) por pelo menos 1h à temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas utilizando reagentes ECL Western Blotting Detection em um sistema Chemidoc MP (Bio-rad) através de quimioluminescência. A quantificação densitométrica foi realizada com o software ImageJ/Fiji, e os resultados foram expressos como níveis relativos de expressão proteica, normalizados pela Beta-actina.

3.5. Ensaios Fenotípicos

3.5.1. Ensaio de Migração

A migração celular foi avaliada utilizando câmaras transwell. Foram semeadas $5,0 \times 10^5$ células em 500 μ L de meio sem soro fetal bovino (SFB) na câmara superior. No poço inferior, foram adicionados 750 μ L de meio suplementado com 10% de SFB, que atuou como quimioatrativo. Após 24 horas de incubação, as células que migraram para a face inferior da membrana foram fixadas com metanol gelado (1 mL por 15 minutos) e coradas com solução de cristal violeta (500 μ L por 15 minutos). Em seguida, as células não migradas foram removidas com lavagens em DPBS (500 μ L por 2 minutos) e por limpeza mecânica suave com um cotonete na superfície interna da câmara. A quantificação foi realizada por eluição do corante com ácido acético, seguida de leitura de absorbância a 590 nm no equipamento Varioskan, complementada por análise de imagens.

3.5.2. Ensaio de Adesão

A capacidade de adesão celular foi avaliada em placa de 96 poços previamente revestida com uma solução de Matrigel e BSA (10 ng/mL em PBS) na proporção de 1:10, utilizando 50 μ L da mistura por poço. O revestimento foi realizado com pelo menos 24 horas de antecedência para permitir a solidificação do Matrigel. No dia seguinte, os poços foram lavados com DPBS e incubados com BSA a 0,1% em água destilada por 2 horas. Após a remoção dessa solução, foram semeadas $7,0 \times 10^4$ células por poço em 100 μ L de meio sem SFB. As células foram incubadas por 24 horas em estufa, e as células aderidas foram então fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 4°C por 1 hora e coradas com cristal violeta por 15 minutos. A quantificação foi realizada por eluição do corante e leitura de absorbância a 590 nm no equipamento Varioskan, complementada por análise de imagens.

3.6. Análise de Número de Cópias do Gene KRAS por ddPCR

A variação do número de cópias do gene KRAS foi determinada por Droplet Digital PCR (ddPCR). O DNA genômico foi extraído de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células utilizando um kit comercial baseado em coluna. A quantificação foi realizada em fluorômetro Qubit, que permite uma medida precisa de DNA através de intercalante fluorescente. Com base nessa

análise, as amostras foram diluídas em água Milli-Q para atingir uma concentração final de trabalho de 5 ng/μL.

Para a reação de ddPCR, foi preparada uma mistura contendo 10 μL de mix para sondas (ddPCR Supermix), 1 μL de primers e sondas multiplex (20X), 2 μL da amostra de DNA (5 ng/μL) e 8 μL de água ultrapura, totalizando 21 μL. Esta mistura foi então carregada em um gerador de gotículas (droplet generator) juntamente com óleo específico para particionar cada amostra em aproximadamente 20.000 gotículas. Para validação do processo, foi verificado que cada amostra apresentou pelo menos 10.000 gotículas válidas.

O termociclador foi programado com as seguintes condições: ativação enzimática a 95°C por 10 minutos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento/extensão a 55°C por 1 minuto; e desnaturação final a 98°C por 10 minutos, com armazenamento a 4°C.

A detecção foi realizada utilizando sondas específicas para KRAS mutado (marcado com FAM) e KRAS selvagem (marcado com HEX). A linhagem H727, conhecida por ser heterozigota para KRAS, foi utilizada como controle positivo. A leitura foi realizada no Droplet Reader, e a análise foi baseada no algoritmo de detecção de eventos raros (Rare Event Detection) do software QuantaSoft, que permite a quantificação absoluta das diferentes variantes do gene.

3.7. Análise Estatística

Os ensaios descritos neste projeto serão realizados em triplicata biológica e experimental. Após o teste de normalidade, caso apresentem distribuição normal, as comparações simples entre as diferentes situações estudadas serão avaliadas estatisticamente através do teste t de Student, e as diferenças entre os grupos serão testadas utilizando a análise de variância (ANOVA) One-way, seguida do teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando o software GraphPad Prism v.9.

RESULTADOS

4.1. Validação do modelo de resistência

O ensaio de viabilidade celular Presto Blue confirmou um aumento gradativo de IC₅₀ em relação ao Sotorasibe ao longo das subpopulações selecionadas. As linhagens Parental, 16, 32 (IC₅₀ entre 7,9 e 58,65 nM). Uma diminuição significativa na sensibilidade consequente do advento da resistência foi observado a partir da linhagem 64 (IC₅₀ = 92 nM), tornando-se pronunciado nas linhagens 128, 256, 512 e o clone E9 (IC₅₀ >1000 nM) (Figura 3).

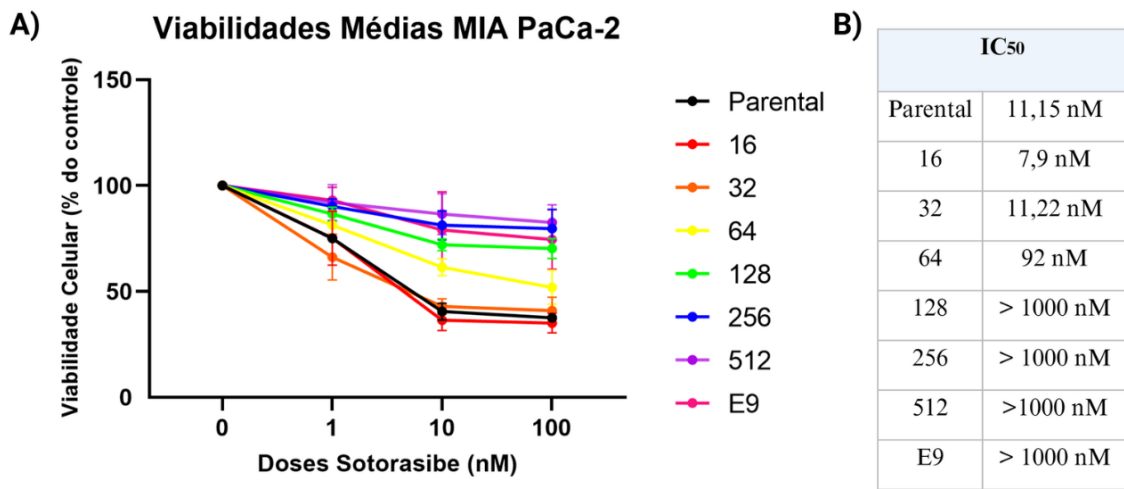


Figura 3. Curvas de viabilidade celular (A) e valores de IC₅₀ das subpopulações resistentes de MIA PaCa-2 ao Sotorasibe (B).

4.2. Análise de expressão de marcadores da EMT por RT-qPCR

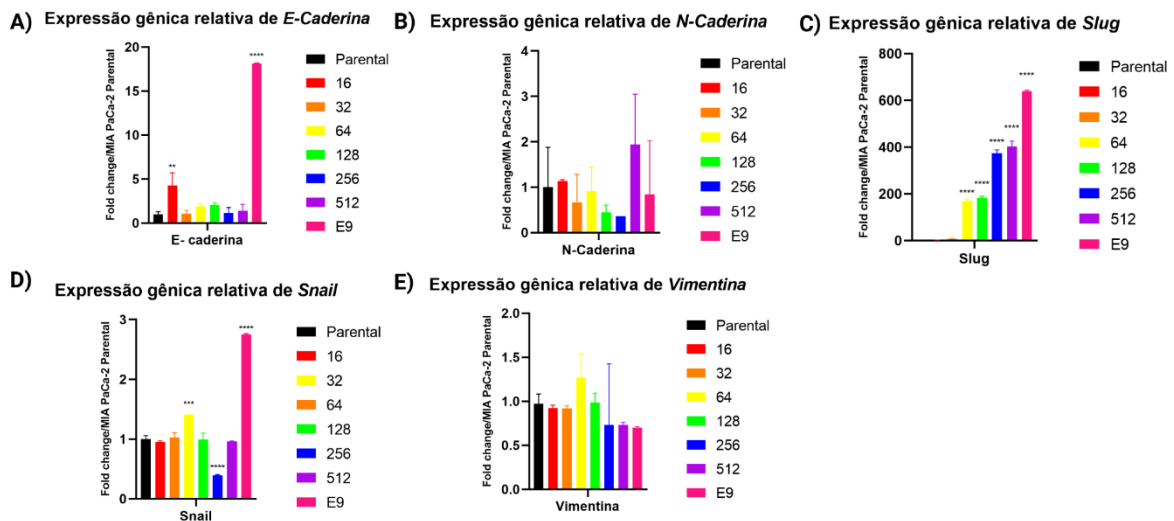


Figura 4. Gráficos relativos à expressão dos genes E-Caderina, N-Caderina, Slug, Snail e Vimentina, normalizados pela linhagem parental. *Valores estatisticamente diferentes das células parentais ($p < 0.05$; Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet).

4.3. Análise de expressão de marcadores da EMT por Western Blot

Para complementar os achados da análise por RT-qPCR, realizamos Western Blot para avaliar as alterações na expressão proteica de marcadores de EMT associados à aquisição de resistência (Figuras 5 e 6).

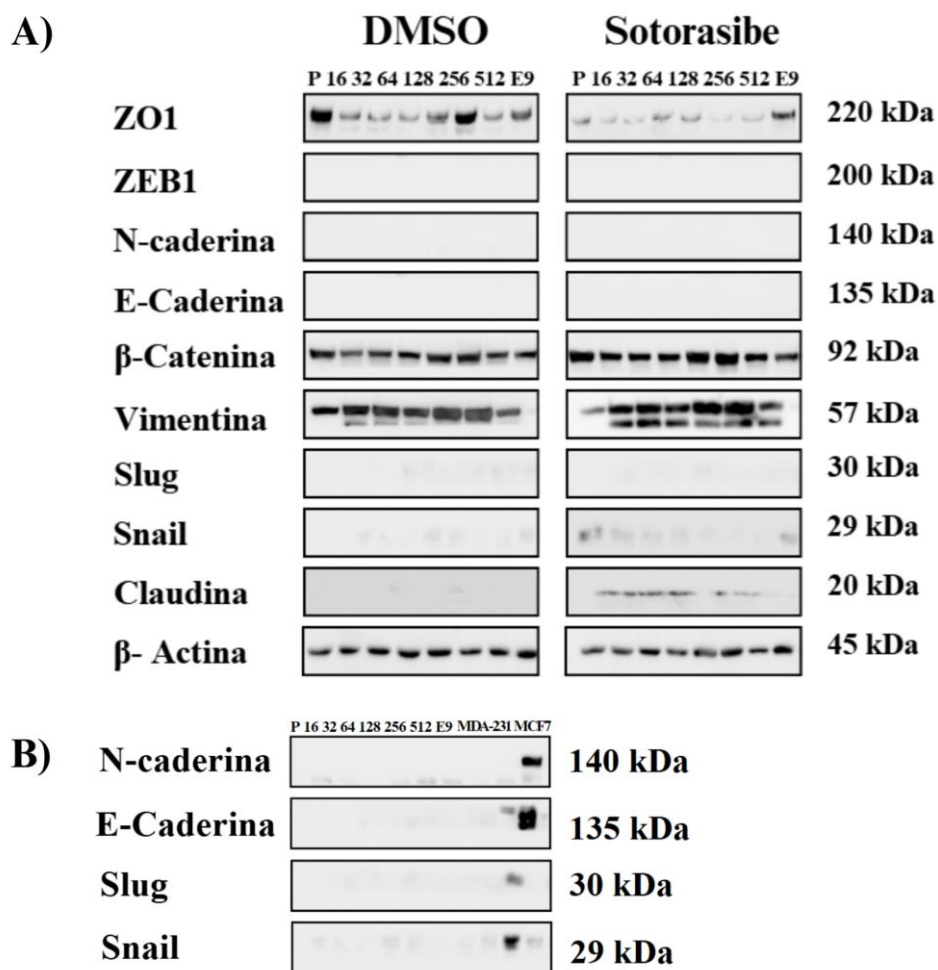


Figura 5. Análise por Western Blot do perfil de expressão de biomarcadores proteicos da EMT nas subpopulações resistentes ao Sotorasibe. (A) Membranas marcadas para as proteínas para as proteínas ZO-1, ZEB-1, N-Caderina, E-Caderina, Beta-Catenina, Vimentina, Slug, Snail e Claudina-1, tanto na presença quanto na ausência do fármaco. (B) Membranas marcadas para

as proteínas E-Caderina, N-Caderina, Slug e Snail, sendo utilizadas as amostras de MIA PaCa e também as linhagens MDA MB 231 e MCF7 como controles positivos dos anticorpos.

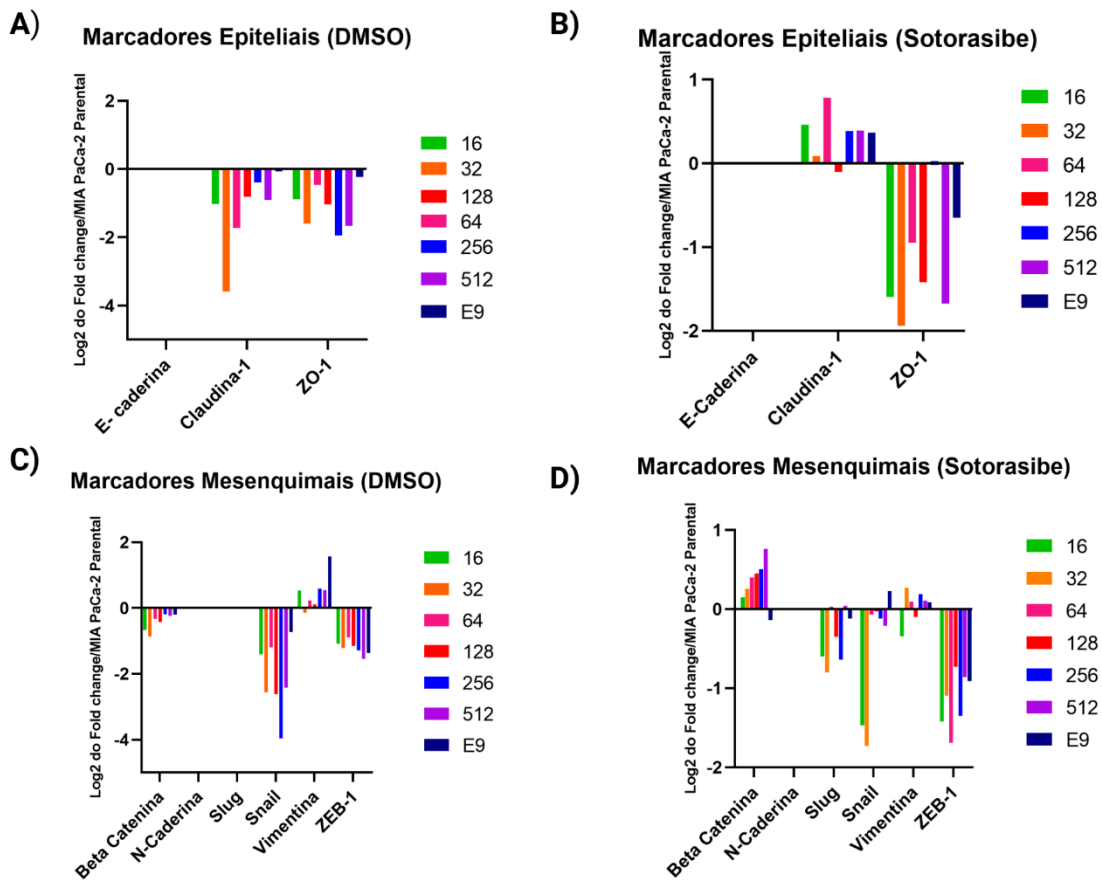


Figura 6. Análise de densitometria da expressão dos biomarcadores proteicos de EMT foi realizada por meio do software ImageJ Fiji. Os gráficos de barras representam o *fold change* normalizado pela linhagem parental MIA PaCa-2 nas seguintes condições: (A) Expressão de marcadores epiteliais na ausência de Sotorasibe; (B) Expressão de marcadores epiteliais na presença de Sotorasibe; (C) Expressão de marcadores mesenquimais na ausência de Sotorasibe; (D) Expressão de marcadores mesenquimais na presença de Sotorasibe.

4.4. Alterações fenotípicas de migração e adesão

A aquisição de um fenótipo epitelial indicaria mudanças na motilidade das células, portanto avaliamos alterações em migração e adesão decorrentes da aquisição de resistência ao Sotorasibe nas subpopulações e no clone E9 (Figura 7 e 8).

Ao compararmos as linhagens resistentes e a linhagem parental, observamos que não houveram diferenças significativas na capacidade migratória das células resistentes (Figura 7). De forma similar, as linhagens 16, 32 e 64 não demonstraram diferenças estatisticamente

significativas na sua capacidade de adesão, em relação a linhagem parental e após 24 horas de plaqueamento ($p > 0,05$), por outro lado, as linhagens 128, 256, 512 e E9 demonstraram ter sua capacidade de adesão reduzida ($p < 0,05$) (Figura 8).

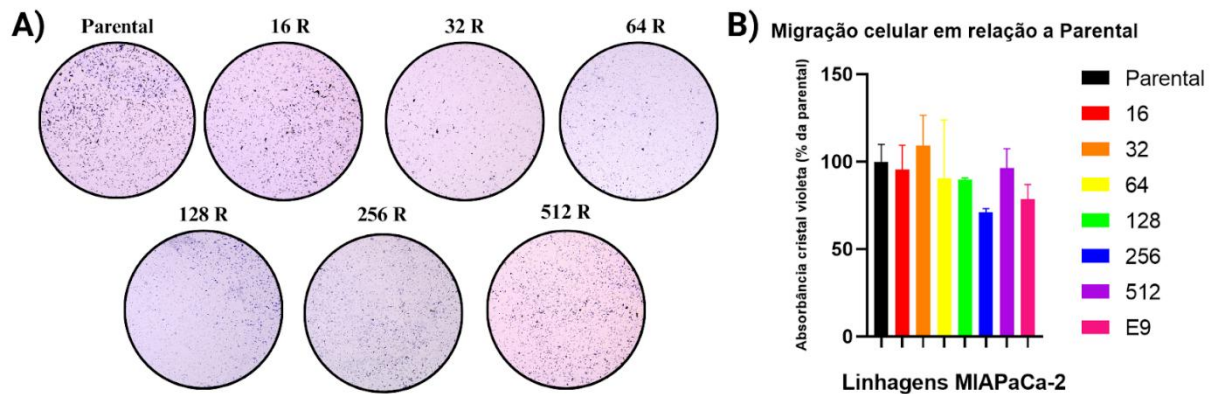


Figura 7. Análise do potencial migratório das subpopulações resistentes. (A) Imagens representativas das células migradas (cristal violeta). (B) Quantificação da migração por absorbância do cristal violeta, normalizada em relação à linhagem parental. *Valores estatisticamente diferentes das células parentais ($p < 0.05$; Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet).

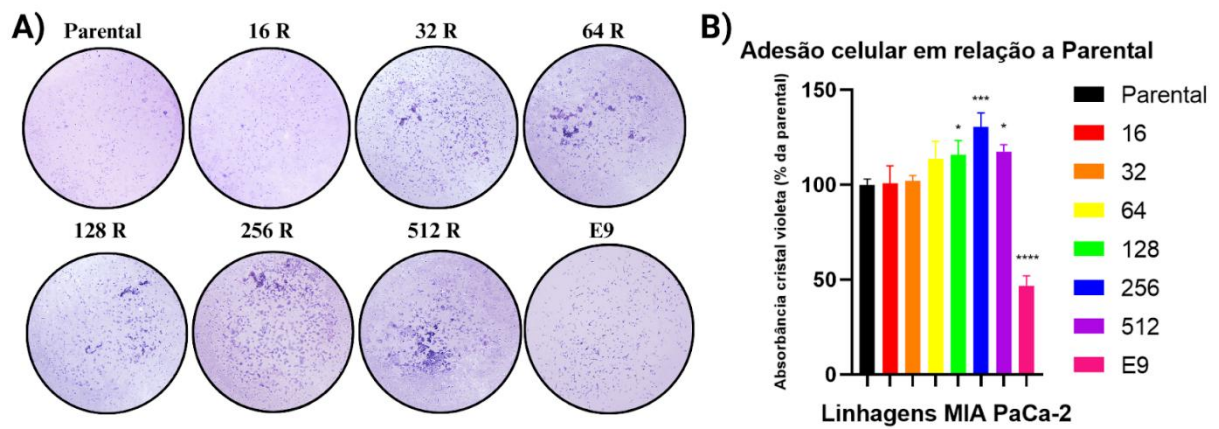


Figura 8. Análise da capacidade de adesão das subpopulações resistentes. (A) Imagens representativas das células aderidas (cristal violeta). (B) Quantificação da adesão por absorbância do cristal violeta, normalizada em relação à linhagem parental. *Valores estatisticamente diferentes das células parentais ($p < 0.05$; Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet).

4.5. Análise de número de cópias do gene KRAS por ddPCR

A análise por ddPCR detectou um aumento progressivo no sinal absoluto de droplets positivos para variação no número de cópias (CNV) do gene KRAS mutado, correlacionando-se com o aumento da resistência ao Sotorasibe nas linhagens analisadas.

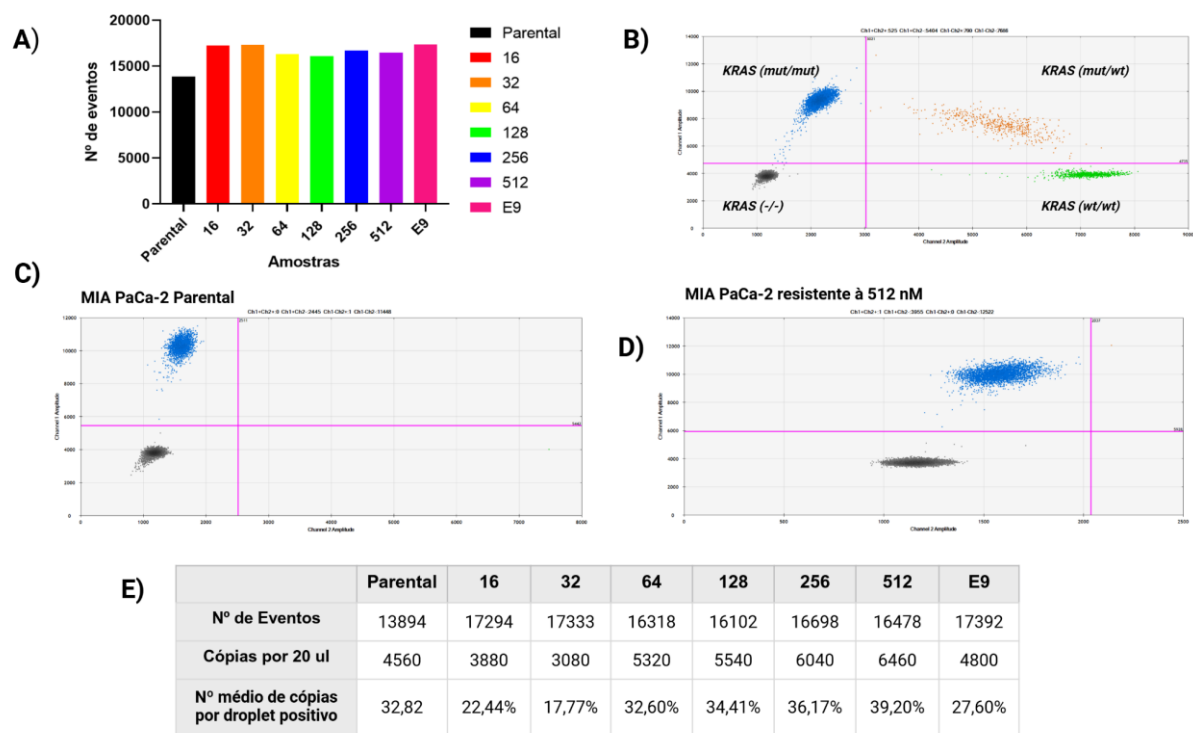


Figura 9. Análise da variação no número de cópias (CNV) do gene *KRAS* e triagem para mutações frequentes por *Droplet Digital PCR* (ddPCR). (A) Gráfico de colunas do número total de *droplets* por amostra, demonstrando a robustez do ensaio. (B-D) Gráficos de dispersão (*droplet plots*) representativos das linhagens: (B) Controle H727 (*KRAS wt/wt*), (C) Parental MIA PaCa-2 (*KRAS G12C/wt*) e (D) Linhagem resistente a 512 nM (*KRAS G12C/wt*). A nuvem de pontos colorida discrimina *droplets* positivos apenas para *KRAS G12C* (azul), apenas para *KRAS* selvagem (verde), para ambos os alelos (laranja) ou negativos (cinza). (E) Tabela resumindo a contagem de eventos e a concentração (cópias/ μ L) do alelo mutante *KRAS G12C*.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de inibidores seletivos da mutação KRAS G12C, como Sotorasibe (AMG 510) e Adagrasibe (MRTX849), representou um avanço significativo no tratamento de certos tipos de câncer. No entanto, a resistência adquirida a esses fármacos tem se mostrado um desafio central, impactando negativamente o prognóstico dos pacientes. Como demonstrado em estudos anteriores, esse fenômeno está intimamente associado à transição epitélio-mesenquimal (EMT) (1,16). Trata-se de um processo de plasticidade celular por meio do qual a célula cancerosa torna-se progressivamente menos dependente da via de sinalização do KRAS para sobrevivência e proliferação, o que explica a perda de eficácia dos inibidores. Diante disso, investigar os mecanismos moleculares subjacentes à resistência, com ênfase no papel da EMT, torna-se fundamental.

Para avaliar esse processo, selecionamos um conjunto de biomarcadores que refletem os principais eventos da EMT em múltiplos níveis. A perda de marcadores epiteliais, como E-caderina e proteínas de junções estreitas (ZO-1 e Claudina), indicaria a desmontagem da arquitetura tissular. Paralelamente, o aumento de marcadores mesenquimais, como N-caderina e Vimentina, sinalizaria a aquisição de um fenótipo migratório e invasivo. Ademais, fatores de transcrição pró-EMT, como Snail, Slug e ZEB1, atuam como reguladores mestres desse programa, reprimindo genes epiteliais e ativando a expressão de genes mesenquimais. É importante contextualizar que, diferentemente da EMT completa observada no desenvolvimento embrionário, a EMT na progressão do câncer (EMT tipo 3) frequentemente se manifesta como um estado parcial ou híbrido (E/M), no qual as células coexistem com características epiteliais e mesenquimais (21). Em conjunto, a análise desses marcadores permitiu uma avaliação abrangente do estágio de EMT associado à resistência em nossos modelos.

A caracterização de linhagens celulares resistentes ao Sotorasibe revelou um perfil molecular complexo, marcado por disparidades notórias entre a expressão gênica e proteica. A análise por RT-qPCR detectou expressão do gene E-caderina em todas as linhagens, com um aumento pronunciado de 18 vezes no clone E9. Contudo, a proteína E-caderina não foi observada no Western Blot, sendo detectada apenas na linhagem MCF-7 -- utilizada como controle positivo devido à sua expressão conhecida de E-caderina --, o que indica uma possível regulação pós-transcricional nas células resistentes. Essa discrepância entre mRNA e proteína é consistente com um mecanismo de degradação pós-traducional acelerada. Estudos

demonstram que a p120-catenina é crucial para estabilizar a E-caderina na membrana. Em sua ausência, a proteína recém-sintetizada sofre rápido turnover -- com meia-vida inferior a 6 horas --, sendo degradada antes de acumular-se em níveis detectáveis no Western Blot. Isso explica a ausência da proteína nas linhagens resistentes, apesar da expressão gênica detectada (7). Esse achado é crucial, uma vez que a perda da proteína E-caderina funcional é um pré-requisito para a redução da adesão celular durante a EMT, determinando o fenótipo final da célula independentemente da expressão de seu mRNA (18).

Paralelamente, a expressão do gene Slug aumentou gradualmente com a resistência, tornando-se significativa a partir de 64 nM, enquanto sua proteína manteve expressão baixa, ainda que discretamente aumentada pela presença do fármaco. A Vimentina apresentou expressão gênica e proteica constantes; no entanto, um achado consistente em sua revelação foi a detecção de um padrão de dupla banda, sugerindo a presença tanto da forma nativa quanto da forma clivada da proteína. De acordo com Battaglia e colaboradores (2014), essa forma clivada é um marcador de apoptose, por ser um dos principais substratos da enzima caspase-3 (3). Dessa forma, a presença constante dessa banda em nossos experimentos sugere uma resposta celular a altas doses de Sotorasibe, indicando que, sob elevado estresse celular, as células ativam cascatas pró-apoptóticas. O gene Snail também apresentou aumento de 3 vezes no clone E9, com sua proteína exibindo maior expressão sob tratamento. Complementarmente, observou-se aumento proteico de Claudina-1 e Beta-catenina com a resistência, bem como diminuição na expressão de ZEB1.

O perfil molecular observado -- com aumento de marcadores epiteliais (Claudina-1, Beta-catenina) juntamente com a ativação de fatores mesenquimais (Snail) -- configura uma assinatura clássica do fenótipo híbrido E/M (18). A coexpressão desses marcadores aparentemente opostos define esse estado intermediário, que confere maior plasticidade às células. É notável que estudos recentes indiquem que a capacidade de resistência a drogas -- assim como a habilidade de iniciar tumores -- é máxima precisamente nesse estado intermediário de EMT, e não na transição completa (26). Isso explica mecanicamente por que as células resistentes em nossos modelos não adotam um fenótipo totalmente mesenquimal, mas sim um estado híbrido que equilibra sobrevivência e plasticidade.

Esse perfil molecular específico correlacionou-se com alterações fenotípicas distintas. Ensaios de migração celular não apresentaram grandes variações. No entanto, a adesão celular

aumentou gradualmente com a resistência, a partir de 128 nM. De modo contrastante, o clone E9 -- que apresentou a maior expressão gênica de E-caderina -- exibiu nível de adesão significativamente menor que o da linhagem parental. Essa divergência fenotípica entre os clones reflete a heterogeneidade intratumoral, na qual subpopulações celulares distintas coexistem e respondem de maneiras diferentes à pressão terapêutica, impulsionando coletivamente a resistência adquirida (20). É crucial ressaltar que o E9 não representa a totalidade da população resistente a 512 nM, mas sim um clone específico que, apesar de seu perfil transcricional, não desenvolveu um fenótipo epitelial acentuado, destacando a heterogeneidade da resistência.

O aumento progressivo no sinal absoluto de droplets positivos para CNV do KRAS mutado, correlacionado com a resistência ao Sotorasibe, sugere um possível mecanismo de amplificação gênica. Ressalta-se, porém, que essa análise não foi confirmada quantitativamente, uma vez que a amostra é homozigota para a mutação em KRAS, impossibilitando a normalização por um alelo wild-type. A interpretação baseia-se, portanto, no aumento consistente na concentração de eventos mutados detectados, o que é consistente com o mecanismo de resistência por desequilíbrio alélico descrito na literatura, no qual a amplificação do alelo mutante permite que a célula supere a inibição terapêutica (5). Nossos dados sugerem, assim, que a resistência ao Sotorasibe em nossos modelos é sustentada por uma combinação de mecanismos: um estado de EMT parcial que confere plasticidade e reduz a dependência da via do KRAS, potencialmente coadjuvado por uma amplificação gênica do alelo mutante -- reforçando a noção de que a resistência a inibidores de KRASG12C raramente é mediada por um único mecanismo (19).

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o desenvolvimento de resistência ao inibidor Sotorasibe em células de câncer de pâncreas com mutação KRAS G12C está intrinsecamente associado à aquisição de um estado celular híbrido de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Nossos principais achados incluem um perfil molecular complexo, marcado pela notável disparidade entre a expressão gênica e proteica da E-caderina -- sugerindo forte regulação pós-traducional --, pela coexpressão de marcadores epiteliais (como Claudina-1 e Beta-catenina) e mesenquimais (como Snail), e pela heterogeneidade fenotípica observada entre os clones resistentes. Adicionalmente, os dados indicam a possível ocorrência de amplificação do alelo mutante KRAS G12C como um mecanismo coadjuvante de resistência.

A relevância deste estudo reside no contexto clínico do câncer de pâncreas, uma doença de prognóstico extremamente desfavorável na qual a mutação no gene KRAS é um evento quase ubíquo. Embora a variante G12C seja menos frequente nesse tipo de tumor, sua existência representa uma oportunidade terapêutica crucial para um subgrupo de pacientes. A resistência adquirida, no entanto, é uma barreira previsível. Portanto, identificar os mecanismos e, principalmente, os biomarcadores associados a essa resistência -- como a assinatura molecular de EMT parcial aqui descrita -- é um passo fundamental para melhor adequar as terapias. Por exemplo, compreender se um tumor já apresenta características de plasticidade celular no momento do diagnóstico pode ajudar a prever a duração da resposta ao inibidor e a necessidade de estratégias combinatórias desde o início.

Este trabalho apresenta limitações que devem ser consideradas. O estudo foi conduzido principalmente na linhagem MiaPaCa-2 de câncer de pâncreas. Inicialmente, planejava-se incluir a linhagem H358 de câncer de pulmão de não pequenas células -- outro tumor com significativa incidência da mutação G12C -- para investigar se os mecanismos de resistência são conservados entre diferentes origens tumorais, porém, restrições de tempo impossibilitaram essa análise comparativa. Ademais, a análise por RT-qPCR não abrangeu todos os alvos proteicos investigados no Western Blot, devido à disponibilidade de primers, o que limitou uma correlação mais abrangente entre os níveis de mRNA e proteína para todo o painel de biomarcadores.

Para investigações futuras, é altamente recomendável: 1) Validar estes achados em outras linhagens celulares portadoras de KRAS G12C, como a H358, para determinar a

universalidade dos mecanismos identificados; 2) Explorar estratégias terapêuticas que visem simultaneamente a via do KRAS e o programa de EMT, como a combinação de Sotorasibe com inibidores das vias de sinalização que sustentam o estado híbrido E/M; e 3) Realizar a quantificação absoluta da amplificação gênica do KRAS por técnicas como PCR digital, para confirmar e quantificar este mecanismo de resistência. Em conjunto, essas abordagens poderão pavimentar o caminho para regimes terapêuticos mais duradouros e eficazes para os pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (seguir regras ABNT)

1. ADACHI, Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition is a cause of both intrinsic and acquired resistance to KRAS G12C inhibitor in KRAS G12C mutant non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 26, n. 22, p. 5962-5973, 2020.
2. AWAD, M. M. et al. Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition in Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 384, n. 25, p. 2382-2393, 2021.
3. BATTAGLIA, R. A. et al. Caspase-mediated cleavage of vimentin is a primary event in the execution of apoptosis. *Journal of Cell Science*, v. 127, Pt 5, p. 1084-1098, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24424023/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
4. BATTAGLIA, R. A.; DELIC, S.; HERRMANN, H.; SNIDER, N. T. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*, v. 7, p. F1000 Faculty Rev-1796, 2018.
5. BURGESS, M. R. et al. KRAS Allelic Imbalance Enhances Fitness and Modulates MAP Kinase Dependence in Cancer. *Cell*, v. 168, n. 5, p. 817-829, 2017.
6. COX, A. D. et al. Drugging the undruggable Ras: mission possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 11, p. 828-851, 2014.
7. FUKUMOTO, Y. et al. The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane. *Experimental Cell Research*, v. 314, n. 1, p. 52-67, 2008.
8. GUARINO, M.; RUBINO, B.; BALLABIO, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, v. 39, n. 3, p. 305-318, jun. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17558857/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
9. HAY, E. D. An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anatomica*, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995.
10. HUANG, L. et al. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 386, 2021.
11. JANČÍK, S.; DRÁBEK, J.; RADZIOCH, D.; HAJDÚCH, M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, Artigo ID 150960, 2010.
12. KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

13. KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, jun. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487818/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
14. KIDD, M. E.; SHUMAKER, D. K.; RIDGE, K. M. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 50, n. 1, p. 1-6, 2014.
15. LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.
16. MEGID, R. A. et al. Sotorasib resistance triggers epithelial-mesenchymal transition and activates AKT and P38-mediated signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 12, p. 1537523, 2025.
17. OSTREM, J. M. et al. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, v. 503, n. 7477, p. 548-551, 2013.
18. PASTUSHEV, I. et al. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 10, p. 611-629, out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397828/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
19. SANTAMARÍA, P. G. et al. Non-genetic adaptive resistance to KRASG12C inhibition: EMT is not the only culprit. *Trends in Cancer*, v. 8, n. 7, p. 536-539, jul. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35339336/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
20. SANTOS, G. C. et al. EMT, stemness and drug resistance in cancer. *Pathobiology*, v. 85, n. 1-2, p. 105-115, 2018.
21. SATOH, K. et al. Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry*, v. 164, n. 4, p. 257-264, out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29931079/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
22. SHICHI, Y. et al. Epithelial and Mesenchymal Features of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines in Two- and Three-Dimensional Cultures. *Journal of Personalized Medicine*, v. 12, n. 5, p. 746, 2022.
23. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.
24. SIMANSHU, D. K.; NISSLEY, D. V.; MCCORMICK, F. Ras proteins and their regulators in human disease. *Cell*, v. 170, n. 1, p. 17-33, 2017.

25. TANAKA, N.; EBI, H. Mechanisms of Resistance to KRAS Inhibitors: Cancer Cells' Strategic Use of Normal Cellular Mechanisms to Adapt. *Cancer Science*, v. 116, n. 2, p. 600-612, 2025.
26. THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, v. 139, n. 5, p. 871-890, 25 nov. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945376/>>. Acesso em: 24 out. 2024.
27. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA grants accelerated approval to sotorasib for KRAS G12C-mutated NSCLC. 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-sotorasib-kras-g12c-mutated-nsclc>>. Acesso em: 26 mar. 2025.
28. XU, Z. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition-Mediated Tumor Therapeutic Resistance. *Molecules*, v. 27, n. 15, p. 4750, 2022.