

**PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES  
SECRETADAS POR ADENOCARCINOMAS  
GÁSTRICOS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO  
QUIMIOTERÁPICO**

**EDSON KUATELELA CASSINELA**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins**

**Co-Orientadora: Dra. Michele Landemberger**

**São Paulo**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cassinela, Edson Kuatelela

**Papel das vesículas extracelulares secretadas por adenocarcinomas gástricos na resposta ao tratamento quimioterápico** / Edson Kuatelela  
Cassinela – São Paulo, 2018.

125p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. Neoplasias Gástricas/Stomach Neoplasms. 2. Vesículas Extracelulares/Extracellular Vesicles. 3. Quimioterápico/Drug Therapy. 4. Terapia Neoadjuvante/Neoadjuvant Therapy.

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.*

Mahatma Gandhi



## DEDICATÓRIA

À minha grandiosa e amada família: Aos meus pais, Domingos e Sofia Cassinela, pela batalha incansável para poderem honrar-me de educação e princípios, que são valores imensuráveis que carrego nessa estrada da vida, pelo sacrifício, conselhos, apoio moral e incondicional que realizaram para propiciar-me os requisitos indispensáveis para que esse meu sonho fosse almejado;

Aos meus irmãos, Ernestina, Elsa, Ildo, Azda, Aires Chimy, Aires Tydes, Ester, Osvaldo e Yolanda, pelo apoio incondicional, aos meus amados e idolatrados sobrinhos pelo amor que vocês transmitem;

À Marcy Souza, pelo amor, companheirismo, apoio e por ser minha fonte de força e inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma jornada árdua chegando ao fim, deixando apenas o sentimento de gratidão, realçando a cada instante meu especial agradecimento que vai, em primeiro lugar à Deus pelo folego da vida. Esse trabalho tornou-se realidade porque pessoas incansáveis sempre estiveram por perto envolvendo-se direta ou indiretamente, contribuindo com sugestões imprescindíveis, agradeço ao envolvimento de cada colaborador porque com eles fui capaz de moldar pilares base para que os objetivos desse trabalho fossem alcançados com êxitos. Por estes e outros motivos, humildemente manifesto minha imensa gratidão a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização do trabalho que culminou nesta tese:

Em primeiro lugar à Dra. Vilma Regina Martins minha orientadora, que considero um grande exemplo de integridade, agradeço pela oportunidade de integrar ao seu grupo e com ela aprender durante esse período, levando seus ensinamentos para toda minha vida profissional e não só;

A minha co-orientadora Dra. Michele Christine Landemberger, pela contribuição científica durante todo o curso;

A Dra. Gabriela Pintar de Oliveira pelas ideias, discussões, contribuições e apoio incondicional que foram fundamentais para o direcionamento deste trabalho.

Ao Dr. Fabio Marchi, por toda a ajuda dada na área de bioinformática, além das orientações e colaborações científicas;

Aos colegas de laboratório, pela receptividade calorosa e carinhosa quando cheguei ao laboratório, das discussões científicas acerca do projeto e ajuda para realizar os primeiros experimentos, da amizade construída cada dia durante os anos de laboratório, lembro ainda e agradeço as conversas durante os cafés na copa que aminizava na correria e longas jornadas de trabalho. Sendo assim agradeço especialmente ao Antuani Batistela pela imensa contribuição científica dada à esse trabalho, pela generosidade, pela parceria diária para tomar chimarrão durante as manhãs frias de São Paulo

e pela amizade sólida que erguemos, Rodrigo Cartaxo pela parceria nos turnos da madrugada, Bruna Roz, Marcos Salles, Fernanda Giudice, Tonielli Lacerda, Daniele Nascimento, Luana Campos, Fernanda Lupinacci, ao Dr. Tiago Goss, Dr. Martin Roffé e Dra. Glaucia Hajj pelas contribuições científicas e críticas construtivas dadas ao trabalho;

Ao Felipe Moreira Hildegardo Bezerra e Danilo Santos, Mayra Lotierzo e Enderson Barboza que deram todo o suporte técnico necessário para realização deste trabalho;

Ao Dr. Helano Freitas pelo apoio e discussões clínicas neste projeto;

A enfermeira de pesquisa Lais Senda pelas coletas incessantes de amostras.

Ao Grupo de Genética médica em geral ao Dr. Emmanuel Dias Neto e Dra Diana Noronha, em particular a Dra. Maria Amorim no auxílio para execução dos experimentos de RNAseq.

Ao Renan Valieris por ter ajudado também nas análises de bioinformática.

Ao Dr Daniel-de-Sousa Martins e sua aluna Sheila Garcia ambos do laboratório de neuroproteômica Departamento tecidual UNICAMP Campinas, pela colaboração na realização da análise proteômica;

À todos os funcionários do CIPE: secretárias, equipe do escritório de projetos, recepcionistas, seguranças, equipe de higiene, entre outros, que de forma direta ou indireta contribuíram com esse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, o qual foi fundamental para a realização desse projeto;

À pós-graduação da Fundação Antônio Prudente que proporcionou todas as condições para a realização do doutorado em especial a Ana Kuninari e a Luciana Pitombeira; Ao pessoal da biblioteca em especial a Suely Francisco.

Ao A.C.Camargo Cancer Center pela excepcional estrutura; A todos os professores e educadores que contribuíram durante toda a minha formação acadêmica;

Em especial agradeço a todos os familiares e amigos como Walter Demba e Aristides Ngolo que estiveram ao meu lado durante essa jornada;

## RESUMO

Cassinela EK. **Papel das Vesículas Extracelulares secretadas por adenocarcinomas gástricos na resposta ao tratamento quimioterápico.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O adenocarcinoma gástrico (AdG) é a terceira causa mais comum de morte por câncer no mundo e um dos tumores com maior índice de mortalidade no Brasil. Estes tumores aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto nas mulheres. A quimioterapia neoadjuvante (QT) com 5-fluorouracil (5-FU) pode melhorar a ressecabilidade e a sobrevida dos pacientes com AdG, porém sua eficácia está limitada pela resistência à droga. Apenas pacientes que respondem a esta terapia com toxicidade tolerável são potencialmente beneficiados, entretanto não é possível identificar e separar clinicamente estes indivíduos. Assim, identificar marcadores preditivos de resposta para selecionar os pacientes que se beneficiariam deste tratamento é relevante. Vesículas extracelulares (VEs) são componentes secretados pelas células incluindo células tumorais, cujo conteúdo é regulado e composto por moléculas que podem ter uma miríade de funções locais e a distância. Muitas destas moléculas podem ser também usadas como biomarcadores séricos por conterem informações importantes sobre o tumor. Desta forma, este trabalho tem como objetivo identificar marcadores de resistência a 5-FU em VEs secretadas por linhagens celulares humanas de câncer gástrico e avaliar o papel das VEs na quimioresistência. Para tanto, foram geradas células de AdG derivadas da linhagem AGS, resistentes a 5-FU (rAGS\_FU) de onde foram isoladas, quantificadas e caracterizadas VEs. Células rAGS-FU secretam cerca de 2 vezes mais VEs que as células parentais (AGS), entretanto a distribuição destas por tamanho é semelhante. As células rAGS\_FU apresentaram maior proliferação, capacidade de formação de colônias e invasão que as células AGS. Interessantemente, as VEs provenientes de células resistentes a 5-FU, rAGS\_FU, são capazes de transferir à células AGS os fenótipos de

resistência ao quimioterápico bem como um aumento na capacidade de formação de colônias e invasão. As células AGS que se tornam resistentes ao tratamento não têm este fenótipo revertido pela remoção das VEs das células resistentes nem pelo tratamento com VEs de células AGS parental, indicando que o fenótipo de resistência adquirido após o tratamento é irreversível, pelo menos pelo período estudado. O conteúdo proteico das VEs das células AGS e rAGS\_FU e suas respectivas VEs foi comparado por proteômica. Nessa abordagem foram identificadas 1.915 proteínas nas células e 1.638 proteínas em VEs das quais 309 proteínas eram diferencialmente expressas em células e 66 em VEs. Entre as proteínas com expressão diferencial entre as duas células e também nas suas respectivas VEs, selecionamos e validamos por *western blotting* a proteína fascina. Esta parece ser um potencial candidato a biomarcador de resistência a 5-FU uma vez que sua expressão é indetectável na célula AGS e suas VEs e altamente expressa nas células rAGS\_FU e suas vesículas. A fascina é uma proteína do citoesqueleto com um papel chave nas interações célula-célula, adesão e motilidade celulares e é associada a agressividade tumoral. Estes dados apontam o papel das VEs nos mecanismos relacionados à resistência a 5-FU em células de AdG e sugerem que fascina possa estar associada ao mecanismo de resistência a este quimioterápico e que também seja um potencial biomarcador deste fenótipo.

## SUMMARY

Cassinela EK. **[Role of Extracellular vesicles secreted by gastric adenocarcinomas in response to chemotherapy]**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Gastric adenocarcinoma (GAd) is the third most common cause of cancer related death worldwide, and one of the tumors with the highest mortality rates in Brazil. In men, this cancer ranks the third most common cancer, while in women, it ranks fifth. 5-fluorouracil (5-FU) based neoadjuvant chemotherapy can improve tumor resectability and patient's survival rates. Its effectiveness however, is limited by drug resistance. Thus, an effort to identify predictive markers of response to neoadjuvant therapy and select patients who could benefit from this treatment is relevant. One such approach could be to use contents of extracellular vesicles (EVs). EVs are components secreted by cells including tumor cells, whose contents are composed of molecules that can have a myriad of local and distance functions and many of these molecules can also be used as serum biomarkers since they contain important information about the tumor. This work aims to identify 5-FU resistance markers in EVs secreted by human gastric cancer cell line and to evaluate the role of EVs in chemoresistance. GAd cells resistant to 5-FU (rAGS\_FU) were generated from the AGS cell line and EVs secreted by rAGS\_FU cells and parental AGS cells were isolated, quantified and characterized. Our results showed that AGS\_FU cells secrete about 2 times more EVs than parental AGS cells, however their size distribution is similar. The resistant rAGS\_FU cells showed higher proliferation rates, capacity of colony formation and invasion properties. Interestingly, EVs from 5-FU resistant cells, rAGS\_FU, are able to transfer to the AGS cells the phenotypes of resistance to chemotherapy as well as an increase in the capacity of colony formation and invasion. AGS cells that become resistant to treatment do not have this phenotype reversed by removal of the EVs from the resistant cells or by treatment with EVs from

parental AGS cells, indicating that the resistance phenotype acquired after treatment is irreversible, at least for the period studied. The protein content of the AGS and rAGS\_FU cells and their respective EVs was compared by proteomics. In this approach, 1,915 proteins were identified in cells and 1,638 proteins in EVs of which 309 proteins were differentially expressed in cells and 66 in EVs. Among the proteins with differential expression between the two cells and also in their respective EVs, we selected and validated by western blotting the protein fascin. Fascin protein appears to be a potential candidate for biomarker of 5-FU resistance since its expression is undetectable in AGS cells and their EVs and highly expressed in rAGS\_FU cells and their vesicles. Fascin is a cytoskeletal protein with a key role in cell-cell interactions, cell adhesion and motility and is associated with tumor aggressiveness. These data point to the role of EVs in the mechanisms related to 5-FU resistance in GAd cells and suggest that fascin may be associated with the mechanism of resistance to this chemotherapeutic agent and that it is also a potential biomarker of this phenotype.

## LISTA DE FIGURA S

<b>Figura 1</b>	Características moleculares dos subtipos de câncer gástrico	5
<b>Figura 2</b>	Princípios gerais de resistência a drogas.....	13
<b>Figura 3</b>	Fatores que influenciam a resistência à quimioterápicos citotóxicos e à terapia alvo .....	14
<b>Figura 4</b>	Tamanho médio das vesículas extracelulares .....	19
<b>Figura 5</b>	Biogênese de VEs .....	21
<b>Figura 6</b>	Figura Composição das vesículas extracelulares .....	25
<b>Figura 7</b>	Mecanismos de resistência mediada por exossomos.....	34
<b>Figura 8</b>	Transferência de quimioresistência mediada por VEs .....	36
<b>Figura 9</b>	Geração de uma linhagem celular de adenocarcinoma gástrico quimiorresistente .....	59
<b>Figura 10</b>	Imunofluorescência para timidilato síntase (TS) .....	60
<b>Figura 11</b>	Proliferação celular de células AGS e rAGS_FU .....	62
<b>Figura 12</b>	Eficiência de plaqueamento das linhagens AGS e rAGS_FU .	64
<b>Figura 13</b>	Perfil das VEs secretadas pelas células AGS e rAGS_FU .....	66
<b>Figura 14</b>	Esquema mostrando o desenho experimental do ensaio .....	67

<b>Figura 15</b>	VEs secretadas por células resistentes a 5-FU transferem este fenótipo a células parentais sensíveis a este quimioterápico .....	71
<b>Figura 16</b>	Ensaio de invasão a matrigel por células AGS e rAGS_FU tratadas ou não com VEs .....	72
<b>Figura 17</b>	Desenho experimental: após 48 horas de carenciamento .....	73
<b>Figura 18</b>	Análise proteômica de células AGS e rAGS_FU de tumores gástricos e VEs secretadas por estas células .....	75
<b>Figura 19</b>	Rede de interação proteína-proteína em células .....	81
<b>Figura 20</b>	Enriquecimento em vias canônicas das proteínas com aumento e diminuição da expressão em células e VEs de células AGS em relação às células e VEs rAGS_FU .....	82
<b>Figura 21</b>	Validação da Expressão das proteínas identificadas na análise proteômica com diferente expressão em células AGS e rAGS_FU .....	84
<b>Figura 22</b>	Validação da Expressão da proteína Fascina em células e VEs .....	86

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

<b>Tabela 1</b>	Top 68 proteínas com maior diferença de expressão após comparação entre as células <b>rAGS_FU</b> e <b>AGS</b> (34 proteínas com expressão aumentada e 34 proteínas com expressão diminuída) .....	76
<b>Tabela 2</b>	66 proteínas com maior diferença de expressão após comparação entre as VEs das células <b>rAGS_FU</b> e <b>AGS</b> (26 proteínas com expressão aumentada e 40 proteínas com expressão diminuída) .....	78
<b>Quadro 1</b>	Proteínas diferenciamente expressas nas condições de resistência x sensibilidade a 5-FU e comuns entre células e VEs .....	80

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>5-FU</b>	5-fluorouracil
<b>AdG</b>	Adenocarcinoma gástrico
<b>ATCC</b>	(do inglês, <i>American Type Culture Collection</i> )
<b>CDH1</b>	Caderina-1
<b>CG</b>	Cancer Gástrico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EBV</b>	Vírus Espstein bar
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ENCODE</b>	Encyclopedia of DNA Elements
<b>ESCRT</b>	Complexo de classificação endossomal requerida para transporte (do inglês, <i>endosomal sorting complex required for transport</i> )
<b>VEs</b>	Vesículas extracelulares
<b>EVs</b>	<i>Extracellular vesicles</i> – Vesículas extracelulares
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FOLFOX</b>	(fluorouracil mais leucovorin e oxaliplatina)
<b>HP</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>ILVs</b>	Vesículas intraluminais (do inglês, <i>intraluminal vesicles</i> )
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>JAK</b>	gene janus cinase 2
<b>lncRNA</b>	<i>Long noncoding RNA</i>
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MVBs</b>	Corpos multivesiculares (do inglês, <i>multivesicular bodies</i> )
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde

<b>PBS</b>	Tampão salina-fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PD-L1</b>	Ligante de morte programada 1 (do inglês, <i>Programmed death-ligand 1</i> )
<b>PD-L2</b>	Ligante de morte programada (do inglês, <i>Programmed death-ligand 2</i> )
<b>PIK3CA</b>	Fosfatidilinositol 3-cinases subunidade alfa catalítica (do inglês, <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> )
<b>PrP<sup>C</sup></b>	Proteína príon celular
<b>RIPA</b>	Tampão de radio-imuno-precipitação (do inglês, <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucléico
<b>RNA-Seq</b>	Sequenciamento de RNAs em larga escala
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>VBs</b>	Corpos multivesiculares (do inglês, <i>multivesicular bodies</i> )

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer gástrico.....	1
1.2	Classificação do AdG .....	3
1.2.1	Classificação molecular do AdG.....	4
1.3	Associação da <i>helicobater pylori</i> e do vírus de epstein barr com AdG	6
1.4	Principais modalidades terapêuticas .....	7
1.5	Resposta à quimioterapia neoadjuvante .....	9
1.6	Mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico.....	10
1.7	Vesículas extracelulares.....	17
1.7.1	Biogênese e secreção de VEs.....	17
1.7.2	Papel das vesículas extracelulares no cancer.....	26
1.7.3	Mecanismos de quimioresistência associados a VEs em tumores gástricos .....	37
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	Linhagens celulares e quimioterápico .....	39
3.2	Padronização das doses de quimioterápico .....	40
3.3	Geração de linhagens de células AGS resistentes aos quimioterápicos 5-fluorouracil (5-FU) .....	40
3.4	Avaliação da viabilidade celular.....	41
3.5	Proliferação celular .....	42
3.6	Quantificação da proliferação celular .....	43
3.7	Formação de colônia .....	44
3.8	Isolamento e quantificação das vesículas extracelulares.....	44

3.9	Transferência do fenótipo de resistência à quimioterapia por vesículas extracelulares .....	45
3.10	Inibição da transferência do fenótipo de resistência à quimioterapia ..	46
3.11	Quantificação da invasão celular .....	46
3.12	Formação de colônias mediada por VEs .....	47
3.13	Avaliação da transferência do fenótipo de resistência após 14 dias de tratamento com VEs .....	48
3.14	Reversão do fenotipo de resistência mediado por VEs de célula sensível.....	49
3.15	Ensaio de <i>western blotting</i> .....	49
3.16	Imunofluorescencia.....	52
3.17	Análise proteômica .....	53
3.17.1	Extração de proteínas.....	53
3.17.2	Digestão das amostras .....	54
3.17.3	Nanoflow nLC-MS/MS .....	55
3.17.4	Identificação de proteínas.....	55
3.17.5	Análise de Bioinformática para identificação de proteínas significativas e enriquecimento de vias biológicas .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
5.1	Geração das linhagens resistentes a 5-fluororacil.....	57
5.2	Caracterização do número, tamanho e concentração de VEs secretadas pelas células AGS e rAGS_FU .....	65
5.3	Vesículas extracelulares secretadas por células rAGS_FU transferem o fenótipo de resistência à 5-FU para células AGS.....	67
5.4	Vesículas extracelulares secretadas por células rAGS_FU transferem o fenótipo de capacidade de formação de colônias e de invasão para células AGS .....	69
5.5	Análise proteômica de células e VEs .....	73
5.5.1	Enriquecimento das proteínas selecionadas em vias canônicas .....	81
5.5.2	Ensaio de western blot para validação da expressão de proteínas selecionadas em vias canônicas .....	83

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>88</b>
6.1	Geração de um modelo celular de câncer gástrico resistente a 5-FU	88
6.2	Vesículas extracelulares secretadas por células de adenocarcinoma gástrico e seu papel na resistência à 5-FU .....	91
6.3	Fascina em adenocarcinoma gástrico e seu papel na resistência à 5-FU .....	95
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>101</b>

#### **ANEXOS**

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

**Anexo 2** Artigo científico: “Rab5C increases resistance to ionizing radiation in rectal cancer”

#### **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de células

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico (CG) é o quinto do ranking na taxa de incidência e o terceiro na mortalidade em todo mundo sendo que mais de 70% dos casos de CG ocorrem em países em desenvolvimento, e metade do total mundial ocorre na população asiática (principalmente na China) (FERLAY et al. 2016). As estimativas para novos casos nos Estados Unidos são de 26.240 e mais de 10.800 mortes pela doença (SIEGEL et al. 2018). No Brasil, em 2013, as mortes em decorrência do câncer de estômago foram de 14.182 e a estimativa de novos casos para 2018 é de 21.290 (Ministério da Saúde 2018). O pico de incidência ocorre em sua maioria em homens por volta dos 70 anos de idade, sendo que aproximadamente 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos. A taxa de sobrevivência dos pacientes é significativamente influenciada pela presença de metástases, sendo que mais de 50% dos pacientes apresentam metástases linfonodais ao diagnóstico. Os principais sítios de metástases são o fígado e o peritônio, mas em estágios avançados pode haver metástases para qualquer região do corpo (DENG e LIANG 2014). Mais de 17% de todos os pacientes com CG são diagnosticados com metástase peritoneal (BRANDL et al. 2018) e metástases de medula óssea são geralmente observadas em pacientes jovens e em tumores pouco diferenciados (EKINCI et al. 2014). Já

as metástases pulmonares são pouco frequentes (KONG et al. 2012), assim como metástases no sistema nervoso central que ocorrem entre 0,16% a 0,69% dos pacientes com CG ou carcinoma da junção esôfago-gástrica (CAVANNA et al. 2018).

O adenocarcinoma representa o tipo histológico responsável por 95% dos tumores gástricos (DENG e LIANG 2014). Na maioria das vezes o adenocarcinoma gástrico (AdG) é assintomático, de forma que 50% dos pacientes podem apresentar alguns problemas gastrointestinais não específicos, podendo atrasar o diagnóstico (STEWART e KLEIHUES 2003). O AdG inicia-se em células glandulares que envolvem a camada interna do estômago e que desempenham a função de preservar a mucosa do órgão da ação dos sucos ácidos gástricos. Sua causa é multivariada, porém os componentes de risco conhecidos podem ser de origem infecciosa, como a infecção gástrica pelo *Helicobacter pylori* (HP) e pelo vírus de *Epstein-Barr* (EBV) (MATSUSAKA et al. 2014). Fatores não infecciosos como idade avançada, dieta pobre em produtos de origem vegetal e rica em sal, consumo excessivo de alimentos com conservantes, tabagismo e associação com doenças como gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal da mucosa gástrica, anemia perniciosa, pólipos adenomatosos do estômago, gastrite hipertrófica e história familiar da doença também estão relacionados com o desenvolvimento da doença (SICHERI et al. 1996; NISHIMOTO et al. 2002; PARK et al. 2011; TABORDA e PROLLA 2012; ZILBERSTEIN et al. 2013).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DO AdG

Apesar de não haver um consenso quanto a classificação histopatológica de AdG a mais tradicional e bastante usada é a descrita por Laurén em 1965 que divide o AdG em três tipos histológicos principais: intestinal, difuso e misto, sendo que estes últimos apresentam características dos dois primeiros (LAUREN 1965; NAGINI 2012).

As lesões do tipo intestinal são caracterizadas pela formação de glândulas com diferentes graus de diferenciação que podem produzir ou não mucina. Grande parte desses tumores segue o mecanismo de carcinogênese descrito por CORREA (1988), que se caracteriza pela sequência: gastrite atrófica → metaplasia intestinal → displasia de baixo grau → displasia de alto grau e adenocarcinoma. Nesse mecanismo, a progressão da displasia pode seguir padrões diferentes, podendo ocorrer um número significativo de pequenas lesões com displasias de baixo grau que podem regredir, assim como lesões com displasia de alto grau que podem permanecer estáveis e não progredirem para adenocarcinomas (YAKIREVICH e RESNICK 2013).

Os tumores do tipo difuso são caracterizados pela perda de adesão celular ao epitélio, com presença de células pouco coesas sem formação de glândulas. Nestas lesões é bastante frequente observar a presença de células em anel de sinete, com núcleos periféricos e mucina intracelular. A carcinogênese dos tumores de tipo difuso tem um mecanismo pouco conhecido, provavelmente relacionado ao *H. pylori* e fatores genéticos.

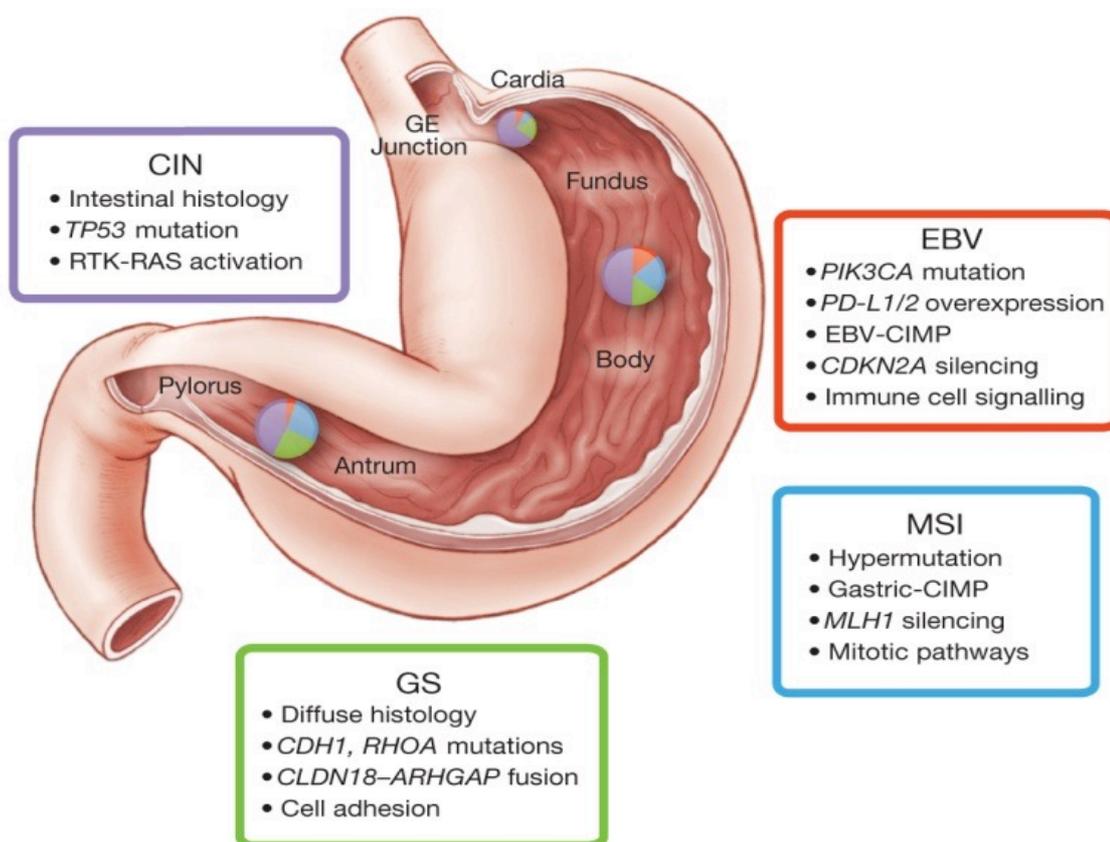
Existe a hipótese de que lesões precursoras originam-se de displasia de glândulas oxínticas e carcinomas *in situ* de células em anel de sinete (GHANDUR-MNAYMNEH et al. 1988). Estes tumores tendem a acometer pacientes jovens, distribuem-se de uma maneira uniforme entre os gêneros e apresentam disseminação de células tumorais na camada submucosa do estômago. Ainda, a lesão ulcerada pode se manifestar como uma infiltração difusa que caracteriza a linite plástica (MAEHARA et al. 1992).

Os tumores difusos estão frequentemente associados com alterações genéticas hereditárias, surgindo após inflamação crônica, especialmente na cárdia. A mutação germinativa no gene *CDH1*, codificador de E-caderina, é a alteração mais conhecida associada a estes tumores representando um passo crucial no processo de ativação de genes que causam um aumento na proliferação e com consequências no desenvolvimento do câncer (BOSMAN et al. 2010).

### **1.2.1 Classificação molecular do AdG**

Em 2014 o consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) propôs uma classificação molecular dividindo o câncer gástrico em quatro subtipos principais, sendo o primeiro composto por tumores positivos para o vírus Epstein-Barr e que apresentam mutações recorrentes de *PIK3CA*, hipermetilação do DNA, amplificação de *JAK2*, PD-L1 e PD-L2. O segundo grupo é formado por tumores com instabilidade de microssatélites, taxas de mutação elevadas, incluindo mutações em genes que codificam proteínas de sinalização oncogênica. O terceiro grupo abrange tumores genomicamente

estáveis, enriquecidos para o tipo histológico difuso e apresentam mutações em *RHOA* ou fusões envolvendo proteínas ativadoras de GTPase da família RHO. O quarto e último grupo são os tumores com instabilidade cromossômica, que mostram uma aneuploidia marcada e amplificação focal de receptores de tirosina quinase. Apesar dessa classificação ainda não ser utilizada na prática clínica dos tumores gástricos, a identificação desses subtipos possibilita a estratificação dos pacientes para terapia direcionada. A Figura 1 ilustra resumidamente as principais características dos subtipos de câncer gástrico de acordo a essa classificação (BASS et al. 2014).



**Fonte:** Adaptado de BASS et al. (2014).

**Figura 1** - Características moleculares dos subtipos de câncer gástrico

### 1.3 ASSOCIAÇÃO DA *HELICOBACTER PYLORI* E DO VÍRUS DE EPSTEIN BARR COM AdG

*Helicobacter pylori* (HP) é um agente patogênico gástrico que provoca inflamação gástrica crônica além de aumentar significativamente o risco de desenvolver úlcera duodenal e gástrica, linfoma gástrico e carcinoma gástrico distal (CAVALCANTE et al. 2012). O primeiro isolamento da HP na década de 1980 por MARSHALL trouxe para as comunidades médica e científica um novo entendimento da patogênese de doenças que afetam o trato digestivo. Desde então, a infecção pela HP tem sido associada ao desenvolvimento de gastrite aguda e crônica, gastrite atrófica, úlceras pépticas e ao AdG. O CG envolve a interação de três fatores principais: o agente (na grande parte dos casos o HP) e sua patogenicidade, as características do hospedeiro e o ambiente externo. Muitos genes de virulência do HP foram relatados entre aqueles de potencial importância no CG (ROESLER et al. 2012). A infecção pela HP com positividade para os genes *vacA s1m1* e *cagA* aumentam o risco do CG (PORMOHAMMAD et al. 2018).

Além dos fatores genéticos e ambientais, alterações que provocam estresse nas células gástricas e mecanismos adaptativos devidos a presença do *H. pylori* parecem ser cruciais durante a infecção crônica e progressão da doença gástrica. Em primeiro lugar, a infecção por *H. pylori* promove morte celular gástrica, resultando em lesões teciduais associadas a uma resposta inflamatória inicial (DÍAZ et al. 2018).

Além do HP na patogênese de CG, o vírus Epstein Barr (EBV) também está associado a pelo menos 10% dos AdG (TAKADA 2000). O CG associado ao EBV é definido como uma neoplasia onde há proliferação monoclonal de células epiteliais gástricas infectadas com EBV. Esta associação mostra algumas características clínico-patológicas distintas, tais como a predominância no sexo masculino, a predisposição para o estômago proximal, e uma proporção elevada do AdG tipo difuso (LIMA et al. 2008). O EBV é geralmente adquirido na infância e transmitido pela saliva podendo estabelecer infecção persistente em mais de 90% da população mundial adulta (CHEN et al. 2012). Além disso, como descrito anteriormente vários fatores não infecciosos estão associados ao AdG como ingestão de alimentos salgados, consumo de alimentos mal conservados, defumados, alimentos contaminados com aflatoxina, nitrato e fungos, anemia perniciosa e tabagismo (AJANI et al. 2017).

#### **1.4 PRINCIPAIS MODALIDADES TERAPÊUTICAS**

Os tumores gástricos são tratados por abordagem cirúrgica na qual se deve considerar a localização, tamanho, padrão e extensão da disseminação e tipo histológico do tumor. Tratamentos complementares à cirurgia como a radioterapia (RT) e a quimioterapia (QT) podem determinar melhor resposta da cirurgia. Assim, devido ao mau prognóstico, novas estratégias terapêuticas têm sido implementadas, como por exemplo, a utilização de QT neoadjuvante (AGBOOLA 1994). Em 1989 WILKE et al.

fizeram pela primeira vez um relato sobre a aplicação da QT neoadjuvante para o tratamento do AdG, abordando pacientes com tumores localmente avançados e irresssecáveis. A QT neoadjuvante pode melhorar a sobrevida dos pacientes com AdG, apresentando resposta completa de 5,8% e uma resposta parcial de 30,4% resultando em uma taxa de resposta geral de 36,2% (PROSERPIO et al. 2014).

Uma das formas de tratamento padrão para o CG é QT perioperatória seguida de cirurgia utilizando as drogas fluoropirimidina e oxaliplatina seguida de gastrectomia, além do esvaziamento dos nódulos linfáticos próximos, sendo a principal alternativa terapêutica e única chance de cura (COSTA et al. 2012). A QT perioperatória aumenta significativamente a taxa de ressecção curativa, sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com adenocarcinomas gástricos localmente avançados (CUNNINGHAM et al. 2006; YCHOU et al. 2011; CATENACCI et al. 2017). Acompanhado as atualizações dos estudos citados acima, em nossa instituição o tratamento é feito a base de FLOT (5-fluorouracil, leucovorina, oxaliplatina e docetaxel).

Em casos avançados, a terapia alvo disponível é restrita ao uso de trastuzumabe em combinação com QT. Em setembro de 2017 o Pembrolizumab, um inibidor de PD-1 (Programed Cell Death-1), foi aprovado pelo FDA (US Food and Drug Administration) para uso no AdG avançado com resultados promissores. Este inibidor de “check point” foi recentemente aprovado pela ANVISA no Brasil. No momento está em curso um ensaio clínico fase 3 com Nivolumab, uma IgG4 também inibidora de PD-1

mostrando que a abordagem terapêutica do CG com imunoterapia continua sendo bastante investigada (KANG et al. 2017).

## **1.5 RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

O CG é geralmente diagnosticado em estágios avançados, devido a inespecificidade dos sintomas. Dentre as vantagens da QT neoadjuvante estão a melhora na ressecabilidade e o fato de constituir-se em uma terapia sistêmica na qual o tratamento pode ser administrado ao mesmo tempo em que a resposta a neoplasia é avaliada, permitindo desse modo que a terapia possa continuar somente em pacientes com maior probabilidade de resposta benéfica em AdG com progressão rápida.

A QT neoadjuvante permite avaliar a sensibilidade do tumor à quimio *in vivo*, a eventual terapia pós-operatória final pode ser adaptada a resposta individual ao tratamento pré-operatório (SCHUHMACHER et al. 2013). Entretanto, alguns estudos sugerem que apenas os pacientes que respondem à QT neoadjuvante com toxicidade tolerável são potencialmente beneficiados, ao contrário dos não respondedores ou sem progresso durante a terapia. Portanto, a procura por marcadores preditivos para identificar os pacientes que poderiam se beneficiar da QT neoadjuvante são de extrema importância para prever a resposta ao tratamento.

## 1.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O 5-fluorouracil (5-FU) é um potente agente antineoplásico utilizado para o tratamento de várias neoplasias malignas devido à sua ampla atividade antitumoral e à ação sinérgica com outras drogas (LIU et al. 2018). O 5-FU é um antimetabolito que atua inibindo processos biossintéticos essenciais, ou incorporado em macromoléculas, tais como DNA e RNA, inibindo a sua função normal. 5-FU é um derivado de Uracil e um análogo da Timina, sua eficiência em reduzir tumores foi atribuída principalmente pela incorporação errônea de fluoronucleótidos no RNA e DNA e à inibição da enzima timidilato sintase (TS) (LONGLEY et al. 2003).

O 5-FU é um análogo do uracil com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar do hidrogênio. Ele entra rapidamente na célula utilizando o mesmo mecanismo de transporte facilitado como o Uracil (WOHLHUETER et al. 1980). No entanto, o 5-FU é convertido intracelularmente em vários metabólitos ativos tais como: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP) esses metabólitos ativos interrompem a síntese de RNA e a ação de TS (DIASIO e HARRIS 1989)

A QT é uma das principais formas de tratamento do câncer, porém sua eficácia é extremamente limitada devido a resistência à droga. A falha de resposta à terapia em pacientes com câncer pode estar relacionado a diversos fatores, como por exemplo, alterações genéticas e/ou epigenéticas

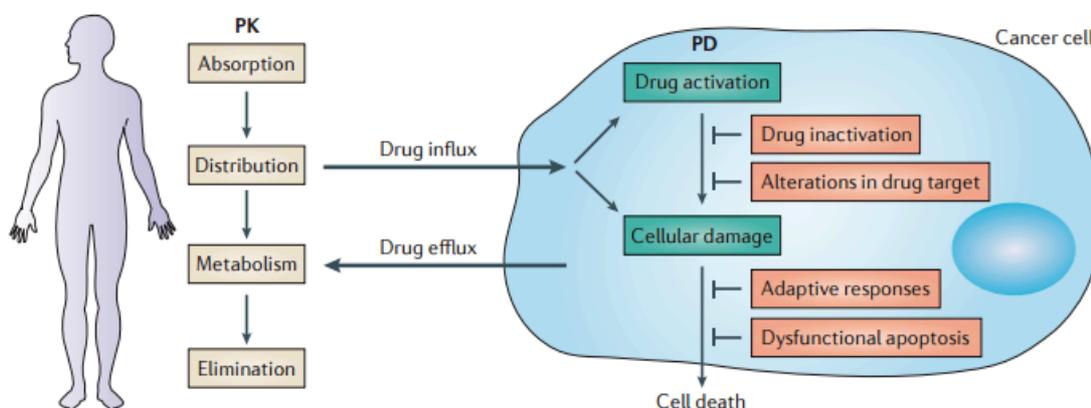
nas células tumorais que afetam a sensibilidade à droga. Os fatores ligados ao paciente incluem a má absorção ou metabolismo acelerado, ou ainda, a excreção da droga, resultando em baixos níveis séricos e baixa tolerância aos efeitos da droga. Isso acontece especialmente em pacientes idosos resultando em uma necessidade de reduzir a dose abaixo dos níveis ideais, e incapacidade de direcionar o fármaco para o local do tumor (GOTTESMAN 2002).

Buscando por novas abordagens terapêuticas cada vez mais específicas e eficientes no tratamento do câncer, houve um avanço, surgindo assim nas últimas décadas uma vasta gama de novos tratamentos, assim a terapia-alvo e drogas mais modernas têm sido destacadas. Porém, ainda existe uma grande limitação para cura de muitos tumores devido, principalmente, à resistência de células tumorais às tais terapias. Há mais ou menos meio século, a resistência à terapia tem sido amplamente estudada com objetivo de entender quais fatores e mecanismos estão envolvidos nesse fenômeno, mas até hoje, na era da terapia alvo molecular e da medicina personalizada, alguns pacientes respondem a determinada terapia e outros apresentam apenas uma resposta parcial ou transitória à essa mesma terapia (GOTTESMAN 2002; KUCZYNSKI et al. 2013).

Dois tipos de resistência à terapia antitumoral podem ser destacadas: a intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca, também chamada de resistência inata ou primária, é preexistente nas células tumorais antes de receber o tratamento, podendo estar relacionada a alterações genéticas ou epigenéticas do próprio paciente, do tumor ou do microambiente tumoral. A

resistência adquirida, também chamada de evasiva, adaptável, ou secundária, pode ser desenvolvida durante o tratamento devido às mutações causadas pelo mesmo.

Diferentes mecanismos de resistência estão envolvidos nas diferentes terapias anticâncer. Esse fato é evidenciado pelas diferenças existentes nos mecanismos moleculares de resistência à QT, entre esses mecanismos o aumento do efluxo de drogas, mutações nos alvos da droga, alterações no metabolismo das drogas, inativação de mecanismos de morte celular, ativação de mecanismos de sobrevivência celular, alterações epigenéticas, influência do microambiente e presença de células tronco tumorais (CSCs – *Cancer Stem Cells*), que são potencialmente resistentes à maioria das terapias oferecidas atualmente (HOLOHAN et al. 2013). Alguns fatores importantes que podem de certa maneira limitar a quantidade de droga que atinge o tumor, a toxicidade para os tecidos normais e os efeitos farmacocinéticos, como a solubilidade do fármaco, a distribuição sistêmica, metabolismo e eliminação são apresentados na Figura 2.



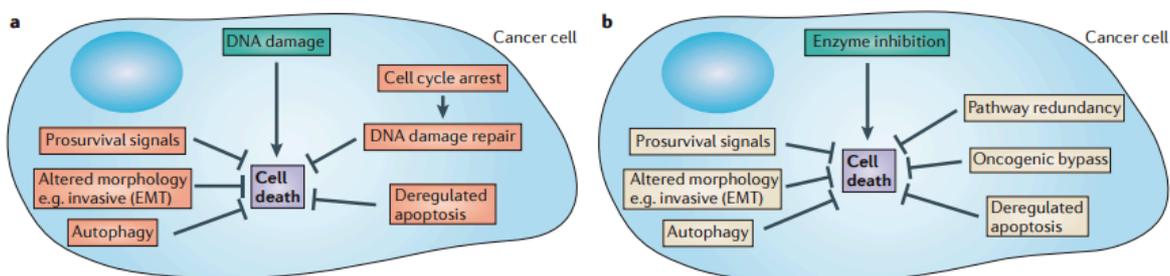
Fonte: Adaptado de HOLOHAN et al. (2013)

**Figura 2** - Princípios gerais de resistência a drogas. Fatores farmacocinéticos (PK), tais como a absorção da droga, distribuição, metabolismo e eliminação, limitam a quantidade de droga administrada sistemicamente que atinge o tumor. No tumor, os efeitos da droga sobre as células tumorais são designados coletivamente por suas propriedades farmacodinâmicas (PD).

A inativação ou a falta de ativação de drogas são também mecanismos relevantes para a resistência à quimioterápicos (HOLOHAN et al. 2013). Tais mecanismos são altamente específicos para cada classe de drogas, por exemplo, compostos de platina podem ser inativados pela L-Glutationa, e a conversão de anti-metabólitos que são drogas que inibem a biossíntese de processos essenciais, ou por serem incorporadas a macromoléculas como DNA e RNA, inibindo as funções normais das células. Anti-metabólitos tais como 5-fluorouracil (5-FU) e metotrexatos nas suas formas mais ativas não ocorrem na ausência de atividades enzimáticas (HOUGHTON e HOUGHTON 1983; SCHWARTZ et al. 1985). Portanto, podemos ressaltar que compreender os mecanismos de resistência às

drogas citotóxicas podem ajudar a entender os principais mecanismos de resistência às mais recentes terapias alvo moleculares (Figura 3).

Apesar da QT com 5-fluorouracil (5-FU) ser a primeira escolha para o tratamento de câncer gástrico avançado, sua eficácia está limitada pela resistência à droga como descrito acima. Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que células residuais de câncer gástrico resistentes ao 5-FU apresentam algumas características de célula-tronco tumoral, tais como: alta porcentagem de células quiescentes, aumento da capacidade de auto-renovação e tumorigenicidade (XU et al. 2015), sugerindo que a existência de células-tronco tumorais contribuem para quimioresistência.



Fonte: Adaptado de HOLOHAN et al. (2013).

**Figura 3** - Fatores que influenciam a resistência à quimioterápicos citotóxicos e à terapia alvo.

As alterações de metilação do DNA adquiridas no processo de indução de resistência à drogas podem causar diferenças transcricionais em alguns grupos de genes entre uma célula resistente e sua célula parental após o tratamento. Foi demonstrado que a hipermetilação mediada por desregulação de genes em células resistentes poderia levar à resistência adquirida ao 5-FU (SHEN et al. 2018). Portanto, a procura de marcadores preditivos para identificar os pacientes que poderiam se beneficiar da QT neoadjuvante são de extrema importância para prever a resposta ao tratamento (XU et al. 2014).

Nos últimos anos muitos estudos têm buscado técnicas mais seguras e precisas para identificar biomarcadores preditivos da resposta a terapia e a biópsia líquida tem sido apontada como uma grande inovação no campo da medicina de precisão (SIRAVEGNA et al. 2017). Esta tem sido usada para determinar, em tempo real, o perfil genômico de pacientes com câncer, monitorar a resposta ao tratamento, quantificar a doença residual e além disso para avaliar o surgimento da resistência à terapia, sendo uma ferramenta não invasiva para a descoberta de biomarcadores. Estas podem refletir melhor o perfil genético de todos os subclones de tumor, ao contrário das biópsias de tecido que são obtidas de apenas uma região tumoral (CHENG et al. 2016).

As biópsias líquidas baseiam-se na análise de células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA) ou vesículas extracelulares (VEs) derivadas de tumor que podem ser lançadas para a corrente sanguínea (HEITZER et al. 2017). Portanto, muito tem sido

explorado no contexto de biomarcadores circulantes como o ctDNA e a célula tumoral circulante neste contexto (WAN et al. 2017) e particularmente em tumores gástricos (ZHOU et al. 2017; NORDGÅRD et al. 2018).

Por outro lado, um elemento importante da biópsia líquida são as vesículas extracelulares liberadas por células e presentes em líquidos corpóreos. Seu uso para propósitos diagnósticos e como agentes terapêuticos tem sido amplamente discutido mas desafios tecnológicos ainda precisam ser resolvidos para que estas se tornem eficientes nestes contextos (STAHL e RAPOSO 2018).

As VEs têm um papel fundamental como agentes de comunicação entre células e tecidos tanto no contexto fisiológico como patológico (STAHL e RAPOSO 2018). Especificamente no processo tumoral as VEs estão envolvidas com o remodelamento do microambiente tumoral, regulação da resposta imune, resposta a terapia e na formação da metástase (BECKER et al. 2016) e em todos os processos envolvidos na resistência a terapia, apontados na Figura 3 (KANADA et al. 2016). Portanto, o entendimento do potencial de VEs como biomarcadores de várias etapas do processo tumoral inclusive na resistência a QT apresenta um desafio científico de grande relevância clínica.

## 1.7 VESÍCULAS EXTRACELULARES

Em 1946 foram apontadas as primeiras observações de Vesículas Extracelulares (VEs) descritas como partículas procoagulantes derivadas de plaquetas plasmáticas (CHARGAFF e WEST 1946). Em 1967, WOLF forneceu evidências de que plasmas depletados de plaquetas sedimentadas por centrifugação de alta velocidade contêm um material em forma de micropartículas, mas diferenciadas das plaquetas intactas. Sugeriu-se então que este material, doravante seria denominado "pó de plaquetas" do inglês "*platelet dust*". Estas foram descritas como sendo abundantes em fosfolipídeos e apresentavam propriedades coagulantes, porém, até aquela data eram desconhecidas suas funções fisiológicas. Com a retomada dos estudos moleculares sobre estas partículas, elas batizadas de "exossomo" em 1987, porém além sua participação na exocitose nada mais se sabia a cerca de suas funções (JOHNSTONE et al. 1987).

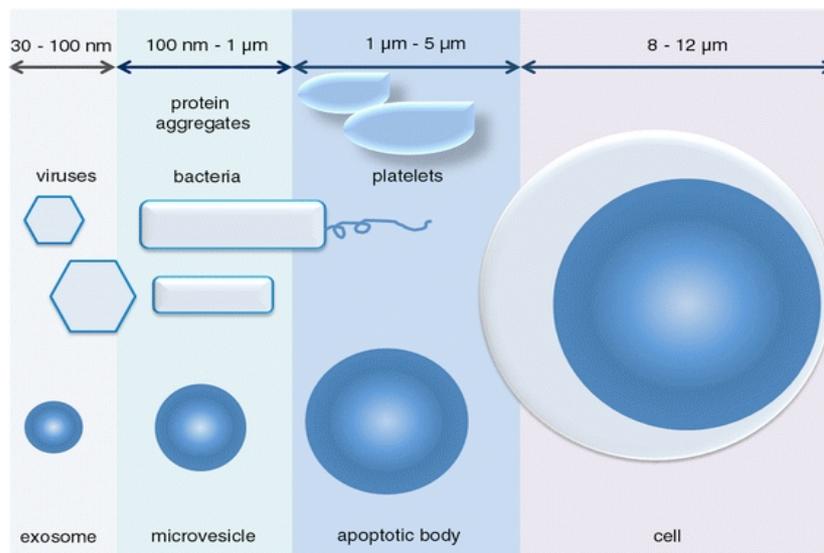
Com a descoberta de que as VEs contêm RNA, incluindo microRNA, estas ganharam uma atenção especial como mediadores de comunicação célula-célula facilitando processos biológicos importantes (RATAJCZAK et al. 2006; VALADI et al. 2007).

### 1.7.1 Biogênese e secreção de VEs

As VEs foram inicialmente classificadas em duas populações principais: exossomos e microvesículas (HEIJNEN et al. 1999). Os exossomos são derivados de vesículas intraluminais (VILs) presentes no

interior de corpos multivesiculares localizados no citoplasma de diferentes tipos celulares e seu tamanho varia entre 30-100nm de diâmetro. Eles são liberados para o espaço extracelular à medida que os MVBs (do inglês *Multivesicular Bodies*) se fundem com a membrana plasmática (FOLKMAN et al. 1971; THÉRY et al. 2002). Um conjunto específico de proteínas, lipídios, e ácidos nucleicos está presente nestas partículas (OHNO et al. 2013) e estes podem ser secretados por várias linhagens e tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (HENDERSON e AZORSA 2012). Nos exossomos encontram-se ainda proteínas envolvidas no transporte celular e na fusão de membranas (flotilinas e anexinas), componentes da biogênese dos MVBs (*TSG101* e *Allix*), integrinas e tetraspaninas (CD9, CD63, CD8 e CD82), proteínas de choque térmico - *heat shock proteins* (Hsp70 e Hsp90) e proteínas modificadas pós-traducionalmente (cinases, fosfatases, e glicosiltransferases) (HENDERSON e AZORSA 2012). Entre as células secretoras de exossomos encontram-se as células dendríticas (THÉRY et al. 2002; SIMPSON et al. 2008), as células-tronco (CHAPUT 2006), os linfócitos B (RAPOSO et al. 1996), mastócitos (DIMITRIS et al. 2002), queratinócitos (CHAVEZ-MUÑOZ et al. 2009) e adipócitos (MÜLLER et al. 2011) (Figura 2).

Por outro lado, as microvesículas foram descritas como provenientes da membrana plasmática, apresentando tamanho maior em relação aos exossomos – 100 a 1000nm (Figura 4).



Fonte: GYÖRGY et al. (2011)

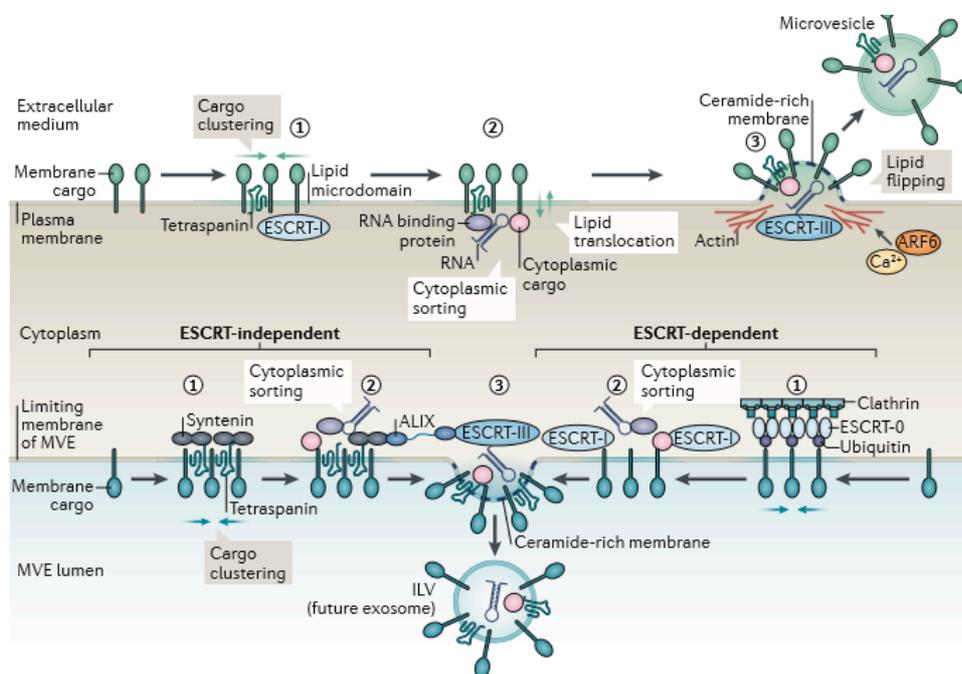
**Figura 4** - Tamanho médio das vesículas extracelulares: Figura esquemática diferenciando os diferentes tamanhos das vesículas extracelulares.

A biogênese, composição proteica e a secreção de microvesículas e exossomos passam por mecanismos diferentes e apesar de ambas as populações serem secretadas por células elas podem ter funções distintas (HEIJNEN et al. 1999). As microvesículas originam-se pelo brotamento de protusões citoplasmáticas diretamente na membrana celular, seguido de sua liberação no espaço extracelular (COCUCCI et al. 2009), e têm a composição de seus marcadores de superfície dependente da composição da membrana de origem (LEE et al. 2012). Os exossomos são formados a partir de invaginações da membrana que formam os endossomos e corpos multivesiculares que podem se fundir à membrana celular liberando o seu conteúdo (exossomos) no meio extracelular (RAPOSO e STOORVOGEL 2013). Os endossomos primários (early endosomes), depois de maturados, dão origem aos endossomos tardios (late endosomes), sendo que durante

esse processo passam a acumular vesículas intraluminais (ILVs - Intraluminal vesicles) no seu lúmen. O processo de biogênese de exossomos é coordenado por proteínas do complexo ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) que consiste de aproximadamente trinta proteínas organizadas em quatro complexos, em conjunto com outras proteínas como VPS4, VTA1 e ALIX (COLOMBO et al. 2014) além de uma série de outras proteínas que têm sido descritas (DE GASSART et al. 2004; HANSON et al. 2009; RAIBORG e STENMARK 2009; TAMAI et al. 2010; MAYERS e AUDHYA 2012; PANT et al. 2012).

Mecanismos de *sorting* estão envolvidos em diferentes etapas da biogênese de exossomos e microvesículas. Cargos programados para a secreção devem ser direcionados para o local de produção, sendo este na membrana plasmática (para microvesículas) ou na membrana limitante dos MVBs (para exossomos). Por outro lado, os cargos são enriquecidos nas vesículas por um mecanismo escalonado de aglomeração e brotamento seguido por fissão e liberação de vesículas. A Figura 5 ilustra a biogênese das VEs onde diversas maquinarias de *sorting* estão envolvidas em diferentes etapas do processo. Em microvesículas, os lipídeos e proteínas associados à membrana são agrupados em microdomínios na membrana plasmática (no topo) e na membrana limitante do MVB em exossomos (parte inferior) (etapa 1). Tais microdomínios certamente participam no recrutamento de componentes solúveis, tais como proteínas citosólicas e RNA, destinadas ao *sorting* (etapa 2). Em conjunto, as formações destes microdomínios agrupados juntamente com maquinarias adicionais

promovem a formação de membranas, seguida por um processo de fissão na membrana plasmática em direção ao meio extracelular ou na membrana limitadora do MVB em direção ao lúmen do MVB (etapa 3). Mecanismos de biogênese do exossomo envolvem subunidades do complexo endossômico de *sorting* necessário para o transporte (ESCRT), ESCRT-III é necessário para a cisão das vesículas intraluminais (ILVs) no lúmen do MVB, mas o cargo e brotamento por membrana podem ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de ESCRT (VAN NIEL et al. 2018).



Fonte: VAN NIEL et al. (2018)

**Figura 5** - Biogênese de VEs: Figura mostrando as diferentes proteínas envolvidas no processo da biogênese de vesículas extracelulares.

O complexo ESCRT-0, formado pela proteína HRS (hepatocyte growth factor), que associado a STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule) reconhece a ubiquitina presente em determinadas proteínas (DE GASSART et al. 2003; LEE et al. 2011; NICKEL e RABOUILLE 2009; BAIETTI et al. 2012), recrutando TSG101 do complexo ESCRT-I, que por sua vez recruta o complexo ESCRT-III por meio de ESCRT-II ou ALIX. Os complexos ESCRT-I e II são responsáveis pela deformação da membrana, com cargo proteico selecionado, além disso o complexo ESCRT-I também participa do recrutamento do ESCRT-III e os componentes desse complexo conduzem a cisão das vesículas. Finalmente, a ATPase VPS4 é recrutada para dissociar os oligômeros, que são então reciclados (RUSTEN et al. 2012; HANSON e CASHIKAR 2012). Existem evidências de que ocorre a formação de MVBs e ILVs mesmo sem o funcionamento dos ESCRTs, sugerindo que os MVBs e suas ILVs podem ser originadas de forma dependente e independentemente dos ESCRTs (THEOS et al. 2006; STUFFERS et al. 2009; CARAYON et al. 2011; EDGAR et al. 2014). A fusão dos MVBs com a membrana plasmática para liberação dos exossomos no espaço extracelular é subordinada a atividade de proteínas da família Rab como a Rab27A, Rab27B e também de GTPases (OSTROWSKI et al. 2010).

Em humanos existem cerca de 70 proteínas da família Rab, muitas das quais são importantes participantes na regulação do transporte intracelular das vesículas, estando envolvidas no brotamento e mobilidade pela interação com o citoesqueleto, até a fusão das vesículas à membrana (STENMARK e OLKKONEN 2001; OSTROWSKI et al. 2010). A Rab 11 foi a

primeira proteína da família Rab descrita como importante na secreção de VEs. Seu papel de destaque nessa atividade foi observado por SAVINA et al. (2003) em um estudo mostrando que a inibição dessa proteína levou à diminuição da secreção de exossomos. A secreção de exossomos também já foi associada à dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (SAVINA et al. 2003) e outros fatores fisiológicos como pH e hipóxia poderiam afetar a produção de VEs (PAROLINI et al. 2009).

MATHIVANAN e SIMPSON (2009) criaram o primeiro banco de dados denominado de ExoCarta (<http://exocarta.org>) que armazena o conteúdo de exossomos identificados em mamíferos. Posteriormente o ExoCarta foi incorporado a um novo banco denominado Vesiclepedia (<http://microvesicles.org>) (KALRA et al. 2012), este reuniu dados obtidos de vários tipos de VEs. KIM et al. (2013) criaram o Evpedia (<http://evpedia.info>), em 2017 este foi atualizado e apresenta o conteúdo de 443 estudos e mais de 592.870 moléculas catalogadas. Esses bancos têm extrema relevância por reunir diferentes achados para melhor compreensão do vasto campo de VEs.

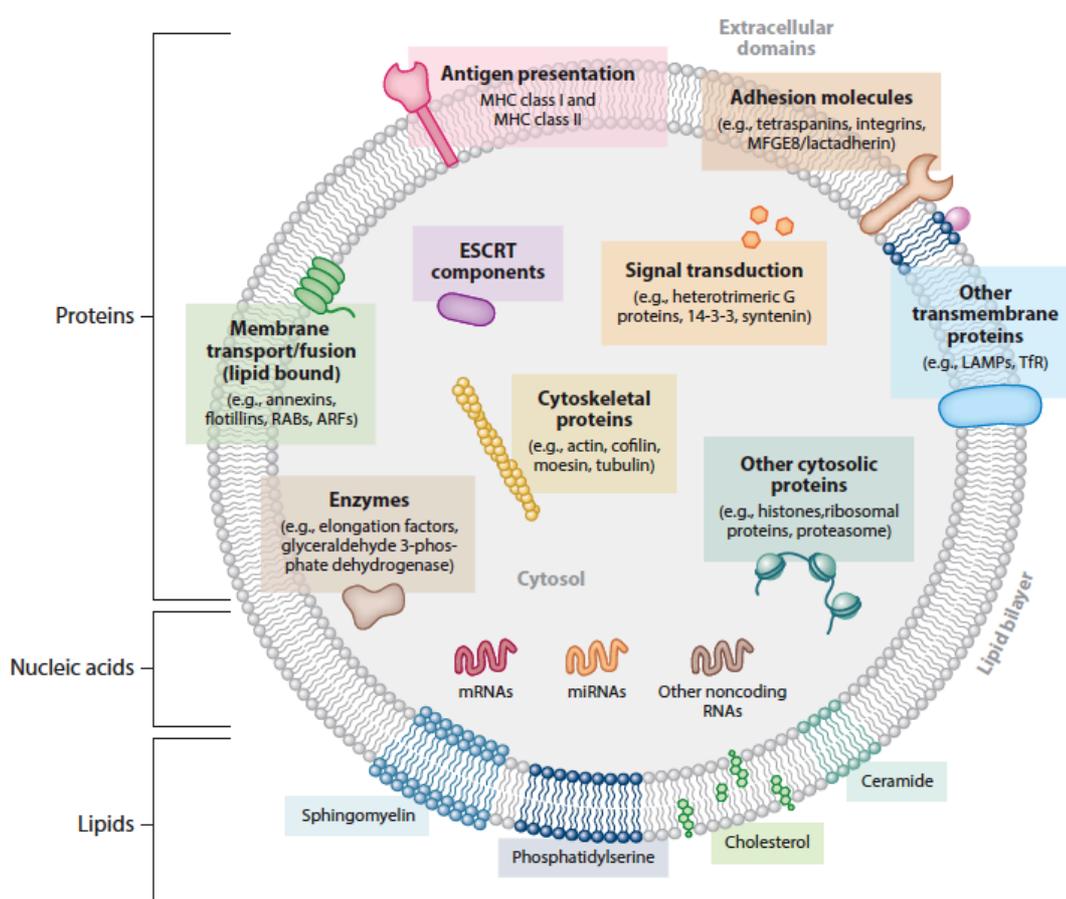
Na Figura 6 podemos observar que os exossomos carregam um conteúdo rico e diversificado que pode ser usado como marcador de exossomos: as chaperonas, Rabs, enzimas metabólicas e a proteína prion celular ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) (FÉVRIER e RAPOSO 2004; VELLA et al. 2007; ALAIS et al. 2008; SIMONS e RAPOSO 2009). As integrinas destacam-se no processo de adesão celular, actina e cofilina proteínas de citoesqueleto, flotilina conhecidas como proteínas de *lipid-rafts*, as proteínas transmembrana da

família de tetraespaninas, como CD9, CD63, CD81 e CD82, as proteínas Alix, TSG101 que são proteínas componentes da biogênese dos MVBs e clatrina envolvidas com a biogênese das VEs, e as proteínas de apresentação de antígeno, como MHC I e II além disso as proteínas de choque térmico (Hsp70 e Hsp90), proteínas modificadoras pós translacional (cinases, fosfatases e glicosiltransferases) colesterol, lipídeos, esfingolipídeos e ceramidas (MATHIVANAN et al. 2012).

VALADI et al. (2007) identificaram os primeiros ácidos nucleicos em VEs demonstrando que os mRNAs presentes nos exossomos eram funcionais. O grupo também observou que um destes mRNAs foi transferido de células de camundongo para uma linhagem de células humanas. Ainda, foi demonstrado que este mRNA foi passível de ser traduzido *in vitro*, produzindo assim uma proteína murina na célula receptora. Foram identificadas diferenças no conteúdo transcricional entre os exossomos e as células secretoras, sendo que foram detectados exclusivamente nos exossomos 270 a 1.300 transcritos em comparação com as células que os secretaram. Em estudo com cultura primária de glioblastoma, 4.700 a 27.000 transcritos foram encontrados exclusivamente nas VEs (SKOG et al. 2008).

O DNA genômico em VEs foi descrito pela primeira vez por BALAJ et al. (2011). Nesse trabalho foi identificada a presença do DNA dupla fita em VEs derivadas de linhagens tumorais de meduloblastoma, onde foi demonstrado a amplificação do oncogene c-Myc (BALAJ et al. 2011). Em outro estudo desenvolvido por este grupo foi avaliado um painel de linhagens tumorais onde se demonstrou que o DNA contido em VEs é

predominantemente dupla fita, representando sem viés todo genoma. Este DNA reflete ainda o perfil mutacional da célula secretora e foi possível a detecção de mutações em *BRAF* e *EGFR* nas VEs derivadas de melanoma e tumor de pulmão (THAKUR et al. 2014). Também já foram identificadas mutações em *KRAS* e *TP53* no DNA contido em VEs derivadas do soro de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas (KAHLERT et al. 2014).



Fonte: Adaptado de COLOMBO et al. (2014).

**Figura 6** - Composição das vesículas extracelulares: Figura esquemática demonstrando a composição geral que compõe as VEs.

Entre as diferentes funções das VEs a comunicação celular tem sido destacada como a principal. A interação das VEs com receptores de membrana de células alvo pode modular sinais intracelulares nessas células. Além disso, diferentes moléculas intravesiculares, como os miRNAs, podem ser transferidos para células alvo ou receptoras e modular o perfil proteico dessas células, além de interferir na sinalização celular. Essas características moleculares e estruturais das VEs conferem a elas a capacidade de atuar como plataformas para sinalização intercelular altamente eficiente (RATAJCZAK et al. 2006; MARTINS et al. 2013).

### **1.7.2 Papel das vesículas extracelulares no câncer**

As VEs podem carrear oncoproteínas, que quando incorporadas nas células vizinhas levam à transição neoplásica (RAJAGOPAL e HARIKUMAR 2018). Os processos de invasão e metástase podem ser modulados por vesículas derivadas de células tumorais, que agem no microambiente tumoral ou então serem lançadas para a circulação sanguínea (RATAJCZAK et al. 2006; LOGOZZI et al. 2009). Nosso grupo participou em um estudo onde foi descrita a relação entre VEs secretadas por melanoma e a formação do nicho pré-metastático (PEINADO et al. 2012). Estas vesículas foram capazes de educar progenitores da medula óssea para um fenótipo pró-angiogênico e pró-metastático, através do receptor de tirosina quinase MET. A migração destes progenitores “educados” ao pulmão gerou um ambiente pró-inflamatório que propicia a formação da metástase (PEINADO et al. 2012).

VEs podem modular nas células alvo sinais envolvidos em processos de adesão celular, proliferação, sobrevivência, inflamação, resposta imune inata e adaptativa, coagulação sanguínea, trombose e angiogênese (GRAVES et al. 2004; JANOWSKA-WIECZOREK et al. 2005; AL-NEDAWI et al. 2008; SKOG et al. 2008; GRANER et al. 2009; HOOD et al. 2009; RISTORCELLI et al. 2009; GHOSH et al. 2010; MCCREADY et al. 2010; SHELDON et al. 2010; ANTONYAK et al. 2011; PEINADO et al. 2012). VEs derivadas de células tumorais têm sido amplamente estudadas e destacadas no campo de biomarcadores tumorais (KATSUDA et al. 2014). Atualmente encontram-se sob intensa investigação por sua composição, funções biológicas e distribuição, assim como seu potencial diagnóstico e terapêutico (SZATANEK et al. 2017). No entanto, em CG existem poucos estudos centrados em VEs. Sabe-se que pacientes com CG estádios 2 a 4 apresentam um número significativamente maior de VEs circulantes que aqueles de estágio 1 ou ainda que indivíduos controle saudáveis (BARAN et al. 2010). Foi possível observar em outro estudo com linhagens celulares de CG, que CD44H e CD44v6 (receptores hialurônicos) e CCR6 (receptor de quimiocina) podem desempenhar um papel na ligação de VEs derivadas do tumor às células autólogas, enquanto HER-2 associado à CD24 está envolvido na promoção do crescimento das células tumorais. A pré-exposição de células às VEs derivadas de células tumorais resultou no aumento do crescimento do tumor e indução da angiogênese em modelos animais (STEC et al. 2015). Em um estudo recente foi demonstrado que exossomos de células tumorais associados à fibroblastos CD9 positivos

foram capazes de estimular o processo de migração em linhagens celulares de CG (MIKI et al. 2018).

### **1. VEs derivadas de células tumorais no microambiente tumoral**

As VEs estão emergindo como mediadores de comunicação no microambiente tumoral (SAMUEL et al. 2018). A progressão tumoral envolve a capacidade das células tumorais de comunicarem-se com as células normais no seu microambiente. As VEs derivadas células tumorais desempenham papel importante e têm sido bastante estudadas devido ao potencial de participar na transferência horizontal de proteínas de sinalização entre células. VEs secretadas por células tumorais podem afetar o microambiente tumoral ao induzirem a transformação de células normais do estroma. Esta transformação contribui para a progressão do câncer (expansão da massa tumoral) de maneira que não depende somente da proliferação das células tumorais em si (ANTONYAK et al. 2011). Em glioblastomas e CG, por exemplo, os exossomos têm papel importante sinalizando para o aumento da proliferação de forma autócrina e parácrina (SKOG et al. 2008; QU et al. 2009).

Fibroblastos associados ao tumor são importantes componentes celulares do microambiente tumoral na maioria dos cânceres sólidos. Os exossomos derivados de fibroblastos associados ao câncer inibem a fosforilação oxidativa mitocondrial aumentando assim a glicólise e a carboxilação redutora dependente da glutamina em células tumorais (ZHAO et al. 2016b). VEs secretadas por células de câncer de próstata com

aumento de expressão de EBAG9 carregam esta última proteína que é transferida para o microambiente facilitando o escape de tumores do sistema imune através da inibição da citotoxicidade das células T e modulação da expressão gênica. Nesse estudo foi demonstrado ainda que um anticorpo neutralizante para EBAG9 poderia resgatar a supressão imune mediada por VEs pela recuperação da citotoxicidade das células T (MIYAZAKI et al. 2018).

## **2. VEs derivadas de células tumorais na angiogênese**

O papel da angiogênese no crescimento tumoral foi sugerido como alvo terapêutico desde a década de 70 (FOLKMAN et al. 1971). VEs podem mediar a angiogênese estimulando-a ou inibindo-a e esses efeitos são altamente dependentes do conteúdo e da expressão de molécula de superfície que podem ser altamente moduladas pelo estímulo usado para induzir a produção de VEs (TODOROVA et al. 2017). VEs têm o potencial de fornecer informações complexas para células endoteliais e induzir sinalização pro ou anti-angiogênica. Como sistemas dinâmicos em resposta a mudanças no microambiente, as VEs adaptam sua composição de carga para modular o processo de angiogênese (TODOROVA et al. 2017).

Os principais mecanismos envolvidos na modulação da estimulação da angiogênese por VEs são a transferência de miRNAs (miR-126, miR-214, miR-296, miR125a, miR-31 e miR-150), transferência de proteínas (VEGF, FGF-2, PDGF, c-kit, SCF, RANTES, CD40L, CRP e metaloproteases), transferência de lipídeos (S1P), ativação de vias de sinalização (PI3K,

ERK1/2, Wnt4/ $\beta$ -catenin e NF- $\kappa$ B), transferência de fatores de transcrição (STAT3 e STAT5) e inibição da angiogênese, indução de estresse oxidativo e endocitose mediada pelo receptor LDL (TODOROVA et al. 2017).

DEREGIBUS et al. (2007) demonstraram que as VEs secretadas por progenitores de células endoteliais estimulam a angiogênese, células endoteliais HMECs e HUVECs, quando internalizaram VEs foram capazes de formar estruturas capilares *in vitro* em matrigel (DEREGIBUS et al. 2007). Além disso células endoteliais tratadas com VEs também foram capazes de formar vasos funcionais *in vivo* em camundongos e o tratamento com RNase inibiu efeitos pro-angiogênicos de VEs sugerindo assim que é necessária a transferência de RNAs para estimular as células endoteliais.

VEs podem também estimular angiogênese pela transferência do receptor oncogênico EGFR, ativando nas células endoteliais as vias de sinalização MAKT e AKT que levam à expressão autócrina do fator pró-angiogênico VEGF (AL-NEDAWI et al. 2009). Este efeito angiogênico é inibido pelo bloqueio da interação VEs-célula pela anexina-V, demonstrando que a transferência de VEs é responsável pela ativação das células endoteliais.

### **3. VEs derivadas de células tumorais na evasão do sistema imune**

A evasão do sistema imune é um processo no qual as células tumorais escapam da destruição por células imunológicas do hospedeiro. VEs secretadas por células tumorais (da linhagem de carcinoma de próstata LNCaP) contribuem para a evasão do sistema imune pela presença do

ligante FasL na membrana, que por sua vez se liga ao receptor Fas de linfócitos T citotóxicos CD8, induzindo sua apoptose (ABUSAMRA et al. 2005). Este efeito é inibido pelo tratamento das VEs com anticorpos que bloqueiam FasL, sugerindo que uma interação direta entre os ligantes das VEs e o receptores nos linfócitos T seja necessária para a indução da apoptose.

Recentemente foi demonstrado que a alta expressão de PD-L1 em monócitos tratados com exossomos derivados de células tronco e células CD14<sup>+</sup> infiltrantes ambas de glioblastoma correlaciona-se predominantemente com o aumento da fosforilação de STAT3 e, em alguns casos, com p70S6 quinase fosforilada e Erk1/2. Os exossomos derivados de GBM são segregados por fatores de liberação que são potentes moduladores do microambiente imunossupressor associado ao GBM, elucidando assim um novo mecanismo de modulação de exossomos derivados de células tronco tumoral, de polarização de macrófagos M2 e indução imunossupressiva de PD-L1 (GABRUSIEWICZ et al. 2018).

Também já foi demonstrado que VEs secretadas por linhagens de carcinoma de ovário (OVCAR3, SKOV3 e AD10) estimulam a expansão e a atividade de linfócitos T regulatórios, que promovem a tolerância imunológica pela secreção de citocinas imunossupressoras, como TGF $\beta$  e IL-10 (SZAJNIK et al. 2010). Outro estudo demonstrou que VEs derivadas do plasma de pacientes com melanoma avançado alteram a diferenciação normal de monócitos que em indivíduos saudáveis se transformam de células dendríticas para células mielóides sem capacidade fagocítica e com

atividade imunossupressora em células T mediada por TGF $\beta$  (VALENTI et al. 2006).

Resultados bastante interessantes mostram que as VEs podem induzir imunidade tumoral específica, revertendo o crescimento tumoral, o que representa um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de vacinas antitumorais (CASTELLANA et al. 2009; LIU et al. 2015).

#### **4. VEs derivadas de células tumorais em invasão e metástase**

Além de evasão da vigilância imune, as células tumorais necessitam vias alternativas para crescer e colonizar outros órgãos ou tecidos. Essas VEs carregam importantes informações moleculares necessárias para modulação do processo metastático, por induzir mudanças no estroma tumoral, promovendo a angiogênese e favorecendo a transição epitelio-mesenquima (O'LOGHLEN 2018). Uma vez que VEs contêm miRNAs, proteínas, metabólitos livres e outras moléculas, portanto, parece que o estudo de um único componente é insuficiente para justificar os efeitos das VEs em metástases. Entretanto sabe-se por exemplo que VEs derivadas de células de adenocarcinoma ductal de pâncreas carregam uma proteína denominada MIF até ao fígado, a qual é responsável pelo preparo do nicho pré-metastático nesse órgão (COSTA-SILVA et al. 2015). Se forem entendidos os mecanismos moleculares relacionados aos componentes funcionais das VEs estas poderiam ser projetados para que carregassem componentes de interesse farmacológico (ZHAO et al. 2018).

Os mecanismos relacionados ao papel das VEs no processo

metastático é bastante complexo e a literatura já apresenta uma quantidade bastante relevante de evidências neste sentido. Os resultados de forma geral apontam que ao transferir o conteúdo das células tumorais para células não tumorais as VEs influenciam o comportamento das células receptoras e promovem o desenvolvimento de um ambiente favorável para o crescimento, invasão e metástase (revisado por BECKER et al. 2016).

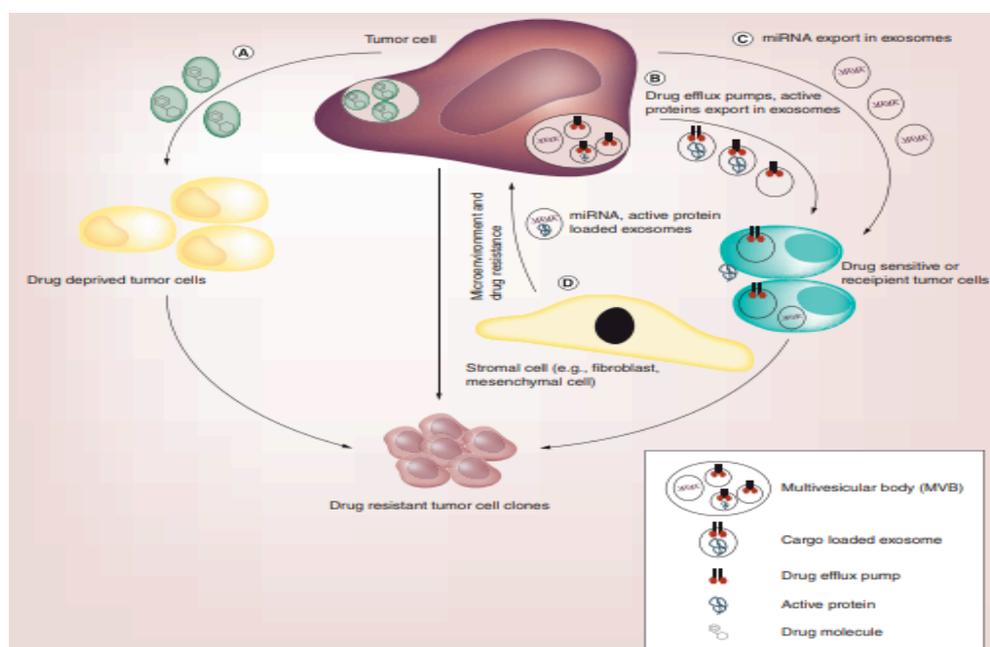
##### **5. VEs derivadas de células tumorais na resistência à terapia**

A absorção de drogas pelas células é um assunto amplamente discutido, pois carece de consenso sobre como os fármacos são captados pela célula, seja por acúmulo intracelular mediado por bombas de transporte ou pela bicamada lipídica (KELL e OLIVER 2014; MATEUS et al. 2017). Em 2003, um dos primeiros relatos na literatura mostrou que várias drogas eram exportadas para vesículas ou exossomos implicando a secreção de VEs como potencial mecanismo de efluxo a drogas e na resistência a terapia (SHEDDEN et al. 2003).

Foi proposto por SHARMA (2017) pelo menos quatro possíveis mecanismos de resistência a QT poderiam ser mediados por VEs (Figura 7) os exossomos aumentam a quimioresistência agindo pela retirada da droga da célula (*excluding out drugs*). De fato, um estudo mostrou que após o tratamento *in vitro* com cisplatina, células de carcinoma de ovário resistentes à cisplatina exportaram, via exossomos, 4,9 vezes mais cisplatina do que as células sensíveis (SAFAEI 2005). Também foi observado que o acúmulo de doxorubicina em VEs de células resistentes (SHEDDEN et al. 2003). De

acordo com a hipótese em A (Figura 7) foi mostrado ainda que as VEs podem mediar a resistência a QT interagindo como vias para o sequestro de drogas citotóxicas, reduzindo a concentração nos sítios alvo. Mas além disso, as VEs também atuam como iscas transportando proteínas de membrana e capturando anticorpos monoclonais destinados a atingir receptores na superfície celular (SAMUEL et al. 2017).

Um segundo mecanismo (B) apoia que a transferência horizontal de bombas de efluxo de drogas para células vizinhas pode propagar a resistência dentro de um pool celular. Além, disso, os exossomos são capazes de transferir diferentes moléculas para as células alvo usando pelo menos de três formas diferentes: a adesão mediada por receptores, a fusão direta com a membrana plasmática e a endocitose (COCUCCI et al. 2009).



Fonte: SHARMA (2017)

**Figura 7** - Mecanismos de resistência mediada por exossomos: Figura esquemática mostrando os possíveis mecanismos de resistência a drogas e heterogeneidade tumoral mediada por exossomos.

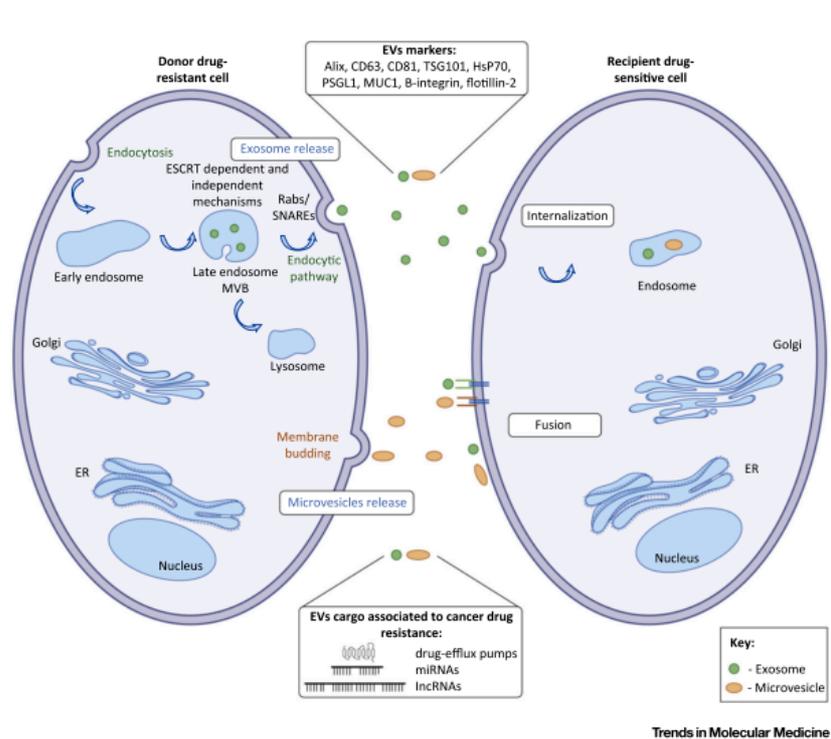
Recentemente, foi demonstrado que em células de câncer de ovário, VEs liberadas após o tratamento com cisplatina foram capazes e induzir diversos efeitos nas células receptoras incluindo uma resposta adaptativa que produz maior resistência ao tratamento ao quimioterápico e maior capacidade de invasão (SAMUEL et al. 2018).

O terceiro mecanismo de transferência de resistência (C) pode envolver a interação de VEs do tumor com células estromais modificando-as de tal forma que o microambiente é alterado para um fenótipo de resistência (SHARMA 2017). Interações células tumorais - microambiente tumoral são cruciais na progressão tumoral contribuindo para alterações no metabolismo, proliferação, metástases e imunidade associada ao tumor (ALLINEN et al. 2004; WHITESIDE 2008; FIASCHI e CHIARUGI 2012; ZHAO et al. 2016b; BRAUER et al. 2013), essas interações são mediadas por VEs (QIU et al. 2018)

Em 2007 foi descrito pela primeira vez que a transferência de diversos RNAs tais como mRNA, *long noncoding* RNA (lncRNA), e microRNA (miRNA) de uma célula para outra pode ser mediada por VEs (VALADI et al. 2007). Estes RNAs são mediadores importantes na transferência de resistência a drogas a células sensíveis. Exossomos secretados por células de leucemia mielóide crônica resistentes ao imatinib mediarão a transferência horizontal de resistência a drogas através do miR-365 (MIN et al. 2017). Em células de sarcoma sinovial a transferência do miR-761 mediada por VEs de células resistentes a pazopanibe para célula sensíveis

sugere que o miR-761 esteja relacionado à quimiorresistência (SHIOZAWA et al. 2018).

Desta forma, considera-se o potencial de transferência horizontal de mediadores de quimiorresistência de células resistentes (células doadoras) para células sensíveis (células receptoras) como um mecanismo importante de aquisição do fenótipo de quimiorresistência (SOUSA et al. 2015) (Figura 8).



Fonte: SOUSA et al. (2015)

**Figura 8** - Transferência de quimiorresistência mediada por VEs: Principais mecanismos de transferência intercelular de resistência a quimioterápicos mediada por VEs.

### **1.7.3 Mecanismos de quimioresistência associados a VEs em tumores gástricos**

A presença de marcadores de resposta a QT em VEs de tumores gástricos ainda é pouco explorada. Um estudo mostrou que VEs liberadas de células tronco mesenquimais aumentam a resistência de células de tumores gástricos a 5-FU, um efeito mediado pela sinalização da via CaMKs /Raf/MEK/ERK por estas vesículas (JI et al. 2015). Por sua vez, a proteína CD97 presente em exossomos promove proliferação e invasão de células gástricas (LI C et al. 2015). Além disso, exossomos secretados de tumores gástricos contêm o RNA não codificador LINC00152 que pode representar um potencial marcador para diagnóstico precoce nestes tumores (LI Q et al. 2015). Finalmente, miRNAs presentes em exossomos do fluido de lavagens do peritônio foram ainda apontados como biomarcadores de prognóstico para metástase peritoneal (TOKUHISA et al. 2015).

Pacientes com tumores gástricos tratados com 5-FU em esquema de neoadjuvância ou de adjuvância podem apresentar, em algum momento, resistência a QT mesmo que tenham apresentado inicialmente resposta a droga. Portanto, a identificação de mecanismos associados a quimioresistência a 5-FU bem como de biomarcadores presentes em VEs para esta condição, são de potencial importância para a conduta terapêutica a ser tomada para estes pacientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar marcadores moleculares de resistência a QT presentes em vesículas extracelulares secretadas por linhagens humanas de câncer gástrico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Gerar linhagens de células de tumor gástrico humano resistentes ao tratamento com o quimioterápico 5-fluorouracil derivadas da linhagem AGS;
- Isolar, quantificar e caracterizar VEs secretadas pela linhagem celular AGS resistente a 5-FU e compara-las com as parentais AGS sensíveis a este quimioterápico.
- Avaliar a capacidade das VEs derivadas de células de tumor gástrico resistentes à QT em transferir esse fenótipo a células parentais.
- Comparar o conteúdo proteico das VEs de células parentais e resistentes a 5-FU usando técnica de proteômica e identificar possíveis candidatos a biomarcadores de resistência a 5-FU.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS CELULARES E QUIMIOTERAPICO

Para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro* deste projeto, foram utilizadas células da linhagem de cancer gástrico humano AGS (ATCC® CRL-1739™), adquirida junto ao centro de recursos biológicos ATCC® (*American Type Culture Collection*). Essas células foram cultivadas em meio de cultura F-12K *Nutrient Mixture, Kaighn's Modification* (1x), *liquid* (Thermo Fisher Scientific nº de catálogo: 21127022), na presença de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen – Life Technologies - nº de catálogo: 12657029). O meio de cultura utilizado recebeu a adição de 0,2mg/mL de Garamicina (Hipolabor). As culturas celulares foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas de cultura celular da marca Corning® de 25cm<sup>2</sup> (nº de catálogo: 3055), 75cm<sup>2</sup> (nº de catálogo: 3275), ou 162cm<sup>2</sup> (nº de catálogo: 3150). O meio de cultura era renovado de três em três dias, as células eram repicadas sempre que a confluência alcançava os 90%, sendo que, para isso, foi usado PBS (*Phosphate-buffered saline*) (PBS 1x= NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM e H<sub>2</sub>O MiliQ) ou PBS contendo EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (0,2g de EDTA para 1L de PBS 1x) para lavar as células e tripsina 0,2% (Instituto Adolfo Lutz) para desprender as células do recipiente de cultivo.

O quimioterápico 5-fluorouracil (Sigma, nº de catálogo 51-21-8) foi usado para gerar as linhagens celulares resistentes.

### **3.2 PADRONIZAÇÃO DAS DOSES DE QUIMIOTERÁPICO**

Células AGS foram plaqueadas na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células em 6 (seis) placas p35, mantidas em cultura com o meio de cultivo completo descrito acima. Ao atingirem 75-80% de confluência, as células foram tratadas com 5-FU nas doses de 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Ainda, uma placa controle foi mantida somente com meio completo e outra foi tratada com o diluente do quimioterápico [DMSO (Sigma; 1:400)]. As células foram mantidas nas mesmas condições descritas por seis dias, de forma que o meio foi apenas renovado na metade deste período. Ao final deste período, as células foram contadas na câmara de Neubauer.

### **3.3 GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS AGS RESISTENTES AOS QUIMIOTERÁPICOS 5-FLUOROURACIL (5-FU)**

O experimento de padronização das doses de quimioterápico 5-FU permitiu selecionar a dose de 10 $\mu$ M para iniciar o processo para gerar uma célula resistente. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,8 \times 10^6$  células em três placas de 100 mm (p100) e mantidas com 5mL de meio completo até atingirem 80% de confluência. Após confluir, as placas foram lavadas três vezes com PBS e foram adicionados 5mL de meio completo

contendo 10 $\mu$ M de 5-FU, 5mL de meio completo contendo DMSO ou somente 5mL de meio completo (controles). As células foram mantidas nas mesmas condições descritas por seis dias, o meio de cultivo celular contendo o quimioterápico foi então substituído no terceiro dia. Após este período de seis dias em que as células foram mantidas em 10 $\mu$ M de 5-FU, a concentração de 5-FU foi aumentada para 20 $\mu$ M na condição tratamento seguindo os mesmos procedimentos citados anteriormente. Uma vez que as condições, controle e DMSO, possuem uma taxa de proliferação normal, sempre que necessário ao atingirem a confluência, as células destes grupos foram passadas para placas novas, de forma que a concentração de DMSO foi sempre a mesma que a presente na condição contendo quimioterápico. A partir desta período, a concentração de 5-FU foi aumentada a cada 48 horas para 30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M e 50 $\mu$ M. O esquema ilustrando o protocolo experimental pode ser encontrado na Figura 9A. Depois de 24 horas as células foram coradas com *Trypan Blue* e contadas na câmara de Neubauer. De modo a manter a pressão seletiva, as células que resistiram ao tratamento foram selecionadas e mantidas em cultura por 6 meses na presença de quimioterápico.

### **3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

Para avaliar a viabilidade celular das linhagens AGS e rAGS\_FU foi utilizado o ensaio de MTT. As linhagens foram plaqueadas em placas de 96 *wells* na densidade de  $7,5 \times 10^3$  *overnight* e no dia seguinte foram tratadas

com diferentes concentrações de 5-FU. No 5º dia o meio com quimioterápico foi removido, 20µL de 5mg/mL de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma, catalogo M5655) diluído em meio de cultura foram adicionados em cada *well*, incluindo uma condição com MTT sem células (controle). Todo procedimento foi feito assepticamente. Após incubação por 3,5 horas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o meio foi cuidadosamente coletado e 150µL de MTT solvente (4mM HCl, 0.1% Nondet P-40 (NP40) em isopropanol) foram adicionados. A placa foi, então, coberta com papel alumínio e as células foram agitadas no shaker por 15 min, a absorbância foi lida a 590nm com filtro de referência de 620nm no equipamento POLARIS/Modelo: EE – Leitor de microplacas. Foi calculada a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco e dos controles e, posteriormente, foi subtraída a média da absorbância do branco de todos os testes, inclusive do controle. O valor obtido pela subtração da média dos controles pela média dos brancos foi considerado como 100% de células viáveis. Para os demais testes, foi feita uma regra de três (utilizar o valor obtido pela subtração da média dos testes pela média do controle) para obter o percentual de células viáveis.

### **3.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Para avaliar a capacidade de proliferação da célula AGS e rAGS\_FU, em 12 dias, foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  em placas de 35mm em duplicatas. No segundo dia, carenciadas por 24 horas e mantidas em 10µM de 5-FU. O

meio com quimioterápico foi trocado de três em 3 dias e as células foram tripsinizadas, coradas com *Trypan blue* e contadas em câmara de Neubauer a cada 48 horas.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foram plaqueadas  $10^4$  células de cada condição por poço de uma placa de 96-wells em triplicatas. Após o tempo para as células aderirem (*overnight*), as mesmas foram carenciadas por 32 horas. O ensaio seguiu o protocolo do BrdU Cell Proliferation Assay kit (Cell Signaling - catálogo 6813S) conforme descrito a seguir. Foi adicionado aos poços com células solução de BrdU 10x em uma concentração final de 1x, e então as células foram incubadas por 12 horas na estufa. As células foram fixadas por 30 minutos, depois foi adicionado o anticorpo primário (anti-BrdU) por uma hora em TA. Após três lavagens com *wash buffer*, foi adicionado o anticorpo secundário (*HRP-conjugated secondary antibody*) e as células incubadas por 30 minutos, sendo na sequência lavadas por mais três vezes. Foi então adicionado 100µL da solução TMB e após 30 minutos adicionado a *Stop Solution*. A absorbância foi lida à 450nm no equipamento iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad®).

### **3.7 FORMAÇÃO DE COLÔNIA**

Para avaliar a capacidade de formação de colônias,  $3,5 \times 10^2$  células AGS e rAGS\_FU foram plaqueadas em placas de 35 mm em duplicatas. Na presença ou ausência do quimioterápico o meio com quimioterápico ( $10 \mu\text{M}$ ) foi trocado de três em três dias. Depois de 10 dias as colônias foram fixadas por 15 minutos com metanol e coradas com hematoxilina por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente as colônias foram contadas.

### **3.8 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Células AGS e rAGS\_FU, quando confluentes, foram lavadas três vezes com PBS e cultivadas por 48 horas em meio sem SFB. O meio condicionado total (MCT) foi coletado e pré-centrifugado três vezes para remoção de debris celulares ( $300 \times g$  por 10 minutos,  $2.000 \times g$  por 10 minutos e  $10.000 \times g$  por 30 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ ) (Centrifuge 5804R - Eppendorf®). A obtenção das VEs se deu por ultracentrifugação a  $100.000 \times g$  por 2 horas com o rotor SW28 a  $4^\circ\text{C}$ , ultracentrífuga (Optima XE-90 Ultracentrifuge - Beckman-Coulter). O pellet foi ressuscendido em DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (1X) (Gibco catalogo 14190-144) para ser lavado, e na sequência centrifugado novamente a  $100.000 \times g$  por 2 horas, a  $4^\circ\text{C}$  (THÉRY et al. 2006). Para avaliar a concentração e o tamanho das partículas isoladas, o pellet de VEs foi ressuscendido em  $1000 \mu\text{L}$  de

PBS filtrado e estéril, o qual foi analisado usando o equipamento Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (Nanosight LM10, acoplado a uma câmera CCD e um laser emitindo um raio de 60-mW com comprimento de onda de 405-nm - Nanosight Ltda., Wiltshire, Inglaterra). A aquisição foi realizada em três vídeos de 60 segundos cada. A quantificação do número de VEs secretadas por cada tipo celular avaliado foi feita de forma relativa ao número de células presentes em cultura no momento da coleta do meio condicionado total.

### **3.9 TRANSFERÊNCIA DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA POR VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Foram cultivadas  $5 \times 10^6$  células de cada linhagem AGS e rAGS\_FU em frascos de cultura de  $162 \text{ cm}^2$  até atingirem confluência de 70-80%, quando foram carenciadas por 48 horas e em paralelo foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células AGS em placas de 60 mm (Corning® - nº de catálogo: 430166). Após esse período de 48h de carenciamento o meio condicionado total foi extraído e as VEs isoladas por ultracentrifugação conforme protocolo previamente descrito. O *pellet* de VEs foi ressuspenso em  $100 \mu\text{L}$  de DPBS estéril, e uma alíquota de 10% foi utilizada para quantificação no NTA. A mesma quantidade de VEs ( $1,15 \times 10^9$  vesículas) das células AGS e rAGS\_FU, foram usadas para tratar as células AGS aderidas em placas de 60 mm. Após 36 horas de tratamento com VEs, as células foram tratadas

por 72 horas com 5-FU. Após esse tratamento as células foram tripsinizadas, coradas com *Trypan blue* e contadas em câmara de Neubauer.

### **3.10 INIBIÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA**

O experimento descrito no item anterior foi repetido para inclusão de um grupo experimental em que a heparina foi utilizada para bloquear a captação de vesículas extracelulares pela célula AGS. Uma condição das células AGS aderidas em placas 60 mm foi tratada com 20ug/mL de heparina por 30 minutos antes do tratamento com VEs (ATAI et al. 2013), a mesma quantidade de VEs ( $1,15 \times 10^9$  vesículas) das células AGS e rAGS\_FU, foram usadas para tratar as células AGS aderidas em placas 60 mm. Após 36 horas de pré-tratamento com VEs, as células foram submetidas à um novo tratamento por 72 horas com 5-FU. Após esse tratamento as células foram tripsinizadas, coradas com Trypan blue e contadas em câmara de Neubauer.

### **3.11 QUANTIFICAÇÃO DA INVASÃO CELULAR**

Para avaliar o efeito de VEs na invasão celular, VEs foram isoladas de acordo com o protocolo descrito acima. Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células de cada linhagem que após confluírem foram tratadas com  $1,15 \times 10^9$  vesículas por 36 horas. Câmara transwell (Corning® - nº de catálogo: 3422)

com 6,5 mm de diâmetro e poros de 8 DPBS foram tratadas com matrigel (200µg/ml; BD Matrigel Matrix High Concentration - BD Biosciences). Células AGS e rAGS\_FU foram carenciadas por 24 horas e posteriormente  $5 \times 10^4$  células AGS e rAGS\_FU foram incubadas na parte superior da câmara por 12 horas, sendo que depois desse tempo as mesmas invadiram o matrigel em duas condições com e sem adição de 10% de SFB na parte inferior da câmara, como atrativo para a invasão celular. Depois as células foram fixadas com PFA 4% e coradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride - Sigma nº de catálogo: 32670), diluído 1:500. As células localizadas na parte de cima da câmara foram removidas com cotonetes. Imagens das células que invadiram a membrana porosa foram capturadas no microscópio Nikon Eclipse (TE2000-U) com a objetiva 10X, e analisadas no programa ImageJ.

### **3.12 FORMAÇÃO DE COLÔNIAS MEDIADA POR VES**

Para avaliar a capacidade de formação de colônias foram plaqueadas em placas de 35mm  $3,5 \times 10^2$  células AGS previamente tratadas por 36 horas com  $1,15 \times 10^9$  vesículas dela mesma e da célula resistente. O meio foi trocado de três em três dias. Depois de 10 dias as colônias foram fixadas por 15 minutos com metanol, coradas com hematoxilina por 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente as colônias foram contadas.

### 3.13 AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO COM VEs

Para avaliar a viabilidade celular das linhagens foi utilizado o método de MTT. Células AGS aderidas em placas de 60 mm foram tratadas com  $1,15 \times 10^9$  vesículas dela mesma e com VEs secretadas pela célula resistente. Após 36 horas de tratamento com VEs, as células foram então lavadas com PBS e mantidas em cultura por 14 dias. Em seguida as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 *wells* na densidade de  $7,5 \times 10^3$  *overnight*, no dia seguinte foram tratadas com a concentração de  $200 \mu\text{M}$  de 5-FU por 72h; em seguida o meio com quimioterápico foi removido,  $20 \mu\text{L}$  de  $5 \text{mg/mL}$  de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma, catálogo M5655) diluído em meio de cultura foram adicionados em cada poço incluindo uma condição com MTT sem células (controle) todo procedimento foi feito assepticamente. Após incubação por 3,5 horas em estufa à  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , o meio foi cuidadosamente coletado e  $150 \mu\text{L}$  de MTT solvente (4 mM HCl, 0.1% Nondet P-40 (NP40) em isopropanol) foram adicionados. A placa foi, então, coberta com papel alumínio e as células foram agitadas no *shaker* por 15 minutos, a absorbância foi lida a  $590 \text{nm}$  com filtro de referência de  $620 \text{nm}$  no equipamento POLARIS/Modelo: EE – Leitor de microplacas. Foi calculada a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco e dos controles e posteriormente, foi subtraída a média da absorbância do branco de todos os testes, inclusive do controle. O valor obtido pela subtração da

média dos controles pela média dos brancos foi considerado como 100% de células viáveis. Para os demais testes, foi feita uma regra de três (utilizar o valor obtido pela subtração da média dos testes pela média do controle) para obtenção do percentual de células viáveis.

### **3.14 REVERSÃO DO FENÓTIPO DE RESISTENCIA MEDIADO POR VEs DE CELULA SENSÍVEL**

Para avaliar se VEs derivadas de células sensíveis são capazes de reverter o fenótipo de resistência, foi avaliada a viabilidade celular das linhagens rAGS\_FU previamente tratadas com VEs derivadas da linhagem sensível, utilizando o método de MTT. Células rAGS\_FU aderidas em placas de 60mm foram tratadas com  $1,15 \times 10^9$  vesículas secretadas pelas células AGS. Após 36 horas de tratamento com VEs, as células foram então lavadas com PBS, em seguida as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 wells na densidade de  $7,5 \times 10^3$  *overnight*, no dia seguinte foram tratadas com a concentração de 200 $\mu$ M de 5-FU por 72h.

### **3.15 ENSAIO DE WESTERN BLOTTING**

Os extratos celulares foram feitos usando o tampão RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (50mM Tris-HCL [pH 7,4], 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% deoxicolato de sódio, e 1mM de EDTA) com inibidor de protease [10x] - (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail- [100X] - Thermo

Scientific™ - nº de catálogo: 78430). A quantificação de proteína das amostras foi realizada usando o método de Bradford (*colorimetric protein assay*). Em uma placa 96-wells, flat bottom (Corning® - nº de catálogo: CLS3997) foi preparada uma curva de diluição da proteína BSA (*Bovine serum albumin*) com 0,5; 1; 1,5; 2; e 2,5 µg/µL em 200µL do corante (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate* - nº de catálogo:500-0006 - Bio-Rad®) diluído 1:4. Cada amostra foi quantificada em duplicata, sendo utilizado 1µL de cada amostra por poço. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 595nm no equipamento iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad®). Após quantificação, as amostras foram preparadas com tampão redutor 4x (2,46mL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,5mL de TrisHCl 1M pH 6,8, 10mL de SDS [sodium dodecyl sulfate] 10%, 4,6mL de glicerol, 40µL de EDTA 0,5M pH 8,5, 1mL de β-mercapto etanol, e 4 mg de bromofenol blue [preparado em capela]). A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida, 8%, 10% ou 14%, dependendo do tamanho da proteína a ser analisada (gel 8%: 3,6mL de dH<sub>2</sub>O, 3mL de lower buffer [Tris 181,5g, SDS 4g, pH 8,8 acertado com HCl ou NaOH], 2,4mL de acrilamida 30% [300g acrilamida, 8,2g NN Metileno, 1L H<sub>2</sub>O MiliQ], 50µL de APS 10% [Ammonium persulfate][5g APS em 50mL H<sub>2</sub>O MiliQ], e 25µL de Temed [N, N, N',N'-Tetrametiletlenodiamina - nº de catálogo: T9281 - Sigma); gel 10%: 3mL de dH<sub>2</sub>O, 3mL de lower buffer, 3mL de acrilamida, 50µL de APS, e 25µL de Temed; e gel 14%: 1,8mL de dH<sub>2</sub>O, 3mL de lower buffer, 4,2mL de acrilamida, 50µL de APS, e 25µL de Temed). O gel *stacking* contém 3mL de dH<sub>2</sub>O, 1,25mL de *upper buffer* (Tris 60,5g, SDS 4g, pH 6,8 acertado com HCl ou NaOH), 625µL de acrilamida, 25µL de

APS e 10 $\mu$ L de Temed). O tampão utilizado para a eletroforese foi o *running buffer* 1x (Diluir o *Stock* 10x em H<sub>2</sub>O MiliQ para 1x [*running buffer* 10x: Tris 30,3g, glicina 144g, SDS 10g, em 1L de H<sub>2</sub>O MiliQ]). Foi aplicado no gel 3 $\mu$ L de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* nº de 1610374). A eletroforese foi realizada por 20 minutos com 75V, e depois até o final com 120V (Fonte utilizada: PowerPac™ HC High-Current Power Supply - Bio-Rad®). A transferência utilizou a mesma fonte, por 1 hora a 100V, utilizando membrana de nitricelulose 0,45 $\mu$ m (Nitrocellulose Blotting Membrane, nº de catálogo: 10600016 - Amersham™ Protran™ - GE Healthcare, Life Science). O tampão de transferência utilizado contém 700mL de dH<sub>2</sub>O, 200mL de Metanol (nº de catálogo: 32213 - Sigma) e 100mL de *running buffer* 10x. Os anticorpos usados nos ensaios de Western Blotting foram: anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) - Rabbit Polyclonal [nº de catálogo: 9102 - Cell Signaling®], na concentração de 1:1000; anti-Fscn1 - Rabbit [nº de catálogo: HPA005723 - Sigma Aldrich] na concentração de 1:1000, anti-PDIA3- Rabbit [nº de catálogo: HPA003230 - Sigma Aldrich] na concentração de 1:1000, anti-SOD1 - Rabbit [nº de catálogo: SAB5200083 - Sigma Aldrich] na concentração de 1:1000, anti-eIF2 $\alpha$  - Rabbit [nº de catálogo: 9722S - Cell Signaling] na concentração de 1:1000. anti-Flotillin antibody [nº de catálogo: AB9292 - Millipore®] na diluição de 1:2000. Os anticorpos foram diluídos em leite (Molico®) 5% com TBST (Tris-buffered saline + Tween 20), ou em BSA 5% (Bovine Serum Albumin) com TBST, e incubados *overnight* a 4°C. Os anticorpos secundários utilizados foram: Mouse IgG HRP Linked Whole Ab (GE Healthcare - nº de catálogo: NA931)

and Rabbit IgG HRP Linked Whole Ab (GE Healthcare - nº de catálogo: NA934), ambos na concentração de 1:2000 e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram reveladas usando o kit de substrato de peroxidase ECL (Enhanced chemiluminescence) (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate - Thermo Scientific - nº de catálogo: 32209), e as imagens adquiridas no equipamento de documentação de quimiluminescência UVITEC (Imaging System: Alliance Mini 4 16.08a - Cambridge - UK).

### **3.16 IMUNOFLORESCENCIA**

As células AGS e rAGS\_FU foram submetidas à marcação por imunofluorescência para timidilato sintase. As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro na densidade de  $3,5 \times 10^3$ . Após confluírem, foram então lavadas três vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% sem metanol por 20 minutos, lavadas novamente três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton 0,5% por 5 minutos, e bloqueadas com BSA 5% (em PBS) durante 1 hora em temperatura ambiente. As células foram então incubadas com os anticorpos Anti-Thymidylate Synthase antibody (nº de catálogo: SAB5500186 - Sigma, *overnight* a 4°C. Após este período, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-camundongo e com o marcador nuclear Draq5 (nº de catálogo 4084 - Cell Signaling) por uma hora à temperatura ambiente e no escuro.

Após lavar três vezes com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas e analisadas em microscópio confocal TCS SP5 II (Leica).

### **3.17 ANÁLISE PROTEÔMICA**

A análise proteômica foi realizada por espectrometria de massa, na Universidade de Campinas (UNICAMP, Campinas-SP-Brasil), sob coordenação do Dr. Daniel Martins, através de uma colaboração institucional. Foram realizadas análises das linhagens celulares AGS, rAGS\_FU e as VEs que elas secretam.

#### **3.17.1 Extração de proteínas**

As proteínas foram extraídas após ressuspensão dos *pellets* de células e VEs em 50µl de tampão de lise contendo: 6M de ureia (PlusOne Urea; GE, nº de catálogo: 17-1319-01), 2 M tiourea (PlusOne Thiourea; GE, nº de catálogo: RPN6301, 10 mM de ditioneitol (DTT) (PlusOne DTT; GE, nº de catálogo: 17-1318-02), inibidores de protease e fosfatase (cOmplete ULTRA; Roche, nº de catálogo: 05 892 970 001) (c-Omplet e Phostop – Roche), 0.1 mM pervanadato de sódio (Sigma, nº de catálogo:S6508) – contendo ou não 0.4 AU ou 1:100 de LYs-C. As amostras foram vortexadas cuidadosamente e incubadas por 2h a 37°C. Após incubação, a amostra foi diluída dez vezes com 20mM de TEAB (Triethylammonium bicarbonato buffer) (Sigma, c nº de catálogo: T7408), pH 7.5 e sonicadas. Em seguida, as amostras foram alquiladas com 20mM de iodoacetamida (GE catálogo RPN6302) (50uL de

200mM de iodoacetamida em 20mM de TEAB) e incubadas 20min no escuro em temperatura ambiente.

### 3.17.2 Digestão das amostras

As amostras foram digeridas em 10uL de tripsina *kit Sequencing Grade Modified Trypsin* ( nº de catálogo: V5117, Promega) para VEs e 20uL para células (enzima para razão do substrato 1:50 – 2% de tripsina; 1 ou 2 ug de enzima) por 16horas a 37°C. Após incubação, adicionamos 5% de ácido fórmico às amostras por 5 minutos em temperatura ambiente para parar a reação da tripsina. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 45min a 14.000xg para remover a camada de lipídeos.

#### ✓ **Dessalinização/Concentração dos peptídeos**

A dessalinização foi feita em coluna HLB/RP, foi adicionado 0.1% TFA [Ácido trifluoroacético (Sigma, nº de catálogo: 3020310)] para diluir os peptídeos para aproximadamente 1mL de volume final em pH ácido (ajustado abaixo de 2.0). A coluna foi ativada com 1mL de metanol 100%, posteriormente 1mL de 100% de acetonitrila. A coluna foi equilibrada 2X com 20mL de 0,1% de TFA. A amostra foi carregada na coluna lentamente e a porção coletada foi injetada novamente na coluna. A coluna foi lavada 2X com 2mL de 0.1% TFA. Os peptídeos foram eluídos os com 1mL de 70% ACN / 0,1% TFA. Após secar as amostras no speed vacuum, as mesmas foram reconstituídas em 20mM de formiato de amônio. A concentração dos peptídeos foi quantificada no Qubit.

### 3.17.3 Nanoflow nLC–MS/MS

As amostras foram previamente quantificadas usando o sistema de quantificação fluorométrica Qubit (Thermo Fisher Scientific) e preparadas de modo que a concentração final seja 0,5 µg / µL. As amostras foram injetadas em duplicata num sistema ACQUITY UPLC M-Class (Waters Co) acoplado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si. Foram injetadas 0,5 µg de amostra numa coluna HSST3 de 1,8 µm na qual um gradiente de 7% a 40% de acetonitrila / água contendo 0,1% de ácido fórmico correu durante 95 minutos (células e VEs). A aquisição no espectrômetro de massas foi realizada com ionização nanoESI em modo positivo, com aquisição do HDMSE. A aquisição dos espectros de ions produtos foi feita na faixa de 50 a 2000 m/z.

### 3.17.4 Identificação de proteínas

A identificação e quantificação das amostras foram realizadas utilizando o software Progenesis *for Proteomics* (Waters Co). Pesquisamos no banco de dados não revisado *Homo sapiens* do UniProt (versão dezembro 2017). Os parâmetros de busca foram: Modificação fixa de carboamidometilcisteína; Modificação variável da oxidação da metionina; Taxa de falsos positivos de 4% (FDR); para parâmetros de *ion match* utilizamos mínimo de 1 ion fragmento por peptideo, 3 íons fragmentos por proteína e mínimo de 1 peptideo por proteína; máximo de 2 erros de clivagem.

### **3.17.5 Análise de Bioinformática para identificação de proteínas significativas e enriquecimento de vias biológicas**

As análises aqui apresentadas foram realizadas com o auxílio do Dr. Fabio Marchi. Os critérios estatísticos utilizados para a seleção de proteínas significativas após a comparação entre os grupos avaliados foi  $P \leq 0.05$  (teste t de Student) e *fold-change* (FC)  $\geq 2$  e  $\leq -2$ . Todos os p-valores apresentados na análise foram corrigidos por *Benjamini and Hochberg* (BH) para múltiplos testes.

Todas as análises foram feitas utilizando o R (versão 3.4.4, disponível em <https://cran.r-project.org>). O programa *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, EUA) foi utilizado para a análise *in silico* do enriquecimento biológico das proteínas. Para isso será utilizado o *Knowledge Base*, que é o banco de dados próprio da empresa e possui informações constantemente atualizadas. Esse banco de dados inclui proteínas, substâncias endógenas, informações sobre diferentes espécies, linhagens celulares e doenças. O enriquecimento é calculado pelo teste exato de Fisher para determinar a probabilidade de que a associação entre os genes e as funções biológicas não seja obtida ao acaso.

## 5 RESULTADOS

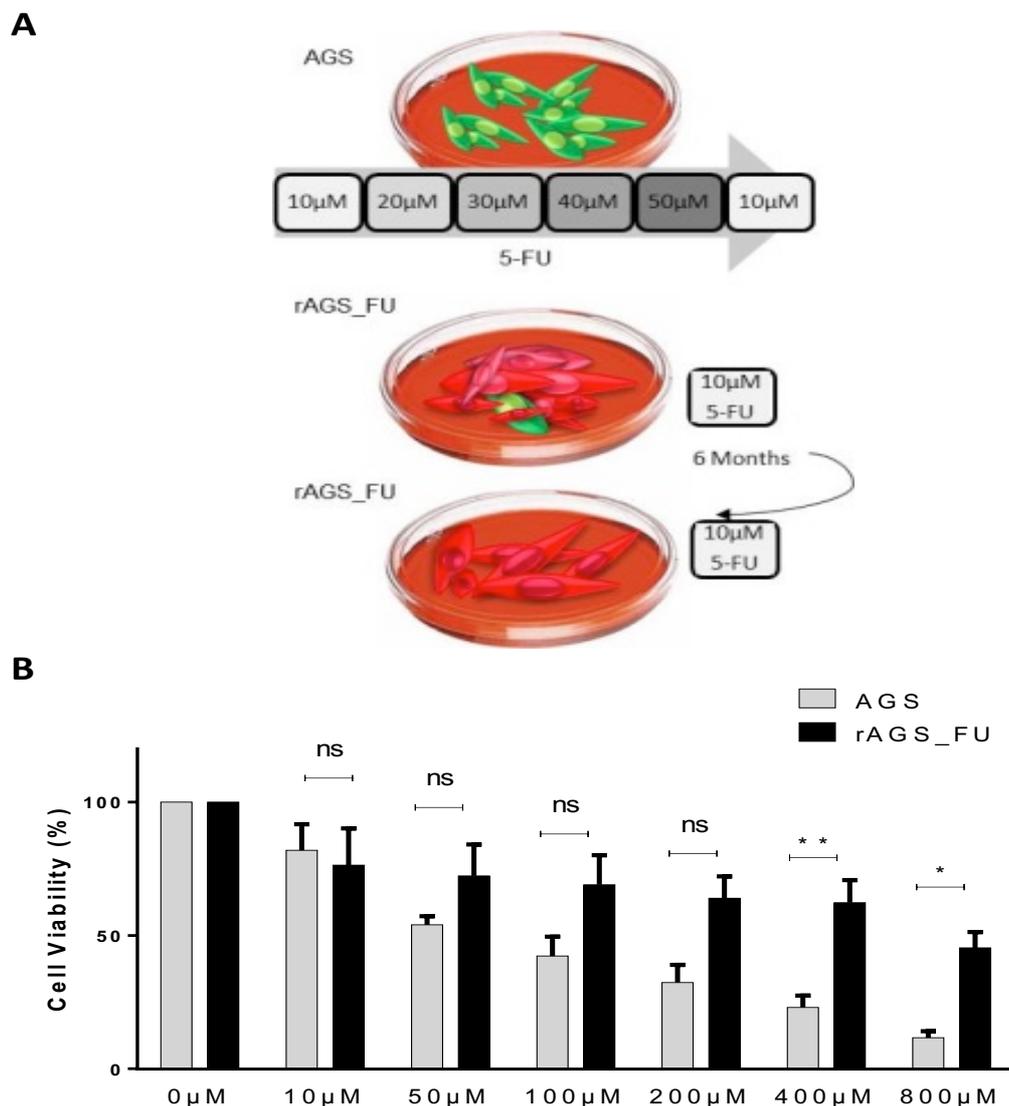
### 5.1 GERAÇÃO DAS LINHAGENS RESISTENTES A 5-FLUORORACIL

O primeiro objetivo desse trabalho gerar uma linhagem de células de adenocarcinoma gástrico humano que fosse resistente ao tratamento quimioterápico com 5-fluorouracil (5-FU). Assim, a partir da célula AGS (ATCC® CRL-1739™) estabelecemos uma linhagem de tumor gástrico resistente a 5-FU, submetendo a célula parental a um tratamento com concentrações crescentes de 10µM a 50µM por um período de 6 meses. Este protocolo foi definido a partir de artigos da literatura e discussões com o Dr. Bruce Zetter, da Universidade de Harvard, o qual tem larga experiência com este tipo de abordagem experimental (PATEL et al. 2010).

Na Figura 9A está um desenho esquemático do processo pelo qual foi gerado a célula resistente denominada aqui rAGS\_FU. As células AGS foram plaqueadas na concentração  $1,8 \times 10^6$  em placas de 100mm de diâmetro, tratadas com aumento gradual da concentração de 5-FU de 10 µM a 50µM. As células que sobreviveram a este protocolo de tratamento foram então mantidas em cultura com pressão seletiva em quimioterápico na concentração de 10µM durante seis meses.

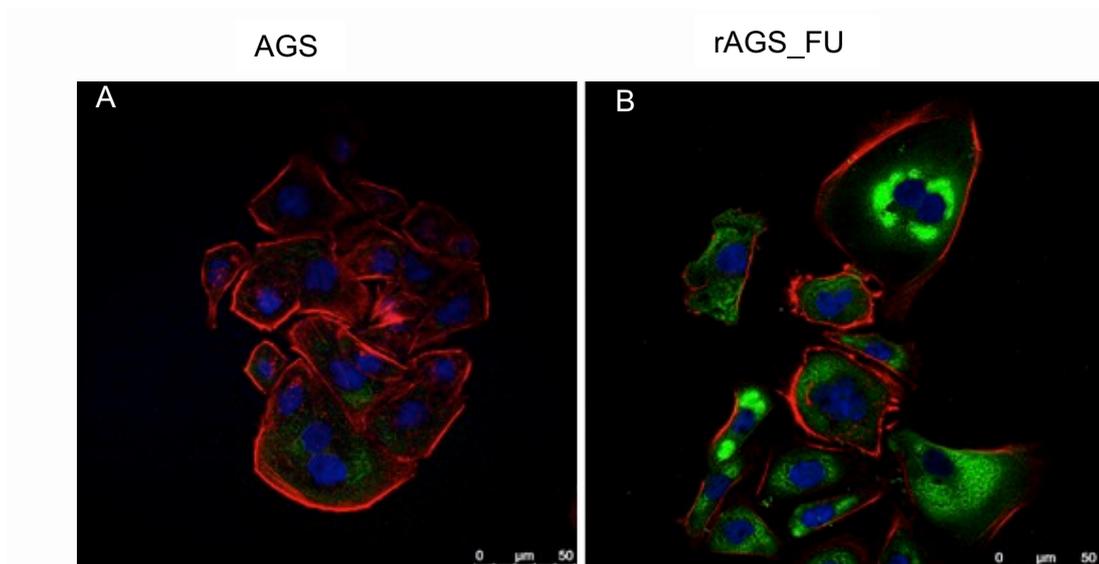
Após os seis meses de tratamento, para confirmar a resistência da célula gerada ao tratamento com 5-FU foi realizado um experimento de

quimiossensibilidade dessas células. As células parental e resistente foram então submetidas a diferentes concentrações de 5-FU e sua viabilidade foi avaliada depois de cinco dias de tratamento utilizando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol). Na Figura 9B temos a representação gráfica de três experimentos independentes com as amostras em triplicata. Os resultados mostram que a linhagem gerada apresenta uma resistência aumentada ao 5-FU quando comparada a linhagem parental AGS quando submetidas a concentrações até 800 $\mu$ M de 5-FU.



**Figura 9** - Geração de uma linhagem celular de adenocarcinoma gástrico quimiorresistente. (A) Esquema mostrando o desenho experimental do ensaio de geração da linhagem celular rAGS\_FU onde  $1,8 \times 10^6$  células AGS foram plaqueadas em placas de 100mm de diâmetro, tratadas com concentrações crescentes de 5-FU (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M e 50 $\mu$ M). As células que sobreviveram ao tratamento foram mantidas com 10 $\mu$ M do quimioterápico para manter a pressão seletiva. Este processo foi contínuo por aproximadamente seis meses e as células resistentes isoladas a partir deste tratamento foram nomeadas rAGS\_FU. (B) A viabilidade celular à um novo tratamento com 5-FU foi determinada pelo ensaio de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazio). As células foram plaqueadas em placas de 96 Wells e tratadas com concentrações crescentes de 5-FU durante cinco dias. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis normalizadas pelo valor de absorbância das células sem tratamento ajustado para 100%. Valores de absorbância obtidos após o tratamento de cada linhagem com 5-FU representam valores relativos comparados a linhagem equivalente sem tratamento. Os valores representaram a média  $\pm$  SD da porcentagem normalizada de células viáveis obtidas a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata. 400 $\mu$ M, 800 $\mu$ M \*P < 0,05, Two-way ANOVA (comparações múltiplas de Sidak).

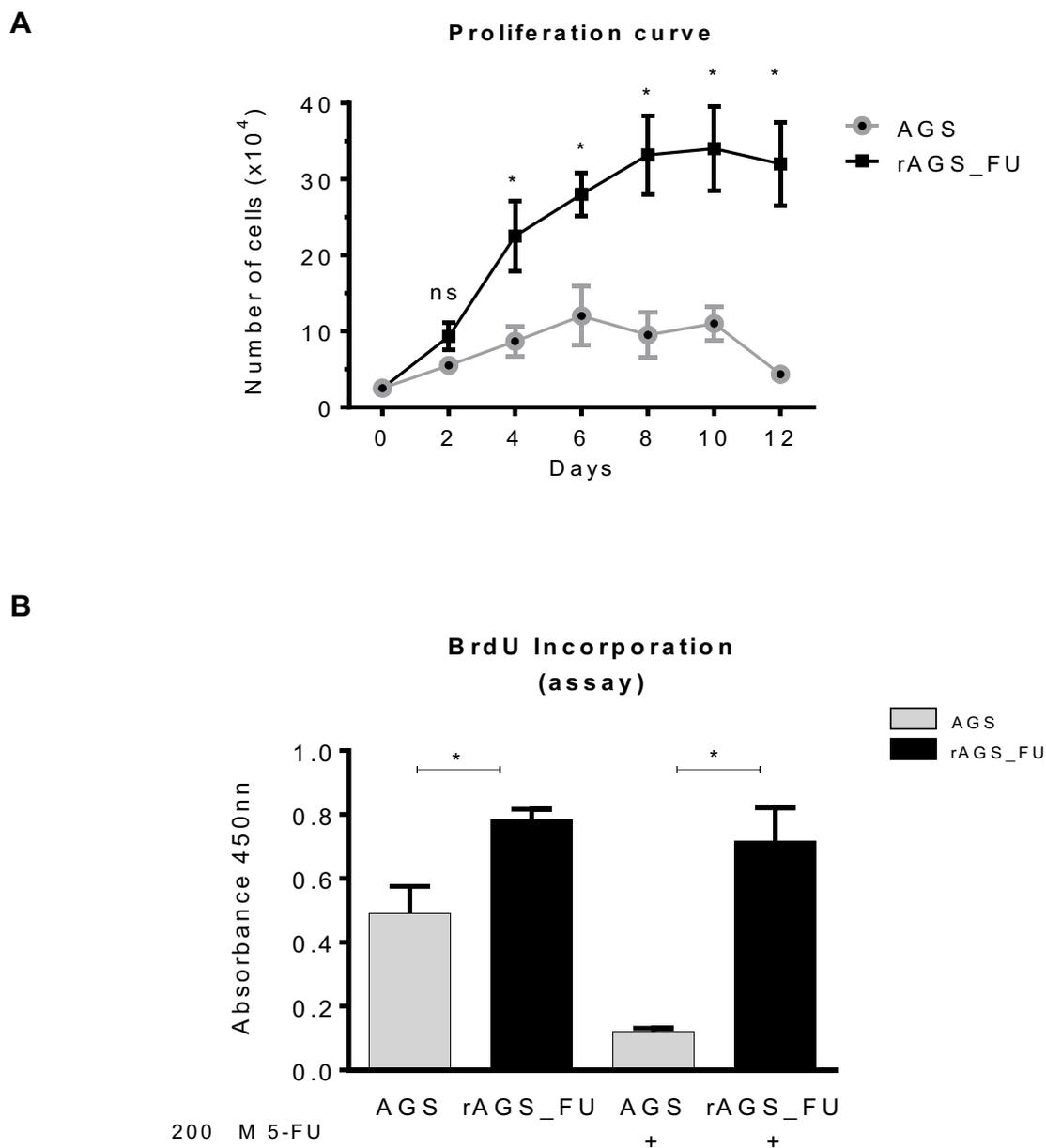
Sabe-se que células resistentes a 5-FU apresentam expressão aumentada de timidilato sintase (TS), enzima alvo de inibição por 5-FU (PETERS et al. 1995). A expressão de TS foi analisada por imunofluorescência em AGS e rAGS\_FU. Na Figura 10 mostra uma expressão muito maior de TS nas células resistentes a 5-FU (Figura 10B) do que nas células controle parentais (Figura 10A). Este resultado é mais uma evidência da resistência a 5-FU das células rAGS-5-FU geradas a partir do experimentos anteriores.



**Figura 10** - Imunofluorescência para timidilato síntase (TS). Células AGS (A) e rAGS\_FU (B) coradas com anticorpos *anti-Thimidilato Sintase* (verde), núcleos marcados com *Draq5* (azul) e F-actina marcada com Rodamina-faloidina (vermelho). As imagens foram obtidas com microscópio confocal TCS SP5 II (Leica). (barra de escala = 50  $\mu$ m).

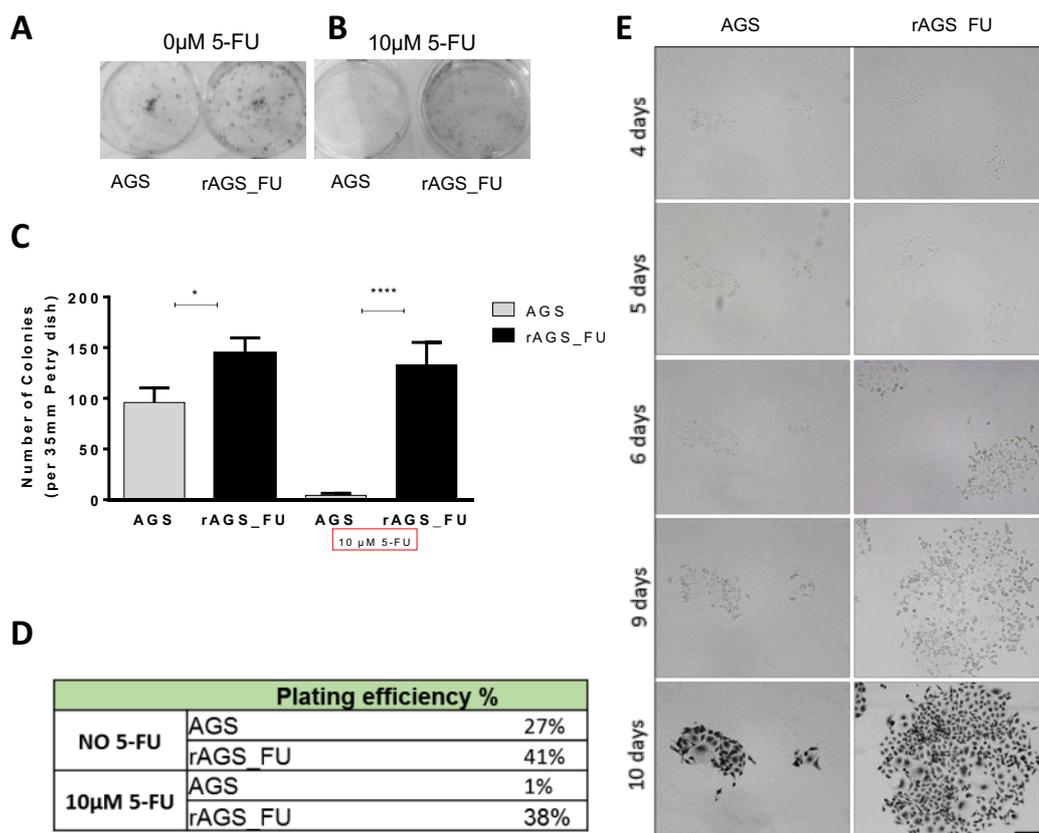
Para avaliar o potencial proliferativo das duas linhagens celulares AGS e rAGS\_FU, estas foram plaqueadas e mantidas por 12 dias na presença de 10 $\mu$ M de 5-FU. Na Figura 11A as células foram contadas a cada 2 dias e o gráfico representa a média de 3 experimentos

independentes. Com esse resultado pudemos verificar que as células resistentes rAGS\_FU adquiriram um fenótipo mais proliferativo, com um crescimento celular aumentado quando comparadas com as células parentais mesmo na presença do 5-FU. Ensaios de incorporação de BrdU mostrados na Figura 11B confirmam este dado. Células AGS e rAGS\_FU crescidas na ausência ou na presença de 200 $\mu$ M de 5-FU apresentam uma maior proliferação quando comparadas as células parentais.



**Figura 11** - Proliferação celular de células AGS e rAGS\_FU. **A)** O potencial proliferativo das linhagens AGS e rAGS\_FU foi avaliado na presença de 10 $\mu$ M 5-FU durante 12 dias. O gráfico representa a média  $\pm$  SEM normalizada da contagem de células, determinada por três experimentos independentes realizados em duplicata (\*P < 0,05), *Two way ANOVA*. **B)** Incorporação de BrdU em células AGS e rAGS\_FU tratadas com 200 $\mu$ M de 5-FU. A média da absorbância em células rAGS\_FU está representada por valores relativos comparando às células AGS. As barras de erro indicam a média da incorporação de BrDU  $\pm$  SEM determinada por três experimentos independentes; (P < 0,05), *One way ANOVA*.

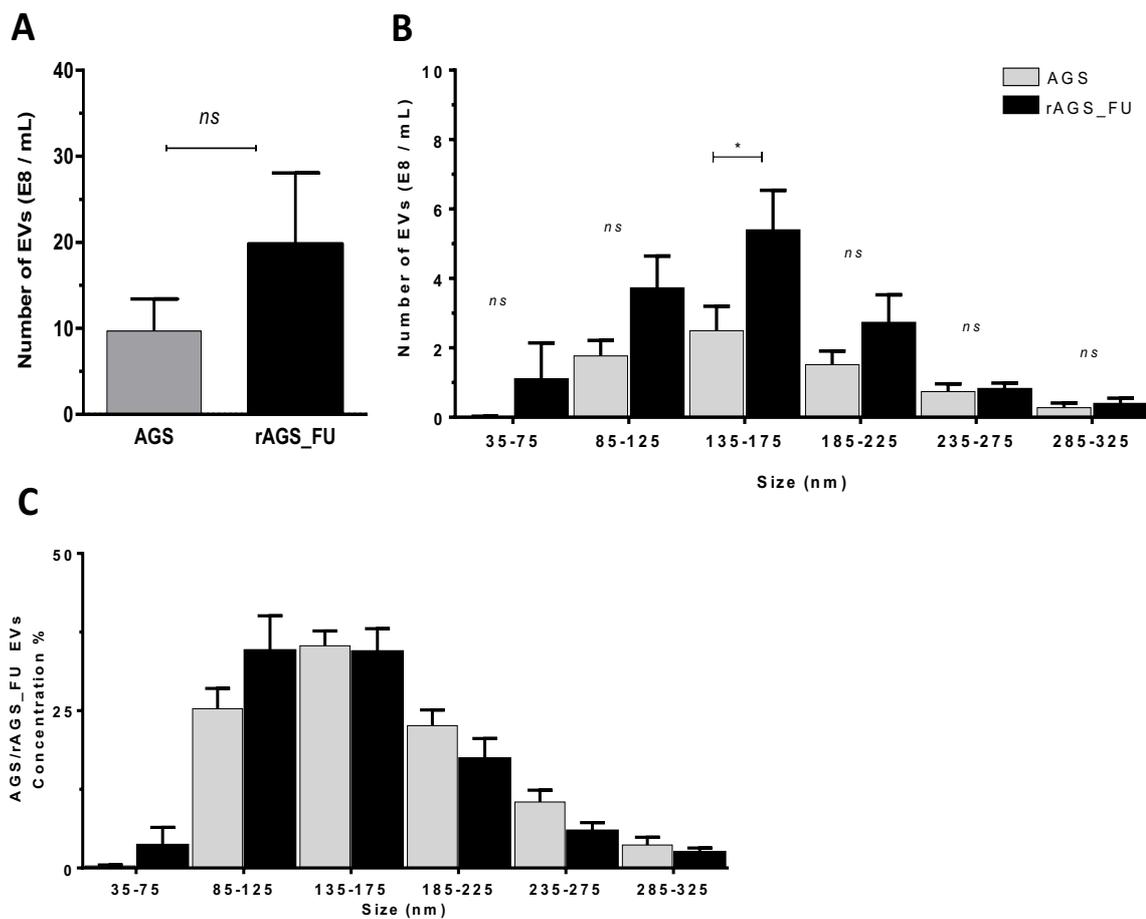
Além de maior potencial proliferativo essas células foram capazes de formar maior número de colônias em ensaios de eficiência de plaqueamento (Figura 12). Na ausência do quimioterápico as células rAGS\_FU já apresentam uma maior eficiência de clonagem do que as AGS (Figura 12 A-C), o que é exacerbado na presença de 5-FU, onde a eficiência de clonagem da célula AGS cai de 27% para 1%, e permanece inalterada para as células rAGS\_FU (Figura 12D). Além disso, as colônias formadas pela célula rAGS\_FU são maiores do que aquelas das células AGS (Figura 12E). No conjunto, estes dados confirmam a maior resistência a 5-FU da célula rAGS\_FU bem como sua maior capacidade proliferativa.



**Figura 12** - Eficiência de plaqueamento das linhagens AGS e rAGS\_FU. As células foram cultivadas em placas de 35mm de diâmetro e tratadas ou não com com 5-FU (10 $\mu$ M). **(A)** Imagem representativa das colônias formadas por células AGS e rAGS\_FU após fixação e coloração com hematoxilina. **(B)** contagem do número de colônias de ambas as células plaqueadas na ausência e presença de 5-FU (média  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes) (\*P <0,05), One way ANOVA. **(C)** Eficiência de plaqueamento (número de células plaqueadas/número de clones formados) para ambas as células na presença e ausência de 5-FU. **(D)** Fotomicrografia em contraste de fase das células AGS e rAGS\_FU. Um total de  $3,5 \times 10^2$  células foram plaqueadas e após aderirem foram tratadas com o quimioterápico (10 $\mu$ M). Imagens das mesmas colônias foram adquiridas entre os dias 4 e 10 após plaqueamento. No 10<sup>o</sup> dia foram fixadas e coradas com hematoxilina e em seguida contadas. Barra de escala 20 $\mu$ m, microscópio Nikon Eclipse TE2000-U.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO NÚMERO, TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DE VEs SECRETADAS PELAS CÉLULAS AGS E rAGS\_FU

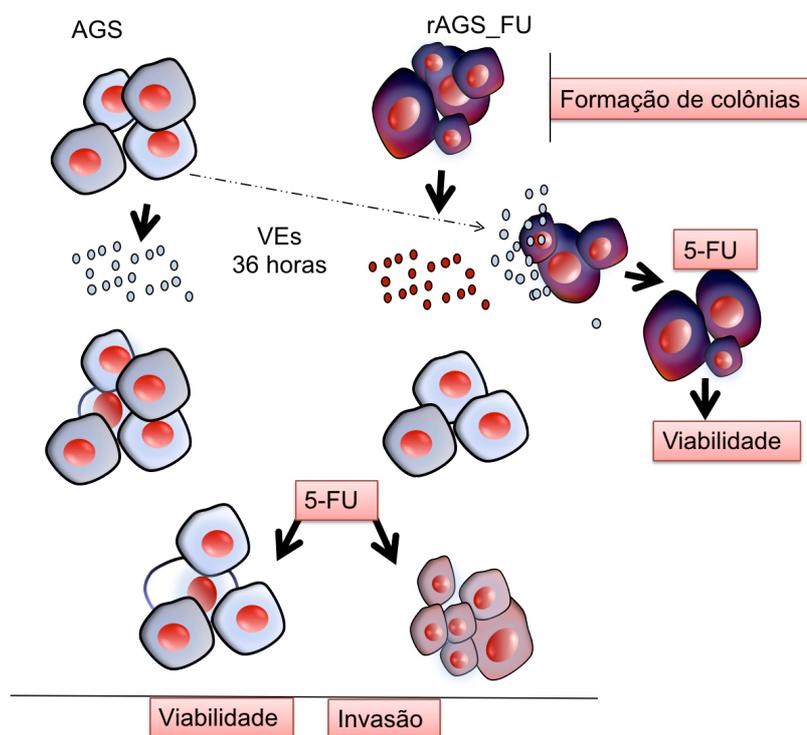
VEs liberadas durante 48 horas pelas células AGS e rAGS\_FU foram isoladas e caracterizadas com o objetivo de determinar o efeito da quimioresistência na quantidade e tamanho de VEs secretadas por estas células. A análise destas VEs no *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) mostra que as células rAGS\_FU secretam  $19,8 \times 10^8$  VEs/ml enquanto as células AGS secretam  $9,7 \times 10^8$  VEs/ml (Figura 13A). As VEs apresentam tamanho entre 35 e 325nm e a distribuição do seu número entre intervalos de tamanho mostra que as células rAGS\_FU secretam maior número de VEs de 85 a 175nm quando comparadas as AGS (Figura 13B). Entretanto, quando os valores do número de vesículas são relativizados é possível observar que a distribuição de vesículas por tamanho é semelhante entre as duas linhagens celulares (Figura 13C). Portanto, as células resistentes a 5-FU, rAGS\_FU secretam cerca de 2 vezes mais vesículas que as parentais mas estas se assemelham em tamanho.



**Figura 13** - Perfil das VEs secretadas pelas células AGS e rAGS\_FU. Após 48 horas de careciamento, o MCT de células foi coletado e as VEs isoladas conforme protocolo previamente descrito. **(A)** Concentração (E8 VEs/mL) de VEs secretadas por células AGS e rAGS\_FU, (média  $\pm$  SEM, n=5). **(B)** Concentração por tamanho (E8 partículas/mL) das VEs secretadas por células AGS e rAGS\_FU (média  $\pm$  SEM, n=5). **(C)** Valores relativos da concentração de VEs secretadas pelas linhagens AGS e rAGS\_FU distribuídas por tamanho (média  $\pm$  SEM, n=5).

### 5.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS rAGS\_FU TRANSFEREM O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À 5-FU PARA CÉLULAS AGS

Em nosso modelo, procuramos analisar se VEs secretadas por células resistentes (rAGS\_FU) tem a capacidade de transmitir o fenótipo de resistência a 5-FU às células sensíveis (AGS). Células AGS foram plaqueadas e tratadas com VEs (dizer concentração) dela mesma ou com VEs da célula rAGS\_FU por 36 horas, seguidas pelo tratamento por 72 horas com 200 $\mu$ M de 5-FU. O desenho experimental está representado na Figura 14.



**Figura 14** - Esquema mostrando o desenho experimental do ensaio. VEs secretadas pela célula AGS e rAGS\_FU foram isoladas e usadas para tratar células AGS por 36 horas. Após esse período as células foram tratadas com 200 $\mu$ M de 5-FU para avaliar viabilidade. Um segundo grupo de células AGS tratadas com EV de células AGS ou de células rAGS\_FU foi usado para avaliar a invasão e a formação de colônias na ausência e presença do 5-FU.

A Figura 15A mostra que células AGS sem tratamento ou tratadas com suas próprias vesículas apresentam viabilidade diminuída para  $\pm 42\%$  e  $\pm 34,3\%$  respectivamente quando tratadas com 5-FU. Entretanto, células AGS tratadas com VEs de células rAGS-5FU mostram viabilidade de  $\pm 93,3\%$  após o tratamento com 5-FU. Além disso, o tratamento com heparina, que diminui a interação de VEs com a membrana celular (ATAI et al. 2013), aboliu o efeito mediado pelas VEs de células rAGS\_FU sobre células AGS. Estes dados, apontam que as VEs de células resistentes a 5-FU são capazes de transferir este fenótipo a células parentais. Interessantemente, quando células rAGS\_FU são tratadas com VEs de células AGS, o fenótipo de resistência ao quimioterápico não é revertido (Figura 15B). Sugerindo que o fenótipo de resistência a 5-FU não pode ser revertido.

Para avaliar se o fenótipo de resistência adquirida é permanente, células AGS foram tratadas por 36 horas com VEs de rAGS\_FU, e a seguir lavadas e mantidas em meio fresco durante 14 dias. O resultado mostra que mesmo após este período na ausência de VEs de células resistentes a 5-FU, as células AGS tratadas com VEs de células rAGS\_FU continuam apresentando o fenótipo de resistência ao quimioterápico (Figura 15C). Portanto, VEs de células resistentes a 5-FU são capazes de transferir este fenótipo de forma permanente, pelo menos pelos períodos de tempo estudados neste modelo.

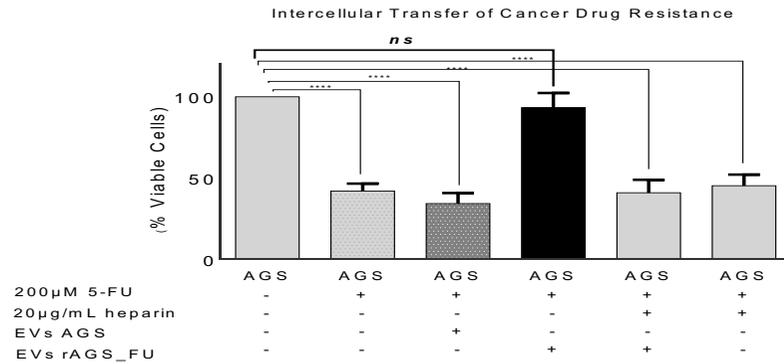
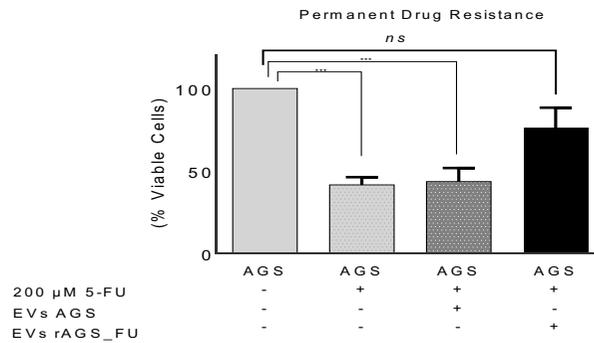
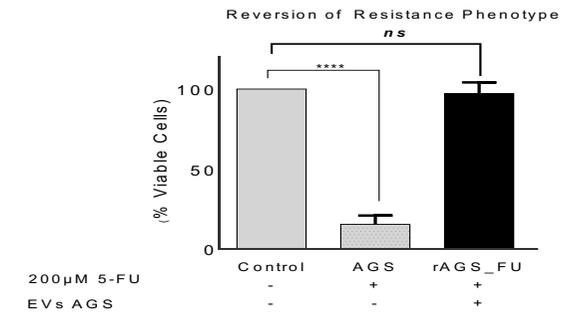
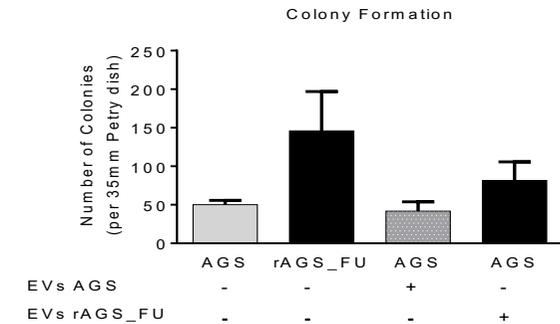
#### **5.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS rAGS\_FU TRANSFEREM O FENÓTIPO DE CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS E DE INVASÃO PARA CÉLULAS AGS**

Os ensaios mostrados na Figura 12 apontam que as células resistentes a 5-FU, rAGS\_FU, apresentam maior capacidade de formação de colônias do que as células parentais AGS. Na tentativa de avaliar se este fenótipo também poderia ser mediado por VEs, células AGS foram previamente tratadas com a mesma concentração de VEs de células AGS ou rAGS\_FU e mantidas em cultura por 10 dias (Figura 15D). O resultado mostra que, células AGS aumentam seu potencial de formação de colônias quando tratadas com VEs de células rAGS\_FU. Portanto, indicando que o fenótipo relacionado a capacidade celular de formar colônias (eficiência de clonagem) pode ser transferido através de VEs.

Estudos mostram que a capacidade de invasão de linhagens celulares de câncer gástrico pode estar associada à resistência à drogas (SHI et al. 2018). Dessa forma, realizamos ensaios de invasão celular em matrigel na tentativa de comparar inicialmente este fenótipo em células AGS e rAGS\_FU. Nossos dados apontam que as células rAGS\_FU apresentam maior capacidade de invasão do que as células AGS tanto quando o experimento é realizado na ausência ou presença de soro. Entretanto como era de se esperar a presença de soro (10% SFB) aumenta a migração de ambas as células (Figura 16).

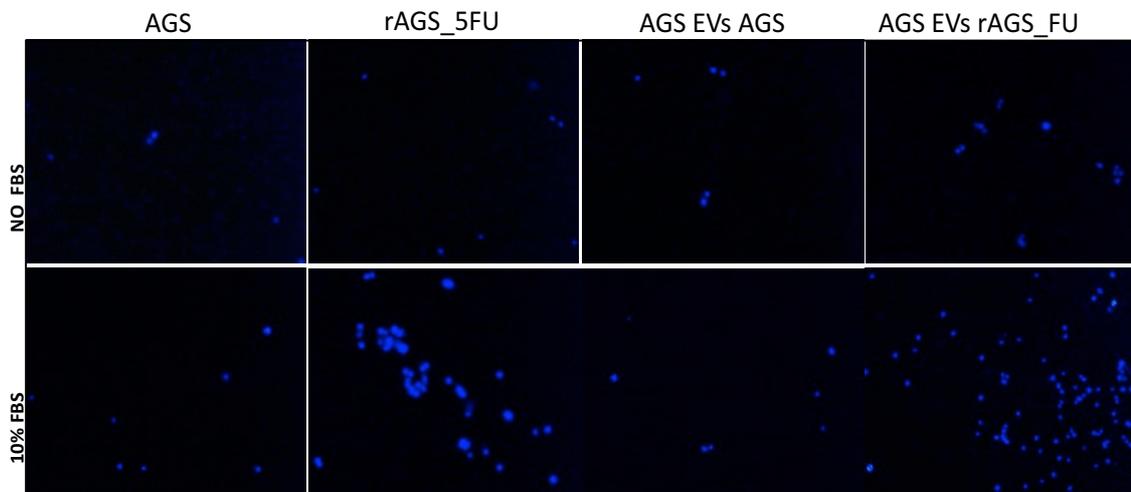
A seguir avaliamos a capacidade das VEs de transferir também o fenótipo de invasão. O tratamento de células AGS com suas próprias vesículas não muda sua capacidade de invasão, entretanto quando estas células são tratadas com VEs de células rAGS\_FU elas apresentam aumento na capacidade de invasão. O estímulo com soro aumenta igualmente a capacidade de invasão das células (Figura 16).

Portanto este grupo de experimentos mostrados nas Figuras 13 a 16 aponta que VEs são capazes de transferir o fenótipo de uma célula resistente a 5-FU a células mais sensíveis. Além do fenótipo de resistência, outros como capacidade de formação de colônias e de invasão de uma matrix de matrigel também podem ser transmitidos.

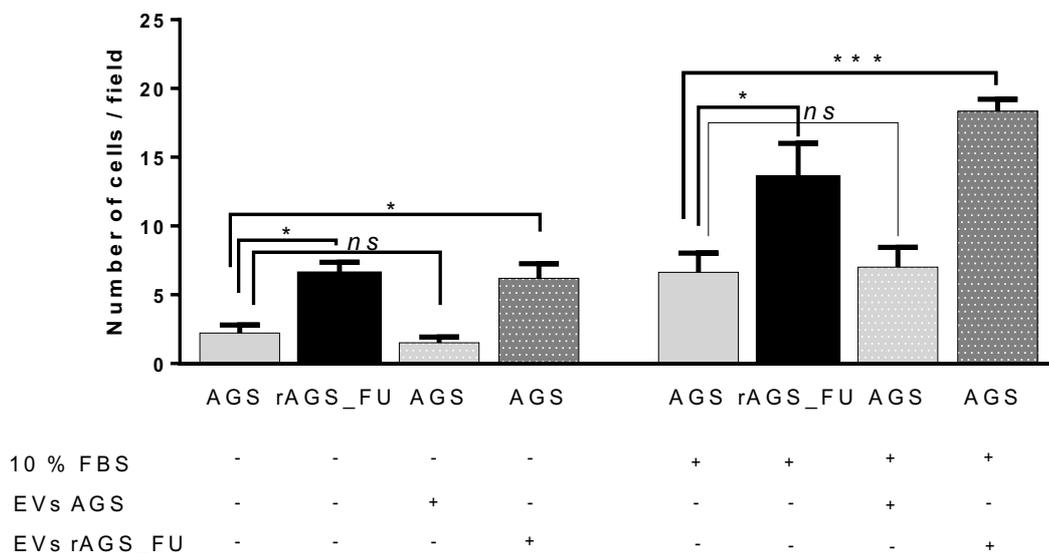
**A****B****C****D**

**Figura 15** - VEs secretadas por células resistentes a 5-FU transferem este fenótipo a células parentais sensíveis a este quimioterápico. **(A)** Células AGS foram previamente tratadas por 36 horas com VEs secretadas por células AGS ou células rAGS\_FU e posteriormente tratadas com 200µM de 5-FU por 72 horas. No grupo controle a interação de VEs com as células foi bloqueada com 20µg /mL de heparina. Gráficos de barras representam valores relativos da porcentagem de células viáveis ao final do experimento, normalizada para 100%, considerando a viabilidade das células AGS sem tratamento. Gráficos de barras representam a média ± SD da porcentagem normalizada de células viáveis de três experimentos independentes com amostras em triplicata, (\*P <0,05), *One way* ANOVA. **(B)** Células rAGS\_FU foram tratadas por 36 horas com VEs secretadas pela célula sensível e posteriormente tratadas com 200µM 5-FU por 72h, Gráficos de barras representam a média ± SD da porcentagem normalizada de células viáveis de três experimentos independentes com amostras em triplicata, (\*P <0,05), *One way* ANOVA. **(C)**. Células AGS foram tratadas por 36 horas com VEs de rAGS\_FU, lavadas e mantidas em cultura durante 14 dias. Células forma a seguir tratadas com 200µM 5-FU por 72 horas. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis, média ± SD da porcentagem normalizada de células viáveis de três experimentos independentes. **(D)** Células AGS foram tratadas durante 36 horas com VEs das células rAGS\_FU. Em seguida,  $3,5 \times 10^2$  células foram semeadas em placas de 3 mm de diâmetro e as colônias formadas foram contadas após dez dias. Valores representam a média do número de colônias em dois experimentos independentes realizados em triplicata.

A



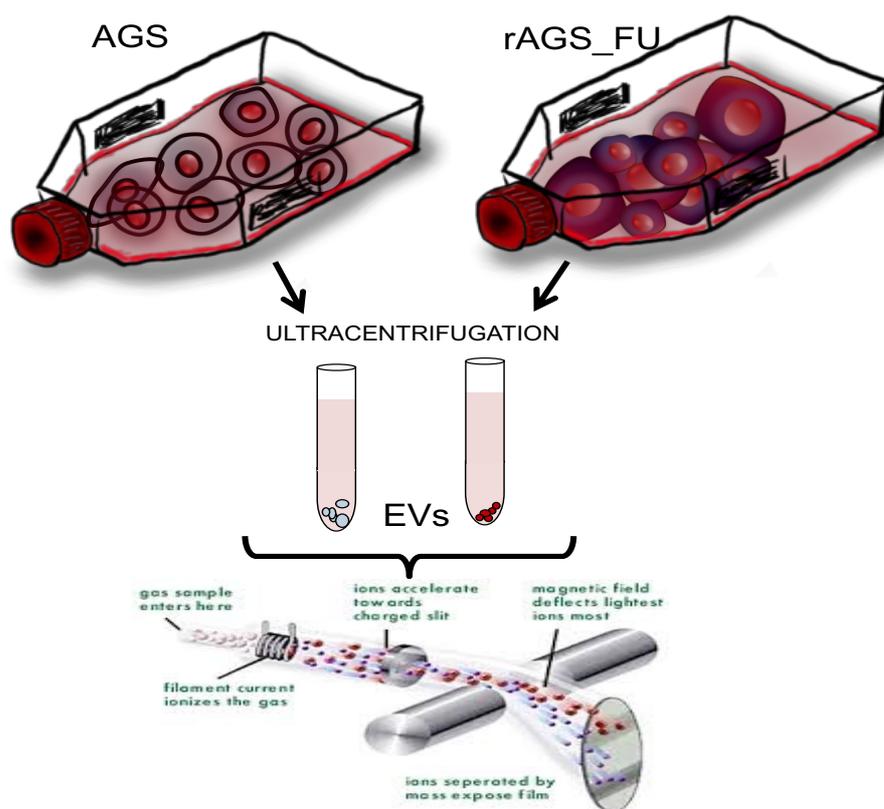
B



**Figura 16** - Ensaio de invasão a matrigel por células AGS e rAGS\_FU tratadas ou não com VEs. Células AGS e rAGS\_FU foram tratadas ou não com por 36 horas com VEs secretadas pela célula AGS ou rAGS\_FU e posteriormente tratadas com 200 $\mu$ M 5-FU por 72h. As células foram então lavadas e plaqueadas na presença ou não de 10% FBS sob matrigel. **(A)** Imagens das células que invadiram a membrana coberta por matrigel capturadas no microscópio Nikon Eclipse (TE2000-U) e analisadas no programa ImageJ. Barra de escala 20 $\mu$ m. **(B)** Gráficos de barras representam a média  $\pm$  SD do número de células/campo que invadiram o matrigel (n=3, em triplicata). \*P <0,05, One way ANOVA. ANOVA (comparações múltiplas de Tukey).

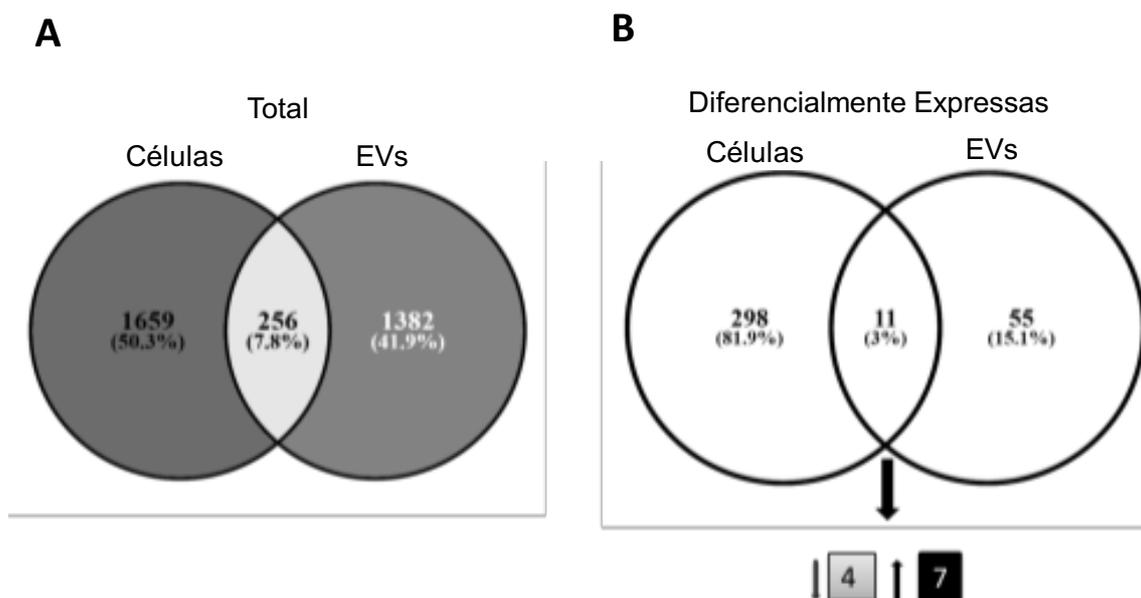
## 5.5 ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS E VEs

Realizamos análises proteômicas das VEs secretadas e das células secretoras com objetivo de identificar alterações no perfil do proteoma pós-resistência a 5-FU. Estas tiveram o objetivo de encontrar proteínas contidas em VEs responsáveis ou envolvidas na transferência de resistência à quimioterapia para células sensíveis e como isso se relacionava a alteração no perfil do proteoma das células em comparação às VEs. Para tanto, VEs das duas linhagens AGS e rAGS\_FU foram isoladas conforme o protocolo descrito anteriormente. Na Figura 17 pode-se observar o desenho experimental.



**Figura 17** - Desenho experimental: após 48 horas de careciamento, o MCT das células foi removido e as vesículas isoladas por ultracentrifugação. O *pellet* seco contendo as VEs ressuspenso, as VEs lisadas, as proteínas quantificada e a seguir submetidas à análise proteômica por espectrometria de massa.

Amostras de células e vesículas foram avaliadas por espectrometria de massas onde foram identificadas um total de 1.659 proteínas de células (AGS e rAGS\_FU) e 1.382 em VEs secretadas por estas células das quais 256 são comuns entre os grupos (Figura 18A). A partir desse total, os grupos de células AGS e rAGS\_FU foram comparados e 309 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas, considerando os critérios estatísticos estabelecidos na metodologia, as proteínas foram filtradas de acordo com os valores de  $p$  ( $< 0,05$ ) e descartamos proteínas identificadas por 2 peptídeos que apresentavam fold-changes acima de 10, considerando também o valor de  $p$  para descartá-las. Destas, 153 proteínas apresentaram expressão aumentada e 156 expressão diminuída. As Top 68 com maior diferença de expressão deste grupo estão apresentadas na Tabela 1. A mesma análise foi feita com relação às VEs com a comparação entre VEs\_AGs e VEs rAGS\_FU resultando em 66 proteínas diferencialmente expressas, sendo 26 com expressão aumentada e 40 com expressão diminuída). A lista destas proteínas está apresentada na Tabela 2.



**Figura 18** - Análise proteômica de células AGS e rAGS\_FU de tumores gástricos e VEs secretadas por estas células. **(A)** Diagrama mostrando um resumo dos achados de proteômica: número semelhante de proteínas totais exclusivas foi encontrado em células AGS e rAGS\_FU (1.659; 50.3%) comparadas ao número total de proteínas exclusivas de suas VEs- (1.382; 41.9%). Destas apenas 256 (7.8%) são proteínas comuns às VEs (AGS e rAGS\_FU) e células (AGS e rAGS\_FU). **(B)** Um total de 309 proteínas apresentaram diferença de expressão na comparação entre células (AGS x rAGS\_FU) das quais 298 proteínas eram exclusivas destas células (AGS e rAGS\_FU). Por sua vez, 66 proteínas apresentaram expressão diferente entre as VEs (AGS x rAGS\_FU). Um total de 11 proteínas são comuns entre células e VEs e apresentam diferenças entre os grupos AGS x rAGS\_FU.

**Tabela 1** - Top 68 proteínas com maior diferença de expressão após comparação entre as células **rAGS\_FU** e **AGS** (34 proteínas com expressão aumentada e 34 proteínas com expressão diminuída).

<b>Expressão aumentada</b>			
<b>Proteína</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>P-valor</b>	<b>FC</b>
FSCN1	Fascin OS	0,0106	24,76
KIAA2026	Uncharacterized protein KIAA2026 OS	0,0276	12,17
LRRC8D	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8D OS	0,0051	10,26
ZBP1	Z-DNA-binding protein 1 OS	0,0097	9,29
GSE1	Genetic suppressor element 1 OS	0,0090	6,89
EIF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS	0,0199	5,23
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS	0,0049	5,17
RERE	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein OS	0,0438	5,11
PFN1	Profilin-1 OS	0,0048	4,98
ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS	0,0378	4,79
PRDX2	Peroxiredoxin-2 OS	0,0010	4,76
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain OS	0,0097	4,67
HSP90AA5P	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5 OS	0,0049	4,38
SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS	0,0076	4,33
TUBB4A	Tubulin beta-4A chain (Fragment) OS	0,0093	4,28
HSPB1	Heat shock protein beta-1 OS	0,0096	4,17
ELAVL1	ELAV-like protein 1 OS	0,0205	4,09
TUBB8	Tubulin beta-8 chain OS	0,0058	3,99
FASN	Fatty acid synthase OS	0,0034	3,98
S100A11	Protein S100-A11 OS	0,0210	3,93
PRAM1	PML-RARA-regulated adapter molecule 1 OS	0,0294	3,92
EZR	Ezrin OS	0,0083	3,89
TUBB4B	Tubulin beta-4B chain OS	0,0008	3,80
FAM129B	Niban-like protein 1 OS	0,0212	3,75
GSN	Gelsolin OS	0,0005	3,75
TUBB	Tubulin beta chain OS	0,0024	3,69
TUBB3	Tubulin beta-3 chain OS	0,0025	3,66
SYNJ1	Synaptojanin-1 OS	0,0355	3,57
TUBB2B	Tubulin beta-2B chain OS	0,0030	3,52
XPO1	Exportin-1 OS	0,0011	3,51
CFL1	Cofilin-1 OS	0,0107	3,51
BCL2L13	Bcl-2-like protein 13 OS	0,0170	3,48
ACOT7	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase OS	0,0099	3,44
SKIV2L	Helicase SKI2W OS	0,0052	3,41

<b>Expressão diminuída</b>			
<b>Proteína</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>P-valor</b>	<b>FC</b>
CFAP47	Cilia- and flagella-associated protein 47 OS	0,0253	-16,99
R3HDM1	R3H domain-containing protein 1 OS	0,0261	-14,39
FKBP8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 OS	0,0064	-11,20
MPHOSPH10	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10 OS	0,0224	-9,44
VPS13C	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS	0,0380	-8,27
SEPT9	Septin-9 OS	0,0433	-8,04
CLUH	Clustered mitochondria protein homolog OS	0,0385	-7,46
CENPV	Centromere protein V OS	0,0142	-6,63
F8	Coagulation factor VIII OS	0,0061	-6,43
AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 OS	0,0167	-6,23
NPHP4	Nephrocystin-4 OS	0,0204	-6,13
MPI	Mannose-6-phosphate isomerase (Fragment) OS	0,0063	-6,00
MYO5C	Unconventional myosin-Vc OS	0,0052	-5,02
APTX	Aprataxin OS	0,0399	-4,64
ADGB	Androglobin OS	0,0236	-4,48
PPA2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial OS	0,0098	-4,44
KMT2B	Histone-lysine N-methyltransferase 2B OS	0,0456	-4,21
KIAA0355	Uncharacterized protein KIAA0355 OS	0,0109	-4,14
TNKS1BP1	182 kDa tankyrase-1-binding protein OS	0,0022	-4,11
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2 OS	0,0034	-3,92
ADD3	Gamma-adducin OS	0,0479	-3,65
TNRC18	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein OS	0,0019	-3,54
PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial OS	0,0118	-3,45
POTE1	POTE ankyrin domain family member 1 OS	0,0219	-3,43
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 OS	0,0359	-3,42
LUC7L2	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS	0,0260	-3,38
CCDC162P	Coiled-coil domain-containing protein 162 OS	0,0150	-3,19
UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS	0,0173	-3,09
SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS	0,0202	-3,04
IFI30	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase OS	0,0261	-2,93
DMGDH	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial OS	0,0032	-2,88
CLTB	Clathrin light chain B OS	0,0062	-2,77
SKIV2L2	Superkiller viralicidic activity 2-like 2 OS	0,0007	-2,76
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial OS	0,0003	-2,75

Na Tabela 2 foram listadas as 66 proteínas com maior diferença de expressão de acordo ao fold change após comparação entre as VEs secretadas por células rAGS\_FU e VEs AGS, sendo 26 proteínas com expressão aumentada e 40 proteínas com expressão diminuída.

**Tabela 2** - 66 proteínas com maior diferença de expressão após comparação entre as VEs das células rAGS\_FU e AGS (26 proteínas com expressão aumentada e 40 proteínas com expressão diminuída).

Expressão aumentada			
Proteína	Nome da proteína	P-valor	FC
ALPP	Alkaline phosphatase, placental type OS	0,0074	65,24
CNTRL	Centriolin OS	0,0026	29,93
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B OS	0,0139	24,64
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS	0,0325	10,26
FSCN1	Fascin OS	0,0328	9,45
HIST1H1B	Histone H1.5 OS	0,0097	8,38
CDCP1	CUB domain-containing protein 1 OS	0,0365	7,81
HIST1H1C	Histone H1.2 OS	0,0302	6,91
FBXO2	F-box only protein 2 (Fragment) OS	0,0289	5,37
TMPRSS9	Transmembrane protease serine 9 OS	0,0065	5,21
HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-A OS	0,0098	4,61
CCDC88B	Coiled-coil domain-containing protein 88B OS	0,0166	4,49
PRPF3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 OS	0,0134	4,09
NCAPD3	Condensin-2 complex subunit D3 OS	0,0008	3,84
EPHA4	Ephrin type-A receptor 4 OS	0,0085	3,43
COL8A1	Collagen alpha-1(VIII) chain OS	0,0158	2,90
SH3KBP1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS	0,0039	2,71
ALPI	Intestinal-type alkaline phosphatase OS	0,0087	2,66
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS	0,0308	2,59
USP34	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 OS	0,0439	2,54
PSMC4	26S protease regulatory subunit 6B OS	0,0275	2,38
S100A10	Protein S100-A10 OS	0,0222	2,34
TG	Thyroglobulin OS	0,0037	2,25
GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 OS	0,0067	2,18
CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4 OS	0,0418	1,61
CCT7	T-complex protein 1 subunit eta OS	0,0196	1,29
CCT7	T-complex protein 1 subunit eta OS	0,0196	1,29

**Expressão diminuída**

<b>Proteína</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>P-valor</b>	<b>FC</b>
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein OS	0,0166	-13,49
PLA2G2A	Phospholipase A2, membrane associated OS	0,0358	-12,91
C17orf78	Uncharacterized protein C17orf78 OS	0,0012	-12,90
C2orf47	Uncharacterized protein C2orf47, mitochondrial OS	0,0409	-6,27
LIPE	Hormone-sensitive lipase OS	0,0173	-6,01
TCAF1	TRPM8 channel-associated factor 1 OS	0,0456	-5,91
VTN	Vitronectin OS	0,0181	-5,84
SLC12A2	Solute carrier family 12 member 2 OS	0,0216	-5,43
EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS	0,0389	-3,11
HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS	0,0146	-2,93
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS	0,0172	-2,87
CST1	Cystatin-SN OS	0,0206	-2,79
PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1 OS	0,0301	-2,64
HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-16 alpha chain OS	0,0091	-2,54
TAF1A	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A OS	0,0177	-2,52
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein OS	0,0185	-2,37
RPL10A	60S ribosomal protein L10a OS	0,0220	-2,37
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6 OS	0,0050	-2,35
MIF	Macrophage migration inhibitory factor OS	0,0348	-2,31
ACTN4	Alpha-actinin-4 OS	0,0148	-2,28
ADGB	Androglobin OS	0,0021	-2,28
GMDS	GDP-mannose 4,6 dehydratase OS	0,0220	-2,18
EPB41L1	Band 4.1-like protein 1 OS	0,0490	-2,12
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS	0,0135	-2,05
NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment) OS	0,0095	-2,04
ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS	0,0062	-1,89
RPS28	40S ribosomal protein S28 OS	0,0402	-1,88
DIP2B	Disco-interacting protein 2 homolog B OS	0,0022	-1,85
GDI1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS	0,0390	-1,83
ERP44	Endoplasmic reticulum resident protein 44 OS	0,0051	-1,69
FDXR	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial OS	0,0376	-1,66
CORO1C	Coronin OS	0,0069	-1,54
NME1-NME2	Nucleoside diphosphate kinase OS	0,0224	-1,52
SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS	0,0302	-1,48
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1 OS	0,0051	-1,38
RPL32	60S ribosomal protein L32 (Fragment) OS	0,0169	-1,34
ITGAV	Integrin alpha-V OS	0,0436	-1,34
RPL23	60S ribosomal protein L23 OS	0,0132	-1,26
ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS	0,0004	-1,21
ITGA6	Integrin alpha-6 OS	0,0329	-1,15

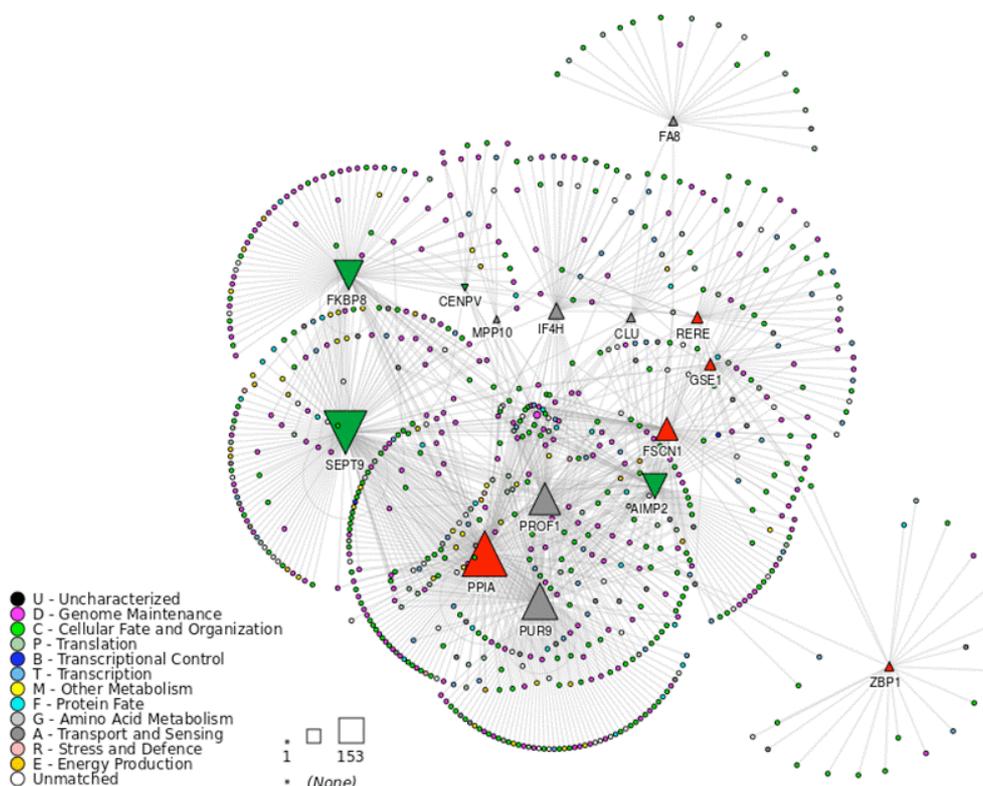
Por sua vez, a comparação entre os dois grupos de VEs (AGS e rAGS\_FU) mostrou 66 proteínas diferencialmente expressas. A comparação entre as proteínas diferencialmente expressas em condições de sensibilidade e resistência a 5-FU apontou que 11 delas estão presentes tanto em células como em VEs sendo que 7 proteínas foram identificadas com expressão aumentada e 4 com expressão diminuída (Figura 18B). No Quadro 1 identifica este grupo de proteínas.

**Quadro 1** - Proteínas diferencialmente expressas nas condições de resistência x sensibilidade a 7-FU e comuns entre células e VEs

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=3
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2
Centriolin OS=Homo sapiens GN=CNTRL PE=1 SV=2
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1
Androglobin OS=Homo sapiens GN=ADGB PE=2 SV=3
Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2
60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 OS=Homo sapiens GN=USP34 PE=1 SV=2
Condensin-2 complex subunit D3 OS=Homo sapiens GN=NCAPD3 PE=1 SV=2
Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3
Protein S100-A10 OS=Homo sapiens GN=S100A10 PE=1 SV=2

A rede de interação proteína-proteína produzida com a ferramenta NAViGaTOR apontou diferentes processos biológicos associados às proteínas com aumento de expressão (vermelho) e diminuição de expressão (verde) nas células (Figura 19) (BROWN et al. 2009). Também é possível observar a alta conectividade de proteínas importantes para os processos, esta conectividade tende a ser proporcional a importância/correlação da proteína na via, considerando as informações conhecidas hoje. Entre os processos biológicos estão a manutenção do genoma, destino celular e organização, tradução, controle transcricional, transcrição, metabolismo, endereçamento de proteínas,

metabolismo de aminoácidos, transporte e sensoriamento, estresse e defesa e produção de energia.

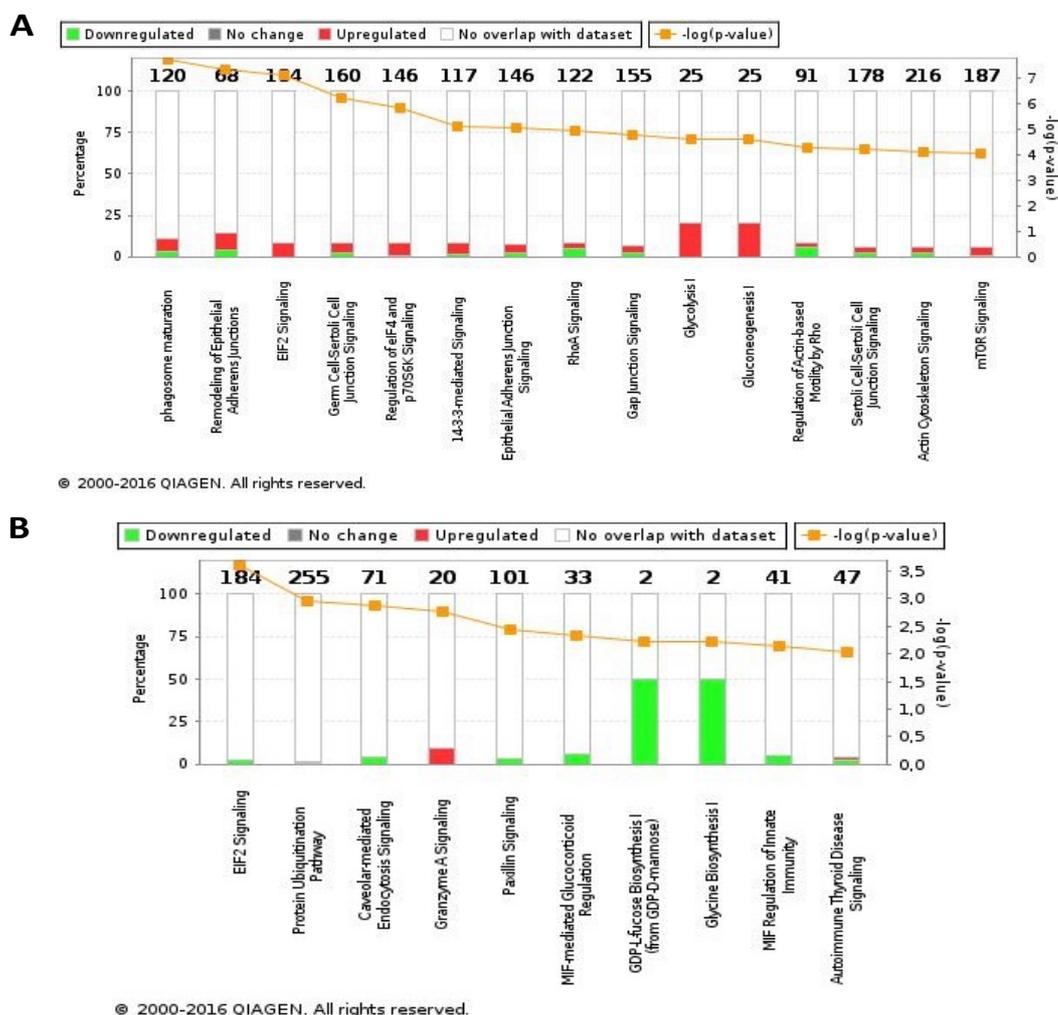


**Figura 19** - Rede de interação proteína-proteína em células. Os processos biológicos enriquecidos entre proteínas com expressão aumentada (vermelho), proteínas com expressão diminuída (verde) e proteínas identificadas pelo banco de dados, mas que não estavam presentes no presente estudo (cinza) estão retratadas em uma rede através da junção de proteínas envolvidas em cada processo formando um círculo

### 5.5.1 Enriquecimento das proteínas selecionadas em vias canônicas

Os resultados mostram que as proteínas com diferentes níveis de expressão entre as células fazem parte de vias de sinalização diferentes. Proteínas com altos níveis de expressão identificadas em células rAGS\_FU comparadas as células parentais (AGS) estão envolvidas preferencialmente em vias de sinalização de eIF2, regulação da sinalização de eIF4 e p70S6K, Glicólise I, Gliconeogênese I e mTOR (Figura 20A). Foi observado ainda que

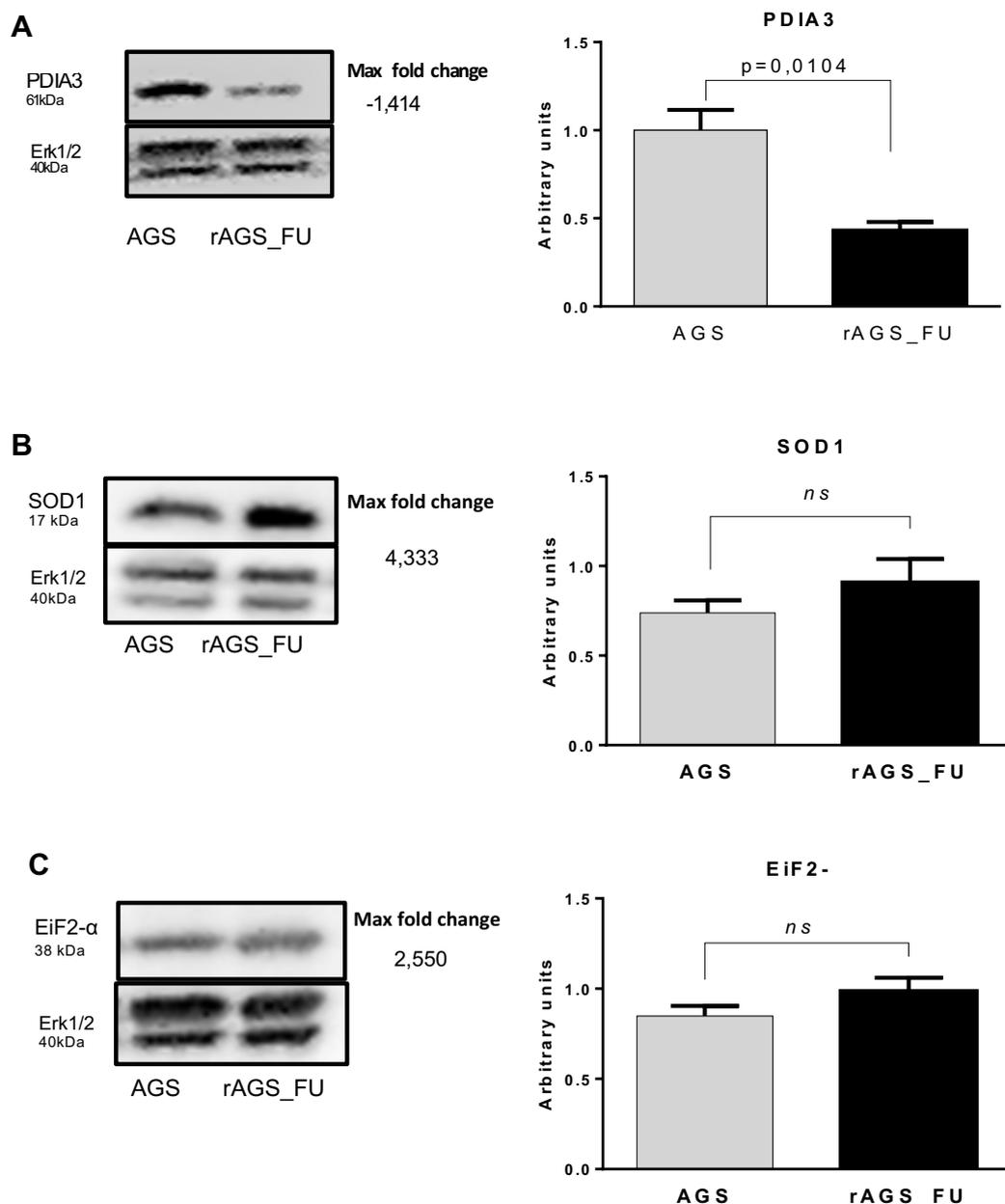
as VEs com expressão aumentada secretadas por estas células (rAGS\_FU) comparadas as VEs das células AGS estão preferencialmente envolvidas na via de sinalização de granzima A (Figura 20B).



**Figura 20** – Enriquecimento em vias canônicas das proteínas com aumento e diminuição da expressão em células e VEs de células AGS em relação às células e VEs rAGS\_FU. As proteínas diferencialmente expressas, com  $p < 0,05$ , entre as células e VEs das duas linhagens foram analisadas no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). **(A)** Top 15 vias que as proteínas com aumento e diminuição da expressão em células rAGS\_FU comparadas a parental AGS estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). **(B)** Lista das top 10 vias que as proteínas com aumento e diminuição da expressão em VEs de células rAGS\_FU comparadas a VEs de células parentais AGS estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Em cada barra está sinalizado verde (aumento de expressão) ou vermelho (diminuição de expressão) a quantidade relativa de proteínas encontradas na análise em relação a quantidade total de proteínas envolvidas na via com base nos bancos de dados do IPA. A significância estatística foi demonstrada por  $-\log(p\text{-valor})$ , conforme apresentado na linha amarela.

### **5.5.2 Ensaio de Western Blot para validação da expressão de proteínas selecionadas em vias canônicas**

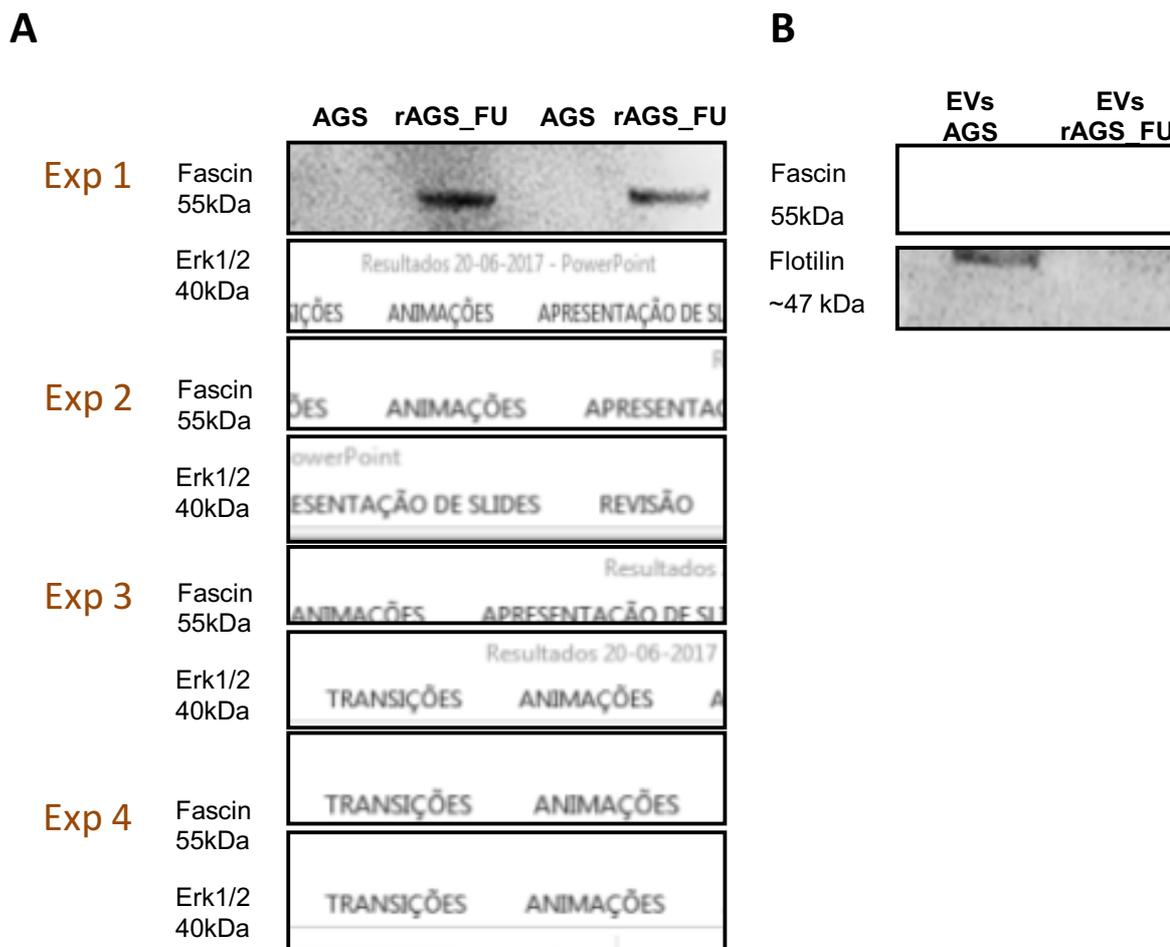
Com base nos achados de proteômica selecionamos para validação por *WB* as proteínas PDIA3, SOD1 e Eif2 $\alpha$  nas linhagens AGS e rAGS\_FU. Observamos através da técnica de *WB* que essas proteínas estão expressas realmente nas células, e o nível de expressão corrobora com os dados obtidos na proteômica, onde foi achado que em células rAGS\_FU a expressão das proteínas PDIA3 esta diminuída, SOD1 e EIF2 $\alpha$  aumentada, porém sem diferença estatística significativa em comparação às células AGS (Figura 21).



**Figura 21** - Validação da Expressão das proteínas identificadas na análise proteômica com diferente expressão em células AGS e rAGS\_FU. Foi preparado o extrato celular de células AGS e rAGS\_FU e as proteínas quantificadas através de WB. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o programa *ImageJ*. O carregamento de proteína total foi normalizado pela expressão da proteína ERK1/2, o gráfico de barras representa unidades arbitrárias da média normalizada da quantidade de proteína  $\pm$  SEM determinada por mais de três experimentos independentes. As proteínas avaliadas foram: PDIA3 (A), SOD1 (B) e Eif2 $\alpha$  (C). Teste t não pareado (\* $P < 0,05$ ).

Um dos objetivos desse trabalho foi identificar potenciais marcadores moleculares de resistência à quimioterapia e que possam ser carregados por VEs secretadas pelas células resistentes. Para isso selecionamos como alvo a proteína Fascina que, pelos ensaios de proteômica, apareceu altamente expressa em células rAGS\_FU (25 vezes mais expressa nestas do que nas células AGS) e nas vesículas por elas secretadas. Pela análise de proteômica a expressão de Fascina nas VEs de células rAGS\_FU é cerca de 9 vezes maior quando comparadas as VEs de células parentais AGS

Fascina é uma proteína aglutinante de actina com massa molecular de 55 a 58 kD associada com a motilidade celular (ONODERA et al. 2009). As linhagens celulares AGS e rAGS\_FU (Figura 22A) bem como suas VEs (Figura 22B) foram lisadas e submetidas a uma análise por *WB*. A análise de extratos celulares de 4 experimentos independentes realizados em duplicata mostram que nas condições experimentais nenhuma marcação para Fascina é observada na célula parental AGS, enquanto a célula rAGS\_FU apresenta alta expressão desta proteína. O carregamento proteico total nestes experimentos foi avaliado pela marcação para ERK1/2 (Figura 22A). Resultados semelhantes quanto a expressão de Fascina foram observados em extratos de VEs, onde aquelas secretadas pelas células rAGR\_FU contem altas concentrações de Fascina enquanto nenhuma expressão foi observada nas Vs derivadas de células parentais AGS. Para estes casos, a proteína flotilina foi usada como marcador de VEs e controle de carregamento de proteína.



**Figura 22** - Validação da Expressão da proteína Fascina em células e VEs. **(A)** *Western blot* para a proteína Fascina a partir de extratos das células AGS e rAGS\_FU. A enzima Erk1/2 foi usada como controle de carregamento total de proteínas. **(B)** As VEs de células AGS e rAGS\_FU foram isoladas, as proteínas precipitadas com TCA 15% e quantificadas por *Bradford*. Ensaio de *western blot* foram realizados para a detecção da expressão de Fascin. Experimentos semelhantes foram realizados para avaliação da proteína flotilina, que foi usada como marcador específico de VEs além de controle para o carregamento total de proteína.

A grupo de experimentos apresentados neste estudo aponta a capacidade de células de tumores gástricos resistentes ao tratamento com 5-FU de secretarem VEs num volume cerca de 2,5 vezes maior que a célula parental. Estas VEs são capazes de transferir o fenótipo de resistência ao quimioterápico quando associam-se a células AGS. Além disso, os fenótipos de

capacidade de formação de colônia e invasão também são transferidos por estas VEs. Análises de proteômica mostraram grupos de proteínas que podem estar envolvidas neste processo bem como vias que podem ser modificadas pela aquisição de resistência ao 5-FU. A Fascina é um ótimo candidato em participar no desenvolvimento de resistência a 5FU, uma vez que a atividade desta proteína no processo tumoral é bastante conhecida (GHEBEH et al. 2014) Outras proteínas que apresentem diferenças entre as células e VEs resistentes X sensíveis a 5-FU e detectadas pela análise do proteomica neste estudo serão avaliadas para entender sua participação no processo de resistência ao 5-FU.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 GERAÇÃO DE UM MODELO CELULAR DE CÂNCER GÁSTRICO RESISTENTE A 5-FU

O 5-FU é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de tumores devido sua eficácia, tal como acontece com outros agentes quimioterápicos, a resistência ao 5-FU continua sendo um fator limitante. Apesar dessas limitações o 5-FU continua na linha da frente da terapia do CG, dessa forma, é relevante entender os mecanismos moleculares de resistência a esse quimioterápico.

A resistência a quimioterápicos pode ser intrínseca, isto acontece quando fatores que medeiam à resistência estão presentes nas células tumorais antes mesmo da terapia o que a torna o tratamento ineficaz. Ela pode ainda ser adquirida durante o tratamento, isto é quando as células inicialmente sensíveis sofrem alterações genômicas e epigenômicas que alteram vias de sinalização, modificando a resposta ao tratamento (HOLOHAN et al. 2013). Os tumores são altamente adaptáveis e a ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência ou/e a inativação das vias indutoras de morte estão intrinsecamente relacionadas com a quimioresistência (DEBATIN e KRAMMER 2004; SONG et al. 2017). Fatores importantes como a influência do microambiente tumoral também contribuem para ineficácia do tratamento com quimioterápicos (MAIER et al. 2005; KONIECZKOWSKI et al. 2018; WATSON et al. 2018). Outro fator fundamental para resistência a quimioterapia é a

presença de células tronco tumorais (CSC do Inglês *cancer stem cells*), essas têm sido mostradas como predominantemente resistentes a quimioterapia (SINGH e SETTLEMAN 2010; VALENT et al. 2012).

É importante lembrar que os tumores possuem uma grande heterogeneidade celular e molecular, justificando que a resistência a drogas poderia ocorrer devido à pressão seletiva induzida pela terapia, onde um pequeno grupo de células resistiria ao tratamento. Este evento acarretaria numa resposta inicial a terapia, mas invariavelmente levaria a resistência ao tratamento e a recidiva do tumor (SWANTON 2012). Na tentativa de mimetizar esses eventos em nosso estudo, geramos um modelo celular de adenocarcinoma gástrico resistente ao tratamento pelo quimioterápico 5-fluorouracil. Para tal, a linhagem celular de tumor gástrico humano, AGS foi exposta a um tratamento com aumento gradual da concentração de 5-FU iniciando com 10 $\mu$ M. A medida que essas células resistiam a essa dose inicial, as concentrações de 5-FU foram aumentadas até 50  $\mu$ M. As células geradas foram denominadas rAGS\_FU e mantidas em cultura na presença do quimioterápico para manter a pressão seletiva.

Ensaio de viabilidade celular realizados com doses crescentes de 5-FU com concentrações maiores em até 16 vezes (800 $\mu$ M) daquela usada para selecionar as células rAGS\_FU (50 $\mu$ M) mostraram, pela medida de viabilidade celular por marcação com MTT, que as células selecionadas são realmente mais resistentes ao quimioterápico do que as parentais AGS (Figura 9).

Estudo recente em câncer gástrico mostrou que o aumento da expressão de Timidilato sintase (TS), está associada à resistência ao 5-FU, sendo a presença desta enzima um determinante crítico da citotoxicidade dessa

droga (LIANG et al. 2017). A avaliação desta enzima nas células geradas no presente trabalho confirma este dado, mostrando uma expressão bastante elevada de TS nas células rAGS\_FU comparadas as parentais AGS (Figura 10). Portanto, as células geradas neste trabalho e denominadas rAGS\_FU confirmaram o fenótipo de resistência ao 5-FU e tornaram-se nosso modelo de estudo.

Foi demonstrado, em estudos prévios com linhagens celulares de CG (MGC803 e AGS) resistentes a cisplatina e linhagens de câncer colorretal (KM12L4 e HT29), resistentes à oxaliplatina, estabelecidas por protocolos similares ao nosso, que essas exibiam maior proliferação, motilidade, invasão e uma mudança fenotípica semelhante a transição epitélio mesenquima quando comparadas com as células sensíveis (YANG et al. 2006; HUANG et al. 2016). Estas observações corroboram com nossos resultados onde observamos que células rAGS\_FU, além de resistirem a um novo tratamento com 5-FU, foram capazes de apresentar um potencial proliferativo cerca de 2,5 vezes maior na presença do quimioterápico que as célula parentais, atingindo uma densidade de saturação próxima a  $35 \times 10^4$  células/35mm mm o que também representa cerca de 3 vezes mais que a célula AGS (Figura 11A). O resultado de proliferação foi confirmado ainda por ensaio de BrdU, um análogo de dTTP (Desoxitimidina trifosfato) que é incorporado às fitas de DNA de células em replicação, substituindo a dexositimidina, quanto maior a incorporação de BrdU, maior a atividade proliferativa das células. Assim células rAGS\_FU foram capazes de incorporar maiores quantidades de BrdU na ausência ou presença do quimioterápico do que as AGS (Figura 11B) indicando o aumento da síntese de DNA nas células resistentes a 5-FU em relação as células sensíveis.

Na presença de 5-FU, as células rAGS\_FU foram capazes de formar um

número maior de colônias e com maior tamanho em ensaios de eficiência de plaqueamento (Figura 12). Juntos estes resultados confirmam a maior capacidade proliferativa da célula rAGS\_FU comparada a célula parental AGS.

Ensaio invasão a matrigel mostram que em condições basais (ausência de soro) as células rAGS\_FU apresentam capacidade de invasão cerca de 2,5 vezes maior que as AGS. Na presença de soro, como era de se esperar, a invasão de ambas as células aumenta, mas a diferença entre as resistentes e sensíveis a 5-FU continua existindo (Figura 16).

## **6.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E SEU PAPÉL NA RESISTÊNCIA À 5-FU**

Estudos recentes demonstraram que VEs secretadas para o espaço extracelular, podem mediar a comunicação entre células vizinhas ou a distância. Estas são geradas a partir dos Corpos multivesiculares (MVBs), e carregam proteínas, lipídeos, mRNA e são enriquecidos em miRNAs (THÉRY 2011; PENFORNIS et al. 2016; TKACH e THÉRY 2016). Vários estudos mostraram que células tumorais secretam VEs para o microambiente, modulando quioresistência e progressão tumoral (BOELENS et al. 2014; QU et al. 2016; WEN et al. 2016; WANG et al. 2016). Apesar do grande número de estudos que mostram o papel das VEs em diferentes tipos tumorais, em CG pouco se sabe sobre o papel destas vesículas na resistência a quimioterapia. Nosso objetivo foi entender a regulação da secreção destas vesículas em condições de resistência celular a 5-FU e a capacidade destas em transferir estes fenótipos a outras células.

Em primeiro, caracterizamos as VEs secretadas por células AGS e rAGS\_FU através da análise da sua concentração e tamanho. Resultados dessa análise evidenciaram que células resistentes secretam 2 a 3 vezes mais VEs em comparação com as células parentais, entretanto nenhuma diferença foi encontrada na distribuição por tamanho dessas VEs. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados em células de mieloma e de câncer de pâncreas resistentes à quimioterapia que têm a secreção de VEs aumentada quando comparadas aquelas sensíveis a droga (MURALIDHARAN-CHARI et al. 2016; BANDARI et al. 2018).

De acordo com os nossos achados VEs secretadas por células resistentes a 5-FU (rAGS\_FU) têm a capacidade de transferir o fenótipo de resistência para células sensíveis (AGS). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada quando células resistentes foram tratadas com VEs derivadas de células sensíveis (Figura 15B). Além disso, a resistência a 5-FU mediada por VEs não é perdida mesmo após a retirada das VEs do sistema (Figura 15C). Portanto, as alterações mediadas por VEs de células resistentes a 5-FU podem causar modificações permanentes nas células que as recebem. Podemos sugerir que estas modificações estão relacionadas, por exemplo, a modificações no DNA como metilação, possibilidade esta não explorada nos nossos estudos. Estes dados são reforçados por outros estudos que mostram a capacidade das VEs de influenciar na resistência celular à terapia (SHAO et al. 2015).

Além disso, nossos dados apontam que células resistentes a 5-FU apresentam maior migração do que as parentais, e que VEs das células resistentes rAGS\_FU têm capacidade de aumentar a invasão de células parentais AGS em níveis semelhantes aqueles das células resistentes.

Estes resultados estão alinhados com aqueles que mostram que em tumores de pâncreas VEs modulam a invasão e metástase devido aos seus efeitos reguladores nas células e no microambiente tumoral (QIU et al. 2018). Em modelo de câncer de ovário as VEs modularam resistência à cisplatina (SAFAEI 2005). Em tumores de mama foi observado que células sensíveis apresentaram fenótipo de transição epitélio-mesenquima, alta capacidade de migração e com alta expressão de miR-155, bem como menos quimiossensibilidade quando as células receberam exossomos de células quimiorresistentes (SANTOS et al. 2018). Em 2012, CORCORAN et al. demonstraram que VEs podem transferir resistência ao docetaxel em câncer de próstata, fenômeno similar foi descrito em outros tumores como nos tumores de pulmão, mama e fígado (TAKAHASHI et al. 2014; XIAO et al. 2014; KONG et al. 2015).

No conjunto nossos dados mostram que as VEs secretadas por células resistentes possuem a capacidade de transmitir este fenótipo às células sensíveis, bem como aumentar a formação de colônias e a invasão. Além disso, observamos que VEs de células sensíveis não alteram o fenótipo tanto de células resistentes como nelas mesmas.

Diante desses resultados, conduzimos experimentos para identificar as moléculas contidas em VEs de células resistentes rAGS\_FU, que pudessem ser responsáveis pelas transmissão das atividades de resistência a 5-FU e de invasão celular. Para isso realizamos espectrometria de massas para avaliação do conteúdo proteico das VEs provenientes de células AGS e comparamos com aquele de VEs de células rAGS\_FU. O sequenciamento do RNA presente nas vesículas também foi realizado, entretanto estes resultados ainda não foram finalizados. Em câncer de mama miRNA carregados por VEs de células

resistentes modificaram a expressão de genes específicos, modulando quimioresistência nas células receptoras (CHEN et al. 2014a; MAO et al. 2016). O miR-222 por exemplo é um desses moduladores com um papel importante nesse processo (CHEN et al. 2014b; YU et al. 2016).

Na análise por espectrometria de massas foram identificadas 1.915 proteínas nas células e 1.638 proteínas em VEs, 309 proteínas diferencialmente expressas entre as células ASG e rASG\_FU, e 66 entre suas VEs. Selecionamos para validação por *western blotting* as proteínas PDIA3, SOD1 e Eif2- $\alpha$ , identificadas como diferencialmente expressas entre as duas células na análise proteômica (Anexo 3). Os resultados de *western blotting* corroboram com a análise proteômica para a proteína PDIA3 que aparece com expressão diminuída em células resistentes. Por sua vez as proteínas SOD1 e Eif2 mostram um ligeiro aumento de expressão nas células resistentes, o que foi observado na proteômica, entretanto no *western blotting* as diferenças não foram estatisticamente significantes.

A proteína PDIA3 (*protein disulfide isomerase family A, member 3*) também conhecida como por ERp57 (*endoplasmic reticulum protein 57*), é uma das principais proteínas da família disulfato isomerase (PDI) conhecida como uma chaperona que auxilia o envelopamento protéico e encaminha proteínas malformadas à destruição, caso não atinjam a configuração correta. Em gliomas a expressão aumentada dessa proteína foi associada à progressão tumoral (PERRI et al. 2017). Foi demonstrado que em pacientes com CG a perda da expressão de PDIA3 está correlacionada à agressividade do tumor (LEYS et al. 2007). Estudos relacionados a proteína PDIA3 em CG são limitados (WU et al. 2014), no entanto os resultados observados na análise

proteômica e posteriormente validados na análise por *Western blotting* corroboram com esse dado da literatura.

A SOD1 (superóxido dismutase 1) é uma metaloenzima citosólica que requer cofatores Cu (II) / Zn (II) para sua ativação, é importante para evitar o estresse oxidativo pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, as espécies reativas de oxigênio são neutralizadas por um sistema de defesa antioxidante complexo, constituído por enzimas, como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase e numerosos antioxidantes não enzimáticos (MIRANDA-VILELA et al. 2010). A abundância de peróxido de hidrogênio intracelular ( $H_2O_2$ ) parece ser a principal causa de estresse oxidativo, frequentemente associado ao desenvolvimento de câncer, distúrbios neurodegenerativos e doenças autoimunes (TRACHOOTHAM et al. 2009). A superexpressão de SOD *in vitro* aumenta a diferenciação celular, diminui o crescimento e a proliferação celular, podendo reverter um fenótipo maligno para um não-maligno. *In vivo*, esse fenômeno é complexo devido às interações célula-microambiente tumoral. A superexpressão de SOD tem sido associada a um mau prognóstico e resistência à quimioterapia e radioterapia (FINKEL e HOLBROOK 2004). BLANDER et al. (2003) descreveram que o silenciamento de SOD1 usando RNAi induziu senescência em células normais e a morte celular em células tumorais. Diversos estudos demonstraram que SOD1 desempenha um papel importante na resistência à cisplatina (SALGANIK 2001; BROWN et al. 2009), em nosso modelo foi observado superexpressão de SOD1 nas células resistentes a 5-FU, corroborando com estes dados da literatura. No entanto, nosso achado precisa de mais aprofundamento, pois que a modulação da atividade de SOD1 pode superar essa resistência e,

finalmente, levar a melhores resultados clínicos nos pacientes (HANGAUER et al. 2017).

Também foi validada a expressão do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 (eIF2- $\alpha$ ), e observamos sua superexpressão em células resistentes. EIF2- $\alpha$  tem papel importante em resposta ao estresse celular, sendo que o ponto de convergência para todos os estímulos que ativam resposta integrada ao estresse é a fosforilação da subunidade eIF2- $\alpha$  na serina 51 (RON 2002). A regulação da tradução através do eIF2- $\alpha$  é um componente importante da imunidade inata à infecção viral, cuja desregulação pode contribuir para a tumorigênese em células humanas (PERKINS e BARBER 2004). Alguns estudos abordam o papel de eIF2- $\alpha$  em câncer, a fosforilação eIF2- $\alpha$  está associada a ativação de vias de resistência e é relevante entender os mecanismos nos quais eIF2- $\alpha$  pode responder ao estresse celular e regular respostas a resistência à quimioterapia (HOLCIK 2015).

### **6.3 A FASCINA EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA À 5-FU**

A resistência a quimioterapia continua sendo o maior problema para terapia anticancer, tendo em conta os nossos resultados, onde foi observado que células resistentes ao 5-FU, foram capazes de transferir seu fenótipo á células selvagens, e essas por sua vez apresentaram características similares às resistentes. Com base nesses dados decidimos buscar na análise proteômica os potenciais alvos para terapia, e/ou encontrar marcadores preditivos de resposta ao tratamento. Como em nossa análise buscamos preferencialmente por marcadores localizados em células e VEs secretadas

pela linhagem resistente, foi selecionada a proteína fascina que apresentou um aumento de expressão tanto em células rAGS\_FU como em VEs secretadas por essas células, sendo o *fold-change* de 24,8 e 9,5, respectivamente. Esses achados foram validados por *WB* e o resultado mostrou que essa proteína é exclusivamente expressa em células resistentes ao 5-FU e VEs secretadas por estas células.

A proteína fascina (*FSCN-1*) é uma proteína do citoesqueleto com funções de agregar filamentos de atina e um papel chave nas interações célula-célula, adesão e motilidade. Esta proteína é ainda fundamental para a formação de uma vasta gama de protrusões celulares, microfilamentos, filopodia e invadopodia, além de ser importante para a funcionalidade dessas protrusões durante a migração celular (VIGNJEVIC et al. 2006; ADAMS 2015). A expressão aberrante de fascina tem sido associada à vários tipos tumorais, e clinicamente está associada à tumores mais agressivos. Em adenocarcinomas colorretais, a expressão aumentada e difusa de fascina está associada à progressão da doença e à redução da sobrevida (HASHIMOTO et al. 2006). Em câncer de mama foi demonstrado que a proteína fascina é superexpressa em tumores negativos ao receptor de estrógeno e essa expressão positiva de estar associada à diminuição da sobrevida livre e global de doença (YODER et al. 2005). Além disso, em outros estudos prévios o significado prognóstico similar da expressão da fascina foi confirmado no carcinoma de células renais (JIN et al. 2006), no adenocarcinoma gástrico (TSAI et al. 2007), no carcinoma de células escamosas da laringe (ZOU et al. 2010) e no carcinoma de ovário (LIN et al. 2008). A supressão do miRNA (miR) -145 no câncer de mama regula a migração celular, tendo como alvo *FSCN-1* e inibindo a transição epitélio mesenquima (ZHAO et al. 2016a). Estudos recentes demonstraram que *FSCN-1*

é regulada em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca e em linhagens celulares derivadas deste mesmo tumor, a superexpressão de FSCN-1 está significativamente correlacionada com a progressão da doença e mau prognóstico, além disso, fascina pode ter um papel importante no processo de migração e invasão (RODRIGUES et al. 2017). Foi demonstrado também que a desregulação da via de sinalização linc-ROR/miR-145/FSCN1 foi associada à resistência terapêutica e transição epitélio-mesenquima em adenocarcinoma pulmonar. A inibição da expressão do linc-ROR aumentou a sensibilidade ao docetaxel e reverteu o processo de transição epitélio mesenquima, reduziu o potencial de proliferação, migração e invasão em células de adenocarcinoma pulmonar resistentes a docetaxel. O miR-145 foi identificado como um alvo direto do linc-ROR, e a sua superexpressão levaria à desregulação de seu gene alvo a FSCN-1 (PAN et al. 2017). A proteína fascina foi demonstrada como um transdutor mecânico de forças citoplasmáticas e fornece evidências de seu papel de promover a migração e invasão celular eficiente (JAYO et al. 2016). Apesar de diversos estudos prévios demonstrarem o envolvimento da fascina diferentes processos celulares incluindo a resistência à drogas pouco se sabe sobre o papel da fascina em câncer gástrico.

Estes dados apontam pela primeira vez a expressão de fascina em VEs, de células resistentes ao 5-FU em linhagens celulares de AdG, sendo necessário mais estudos para melhor compreender os possíveis mecanismos pelos quais essa proteína pode modular a resistência e por conseguinte reverter esse processo para beneficiar pacientes com AdG.

## 7 CONCLUSÕES

- Células tratadas com aumento gradual de 5-FU e mantidas sob pressão seletiva tornaram-se mais resistentes à um novo tratamento em relação às células parentais.
- Células resistentes a 5-FU apresentaram uma maior capacidade proliferativa e de formar colônias, tanto na presença ou ausência do quimioterápico.
- Células de AdG resistentes a 5-FU secretam 2-3 vezes mais VEs do que as parentais sendo que o tamanho médio destas não varia.
- VEs secretadas por células resistentes A 5-FU transferem seu cago para células sensíveis promovendo quimioresistência e aumentando o potencial invasivo das células receptoras. Indicando que as VEs tem um papel importante na resistência a 5-FU em tumores gástricos.
- As VEs secretadas por células resistentes a 5-FU apresentam um perfil proteômico diferente das VEs secretadas pela célula parental.
- As proteínas com aumento da expressão em VEs de células resistentes a 5-FU têm relação com resistência tumoral à terapia, evidenciado pelas vias nas quais as mesmas estão envolvidas.
- O aumento de expressão de fascina em VEs e células rAGS\_FU sugere sua relação com a resistência ao 5-FU, se confirmado este papel, a fascina pode ser um importante biomarcador de resistência ao tratamento com 5-FU.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliação de proteômica foram conduzidas em outros grupos experimentais como aqueles de células parentais que receberam vesículas de células resistentes ou vesículas dela próprias. Análises destes grupos de proteínas ainda precisam ser finalizadas.

Todos os grupos de células e VEs dos diferentes tratamentos também serão submetidos a um sequenciamento de RNA com objetivo de identificar RNAs codificadores e não codificadores que possam ser transferidos de células resistentes para células parentais e modular o fenótipo de resistência.

Neste trabalho alguns achados relevantes abriram novas perspectivas de estudo. Para complementar os achados atuais precisamos perseguir experimentos que demonstrem a importância de fascina presente em VEs no processo de transferência do fenótipo de resistência a 5-FU.

- Avaliar as alterações biológicas resultantes do silenciamento de fascina, incluindo, adesão, migração e invasão na linhagem celular rAGS\_FU.
- Avaliar a expressão de fascina por tissue microarray em AdG de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento por 5-FU.
- Isolar, quantificar e avaliar a presença de fascina em VEs presentes em plasmas provenientes de pacientes portadores de AdG antes da terapia neoadjuvante com 5-FU (entre outras drogas) e correlaciona-las com a resposta patológica apresentada no momento da cirurgia.
- Isolar, quantificar e avaliar a presença de fascina em VEs presentes em plasmas provenientes de pacientes portadores de AdG antes e durante a terapia adjuvante com 5-FU (em combinação com outras drogas) e correlaciona-las com a resposta clínica ao tratamento.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. **Blood Cells Mol Dis** 2005; 35:169-73.

Adams JC. Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer. **Expert Rev Mol Diagn** 2015; 15:41-8.

Agboola O. Adjuvant treatment in gastric cancer. **Cancer Treat Rev** 1994; 20:217-40.

Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. **Nat Rev Dis Prim** 2017; 3:17036.

Alais S, Simoes S, Baas D, et al. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. **Biol Cell** 2008; 100:603-18.

Allinen M, Beroukhim R, Cai L, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell** 2004; 6:17-32.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nat Cell Biol** 2008; 10:619-24.

Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. **Proc Natl Acad Sci** 2009; 106:3794-9.

Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. **Proc Natl Acad Sci** 2011; 108:4852-7.

Atai NA, Balaj L, Van Veen H, et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. **J Neurooncol** 2013; 115:343-51.

Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nat Cell Biol** 2012; 14:677-85.

Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. **Nat Commun** 2011; 2:180.

Bandari SK, Purushothaman A, Ramani VC, et al. Chemotherapy induces secretion of exosomes loaded with heparanase that degrades extracellular matrix and impacts tumor and host cell behavior. **Matrix Biol** 2018; 65:104-18.

Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, et al. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. **Cancer Immunol Immunother** 2010; 59:841-50.

Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. **Cancer Cell** 2016; 30:836-48.

Blander G, De Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. **J Biol Chem** 2003; 278:38966-9.

Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. **Cell** 2014; 159:499-513.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of tumours of the digestive system, 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC; 2010.

Brandl A, Pachmayr E, Gül-Klein S, Alberto M, Thuss-Patience P, Rau B. [Surgical treatment of peritoneal metastases of gastric cancer]. **Chirurg** 2018 Apr 3. [Epub ahead of print]

Brauer HA, Makowski L, Hoadley KA, et al. Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2013; 19:571-85.

Brown DPG, Chin-Sinex H, Nie B, Mendonca MS, Wang M. Targeting superoxide dismutase 1 to overcome cisplatin resistance in human ovarian cancer. **Cancer Chemother Pharmacol** 2009; 63:723030.

Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, et al. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. **J Biol Chem** 2011; 286:34426-39.

Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. **Cancer Res** 2009; 69:785-93.

Catenacci DVT, Tebbutt NC, Davidenko I, et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2017; 18:1467-82.

Cavalcante MQ DE F, Silva CIS, Braga-Neto MB, et al. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2012; 107:561-3.

Cavanna L, Seghini P, Di Nunzio C, et al. Gastric cancer with brain metastasis and the role of human epidermal growth factor 2 status. **Oncol Lett** 2018; 15:5787-91.

Chaput N. Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. **J Leukoc Biol** 2006; 80:471-8.

Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **J Biol Chem** 1946; 166:189-97.

Chavez-Muñoz C, Kilani RT, Ghahary A. Profile of exosomes related proteins released by differentiated and undifferentiated human keratinocytes. **J Cell Physiol** 2009; 221:221-31.

Chen JN, He D, Tang F, Shao CK. Epstein-barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. **J Clin Gastroenterol** 2012; 46:262-71.

Chen WX, Cai YQ, Lv M, et al. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. **Tumor Biol** 2014a; 35:9649-59.

Chen WX, Liu XM, Lv MM, et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of MicroRNAs. **PLoS One** 2014b; 9:e95240.

Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. **Oncotarget** 2016; 7:48832-41.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol** 2009; 19:43-51.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2014; 30:255-89.

Corcoran C, Rani S, O'Brien K, et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. **PLoS One** 2012; 7:e50999.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res** 1988; 48:3554-60.

Costa WL, Coimbra FJF, Fogaroli RC, et al. Adjuvant chemoradiotherapy after d2-lymphadenectomy for gastric cancer: the role of n-ratio in patient selection. results of a single cancer center. **Radiat Oncol** 2012; 7:1-9.

Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nat Cell Biol** 2015; 17:816-26.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:11-20.

De Gassart A, Géminard C, Février B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. **Blood** 2003; 102:4336-44.

De Gassart A, Géminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic** 2004; 5:896-903.

Debatin K-M, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. **Oncogene** 2004; 23:2950-66.

Deng J-Y, Liang H. Clinical significance of lymph node metastasis in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3967-75.

Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell - Derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood** 2007; 110:2440-48.

Díaz P, Valderrama MV, Bravo J, Quest AFG. Helicobacter pylori and gastric cancer: adaptive cellular mechanisms involved in disease progression. **Front Microbiol** 2018; 9:5.

Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clin Pharmacokinet** 1989; 16:215-37.

Dimitris S, Hany GB, Michèle R, Salah M. Immunoregulatory properties of mast cell-derived exosomes. **Mol Immunol** 2002; 38:1359-62.

Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. **Traffic** 2014; 15:197-211.

Ekinci AŞ, Bal Ö, Özatl T, et al. Gastric carcinoma with bone marrow metastasis: a case series. **J Gastric Cancer** 2014; 14:54-7.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide**. Lyon, IARC, 2016. (IARC Cancer Base n° 11)

Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16:415-21.

Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. **Int J Cell Biol** 2012; 2012:762825.

Finkel T, Holbrook NJ. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radic Biol Med** 2004; 36:718-44.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **J Exp Med** 1971; 133:275-88.

Gabusiewicz K, Li X, Wei J, et al. Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. **Oncoimmunology** 2018; 7:e1412909.

Ghandur-Mnaymneh L, Paz J, Roldan E, Cassady J. Dysplasia of nonmetaplastic gastric mucosa. a proposal for its classification and its possible relationship to diffuse-type gastric carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1988; 12:96-114.

Ghebeh H, Al-Khaldi S, Olabi S, et al. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. **Br J Cancer** 2014; 111:1552-61.

Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: Implications for disease progression. **Blood** 2010; 115:1755-64.

Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu Rev Med** 2002; 53:615-27.

Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. **FASEB J** 2009; 23:1541-57.

Graves LE, Ariztia E V., Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. **Cancer Res** 2004; 64:7045-9.

György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:2667-88.

Hanson PI, Shim S, Merrill SA. Cell biology of the ESCRT machinery. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:568-74.

Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2012; 28:337-62.

Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. **Nature** 2017; 551:247-50.

Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. **BMC Cancer** 2006; 6:241.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood** 1999; 94:3791-9.

Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, Speicher MR. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. **NPJ Precis Oncol** 2017; 1:36.

Henderson MC, Azorsa DO. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. **Front Oncol** 2012; 2:38.

Holcik M. Could the eIF2 $\alpha$ -independent translation be the achilles heel of cancer? **Front Oncol** 2015; 5:264.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:714-26.

Hood JL, Pan H, Lanza GM, Wickline SA. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. **Lab Invest** 2009; 89:1317-28.

Houghton JA, Houghton PJ. Elucidation of pathways of 5-fluorouracil metabolism in xenografts of human colorectal adenocarcinoma. **Eur J Cancer Clin Oncol** 1983; 19:807-15.

Huang D, Duan H, Huang H, et al. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. **Sci Rep** 2016; 6:20502.

Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. **Int J Cancer** 2005; 113:752-60.

Jayo A, Malboubi M, Antoku S, et al. Fascin regulates nuclear movement and deformation in migrating cells. **Dev Cell** 2016; 38:371-83.

Ji R, Zhang B, Zhang X, et al. Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. **Cell Cycle** 2015; 14:2473-83.

Jin JS, Yu CP, Sun GH, et al. Increasing expression of fascin in renal cell carcinoma associated with clinicopathological parameters of aggressiveness. **Histol Histopathol** 2006; 21:1287-93.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation: association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J Biol Chem** 1987; 262:9412-20.

Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. **J Biol Chem** 2014; 289:3869-75.

Kalra H, Simpson RRJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol** 2012; 10:e1001450.

Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. **Trends Cancer** 2016; 2:84-94.

Kang YK, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet** 2017; 390:2461-71.

Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: Toward the development of novel cancer biomarkers. **Proteomics** 2014; 14:412-25.

Kell DB, Oliver SG. How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion. **Front Pharmacol** 2014; 5:231.

Kim DK, Kang B, Kim OY, et al. EVpedia: An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. **J Extracel Vesicles** 2013; 2:

Kong JH, Lee J, Yi C-A, et al. Lung metastases in metastatic gastric cancer: Pattern of lung metastases and clinical outcome. **Gastric Cancer** 2012; 15:292-8.

Kong JN, He Q, Wang G, et al. Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells. **Int J Cancer** 2015; 137:1610-20.

Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Garraway LA. A Convergence-Based Framework for Cancer Drug Resistance. **Cancer Cell** 2018; 33:801-15.

Kuczyński EA, Sargent DJ, Grothey A, Kerbel RS. Drug rechallenge and treatment beyond progression-implications for drug resistance. **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:571-87.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular “ debris ”. **Semin Immunopathol** 2011; 33:455-67.

Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. **Hum Mol Genet** 2012; 21:R125-34.

Leys CM, Nomura S, LaFleur BJ, et al. Expression and prognostic significance of prothymosin- $\alpha$  and ERp57 in human gastric cancer. **Surgery** 2007; 141:41-50.

Li C, Liu D-R, Li G-G, et al. CD97 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion through exosome-mediated MAPK signaling pathway. **World J Gastroenterol** 2015; 21:6215-28.

Li Q, Shao Y, Zhang X, et al. Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. **Tumor Biol** 2015; 36:2007-2012.

Liang X, Shi H, Yang L, et al. Inhibition of polypyrimidine tract-binding protein 3 induces apoptosis and cell cycle arrest, and enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. **Br J Cancer** 2017; 116:903-11.

Lima MAP, Ferreira MVP, Barros MAP, et al. Relationship between ebv infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and bax in gastric carcinomas. **Diagnostic Mol Pathol** 2008; 17:82-89.

Lin C, Su H-Y, Tsai W-C, Sheu L-F, Jin J-S. Association of cortactin, fascin-1 and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathological parameters. **Dis Markers** 2008; 25:17-26.

Liu Y, Gu Y, Cao X. The exosomes in tumor immunity. **Oncoimmunology** 2015; 4:e1027472.

Liu XY, Zhang FR, Shang JY, et al. Renal inhibition of miR-181a ameliorates 5-fluorouracil-induced mesangial cell apoptosis and nephrotoxicity. **Cell Death Dis** 2018; 9:610.

Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. **PLoS One** 2009; 4:e5219.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:330-8.

Maehara Y, Sakaguchi Y, Moriguchi S, et al. Signet ring cell carcinoma of the stomach. **Cancer** 1992; 69:1645-50.

Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. **Am J Pharmacogenomics** 2005; 5:223-32.

Mao L, Li J, Chen WX, et al. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. **Tumor Biol** 2016; 37:5247-56.

Marshall BJ. One hundred years of discovery and rediscovery of helicobacter pylori and its association with peptic ulcer disease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. **Helicobacter pylori: physiology and genetics**. Washington (DC): ASM Press; 2001.

Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:66-75.

Mateus A, Treyer A, Wegler C, Karlgren M, Matsson P, Artursson P. Intracellular drug bioavailability: A new predictor of system dependent drug disposition. **Sci Rep** 2017; 7:43047.

Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. **Proteomics** 2009; 9:4997-5000.

Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. **Nucleic Acids Res** 2012; 40:D1241-4.

Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric cancer, related to helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3916-3926.

Mayers JR, Audhya A. Vesicle formation within endosomes: an ESCRT marks the spot. **Commun Integr Biol** 2012;

McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90 $\alpha$  via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. **BMC Cancer** 2010; 10:294.

Miki Y, Yashiro M, Okuno T, et al. CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhous-type gastric cancer cells. **Br J Cancer** 2018; 118:867-77.

Min QH, Wang XZ, Zhang J, et al. Exosomes derived from imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells mediate a horizontal transfer of drug-resistant trait by delivering miR-365. **Exp Cell Res** 2017; 362:386-33.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Miranda-Vilela AL, Alves PCZ, Akimoto AK, Pereira LCS, Nazaré Klautau-Guimarães M DE, Grisolia CK. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on leukocytes depends on age and physical training in healthy human subjects carrying the same genotypes of antioxidant enzymes' gene polymorphisms. **Am J Hum Biol** 2010; 22:807-12.

Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-inoue K, Inoue S. Extracellular vesicle-mediated EBAG9 transfer from cancer cells to tumor microenvironment promotes immune escape and tumor progression. **Oncogenesis** 2018; 7:7.

Müller G, Schneider M, Biemer-Daub G, Wied S. Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis. **Cell Signal** 2011; 23:1207-23.

Muralidharan-Chari V, Kohan HG, Asimakopoulos AG, et al. Microvesicle removal of anticancer drugs contributes to drug resistance in human pancreatic cancer cells. **Oncotarget** 2016; 7:50365-79.

Nagini S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol** 2012; 4:156.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:148-55.

Nishimoto IN, Hamada GS, Kowalski LP, et al. Risk factors for stomach cancer in Brazil (I): a case-control study among non-Japanese Brazilians in São Paulo. **Jpn J Clin Oncol** 2002; 32:277-83.

Nordgård O, Tjensvoll K, Gilje B, Søreide K. Circulating tumour cells and DNA as liquid biopsies in gastrointestinal cancer. **Br J Surg** 2018; 105:e110-e120.

Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. **Adv Drug Deliv Rev** 2013; 65:398-401.

O'Loghlen A. Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. **Philos Trans R Soc B Biol Sci** 2018; 373:20160488.

Onodera M, Zen Y, Harada K, et al. Fascin is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma. **Lab Investig** 2009; 89:1261-74.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol** 2010; 12:19-30.

Pan Y, Chen J, Tao L, et al. Long noncoding RNA ROR regulates chemoresistance in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells via epithelial mesenchymal transition pathway. **Oncotarget** 2017; 8:33144-33158.

Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochem Pharmacol** 2012; 83:1484-94.

Park B, Shin A, Park SK, et al. Ecological study for refrigerator use, salt, vegetable, and fruit intakes, and gastric cancer. **Cancer Causes Control** 2011; 22:1497-502.

Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. **J Biol Chem** 2009; 284:34211-22.

Patel N, Chatterjee SK, Vrbanac V, et al. Rescue of paclitaxel sensitivity by repression of Prohibitin1 in drug-resistant cancer cells. **Proc Natl Acad Sci** 2010; 107:2503-8.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nat Med** 2012; 18:883-91.

Penfornis P, Vallabhaneni KC, Whitt J, Pochampally R. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. **Int J Cancer** 2016; 138:14-21.

Perkins DJ, Barber GN. Defects in translational regulation mediated by the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. **Mol Cell Biol** 2004; 24:2025-40.

Perri E, Parakh S, Atkin J. Protein Disulphide Isomerases: emerging roles of PDI and ERp57 in the nervous system and as therapeutic targets for ALS. **Expert Opin Ther Targets** 2017; 21:37-49.

Peters GJ, Van der Wilt CL, Van Triest B, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. **Eur J Cancer** 1995; 31A:1299-305.

Pormohammad A, Ghotaslou R, Leylabadlo HE, Nasiri MJ, Dabiri H, Hashemi A. Risk of gastric cancer in association with Helicobacter pylori different virulence factors: a systematic review and meta-analysis. **Microb Pathog** 2018; 118:214-9.

Proserpio I, Rausei S, Barzaghi S, et al. Multimodal treatment of gastric cancer. **World J Gastrointest Surg** 2014; 6:55-8.

Qiu J, Yang G, Feng M, et al. Extracellular vesicles as mediators of the progression and chemoresistance of pancreatic cancer and their potential clinical applications. **Mol Cancer** 2018; 17:2.

Qu Z, Wu J, Wu J, Luo D, Jiang C, Ding Y. Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro. **J Exp Clin Cancer Res** 2016; 35:1-12.

Qu Z, Wu J, Wu J, Luo D, Jiang C, Ding Y. Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro. **J Exp Clin Cancer Res** 2016; 35:1-12.

Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature** 2009; 458:445-52.

Rajagopal C, Harikumar KB. The origin and functions of exosomes in cancer. **Front Oncol** 2018; 8:66.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol** 2013; 200:373-83.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B-Lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med** 1996; 183:1161-72.

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia** 2006; 20:847-56.

Ristorcelli E, Beraud E, Mathieu S, Lombardo D, Verine A. Essential role of Notch signaling in apoptosis of human pancreatic tumoral cells mediated by exosomal nanoparticles. **Int J Cancer** 2009; 125:1016-26.

Rodrigues PC, Sawazaki-calone I, Oliveira CE DE, et al. Fascin promotes migration and invasion and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2017; 8:74736-54.

Roesler BM, Costa SCB, Zeitune JMR. Eradication treatment of helicobacter pylori infection: its importance and possible relationship in preventing the development of gastric cancer. **ISRN Gastroenterol** 2012; 2012:935410.

Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **J Clin Invest** 2002; 110:1383-8.

Rusten TE, Vaccari T, Stenmark H. Shaping development with ESCRTs. **Nat Cell Biol** 2012; 14:38-45.

Safaei R. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. **Mol Cancer Ther** 2005; 4:1595-604.

Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J Am Coll Nutr** 2001; 20:464S–72S.

Samuel P, Fabbri M, Carter DRF. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer: The Role of Extracellular Vesicles. **Proteomics** 2017; 17:23-4.

Samuel P, Mulcahy LA, Furlong F, et al. Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2018; 373:20170065.

Santos JC, Lima NDS, Sarian LO, Matheu A, Ribeiro ML, Derchain SFM. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. **Sci Rep** 2018; 8:829.

Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. **J Biol Chem** 2003; 278:20083-90.

Schuhmacher C, Reim D, Novotny A. Neoadjuvant treatment for gastric cancer. **J Gastric Cancer** 2013; 13:73-8.

Schwartz PM, Moir RD, Hyde CM, Turek PJ, Handschumacher RE. Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil. **Biochem Pharmacol** 1985; 34:3585-9.

Shao H, Chung J, Lee K, et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. **Nat Commun** 2015; 6:6999.

Sharma A. Chemoresistance in cancer cells: exosomes as potential regulators of therapeutic tumor heterogeneity. **Nanomedicine** 2017; 12:2137-48.

Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: Association with gene expression and chemosensitivity profiles. **Cancer Res** 2003; 63:4331-7.

Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes. **Blood** 2010; 116:2385-94.

Shen Y, Tong M, Liang Q, et al. Epigenomics alternations and dynamic transcriptional changes in responses to 5-fluorouracil stimulation reveal mechanisms of acquired drug resistance of colorectal cancer cells. **Pharmacogenomics J** 2018; 18:23-8.

Shi J, Li F, Yao X, et al. The HER4-YAP1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-positive gastric cancer by inducing epithelial and mesenchymal transition. **Oncogene** 2018; 37:3022-38.

Shiozawa K, Shuting J, Yoshioka Y, Ochiya T, Kondo T. Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-761 enhances pazopanib resistance in synovial sarcoma. **Biochem Biophys Res Commun** 2018; 495:1322-27.

Sichieri R, Everhart JE, Mendonça GA. Diet and mortality from common cancers in Brazil: an ecological study. **Cad Saude Publica** 1996; 12:53-9.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:7-30.

Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:575-81.

Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics** 2008; 8:4083-99.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene** 2010; 29:4741-51.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. **Nat Rev Clin Oncol** 2017; 14:531-48.

Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol** 2008; 10:1470-6.

Song C, Wang L, Xu Q, et al. Targeting BMK1 Impairs the drug resistance to combined inhibition of BRAF and MEK1/2 in melanoma. **Sci Rep** 2017; 7:46244.

Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH. Intercellular transfer of cancer drug resistance traits by extracellular vesicles. **Trends Mol Med** 2015; 21:595-608.

Stahl PD, Raposo G. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward. **Essays Biochem** 2018; 62:119-24.

Stec M, Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, et al. Interactions of tumour-derived micro(nano)vesicles with human gastric cancer cells. **J Transl Med** 2015; 13:376.

Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. **Genome Biol** 2001; 2:REVIEWS3007.

Stewart BW, Kleihues P. **World cancer report 2003: cancer control**. Available from: <URL:<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/>> [2017 dez 12]

Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic** 2009; 10:925-37.

Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer Res** 2012; 72:4875-83.

Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). **PLoS One** 2010; 5:e11469.

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. **Int J Mol Sci** 2017; 18:1153.

Taborda AG, Prolla JC. Alimentary factors in the development of gastric intestinal metaplasia in functional dyspeptic patients. **Arq Gastroenterol** 2012; 49:208-13.

Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Mol Pathol** 2000; 53:255-61.

Takahashi K, Yan IK, Kogure T, Haga H, Patel T. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer. **FEBS Open Biol** 2014; 4:458-67.

Tamai K, Tanaka N, Nakano T, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. **Biochem Biophys Res Commun** 2010; 399:384-90.

Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. **Cell Res** 2014; 24:766-9.

Theos AC, Truschel ST, Tenza D, et al. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. **Dev Cell** 2006; 10:343-54.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr Protoc cell Biol** 2006; Chapter 3:3.22.1–3.22.29.

Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. **F1000 Biol Rep** 2011; 3:15.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:569-79.

Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. **Cell** 2016; 164:1226-32.

Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular vesicles in angiogenesis. **Circ Res** 2017; 120:1658-73.

Tokuhiya M, Ichikawa Y, Kosaka N, et al. Exosomal miRNAs from peritoneum lavage fluid as potential prognostic biomarkers of peritoneal metastasis in gastric cancer. **PLoS One** 2015; 10:e0130472.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov** 2009; 8:579-91.

Tsai WC, Jin JS, Chang WK, et al. Association of cortactin and fascin-1 expression in gastric adenocarcinoma: correlation with clinicopathological parameters. **J Histochem Cytochem** 2007; 55:955-62.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol** 2007; 9:654-9.

Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:767-75.

Valenti R, Huber V, Filipazzi P, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor- $\beta$ -mediated suppressive activity on T lymphocytes. **Cancer Res** 2006; 66:9290-8.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2018; 19:213-28.

Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. **J Pathol** 2007; 211:582-90.

Vignjevic D, Kojima SI, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. Role of fascin in filopodial protrusion. **J Cell Biol** 2006; 174:863-75.

Xu HY, Xu WL, Wang LQ, Chen MB, Shen HL. Relationship between p53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e95371.

Xu ZY, Tang JN, Xie HX, et al. 5-Fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells. **Int J Biol Sci** 2015; 11:284-94.

Xiao X, Yu S, Li S, et al. Exosomes: Decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. **PLoS One** 2014; 9:e89534.

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. **Nat Rev Cancer** 2017; 17:223-38.

Wang X, Xu C, Hua Y, et al. Exosomes play an important role in the process of psoralen reverse multidrug resistance of breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res** 2016; 35:186.

Watson SS, Dane M, Chin K, et al. Microenvironment-mediated mechanisms of resistance to HER2 inhibitors differ between HER2+ breast cancer subtypes. **Cell Syst** 2018; 6:329-42.e6.

Wen SW, Sceneay J, Lima LG, et al. The biodistribution and immune suppressive effects of breast cancer-derived exosomes. **Cancer Res** 2016; 76:6816-27.

Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene** 2008; 27:5904-12.

Wilke H, Preusser P, Fink U, et al. Preoperative chemotherapy in locally advanced and nonresectable gastric cancer: a phase II study with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. **J Clin Oncol** 1989; 7:1318-26.

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol** 1967; 13:269-88.

Wohlhueter RM, Mclvor RS, Plagemann PGW. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. **J Cell Physiol** 1980; 104:309-19.

Wu JY, Cheng CC, Wang JY, et al. Discovery of tumor markers for gastric cancer by proteomics. **PLoS One** 2014; 9:e84158.

Yakirevich E, Resnick MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. **Gastroenterol Clin North Am** 2013; 42:261-84.

Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4147-53.

Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:1715-21.

Yoder BJ, Tso E, Skacel M, et al. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. **Clin Cancer Res** 2005; 11:186-92.

Yu D DAN, Wu Y, Zhang X HUI, et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. **Tumor Biol** 2016; 37:3227-35.

Zhao H, Kang X, Xia X, et al. miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. **Am J Transl Res** 2016a; 8:3106-14.

Zhao H, Yang L, Baddour J, et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. **Elife** 2016b; 5:1-27.

Zhao H, Achreja A, Iessi E, et al. The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer** 2018; 1869:64-77.

Zhou J, Ma X, Bi F, Liu M. Clinical significance of circulating tumor cells in gastric cancer patients. **Oncotarget** 2017; 8:25713-25720.

Zilberstein B, Malheiros C, Lourenco LG, et al. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. **Arq Bras Cir Dig** 2013; 26:2-6.

Zou J, Yang H, Chen F, et al. Prognostic significance of fascin-1 and E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer Prev** 2010; 19:11-7.

## Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 04 de Maio de 2015.

À  
**Dra. Vilma Regina Matrins**  
**Aluno: Edson Kuatlelela Cassinela (Doutorado)**

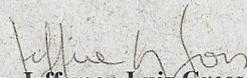
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2018/15**  
**“Papel das vesículas extracelulares secretadas por adenocarcinomas gástricos na resposta ao tratamento quimioterápico”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/04/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 10/03/2015, **aprovaram** a realização do projeto (datado de 26 de novembro de 2014), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de março de 2015 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do AC Camargo Cancer Center
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Cirurgia Abdominal;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do CIPE;
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

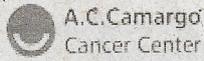
**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).**

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1



A.C. Camargo  
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE-HOSPITAL DO  
CÂNCER A C CAMARGO



Plataforma  
Brasil

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Papel das vesículas extracelulares secretadas por adenocarcinomas gástricos na resposta ao tratamento quimioterápico

**Pesquisador:** Vilma Regina Martins

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 41942215.1.0000.5432

**Instituição Proponente:** Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.046.913

**Data da Relatoria:** 14/04/2015

**Apresentação do Projeto:**

O projeto foi reapresentado após pendências apontadas por este Comitê. Todas as sugestões foram acatadas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Conforme parecer anterior.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme parecer anterior.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Adequados

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentou adequadamente os termos obrigatórios, o Termo de Consentimento Livre foi alterado conforme sugestões e a Declaração de Ciência do Departamento de Oncologia Clínica foi apresentada.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**UF:** SP

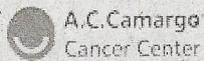
**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01.509-900

**Telefone:** (11)2189-5020

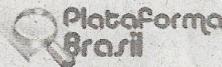
**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo  
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE-HOSPITAL DO  
CÂNCER A C CAMARGO



Continuação do Parecer: 1.046.913

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

SAO PAULO, 04 de Maio de 2015

Assinado por:

**Jefferson Luiz Gross**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep\_hcancer@accamargo.org.br

## **Anexo 2 - Artigo científico: “Rab5C enhances resistance to ionizing radiation in rectal cancer”**

Na última parte desta tese, apresentamos um manuscrito intitulado “**Rab5C enhances resistance to ionizing radiation in rectal cancer**”. Este trabalho foi realizado pelo Dr. Antuani Rafael Baptistella e contou com a minha colaboração em estudos e desenhos experimentais, preparação de amostras e realização de ensaios funcionais, análise e interpretação de resultados.

### **Resumo:**

O artigo demonstra que amostras teciduais de pacientes com tumores retais resistentes à quimiorradiação apresentaram maiores níveis de expressão das proteínas de reparo de DNA, Ku70 e Ku80, assim como Rab5C, membro da família oncogênica RAS, em comparação as amostras obtidas antes do tratamento. Além disso, um modelo *in vitro* de câncer retal foi usado para demonstrar que Rab5C modula a internalização induzida pela radiação ionizante do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que subsequentemente regula os alvos a jusante, Ku70 e Ku80, para mediar a resistência celular à radiação ionizante.

Atualmente, a quimiorradioterapia neoadjuvante como tratamento para câncer retal reduz o risco de recorrência local, ao passo que uma resposta patológica completa só é alcançada apenas em 10 a 40% dos pacientes tratados. Infelizmente, a resposta dos tumores do reto ao tratamento neoadjuvante permanece pouco esclarecida, principalmente em relação aos mecanismos que mediam a resistência à quimiorradioterapia. A fim de identificar os fatores envolvidos na resistência terapêutica, foi realizada uma análise proteômica de tecidos de biópsia obtidos de pacientes com adenocarcinoma retal em estágio II e III antes do tratamento neoadjuvante, e também de tecidos tumorais residuais que foram removidos por cirurgia após terapia neoadjuvante. As proteínas Ku70, Ku80 e Rab5C exibiram um aumento significativo na expressão após quimiorradioterapia. Além disso, uma linhagem celular de adenocarcinoma retal foi irradiada com radiação ionizante para gerar uma linhagem resistente à radioterapia. Verificou-se também que estas últimas células super-expressam Ku70, Ku80 e Rab5C. Pesquisas adicionais deste modelo *in vitro* demonstraram que o Rab5C orchestra um mecanismo de

radiorresistência nas células do adenocarcinoma retal, modulando a internalização do EGFR e permitindo que ele atinja o núcleo. Uma vez no núcleo, o EGFR pode modular a expressão das proteínas de reparo de DNA, Ku70 e Ku80. Os presentes resultados indicam que este processo é importante para a sobrevivência de células de câncer retal expostas à radiação ionizante, e também estão de acordo com os achados proteômicos de tecidos de pacientes resistentes ao tratamento de quimiorradiação. Assim, parece que o mecanismo identificado no presente estudo é ativo não apenas *in vitro*, mas também em pacientes com adenocarcinoma retal. Além disso, esses achados indicam que o EGFR e Rab5C são alvos potenciais para a sensibilização de células tumorais ao tratamento neoadjuvante.

**Apêndice 2** - Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de células.

Description	Anova (p)	Max fold change	Highest mean condition	Lowest mean condition
Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	0,0135	1,83	rAGS_FU	AGS
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=3	0,0446	1,17	rAGS_FU	AGS
Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	0,0276	1,50	AGS	rAGS_FU
**Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	0,0373	1,41	AGS	rAGS_FU
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	0,0082	2,42	rAGS_FU	AGS
Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	0,0062	2,09	rAGS_FU	AGS
Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	0,0102	1,31	rAGS_FU	AGS
Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3	0,0034	3,98	rAGS_FU	AGS
Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens GN=ILF3 PE=1 SV=3	0,0186	1,42	AGS	rAGS_FU
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=3	0,0415	1,58	AGS	rAGS_FU
T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4	0,0109	1,88	rAGS_FU	AGS
Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	0,0145	2,70	rAGS_FU	AGS
Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS=Homo sapiens GN=NUMA1 PE=1 SV=2	0,0027	2,35	rAGS_FU	AGS
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	0,0003	2,75	AGS	rAGS_FU
Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	0,0077	1,53	rAGS_FU	AGS
Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=TRIM28 PE=1 SV=5	0,0304	1,57	AGS	rAGS_FU
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	0,0233	1,52	rAGS_FU	AGS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	0,0178	1,43	AGS	rAGS_FU
Periplakin OS=Homo sapiens GN=PPL PE=1 SV=1	0,0183	1,77	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4	0,0406	1,30	rAGS_FU	AGS
40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2	0,0222	1,59	rAGS_FU	AGS
Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2	0,0373	1,87	rAGS_FU	AGS
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	0,0175	2,85	rAGS_FU	AGS
Golgin subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=GOLGB1 PE=1 SV=2	0,0050	3,22	rAGS_FU	AGS
Centriolin OS=Homo sapiens GN=CNTRL PE=1 SV=2	0,0155	1,76	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2	0,0079	1,73	rAGS_FU	AGS
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	0,0394	1,66	AGS	rAGS_FU
Ryanodine receptor 1 OS=Homo sapiens GN=RYR1 PE=1 SV=3	0,0185	1,83	AGS	rAGS_FU
Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2	0,0356	1,32	AGS	rAGS_FU
Vigilin OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=1 SV=2	0,0224	1,73	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2	0,0349	1,95	rAGS_FU	AGS
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PCK2 PE=1 SV=3	0,0118	3,45	AGS	rAGS_FU
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=1 SV=3	0,0092	2,56	AGS	rAGS_FU
Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1B PE=1 SV=1	0,0011	1,32	rAGS_FU	AGS
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2	0,0338	1,78	AGS	rAGS_FU
Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	0,0146	2,54	rAGS_FU	AGS
Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=3	0,0367	1,55	AGS	rAGS_FU
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS=Homo sapiens GN=VPS13C PE=1 SV=1	0,0380	8,27	AGS	rAGS_FU
60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1	0,0444	1,29	rAGS_FU	AGS
Androglobin OS=Homo sapiens GN=ADGB PE=2 SV=3	0,0236	4,48	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	0,0166	1,53	AGS	rAGS_FU
Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens GN=H2AFY PE=1 SV=4	0,0196	1,44	AGS	rAGS_FU
Homeobox protein cut-like 2 OS=Homo sapiens GN=CUX2 PE=1 SV=4	0,0012	1,78	rAGS_FU	AGS
L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2	0,0166	2,40	rAGS_FU	AGS
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	0,0049	5,17	rAGS_FU	AGS
Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS PE=1 SV=2	0,0447	1,44	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=1	0,0418	1,63	rAGS_FU	AGS
Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4	0,0083	3,89	rAGS_FU	AGS
Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PMFBP1 PE=2 SV=1	0,0296	1,94	rAGS_FU	AGS
Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	0,0048	4,98	rAGS_FU	AGS
HEAT repeat-containing protein 5A OS=Homo sapiens GN=HEATR5A PE=1 SV=2	0,0056	2,61	rAGS_FU	AGS
Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4	0,0094	1,18	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2	0,0008	2,99	rAGS_FU	AGS
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	0,0048	3,04	rAGS_FU	AGS
Nuclear receptor corepressor 2 OS=Homo sapiens GN=NCOR2 PE=1 SV=2	0,0144	1,72	rAGS_FU	AGS
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE=1 SV=2	0,0395	1,36	AGS	rAGS_FU
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPUL1 PE=1 SV=1	0,0037	1,90	AGS	rAGS_FU
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	0,0284	1,87	AGS	rAGS_FU
Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 PE=1 SV=4	0,0136	1,21	AGS	rAGS_FU
Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL3 OS=Homo sapiens GN=MICAL3 PE=1 SV=2	0,0096	1,44	AGS	rAGS_FU
T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3	0,0020	2,28	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	0,0200	2,20	rAGS_FU	AGS
Lysine-specific histone demethylase 1B OS=Homo sapiens GN=KDM1B PE=1 SV=3	0,0099	1,78	AGS	rAGS_FU
MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo sapiens GN=IMMT PE=1 SV=1	0,0360	2,41	AGS	rAGS_FU
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	0,0024	3,69	rAGS_FU	AGS
Glycine amidinotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GATM PE=1 SV=1	0,0132	2,06	AGS	rAGS_FU
Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4	0,0001	2,42	AGS	rAGS_FU
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 OS=Homo sapiens GN=ACSL3 PE=1 SV=3	0,0245	1,69	AGS	rAGS_FU
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=EPRS PE=1 SV=5	0,0250	1,63	rAGS_FU	AGS
**Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Homo sapiens GN=EIF2S3 PE=1 SV=3	0,0256	2,55	rAGS_FU	AGS
Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L OS=Homo sapiens GN=ASH1L PE=1 SV=2	0,0460	1,49	AGS	rAGS_FU
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=TACC2 PE=1 SV=1	0,0219	1,16	AGS	rAGS_FU
Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A OS=Homo sapiens GN=BAZ1A PE=1 SV=2	0,0350	2,37	AGS	rAGS_FU
Citrate synthase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CS PE=1 SV=2	0,0014	1,68	AGS	rAGS_FU
Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETHE1 PE=1 SV=2	0,0193	1,24	AGS	rAGS_FU
Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2	0,0220	1,38	rAGS_FU	AGS
RNA cytidine acetyltransferase OS=Homo sapiens GN=NAT10 PE=1 SV=2	0,0183	1,57	rAGS_FU	AGS
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	0,0488	1,57	AGS	rAGS_FU
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2	0,0070	1,84	AGS	rAGS_FU
Histone-lysine N-methyltransferase 2B OS=Homo sapiens GN=KMT2B PE=1 SV=1	0,0456	4,21	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens GN=RPS17 PE=1 SV=2	0,0083	1,97	rAGS_FU	AGS
Clustered mitochondria protein homolog OS=Homo sapiens GN=CLUH PE=1 SV=2	0,0385	7,46	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Homo sapiens GN=HUWE1 PE=1 SV=3	0,0002	2,30	rAGS_FU	AGS
EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=EFCAB6 PE=1 SV=1	0,0388	1,77	rAGS_FU	AGS
Uncharacterized protein KIAA0355 OS=Homo sapiens GN=KIAA0355 PE=1 SV=2	0,0109	4,14	AGS	rAGS_FU
60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1	0,0002	1,48	rAGS_FU	AGS
DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1 PE=1 SV=4	0,0252	1,09	rAGS_FU	AGS
ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1 OS=Homo sapiens GN=ERC1 PE=1 SV=1	0,0018	3,11	rAGS_FU	AGS
Envoplakin OS=Homo sapiens GN=EVPL PE=1 SV=1	0,0048	1,67	rAGS_FU	AGS
Liprin-beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPFIBP1 PE=1 SV=1	0,0074	2,34	AGS	rAGS_FU
Oral-facial-digital syndrome 1 protein OS=Homo sapiens GN=OFD1 PE=1 SV=1	0,0028	2,58	AGS	rAGS_FU
Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	0,0010	4,76	rAGS_FU	AGS
von Willebrand factor A domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens GN=VWA3B PE=2 SV=3	0,0119	1,48	rAGS_FU	AGS
4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=3	0,0120	1,30	AGS	rAGS_FU
DNA repair protein RAD50 OS=Homo sapiens GN=RAD50 PE=1 SV=1	0,0354	1,47	rAGS_FU	AGS
Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2 OS=Homo sapiens GN=PPIP5K2 PE=1 SV=3	0,0315	1,73	AGS	rAGS_FU
Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 PE=1 SV=1	0,0054	1,88	rAGS_FU	AGS
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MARS PE=1 SV=2	0,0178	1,24	rAGS_FU	AGS
Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1	0,0073	1,75	rAGS_FU	AGS
Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens GN=SRSF3 PE=1 SV=1	0,0112	1,64	AGS	rAGS_FU
Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A OS=Homo sapiens GN=CACNA1A PE=1 SV=1	0,0265	2,78	rAGS_FU	AGS
Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	0,0006	1,92	AGS	rAGS_FU
Rap guanine nucleotide exchange factor 2 OS=Homo sapiens GN=RAPGEF2 PE=1 SV=1	0,0138	1,46	AGS	rAGS_FU
T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4	0,0479	1,94	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Cilia- and flagella-associated protein 47 OS=Homo sapiens GN=CFAP47 PE=2 SV=4	0,0253	16,99	AGS	rAGS_FU
Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DMGDH PE=1 SV=2	0,0032	2,88	AGS	rAGS_FU
60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2	0,0427	1,18	rAGS_FU	AGS
Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	0,0440	1,28	AGS	rAGS_FU
Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SRSF1 PE=1 SV=2	0,0183	1,49	AGS	rAGS_FU
T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4	0,0023	1,82	rAGS_FU	AGS
Uncharacterized protein KIAA2026 OS=Homo sapiens GN=KIAA2026 PE=2 SV=2	0,0276	12,17	rAGS_FU	AGS
14-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens GN=SFN PE=1 SV=1	0,0221	3,18	rAGS_FU	AGS
40S ribosomal protein SA (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=7	0,0375	1,95	rAGS_FU	AGS
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens GN=ATIC PE=1 SV=3	0,0378	4,79	rAGS_FU	AGS
E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1 OS=Homo sapiens GN=HECTD1 PE=1 SV=1	0,0063	1,48	rAGS_FU	AGS
HCG2044799 OS=Homo sapiens GN=HNRNPUL2-BSCL2 PE=4 SV=1	0,0210	1,83	AGS	rAGS_FU
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRR59 PE=1 SV=1	0,0360	1,39	AGS	rAGS_FU
RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=1 SV=2	0,0457	1,76	AGS	rAGS_FU
SET and MYND domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=SMYD4 PE=2 SV=3	0,0109	1,79	AGS	rAGS_FU
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=1 SV=2	0,0251	1,46	AGS	rAGS_FU
Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEXB PE=1 SV=3	0,0079	2,14	AGS	rAGS_FU
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=1 SV=3	0,0336	2,40	AGS	rAGS_FU
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0,0005	3,75	rAGS_FU	AGS
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	0,0096	4,17	rAGS_FU	AGS
Kinesin-like protein KIF27 OS=Homo sapiens GN=KIF27 PE=2 SV=1	0,0028	2,35	rAGS_FU	AGS
Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRR1Q1 PE=2 SV=3	0,0164	1,95	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	0,0136	1,64	rAGS_FU	AGS
Phosphate-regulating neutral endopeptidase OS=Homo sapiens GN=PHEX PE=1 SV=1	0,0311	1,28	rAGS_FU	AGS
26S protease regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PSMC1 PE=1 SV=1	0,0032	1,67	rAGS_FU	AGS
39S ribosomal protein L40, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL40 PE=1 SV=1	0,0014	2,15	AGS	rAGS_FU
Alanine aminotransferase 2 OS=Homo sapiens GN=GPT2 PE=1 SV=1	0,0061	1,97	rAGS_FU	AGS
Diacylglycerol kinase alpha OS=Homo sapiens GN=DGKA PE=1 SV=3	0,0299	2,23	rAGS_FU	AGS
Epithelial splicing regulatory protein 1 OS=Homo sapiens GN=ESRP1 PE=1 SV=2	0,0158	1,69	AGS	rAGS_FU
GTP-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=GTPBP2 PE=1 SV=1	0,0272	3,26	rAGS_FU	AGS
Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=KPNA2 PE=1 SV=1	0,0019	2,92	rAGS_FU	AGS
Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=GTPBP4 PE=1 SV=3	0,0020	1,49	AGS	rAGS_FU
Pescadillo homolog OS=Homo sapiens GN=PES1 PE=1 SV=1	0,0426	2,04	AGS	rAGS_FU
Protein canopy homolog 2 OS=Homo sapiens GN=CNPY2 PE=1 SV=1	0,0138	2,32	AGS	rAGS_FU
Protein FAM65A OS=Homo sapiens GN=FAM65A PE=1 SV=1	0,0017	2,81	rAGS_FU	AGS
Reticulon-4 OS=Homo sapiens GN=RTN4 PE=1 SV=2	0,0283	1,85	AGS	rAGS_FU
Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	0,0016	2,15	rAGS_FU	AGS
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 OS=Homo sapiens GN=USP34 PE=1 SV=2	0,0025	2,84	rAGS_FU	AGS
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	0,0271	1,55	AGS	rAGS_FU
Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	0,0101	1,39	AGS	rAGS_FU
Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2	0,0422	2,01	rAGS_FU	AGS
Coagulation factor VIII OS=Homo sapiens GN=F8 PE=1 SV=1	0,0061	6,43	AGS	rAGS_FU
Dynein heavy chain 9, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH9 PE=1 SV=3	0,0119	2,55	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA3 PE=1 SV=1	0,0198	2,18	rAGS_FU	AGS
Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens GN=RAB14 PE=1 SV=4	0,0476	1,56	AGS	rAGS_FU
Triple functional domain protein OS=Homo sapiens GN=TRIO PE=1 SV=2	0,0181	1,43	AGS	rAGS_FU
Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 OS=Homo sapiens GN=ELAC2 PE=1 SV=2	0,0162	1,50	AGS	rAGS_FU
Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2 OS=Homo sapiens GN=STAU2 PE=1 SV=1	0,0207	1,40	AGS	rAGS_FU
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=1 SV=2	0,0368	2,27	AGS	rAGS_FU
ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens GN=DDX1 PE=1 SV=1	0,0375	1,43	AGS	rAGS_FU
Condensin-2 complex subunit D3 OS=Homo sapiens GN=NCAPD3 PE=1 SV=2	0,0003	3,11	rAGS_FU	AGS
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC1 PE=1 SV=3	0,0173	3,09	AGS	rAGS_FU
Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Homo sapiens GN=DOCK10 PE=1 SV=3	0,0297	1,56	rAGS_FU	AGS
DNA topoisomerase 2-alpha OS=Homo sapiens GN=TOP2A PE=1 SV=3	0,0450	1,71	rAGS_FU	AGS
Golgin subfamily A member 3 OS=Homo sapiens GN=GOLGA3 PE=1 SV=2	0,0223	1,55	AGS	rAGS_FU
La-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=LARP1 PE=1 SV=2	0,0114	1,28	AGS	rAGS_FU
LIM and SH3 domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=LASP1 PE=1 SV=2	0,0204	2,98	rAGS_FU	AGS
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein OS=Homo sapiens GN=LRBA PE=1 SV=4	0,0230	1,80	AGS	rAGS_FU
PML-RARA-regulated adapter molecule 1 OS=Homo sapiens GN=PRAM1 PE=1 SV=2	0,0294	3,92	rAGS_FU	AGS
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PUF60 PE=1 SV=1	0,0168	1,51	AGS	rAGS_FU
Prolyl endopeptidase-like OS=Homo sapiens GN=PREPL PE=1 SV=1	0,0071	1,53	rAGS_FU	AGS
Protein SFI1 homolog OS=Homo sapiens GN=SFI1 PE=1 SV=2	0,0345	1,54	AGS	rAGS_FU
Sclerostin OS=Homo sapiens GN=SOST PE=1 SV=1	0,0431	1,49	AGS	rAGS_FU
Serine/threonine-protein kinase N3 OS=Homo sapiens GN=PKN3 PE=1 SV=1	0,0151	2,16	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

SRC kinase-signaling inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=SRCIN1 PE=1 SV=1	0,0444	1,10	rAGS_FU	AGS
Superkiller viralicidic activity 2-like 2 OS=Homo sapiens GN=SKIV2L2 PE=1 SV=3	0,0007	2,76	AGS	rAGS_FU
TATA-binding protein-associated factor 2N OS=Homo sapiens GN=TAF15 PE=1 SV=1	0,0236	1,60	AGS	rAGS_FU
182 kDa tankyrase-1-binding protein OS=Homo sapiens GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=4	0,0022	4,11	AGS	rAGS_FU
60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1	0,0443	1,93	rAGS_FU	AGS
Casein kinase II subunit alpha OS=Homo sapiens GN=CSNK2A1 PE=1 SV=1	0,0010	1,61	rAGS_FU	AGS
Centrobin OS=Homo sapiens GN=CNTR0B PE=1 SV=1	0,0032	2,60	rAGS_FU	AGS
Centromere protein V OS=Homo sapiens GN=CENPV PE=1 SV=1	0,0142	6,63	AGS	rAGS_FU
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2	0,0003	1,87	AGS	rAGS_FU
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ALDH4A1 PE=1 SV=3	0,0396	2,26	AGS	rAGS_FU
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=EPS8L2 PE=1 SV=2	0,0302	2,71	rAGS_FU	AGS
Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens GN=EIF6 PE=1 SV=1	0,0351	1,28	rAGS_FU	AGS
Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3	0,0106	24,76	rAGS_FU	AGS
Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase OS=Homo sapiens GN=IFI30 PE=1 SV=3	0,0261	2,93	AGS	rAGS_FU
Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2	0,0251	1,34	AGS	rAGS_FU
Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=IARS2 PE=1 SV=2	0,0282	1,46	AGS	rAGS_FU
Lanosterol 14-alpha demethylase OS=Homo sapiens GN=CYP51A1 PE=1 SV=1	0,0327	1,75	rAGS_FU	AGS
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=MAST1 PE=1 SV=2	0,0285	2,81	rAGS_FU	AGS
Neuronal cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=NRCAM PE=1 SV=3	0,0098	3,22	rAGS_FU	AGS
Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3	0,0210	1,78	rAGS_FU	AGS
Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2	0,0210	3,93	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Septin-9 OS=Homo sapiens GN=SEPT9 PE=1 SV=2	0,0433	8,04	AGS	rAGS_FU
Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Homo sapiens GN=SRP14 PE=1 SV=2	0,0194	1,52	AGS	rAGS_FU
**Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=SOD1 PE=1 SV=2	0,0076	4,33	rAGS_FU	AGS
Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens GN=TPT1 PE=1 SV=1	0,0174	2,36	rAGS_FU	AGS
Translin-associated factor X-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=TSNAXIP1 PE=2 SV=1	0,0344	1,56	AGS	rAGS_FU
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10 OS=Homo sapiens GN=MPHOSPH10 PE=1 SV=2	0,0224	9,44	AGS	rAGS_FU
Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2	0,0025	3,66	rAGS_FU	AGS
A-kinase anchor protein 9 OS=Homo sapiens GN=AKAP9 PE=1 SV=1	0,0329	1,48	rAGS_FU	AGS
T-complex protein 1 subunit theta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=1	0,0444	1,36	AGS	rAGS_FU
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNRNPL PE=1 SV=2	0,0185	1,56	AGS	rAGS_FU
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1	0,0098	1,12	AGS	rAGS_FU
Liprin-alpha-1 OS=Homo sapiens GN=PPFIA1 PE=1 SV=1	0,0236	2,55	rAGS_FU	AGS
Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=WARS PE=1 SV=2	0,0200	2,45	rAGS_FU	AGS
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,0185	1,56	AGS	rAGS_FU
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3	0,0036	2,54	rAGS_FU	AGS
ATP-binding cassette sub-family A member 2 OS=Homo sapiens GN=ABCA2 PE=1 SV=3	0,0448	2,53	rAGS_FU	AGS
ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2	0,0205	4,09	rAGS_FU	AGS
GPI ethanolamine phosphate transferase 2 OS=Homo sapiens GN=PIGG PE=1 SV=1	0,0479	1,17	AGS	rAGS_FU
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=1 SV=3	0,0046	2,03	AGS	rAGS_FU
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	0,0097	4,67	rAGS_FU	AGS
Microtubule cross-linking factor 1 OS=Homo sapiens GN=MTCL1 PE=1 SV=5	0,0293	1,50	rAGS_FU	AGS
Protein tilB homolog OS=Homo sapiens GN=LRR6 PE=1 SV=1	0,0410	1,28	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	0,0472	1,29	AGS	rAGS_FU
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	0,0276	1,29	AGS	rAGS_FU
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=1	0,0367	2,04	rAGS_FU	AGS
60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=2	0,0064	2,10	rAGS_FU	AGS
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein OS=Homo sapiens GN=RERE PE=1 SV=2	0,0438	5,11	rAGS_FU	AGS
Bcl-2-like protein 13 OS=Homo sapiens GN=BCL2L13 PE=1 SV=1	0,0170	3,48	rAGS_FU	AGS
Dedicator of cytokinesis protein 8 OS=Homo sapiens GN=DOCK8 PE=1 SV=3	0,0264	1,58	rAGS_FU	AGS
Erythroid differentiation-related factor 1 OS=Homo sapiens GN=EDRF1 PE=1 SV=1	0,0396	1,95	AGS	rAGS_FU
Gamma-adducin OS=Homo sapiens GN=ADD3 PE=1 SV=1	0,0479	3,65	AGS	rAGS_FU
GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=GAPVD1 PE=1 SV=1	0,0334	1,39	rAGS_FU	AGS
Helicase SKI2W OS=Homo sapiens GN=SKIV2L PE=1 SV=3	0,0052	3,41	rAGS_FU	AGS
Isochorismatase domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ISOC2 PE=1 SV=1	0,0226	2,35	AGS	rAGS_FU
Kinesin-like protein KIF9 OS=Homo sapiens GN=KIF9 PE=1 SV=4	0,0099	1,66	rAGS_FU	AGS
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 OS=Homo sapiens GN=MAST2 PE=1 SV=2	0,0322	1,18	AGS	rAGS_FU
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 OS=Homo sapiens GN=NDUFB9 PE=1 SV=1	0,0326	2,22	AGS	rAGS_FU
Nuclear factor 1 C-type OS=Homo sapiens GN=NFIC PE=1 SV=2	0,0311	3,19	rAGS_FU	AGS
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 OS=Homo sapiens GN=FKBP8 PE=1 SV=1	0,0064	11,20	AGS	rAGS_FU
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PNPT1 PE=1 SV=2	0,0094	1,91	AGS	rAGS_FU
Pulmonary surfactant-associated protein C (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SFTPC PE=1 SV=7	0,0097	1,77	AGS	rAGS_FU
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 PE=1 SV=2	0,0260	3,38	AGS	rAGS_FU
Ran GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RANGAP1 PE=1 SV=1	0,0389	1,24	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog OS=Homo sapiens GN=BRX1 PE=1 SV=2	0,0459	1,52	AGS	rAGS_FU
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R2A PE=1 SV=1	0,0319	2,30	rAGS_FU	AGS
Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Homo sapiens GN=THRAP3 PE=1 SV=2	0,0381	1,58	AGS	rAGS_FU
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens GN=TMED10 PE=1 SV=2	0,0260	2,10	rAGS_FU	AGS
Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein OS=Homo sapiens GN=TNRC18 PE=1 SV=1	0,0019	3,54	AGS	rAGS_FU
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Homo sapiens GN=PSMD13 PE=1 SV=1	0,0430	1,74	rAGS_FU	AGS
40S ribosomal protein S29 OS=Homo sapiens GN=RPS29 PE=1 SV=2	0,0030	2,10	rAGS_FU	AGS
Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2	0,0475	1,36	rAGS_FU	AGS
ADP-ribosylation factor 1 OS=Homo sapiens GN=ARF1 PE=1 SV=2	0,0387	2,11	rAGS_FU	AGS
AN1-type zinc finger protein 2A OS=Homo sapiens GN=ZFAND2A PE=2 SV=2	0,0465	1,61	AGS	rAGS_FU
Atlastin-2 OS=Homo sapiens GN=ATL2 PE=1 SV=2	0,0070	2,65	AGS	rAGS_FU
Clathrin light chain B OS=Homo sapiens GN=CLTB PE=1 SV=1	0,0062	2,77	AGS	rAGS_FU
Coiled-coil domain-containing protein 162 OS=Homo sapiens GN=CCDC162P PE=2 SV=3	0,0150	3,19	AGS	rAGS_FU
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	0,0466	1,38	AGS	rAGS_FU
Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=MT-CO2 PE=1 SV=1	0,0453	1,26	AGS	rAGS_FU
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase OS=Homo sapiens GN=ACOT7 PE=1 SV=3	0,0099	3,44	rAGS_FU	AGS
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM69 OS=Homo sapiens GN=TRIM69 PE=1 SV=1	0,0121	1,68	AGS	rAGS_FU
Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H PE=1 SV=5	0,0199	5,23	rAGS_FU	AGS
Exportin-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1	0,0011	3,51	rAGS_FU	AGS
Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5	0,0285	1,43	rAGS_FU	AGS
Genetic suppressor element 1 OS=Homo sapiens GN=GSE1 PE=1 SV=3	0,0090	6,89	rAGS_FU	AGS

## Cont/ Apêndice 1

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	0,0209	2,07	AGS	rAGS_FU
Homeodomain-interacting protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=HIPK1 PE=1 SV=1	0,0216	2,65	rAGS_FU	AGS
Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PPA2 PE=1 SV=2	0,0098	4,44	AGS	rAGS_FU
Inositol hexakisphosphate kinase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IP6K2 PE=1 SV=1	0,0392	1,26	rAGS_FU	AGS
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=KANK2 PE=1 SV=1	0,0359	3,42	AGS	rAGS_FU
LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=LIMA1 PE=1 SV=1	0,0323	2,39	AGS	rAGS_FU
Liprin-alpha-3 OS=Homo sapiens GN=PPFIA3 PE=1 SV=3	0,0137	1,75	rAGS_FU	AGS
Lysine-specific demethylase 4C OS=Homo sapiens GN=KDM4C PE=1 SV=2	0,0040	2,41	AGS	rAGS_FU
Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2B OS=Homo sapiens GN=MROH2B PE=2 SV=3	0,0015	1,63	AGS	rAGS_FU
Mannose-6-phosphate isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MPI PE=1 SV=1	0,0063	6,00	AGS	rAGS_FU
Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MPRIP PE=1 SV=3	0,0150	1,80	AGS	rAGS_FU
Niban-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM129B PE=1 SV=3	0,0212	3,75	rAGS_FU	AGS
Plexin-D1 OS=Homo sapiens GN=PLXND1 PE=1 SV=3	0,0127	1,57	AGS	rAGS_FU
Protein S100-A10 OS=Homo sapiens GN=S100A10 PE=1 SV=2	0,0021	1,92	rAGS_FU	AGS
Protein SCO1 homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SCO1 PE=1 SV=1	0,0137	2,46	AGS	rAGS_FU
Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like OS=Homo sapiens GN=UBE2NL PE=1 SV=1	0,0060	1,94	rAGS_FU	AGS
R3H domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=R3HDM1 PE=1 SV=3	0,0261	14,39	AGS	rAGS_FU
Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens GN=RAP1A PE=1 SV=1	0,0114	2,72	AGS	rAGS_FU
Septin 11, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=SEPT11 PE=1 SV=1	0,0078	2,26	rAGS_FU	AGS
Serine/threonine-protein kinase 24 OS=Homo sapiens GN=STK24 PE=1 SV=1	0,0031	2,14	AGS	rAGS_FU
SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SH3TC1 PE=1 SV=3	0,0081	2,08	AGS	rAGS_FU

## Cont/ Apêndice 1

Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=1 SV=1	0,0202	3,04	AGS	rAGS_FU
Transcriptional regulator ATRX OS=Homo sapiens GN=ATRX PE=1 SV=5	0,0323	1,23	AGS	rAGS_FU
Transmembrane protein 2 OS=Homo sapiens GN=TMEM2 PE=1 SV=1	0,0178	1,53	AGS	rAGS_FU
Tumor-associated calcium signal transducer 2 OS=Homo sapiens GN=TACSTD2 PE=1 SV=3	0,0034	3,92	AGS	rAGS_FU
Volume-regulated anion channel subunit LRRC8D OS=Homo sapiens GN=LRRC8D PE=1 SV=1	0,0051	10,26	rAGS_FU	AGS
X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator OS=Homo sapiens GN=RPGR PE=1 SV=2	0,0291	1,19	AGS	rAGS_FU
Z-DNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZBP1 PE=1 SV=2	0,0097	9,29	rAGS_FU	AGS
Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1	0,0008	3,80	rAGS_FU	AGS
Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	0,0153	1,95	AGS	rAGS_FU
Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1	0,0030	3,52	rAGS_FU	AGS
Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=1	0,0107	3,51	rAGS_FU	AGS
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	0,0399	1,21	rAGS_FU	AGS
Heat shock protein HSP 90-alpha A2 OS=Homo sapiens GN=HSP90AA2P PE=1 SV=2	0,0171	2,24	rAGS_FU	AGS
Microtubule-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=1	0,0165	1,62	rAGS_FU	AGS
NADPH--cytochrome P450 reductase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=1	0,0477	1,75	AGS	rAGS_FU
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2 OS=Homo sapiens GN=RIMS2 PE=1 SV=1	0,0069	3,03	rAGS_FU	AGS
Tubulin beta-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB8 PE=1 SV=2	0,0058	3,99	rAGS_FU	AGS
POTE ankyrin domain family member I OS=Homo sapiens GN=POTEI PE=3 SV=1	0,0219	3,43	AGS	rAGS_FU
Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5 OS=Homo sapiens GN=HSP90AA5P PE=2 SV=1	0,0049	4,38	rAGS_FU	AGS
Tubulin beta-1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=1	0,0308	2,57	AGS	rAGS_FU

