

**MARCADORES E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À  
TERAPIA NEOADJUVANTE E O PAPEL DAS  
VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS  
PELAS CÉLULAS TUMORAIS NO CÂNCER DE RETO**

**ANTUANI RAFAEL BAPTISTELLA**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dra. Vilma Regina Martins**

**Co-Orientador: Dr. Samuel Aguiar Junior**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Baptistella, Antuani Rafael

**Marcadores e mecanismos de resistência à terapia neoadjuvante e o papel das vesículas extracelulares secretadas pelas células tumorais no câncer de reto** / Antuani Rafael Baptistella - São Paulo, 2016.

208p.

Dissertação (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. NEOPLASIAS RETAIS. 2. RADIOTERAPIA. 3. METILAÇÃO. 4. TRATAMENTO NEOADJUVANTE. 5. GENES EGFR.

*“Há um estímulo grandioso que move a vida humana.  
Esse estímulo é seu fim, é sua meta, é o todo; esse estímulo é o que a incita  
continuamente à busca do saber, do conhecimento.  
O saber é a razão de ser da existência do homem na terra, a primeira e  
última de suas tarefas. Faça com que o estímulo de consegui-lo vibre em  
você permanentemente, porque nele está a verdadeira finalidade de sua  
vida. ”*

C. B. Gonzales Pecotche

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha amada família:

Aos meus pais, Nayr e Valdir Baptistella, pela dedicação integral e intensiva para brindar-me com valerosos princípios, e pelo sacrifício pessoal que realizaram para propiciar-me todas as condições para alcançar esse objetivo;

Às minhas irmãs, Carli e Alessandra, pelo suporte incondicional, pelo amor e por estarem a cada dia me ensinando algo novo;

À Shaline, pelo amor, companheirismo e suporte durante estes longos anos, e por ser minha fonte de força e inspiração.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao final dessa etapa, o sentimento que se sobressai é o de gratidão, pois esse trabalho só tornou-se realidade com a ajuda de inúmeras pessoas. Muitas das quais contribuíram de forma direta e decisiva, enquanto outras ajudaram de forma indireta, sem nem mesmo dar-se conta da importância de sua colaboração. Por isso, quero manifestar aqui minha imensa gratidão a todos que colaboraram na realização do trabalho que culminou nesta tese:

À minha orientadora Dra. Vilma Regina Martins, grande exemplo de integridade e retidão dentro da ciência, pela oportunidade de aprender com o seu exemplo durante estes anos de convivência. Termino essa etapa como admirador de seu trabalho, levando seus ensinamentos para toda minha vida profissional;

Ao meu co-orientador Dr. Samuel Aguiar Junior, pela contribuição científica fundamental para o direcionamento deste trabalho e pelo suporte durante todo o curso do mesmo;

Aos meus queridos colegas de laboratório, os quais, de diferentes formas tiveram importância fundamental na realização deste projeto. Recordo com gratidão a receptividade que tiveram quando iniciei no laboratório, da ajuda para realizar os primeiros experimentos, das produtivas discussões científicas acerca do projeto, da amizade que foi sendo construída ao passar do tempo, e dos cafés para tornar mais leves as longas jornadas de trabalho. Agradeço de forma especial a Bruna Roz Rodrigues, Marcos Salles e Fernanda Giudice pela imensa contribuição científica dada à esse trabalho, e pela amizade construída ao longo destes anos; à Gabriela Pintar de Oliveira, Luana Campos Soares e Edson Cassinela pela generosidade e desprendimento para colaborar sempre, pela parceria diária para tomar chimarrão e pela grande amizade que se formou; à Tonielli Lacerda, Juliana Rocha, Michele Landemberger, Rodrigo Cartaxo e Fernanda Lupinacci pela disponibilidade em ajudar, pela parceria e amizade; ao Tiago Goss, Martin Roffe e Glaucia Hajj pelas contribuições científicas dadas ao trabalho;

Ao Felipe Moreira, Hildegardo Bezerra e Danilo Santos, que deram todo o suporte necessário para que fosse possível a realização deste trabalho, além de proporcionarem momentos de alegria no dia-a-dia do laboratório;

Ao Dr. Petrus Paulo pela imensa contribuição intelectual e de logística para tornar possível o processo de radiação ionizante utilizado neste projeto;

À Dra. Maria Dirlei Begnami, pela contribuição científica na área da anatomia patológica, pela grande disponibilidade para dividir seus conhecimentos e pelo incentivo entusiasta que moveu-me em muitos momentos; ao Dr. Antônio Hugo Campos, pela grande contribuição no processo de seleção do material do Biobanco, e pela sempre pronta disponibilidade em ajudar; ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pela gentil e cordial receptividade apresentada quando cheguei às portas da Instituição por primeira vez; à Marina França de Resende, pela dedicação e comprometimento para auxiliar com a realização das reações de IHQ; em nome destes agradeço aos demais funcionários do departamento de Anatomia Patológica, do Biobanco e do Banco de Macromoléculas do AC Camargo Cancer Center que de alguma forma contribuíram com esse trabalho;

Ao Fabio Marchi, por toda a ajuda dada na área de bioinformática, além das orientações científicas e a amizade que construímos durante esses anos; à Hellen Kuasne, pela importante colaboração científica, pela amizade e parceria no chimarrão;

À Dra. Adriana Franco Paes Leme e ao LNBio de Campinas, pela colaboração na realização da análise proteômica;

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 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;

Ao A.C.Camargo Cancer Center pela excepcional estrutura disponibilizada para o avanço e aperfeiçoamento da ciência brasileira;

A todos os professores e educadores que contribuíram durante toda a minha formação acadêmica;

De forma muito especial e afetuosa agradeço a todos os familiares e amigos que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada;

E por fim, agradeço à Sabedoria Universal pela oportunidade de trilhar esse caminho do aperfeiçoamento chamado vida.

## RESUMO

Baptistella AR. **Marcadores e mecanismos de resistência à terapia neoadjuvante e o papel das vesículas extracelulares secretadas pelas células tumorais no câncer de reto.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de reto é o segundo tumor mais comum no intestino grosso correspondendo a um terço do total de casos de câncer colorretal (CCR). Pacientes com câncer de reto em estádios II e III são tratados com radioquimioterapia neoadjuvante seguida de ressecção cirúrgica do tumor. Análises das peças cirúrgicas ressecadas mostraram que apenas 10-45% dos pacientes obtém resposta patológica completa (RCp) à terapia neoadjuvante, estando essa associada com uma diminuição da recorrência local, melhora da sobrevida livre de doença e aumento na preservação esfinteriana. Apesar da melhora na sobrevida nas últimas décadas, a resposta à terapia neoadjuvante continua variável e imprevisível e não é possível identificar e separar clinicamente os grupos de pacientes que terão ou não resposta completa ao tratamento neoadjuvante. Além disso, os mecanismos de resistência à radioquimioterapia nos tumores de reto são pouco compreendidos. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi identificar marcadores e mecanismos celulares relacionados à resistência à terapia neoadjuvante em adenocarcinoma de reto e o papel das vesículas extracelulares (VEs) nesse processo. O estudo proteômico comparativo entre biópsias obtidas de tumores pré-tratamento com o tumor residual removido cirurgicamente pós-tratamento radioquimioterápico mostrou uma importante alteração no perfil de expressão proteica. Entre as proteínas que aumentam a expressão após a neoadjuvância estão as proteínas de reparo de dano de DNA, Ku70 e Ku80, e a proteína de tráfego intracelular Rab5C. Em um modelo *in vitro*, foi demonstrado que Rab5C orchestra um mecanismo de resistência à radioterapia nos tumores de reto através da

modulação da internalização de EGFR promovida por radiação ionizante (RI). O EGRF intracelular por sua vez é essencial para regular a expressão de Ku70 e Ku80 e a resistência celular à RI. Estes dados apontam Rab5C e EGFR como potenciais alvos terapêuticos para sensibilizar células de câncer de reto resistentes ao tratamento neoadjuvante. Também foi observado que a RI promove alterações epigenéticas predominantemente de hipometilação, e entre os genes alterados estão SPG20 e TBC1D16, sendo o primeiro importante para a internalização de EGFR e o segundo para a regulação de Rab5C e modulação de EGFR. O perfil de expressão proteica foi ainda comparado entre biópsias pré-tratamento de pacientes com RCp e sem resposta patológica, e o resultado mostrou que esses dois grupos de pacientes apresentam um diferente perfil de expressão proteica. Nos pacientes com RCp as proteínas com aumento da expressão estão atuando em vias que favorecem a resposta à terapia, como a detoxificação de glutathione e degradação de glicogênio, enquanto as proteínas com aumento da expressão em pacientes sem RCp estão envolvidas em vias do metabolismo energético do tumor as quais contribuem para a resistência tumoral à terapia. As diferenças observadas nestes grupos devem ser amplamente exploradas uma vez que podem ser marcadores preditivos de resposta ao tratamento radioquimioterápico. A realização de estudos funcionais foi viabilizada pela geração de um modelo celular de tumor de reto resistente à radioterapia. Ao analisar as VEs secretadas por estas células foi observado que a RI não altera a quantidade e o tamanho médio das VEs secretadas, porém é capaz de alterar o carregamento proteico das mesmas. De fato, as VEs de células irradiadas apresentam um perfil proteico diferente quando comparadas as VEs de células não irradiadas, onde encontramos aumento da expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C, além das metiltransferases NSUN2 e GLYM nas VEs de células pós RI. Interessantemente, as VEs secretadas por células irradiadas são capazes de transmitir a resistência à RI às células não irradiadas. Além disso os resultados mostraram que o tratamento com VEs de células irradiadas promove metilação em 98% do DNA avaliado em células SW837 em

comparação ao tratamento com VEs de células não irradiadas. Os genes hipermetilados estão envolvidos em vias relacionadas ao sistema imune, como a apresentação de antígeno, sinalização de imunodeficiência primária e maturação de células dendríticas. Por fim, foi identificado que a expressão da proteína A33 está relacionada ao grau de diferenciação dos tumores colorretais, e que essa proteína está presente em VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto, indicando que a mesma pode ser usada para isolar VEs específicas do tecido colorretal. Os dados obtidos neste trabalho apontam mecanismos relacionados à resistência à terapia neoadjuvante no adenocarcinoma de reto e que em conjunto permitirão identificar novos alvos terapêuticos com potencial de melhorar a resposta à radioquimioterapia, além de identificar marcadores de resposta à terapia neoadjuvante antes do tratamento e dessa forma, poupar os pacientes não respondedores de terapias tóxicas e melhorar a sustentabilidade na saúde poupando os custos com drogas não eficientes para um grupo de pacientes.

## SUMMARY

Baptistella AR. **[Biomarkers and mechanisms of resistance to neoadjuvant therapy and the role of extracellular vesicles secreted by tumor cells in rectal cancer]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Rectal cancer is the second most common cancer in large intestine, corresponding to one third of total cases of colorectal cancer (CRC). Patients with rectal cancer in stage II and III are treated with neoadjuvant chemoradiation followed by surgical resection. Analyses of the resected tumor demonstrated that only 10-45% of the patients achieve pathological complete response (pCR) after neoadjuvant therapy, which is associated with a decrease in local recurrence, improvement of disease free survival and increase in sphincter preservation. Despite the improvement in survival in the last decades, the response to neoadjuvant therapy is still variable and unpredictable, and before the surgery it is not possible to identify and separate clinically the group of patients that will or will not have complete response to neoadjuvant treatment. Moreover, the mechanisms of resistance of rectal tumors to chemoradiation are poorly understood. Thus, the main objective of this work was to identify biomarkers and cellular mechanisms related to the resistance to neoadjuvant therapy in rectal adenocarcinomas and the role of extracellular vesicles (EVs) in this process. The comparative proteomic study between biopsy obtained from tumors pretreatment with residual tumor, post chemoradiation treatment, removed by surgery showed an important alteration in the protein expression profile. Among the proteins with increased expression after neoadjuvant therapy are the DNA repair proteins Ku70 and Ku80, and the protein involved in the intracellular trafficking, Rab5C. It was demonstrated *in vitro* that Rab5C orchestrates a mechanism of radioresistance in rectal tumors by modulating the EGFR internalization promoted by ionizing radiation (IR). The intracellular EGFR is

essential to regulate Ku70 and Ku80 expression and the cell resistance to IR. These data pointed Rab5C and EGFR as potential therapeutic targets to sensitize rectal cancer cells resistant to neoadjuvant treatment. It was also observed that IR promotes epigenetic alterations, predominantly hypomethylation, and between the altered genes are SPG20 and TBC1D16, the first is important to EGFR internalization, while the second regulates Rab5C and modulates EGFR. The protein expression profile was further compared between biopsy pretreatment of patients with and without pCR, and the results showed that these two groups of patients present a different protein expression profile. In patients with pCR the proteins with increased expression are involved in pathways favoring the response to therapy, as glutathione-mediated detoxification and glycogen degradation, while the proteins with increased expression in patients without pCR are involved in tumor energetic metabolism pathways that contribute to tumor resistance to therapy. The observed differences in these groups should be widely explored since they may be predictive markers of response to chemoradiation treatment. The performance of functional studies was possible by generation of a cellular model of rectal tumor resistant to radiotherapy. The analysis of the EVs secreted by these cells showed that IR does not alter the amount and the medium size of secreted EVs, but is able to change their protein content. EVs from irradiated cells presented a different protein profile when compared to EVs from non-irradiated cells, where it was found the increased expression of Ku70, Ku80 and Rab5C, besides the methyltransferases NSUN2 and GLYM in EVs after irradiation. Interestingly, the EVs secreted by irradiated cells are capable of transferring resistance to IR to non-irradiated cells. Moreover, the results showed that the treatment of SW837 cells with EVs from irradiated cells promoted methylation in 98% of the analyzed DNA in comparison with the treatment with EVs from non-irradiated cells. The hypermethylated genes are involved in pathways related to immune system, as antigen presentation, primary immunodeficiency signaling and dendritic cells maturation. Lastly, it was identified that the A33 expression is related to the colorectal tumors differentiation degree, and this protein is present in EVs



secreted by rectal adenocarcinoma, indicating that it may be used to isolate EVs specific from colorectal tissues. The data obtained in this work pointed to mechanisms related to resistance to neoadjuvant therapy in rectal adenocarcinoma that together will allow to identify new therapeutic targets with the potential to improve the response to chemoradiation, as well as to identify markers of response to neoadjuvant therapy before the treatment, and, in this way, avoid the non-responder patients to receive toxic therapies and improve health sustainability, sparing cost with non-efficient drugs for a group of patients.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Anatomia do cólon e do reto.....	2
<b>Figura 2</b>	Alterações moleculares que levam ao início e progressão do CCR através do tempo.....	4
<b>Figura 3</b>	Estadiamento do câncer colorretal.....	5
<b>Figura 4</b>	Anatomia do reto.....	8
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de resistência à quimioterápicos citotóxicos e à terapia alvo.....	17
<b>Figura 6</b>	DNA DSBs e mecanismos de reparo de DNA.....	21
<b>Figura 7</b>	Micrografia eletrônica de exossomos em reticulócitos em maturação.....	27
<b>Figura 8</b>	Tamanho médio dos principais tipos de vesículas extracelulares.....	28
<b>Figura 9</b>	Biogênese de exossomos e microvesículas.....	29
<b>Figura 10</b>	Conteúdo das vesículas extracelulares.....	32
<b>Figura 11</b>	Resumo da análise proteômica entre biópsia e tumor residual na peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto.....	72
<b>Figura 12</b>	Expressão de Rab5C por imunofluorescência nas células SW837 e IR-SW837.....	76

<b>Figura 13</b>	Knockdown de Rab5C por siRNA.....	77
<b>Figura 14</b>	Tratamento com anti-EGFR e localização celular de EGFR por IF nas células SW837.....	78
<b>Figura 15</b>	Viabilidade celular após RI com e sem tratamento com Cetuximab.....	79
<b>Figura 16</b>	Tratamento com quimioterápico e viabilidade celular.....	81
<b>Figura 17</b>	Perfil de metilação de células SW837 e IR-SW837.....	83
<b>Figura 18</b>	Análise de vias dos genes hipo e hipermetilados em células IR-SW837 em relação às células SW837.....	88
<b>Figura 19</b>	Enriquecimento de proteínas da fração de membrana celular	90
<b>Figura 20</b>	Análise proteômica de biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto com RCp e sem RCp.....	92
<b>Figura 21</b>	Análise de vias das proteínas com aumento e diminuição da expressão em pacientes com RCp.....	94
<b>Figura 22</b>	Perfil das VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837	97
<b>Figura 23</b>	Microscopia eletrônica de VEs isoladas de células SW837 e IR-SW837.....	98
<b>Figura 24</b>	Carregamento proteico de VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837.....	99
<b>Figura 25</b>	Expressão das proteínas envolvidas na biogênese e secreção de VEs nas células SW837 e IR-SW837.....	102

<b>Figura 26</b>	Transferência de resistência à RI através de VEs.....	104
<b>Figura 27</b>	Análise proteômica de VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837.....	107
<b>Figura 28</b>	Validação da expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C em VEs por WB.....	109
<b>Figura 29</b>	Análise de vias das proteínas com aumento e diminuição da expressão em VEs de células IR-SW837 em relação às VEs células SW837.....	111
<b>Figura 30</b>	Perfil de metilação de células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 e SW837.....	113
<b>Figura 31</b>	Análise de vias dos genes hipo e hipermetilados em células SW837 tratadas com VEs IR-SW837 em relação às células SW837 tratadas com VEs SW837.....	117
<b>Figura 32</b>	Expressão de A33 em biópsia de adenocarcinoma de reto e diferentes linhagens celulares.....	120
<b>Figura 33</b>	Expressão de A33 em VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto.....	121
<b>Figura 34</b>	Resumo esquemático das conclusões do trabalho.....	164

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características demográficas e clínicas dos pacientes.....	39
<b>Tabela 2</b>	Top 20 genes hipermetilados em célula IR-SW837 comparada à SW837.....	84
<b>Tabela 3</b>	Top 20 genes hipometilados em célula IR-SW837 comparada à SW837.....	85
<b>Tabela 4</b>	Top 20 genes hipermetilados em células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 comparadas às tratadas com VEs de células SW837.....	114
<b>Tabela 5</b>	Top 20 genes hipometilados em células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 comparadas às tratadas com VEs de células SW837.....	115
<b>Quadro 1</b>	Proteínas de membrana com aumento de expressão no grupo com RCp.....	95
<b>Quadro 2</b>	Proteínas de membrana com aumento de expressão ou exclusiva do grupo sem RCp.....	96

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>5-FU</b>	5-fluorouracil
<b>APS</b>	Persulfato de amônia (do inglês, <i>ammonium persulfate</i> )
<b>ATM</b>	Proteína ataxia telangiectasia mutada (do inglês, <i>protein ataxia telangiectasia mutated</i> )
<b>ATR</b>	Proteína ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada (do inglês, <i>ataxia telangiectasia and RAD3-related</i> )
<b>BER</b>	Reparo de excisão de base (do inglês, <i>base excision repair</i> )
<b>BRCA1</b>	Proteína da susceptibilidade ao câncer de mama tipo 1 (do inglês, <i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i> )
<b>BRCA2</b>	Proteína da susceptibilidade ao câncer de mama tipo 2 (do inglês, <i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i> )
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>CA 19-9</b>	Antígeno carboidrato 19-9
<b>CCR</b>	Câncer Colorretal
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionário
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CIMP</b>	Fenótipo metilador de ilhas CpG (do inglês, <i>CpG Island Methylator Phenotype</i> )
<b>CIN</b>	Instabilidade cromossômica (do inglês, <i>chromosomal instability</i> )
<b>CMS</b>	Consenso de subtipos moleculares (do inglês, <i>consensus molecular subtype</i> )
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CTCF</b>	Fluorescência celular total corrigida (do inglês, <i>corrected total cell fluorescence</i> )
<b>DDR</b>	Resposta ao dano de DNA (do inglês, <i>DNA damage response</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNA-PKcs</b>	Proteína quinase DNA-dependente, subunidade catalítica (do inglês, <i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i> )
<b>DSBs</b>	Quebras de dupla fita (do inglês, <i>double-strand breaks</i> )
<b>ECL</b>	do inglês, <i>enhanced chemiluminescence</i>

<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ESCRT</b>	Complexo de classificação endossomal requerida para transporte (do inglês, <i>endosomal sorting complex required for transport</i> )
<b>GIST</b>	Tumores do estroma gastrointestinal (do inglês, <i>gastrointestinal stromal tumors</i> )
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HR</b>	Recombinação homóloga (do inglês, <i>homologous recombination</i> )
<b>HRR</b>	Reparo por recombinação homóloga (do inglês, <i>homologous recombination repair</i> )
<b>HRS</b>	Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i> )
<b>IF</b>	Imunofluorescência
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>ILVs</b>	Vesículas intraluminais (do inglês, <i>intraluminal vesicles</i> )
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IPA</b>	Do inglês, <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
<b>IR-SW837</b>	Ionizing Radiation-SW837
<b>LCCRT</b>	Radioquimioterapia de curso longo (do inglês, <i>long-course chemoradiotherapy</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína-cinases ativadas por mitógenos (do inglês, <i>Ras-mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MCT</b>	Meio condicionado total
<b>MDSCs</b>	Células supressoras derivadas de mielócitos (do inglês, <i>myeloid-derived suppressor cells</i> )
<b>miRNAs</b>	Micro RNAs
<b>MSI</b>	Instabilidade de microssatélites (do inglês, <i>microsatellite instability</i> )
<b>MVBs</b>	Corpos multivesiculares (do inglês, <i>multivesicular bodies</i> )
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio

<b>NHEJ</b>	Junção de extremidades não homólogas (do inglês, <i>non-homologous end joining</i> )
<b>NK</b>	Do inglês, <i>Natural killer cells</i>
<b>NT</b>	<i>non-targeting</i>
<b>NTA</b>	Do inglês, <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
<b>PBS</b>	Tampão salina-fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo (do inglês, <i>propidium iodide</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinases (do inglês, <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> )
<b>PrPC</b>	Proteína príon celular
<b>RAB</b>	Ras relacionada ao cérebro (do inglês, <i>Ras-related in brain</i> )
<b>RCp</b>	Resposta completa patológica
<b>RI</b>	Radiação Ionizante
<b>RIPA</b>	Tampão de radio-imuno-precipitação (do inglês, <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SCRT</b>	Radioterapia de curso curto (do inglês, <i>short-course radiotherapy</i> )
<b>SD</b>	Desvio padrão (do inglês, <i>standard deviation</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SEM</b>	Média do erro padrão (do inglês, <i>standard error of the mean</i> )
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SSBs</b>	Quebras de fita simples (do inglês, <i>single-strand breaks</i> )
<b>STAM</b>	Molécula adaptadora de transdução de sinal (do inglês, <i>signal transducing adaptor molecule</i> )
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TBST</b>	Tampão Tris salino + Tween 20 (do inglês, <i>Tris-buffered saline + Tween 20</i> )
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético



<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>TMA</b>	Do inglês, <i>Tissue Microarray</i>
<b>VECTs</b>	VEs derivadas de células tumorais
<b>VEs</b>	Vesículas extracelulares

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer Colorretal .....	1
1.2	Câncer de Reto .....	7
1.3	Mecanismos de Resistência ao Tratamento Anticâncer .....	15
1.4	Marcadores Preditivos de Resposta à Terapia em Câncer de Reto.....	23
1.5	Vesículas Extracelulares e Câncer.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1	Objetivo Geral.....	37
2.2	Objetivos Específicos .....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	Pacientes e Amostras Teciduais .....	38
3.2	Linhagem Celular .....	40
3.3	Irradiação da Linhagem Celular Sw837.....	41
3.4	Ensaio de Western Blotting .....	42
3.5	Imunofluorescência e Microscopia Confocal .....	46
3.6	Imuno-Histoquímica.....	48
3.7	Isolamento e Quantificação das Vesículas Extracelulares .....	50
3.8	Microscopia Eletrônica .....	51
3.9	Citometria de Fluxo .....	52
3.10	Espectrometria de Massas .....	52
3.11	Quantificação da Sobrevivência Celular e da Eficiência de Plaqueamento .....	57
3.12	Quantificação da Proliferação Celular .....	58
3.13	Quantificação da Invasão Celular.....	58
3.14	Ensaio de Quantificação da Internalização Celular de EGFR.....	59
3.15	Tratamento de Células Sw837 com Vesículas Extracelulares de Células IR-SW837 .....	60

3.16	Quantificação do Cargo Proteico em Vesículas Extracelulares.....	61
3.17	Transfecção Celular com Small Interference RNA .....	62
3.18	Análise do Perfil de Metilação .....	63
3.19	Análise Estatística .....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
4.1	Marcadores e Mecanismo de Resistência á Terapia Neoadjuvante em Adenocarcinoma de Reto .....	70
4.1.1	Análise Proteômica de Biópsia e Tumor Residual de Pacientes com Adenocarcinoma de Reto tratados com Radioquimioterapia Neoadjuvante .....	70
4.1.2	Mecanismo de Resistência à Neoadjuvância em Câncer de Reto .....	73
4.1.3	Expressão e Modulação de Rab5C em células IR-SW837.....	75
4.1.4	Tratamento com Anti-EGFR e Internalização de EGFR em Células SW837 .....	77
4.1.5	Resistência das Células SW837 e IR-SW837 ao Tratamento Quimioterápico .....	79
4.1.6	Análise do Perfil de Metilação das Células SW837 e IR-SW837.....	82
4.2	Marcadores Preditivos de Resposta à Terapia Neoadjuvante em Adenocarcinoma de Reto .....	89
4.3	O Perfil das Vesículas Extracelulares Secretadas por Células de Adenocarcinoma de Reto e seu Papel na Resistência à Terapia.....	96
4.3.1	Concentração, tamanho e cargo proteico das VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto SW837 e IR-SW837.....	96
4.3.2	Screening da Expressão das Proteínas envolvidas na Biogênese e secreção de VEs em Células SW837 e IR-SW837 .....	100
4.3.3	Células IR-SW837 Transferem resistência à RI para Células SW837 através das VEs .....	103
4.3.4	Análise proteômica de VEs secretadas por células SW837 e IR- W837 .....	105
4.3.5	Análise do perfil de metilação das células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 .....	112

4.4	A proteína a33 como marcador de diferenciação tumoral em câncer colorretal e marcador de ves proveniente deste tecido .....	118
4.4.1	Expressão da proteína A33 em diferentes linhagens celulares e em VEs provenientes de célula de adenocarcinoma de reto.....	118
4.4.2	Expressão da proteína A33 em tumores colorretais e relação com o grau de diferenciação tumoral .....	122
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>124</b>
5.1	Marcadores e mecanismo de resistência à terapia neoadjuvante em adenocarcinoma de reto .....	124
5.2	Marcadores preditivos de resposta à terapia neoadjuvante em adenocarcinoma de reto .....	137
5.3	O perfil das vesículas extracelulares secretadas por células de adenocarcinoma de reto e seu papel na resistência à terapia.....	147
5.4	A proteína A33 como marcador de diferenciação tumoral em câncer colorretal e marcador de ves proveniente deste tecido .....	156
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....</b>	<b>165</b>

## **ANEXOS**

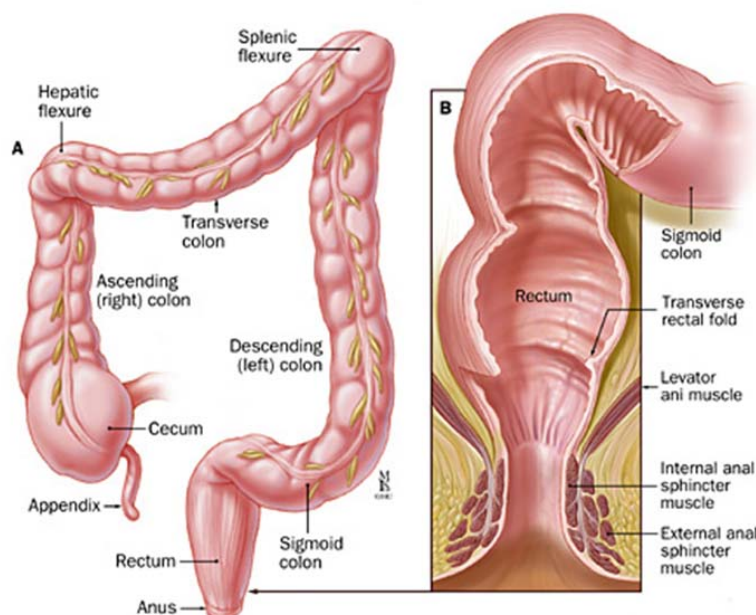
- Anexo 1** Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo 3** Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto
- Anexo 4** Lista de proteínas de membrana diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto

- Anexo 5** Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto com e sem RPc ao tratamento neoadjuvante
- Anexo 6** Lista de proteínas de membrana diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto
- Anexo 7** Lista de proteínas diferentemente expressas na análise proteômica de VEs de células SW837 e IR-SW837, bem como as proteínas identificadas exclusivaente em um dos grupos
- Anexo 8** Artigo científico: “Rab5C increases resistance to ionizing radiation in rectal cancer”
- Anexo 9** Artigo Científico “Heterogeneous expression of A33 in colorectal cancer: possible explanation for A33 antibody treatment failure”

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 CÂNCER COLORRETAL**

O câncer colorretal (CCR) compreende os tumores que acometem o cólon (intestino grosso) e o reto, partes que formam a extremidade mais baixa do sistema digestivo (Figura 1). A grande maioria dos tumores colorretais são adenocarcinomas, tendo origem em células epiteliais, as quais têm como principal função a secreção de muco e outros fluídos (National Cancer Institute-NCI 2015a). O CCR é o terceiro tumor mais diagnosticado em homens e o segundo em mulheres no mundo, com uma estimativa de 1.400.000 novos casos e 693.900 mortes ocorridas em 2012 (TORRE et al. 2015). Para o ano de 2015, estimou-se o aparecimento de mais de 132.700 novos casos e cerca de 49.700 mortes em decorrência do CCR nos EUA (NCI 2015b). No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), foram estimados 32.600 novos casos de CCR para 2014 e em 2011 foram registradas 14.016 mortes decorrentes desta patologia no país (Ministério da Saúde 2015).



Fonte: <http://fightcolorectalcancer.org>

**Figura 1** - Anatomia do cólon e do reto.

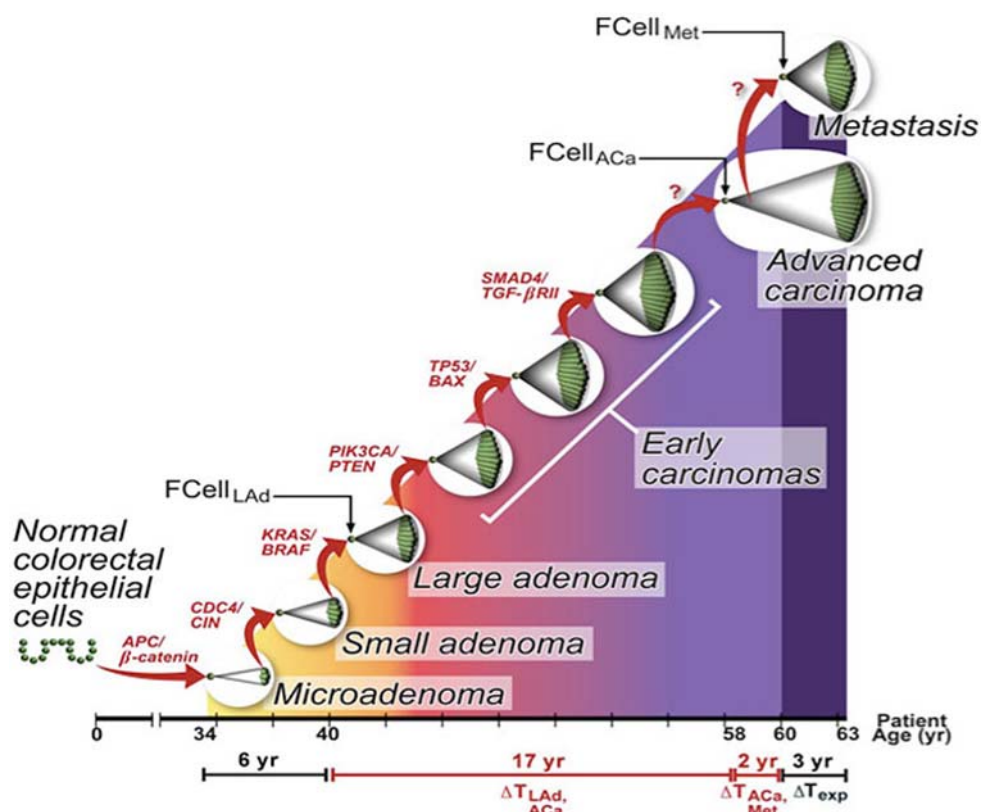
Com base em dados de 2005 a 2011, estima-se que a sobrevida global média em 5 anos do CCR é de 64,9% (NCI 2015b). O CCR é um tipo de câncer considerado de bom prognóstico se diagnosticado em estágios iniciais. Para a detecção precoce do CCR a pesquisa de sangue oculto nas fezes e métodos endoscópicos são utilizados, sendo que através dos métodos endoscópicos são removidos os pólipos adenomatosos colorretais - precursores do CCR - além de tumores em estágios iniciais. A detecção precoce dos tumores colorretais pode ser decisiva para o prognóstico do paciente, pois a extensão da doença em termos de invasão local, acometimento de linfonodos e órgãos distantes na hora do diagnóstico, são importantes fatores definidores de prognóstico (Ministério da Saúde 2015). Em tumores localizados a sobrevida global em 5 anos pode chegar a 90,1%,

enquanto que em tumores que alcançaram órgãos distantes, essa sobrevida cai para 13,1% (NCI 2015b).

O processo de tumorigênese do CCR tem sido amplamente estudado, sendo que o início e progressão da doença classificada como esporádica está relacionada a uma série de mutações genéticas, alterações epigenéticas, translocações cromossômicas e vias de sinalização alteradas, como WNT, RAS-MAPK, PI3K, TGF- $\beta$ , P53 e via de reparo de DNA (MUZNY et al. 2012). Essas alterações genéticas e epigenéticas levam a mudanças nas funções de determinados genes, esses mudam o comportamento normal das células epiteliais que revestem o interior do colón e do reto, permitindo a gênese de uma neoplasia maligna. Esse processo pode levar anos, e nesse período as células adquirem autossuficiência para os sinais de crescimento, potencial para invadirem e destruírem os tecidos adjacentes e potencialidade para a formação de metástases (Figura 2) (JIMENEZ et al. 2010). Além disso, com base em dados de larga escala, recentemente, o CCR foi dividido em 4 subtipos moleculares (CMS – *consensus molecular subtype*): CMS1 (instabilidade de microssatélites e imune, 14% dos casos), sendo caracterizado por ser hipermutado, ter instabilidade de microssatélites, e forte ativação imune; CMS2 (canônico, 37% dos casos), epitelial, com ativação das vias de WNT e MYC; CMS3 (metabólico, 13% dos casos), epitelial e com desregulação metabólica evidente; CMS4 (mesenquimal, 23% dos casos), ativação proeminente de TGF- $\beta$ , invasão estromal e angiogênese; amostras com padrão misto (13%) possivelmente



representam uma transição de fenótipo ou heterogeneidade tumoral (GUINNEY et al. 2015).

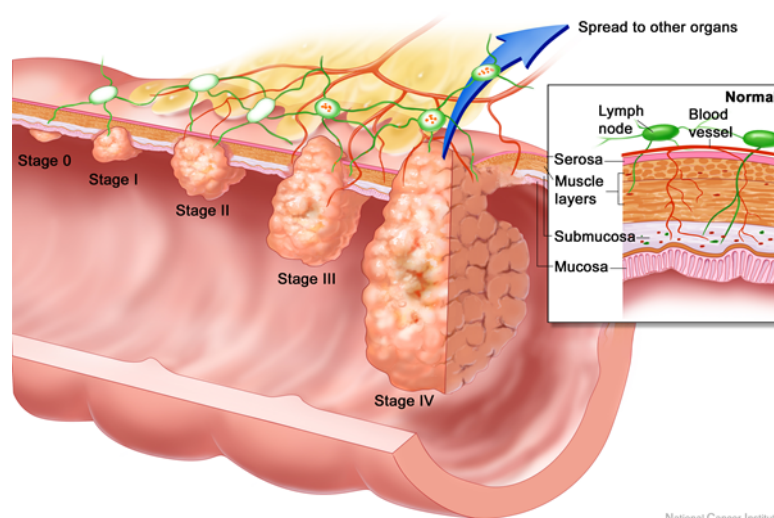


Fonte: <http://commonfund.nih.gov>

**Figura 2** - Alterações moleculares que levam ao início e progressão do CCR.

O estadiamento do CCR é definido através do exame físico, biópsia e exames de imagem. O estágio de 0 a IV é baseado no método TNM, onde o “T” é definido pelo tamanho do tumor, o “N” pela invasão linfonodal e o “M” pela presença de metástase. O estágio 0 é o carcinoma *in situ* (Tis, N0 e M0); no estágio I o tumor cresce da mucosa até a submucosa ou até a camada muscular própria, sem invasão linfonodal ou metástase (T1-T2, N0 e M0); o estágio II, é quando o tumor invade até as camadas mais externas do

cólon e do reto, ou tecidos adjacentes, mas sem invadir linfonodos ou órgãos a distância (T3-T4, N0 e M0); no estágio III o tumor invade linfonodo, mas não apresenta metástase em órgãos distantes, independentemente do tamanho do tumor (qualquer T, N1-N2, M0); já o estágio IV é definido quando o tumor faz metástase para órgãos distantes, independente do T e do N (qualquer T, qualquer N, M1) (Figura 3) (SOBIN et al. 2012).



Fonte: <http://qualityoflife.org>

**Figura 3** - Estadiamento do câncer colorretal.

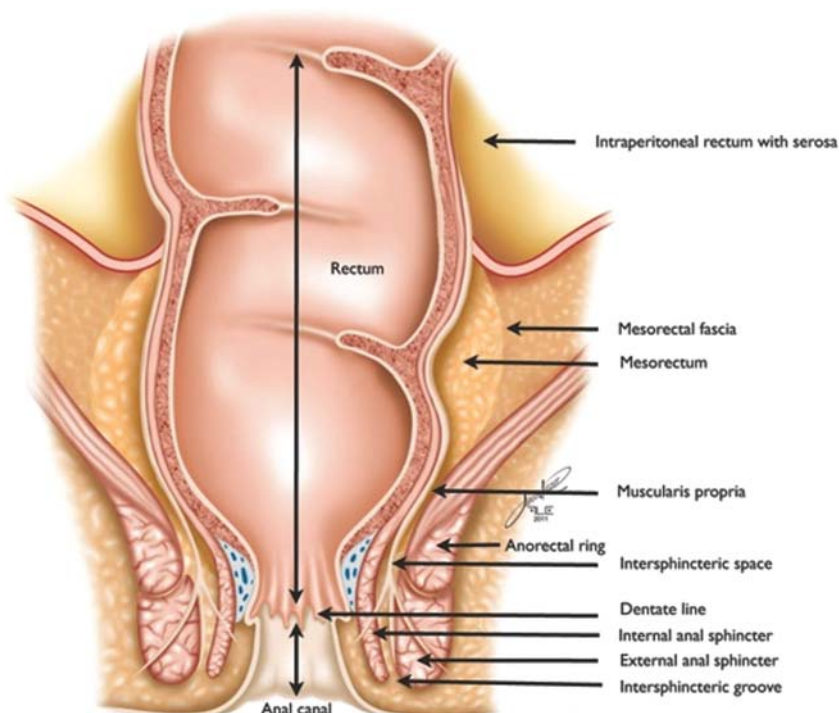
A invasão tecidual local e metástase são consideradas essenciais para o comportamento maligno desta neoplasia, levando a posteriores metástases distantes e fatais (FAN et al. 2013). Aproximadamente 20% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico e outros 30-40% irão desenvolver metástase no período pós-operatório. As metástases são responsáveis pela maioria das mortes em pacientes acometidos pelo CCR, sendo que o sítio mais acometido é o fígado (VAVRA et al. 2015).

Aproximadamente 72% dos tumores colorretais acometem o cólon, enquanto 28% estão localizados no reto (BECK 2009). Os tumores de cólon e reto são comumente considerados uma única entidade, chamada de câncer colorretal. Apesar de compartilharem padrões similares de alterações genéticas (WU e GOLDBERG 2013), o câncer de cólon e de reto apresentam diferenças anatômicas e embrionárias bem definidas, e nos últimos anos veem sendo considerados tumores diferentes em relação ao diagnóstico, prognóstico e tratamento (DECANINI-TERÁN et al. 2005). Diferentes estudos mostram resultados controversos em relação ao prognóstico do câncer de reto quando comparado ao câncer de cólon. Quando avaliada a sobrevida global média em 3 anos no câncer de cólon a mesma é de 70,6%, enquanto no câncer de reto é de 57,0% (LI et al. 2007). Quando avaliada em 5 anos, dois estudos mostraram melhor sobrevida global no câncer de reto. O primeiro estudo mostrou sobrevida de 59% para tumores de cólon e de 61% em tumores de reto nesse período (TAMAS et al. 2015), enquanto outro estudo encontrou uma sobrevida global média em 5 anos de 66,5% nos tumores de reto e de 64,2% para os tumores de cólon. Tais diferenças sugerem comportamentos diferentes entre esses dois tumores, evidenciando cada vez mais a necessidade de considerar tumores de cólon e de reto como doenças diferentes.

## **1.2 CÂNCER DE RETO**

O câncer de reto é o segundo tumor mais comum no intestino grosso (28%), atrás do cólon proximal (42%), correspondendo a um terço do total de casos de CCR, sendo que em 2008 somou aproximadamente 450.000 novos casos no mundo (FAZELI e KERAMATI 2015; TAMAS et al. 2015).

O reto é a porção final do intestino grosso, entre o cólon sigmoide e o canal anal. Inicia na junção retossigmóide na altura da terceira vértebra sacral e termina na altura do anel reto-anal. O reto tem aproximadamente 12 a 15 centímetros com um calibre interno similar ao do cólon sigmoide em seu início, dilatando-se próximo a sua porção terminal formando a ampola retal. A parede retal é composta por 5 camadas de tecido, incluindo mucosa, submucosa, músculo circular interno, musculo longitudinal externo e serosa (Figura 4) (FAZELI e KERAMATI 2015).



**Fonte:** KOSINSKI et al. (2012)

**Figura 4** - Anatomia do reto

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores de cólon e de reto também parecem ser diferentes. Em um estudo com 1443 pacientes com CCR em estádios I-IV, foi observado que a incidência de mutações em BRAF, a alta taxa de instabilidade de microssatélites (MSI-high), e a alta taxa de metilação em ilhas CpG (CIMP-high) diminuem gradativamente do cólon proximal para o reto (YAMAUCHI et al. 2012). A localização do tumor de reto também parece conferir um perfil metastático diferente quando comparado ao tumor de cólon. Em um estudo com 567 pacientes com câncer de cólon e 1013 com câncer de reto, foi observado que 11,5% dos pacientes com tumores retais apresentavam metástase no pulmão, comparado com apenas 3,5% dos pacientes com tumor de cólon. Isso pode ser parcialmente explicado pela drenagem venosa

dessas duas regiões do intestino grosso, pois enquanto a veia retal inferior drena diretamente na veia cava inferior, outras veias do intestino grosso drenam para o sistema portal (PIHL et al. 1987). Outro estudo também mostrou um aumento no risco de metástase no pulmão nos pacientes com adenocarcinomas de reto comparado com pacientes com adenocarcinomas de cólon (KIM et al. 2012). Em um estudo de autópsias que incluiu 1238 pacientes com câncer de cólon metastático e 441 pacientes com câncer de reto metastático observou-se que nos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma mucinoso, as metástases intra-abdominais foram mais frequentes em pacientes com câncer de cólon, enquanto as metástases extra-abdominais foram mais frequentes em pacientes com câncer de reto (HUGEN et al. 2014). O status mutacional do gene BRAF e a amplificação ou superexpressão de EGFR mostram diferenças entre tumores colorretais proximais e distais. O gene BRAF é preferencialmente mutado em tumores de cólon proximais, enquanto o EGFR é mais comumente amplificado ou superexpresso em tumores colorretais distais, o que tem consequências diretas na escolha do tratamento com terapias alvo como inibidores de EGFR e BRAF (PRAHALLAD et al. 2012).

Os fatores de risco para câncer de reto parecem ser diferentes daqueles para câncer de cólon. Tem sido demonstrado que história familiar de CCR leva a um maior risco de desenvolver câncer de cólon em relação ao câncer de reto (WEI et al. 2010). Pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar apresentam risco de desenvolver câncer de cólon, mas não parecem apresentar risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de

reto. Além disso, a prevalência de mutações em K-Ras e o perfil de mutação no gene p53 no câncer de reto parecem ser diferentes daquelas vistas no câncer de cólon (IMPERIALE e HANSOHOFF 2012). Fatores ambientais como dieta e atividade física também podem afetar o risco para câncer de cólon e de reto. A atividade física tem se mostrado mais associada à prevenção de câncer de cólon. Consumo de carne vermelha, carne processada e álcool também foram associados ao câncer de cólon, enquanto o hábito de fumar mostrou maior associação com o câncer de reto (TERRY et al. 2002; WEI et al. 2010). O risco de um paciente com diabetes mellitus desenvolver câncer de cólon é 38% maior que uma pessoa sem diabetes, enquanto que para o câncer de reto o risco é 20% maior (YUHARA et al. 2011). Além disso, história de radioterapia para tratamento de câncer de próstata mostrou ser um fator de risco apenas para câncer de reto (BAXTER et al. 2005).

O sangramento retal é a forma mais comum de apresentação do câncer de reto. Em estádios mais avançados da doença, podem aparecer outros sintomas como tenesmo, evacuação incompleta, diminuição do calibre das fezes, dor pélvica e retal, e sintomas de obstrução (WILKES e HARTSHORN 2012). Em situações raras e extremas o câncer retal pode também apresentar emergências com obstrução intestinal, sangramento gastrointestinal agudo ou peritonite, seguida de perfuração para a cavidade peritoneal. Fístula para órgãos adjacentes como a bexiga, febre de origem indeterminada, abscessos, bacteremia ou sepse também tem sido

consideradas como formas raras de apresentação (PANWANKER 1988; ALVAREZ et al. 2004; TSAI et al. 2007).

O exame mais utilizado mundialmente para a triagem de câncer de reto é a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Em caso de positividade desse exame, o toque retal, seguido de exames como a colonoscopia, retoscopia, sigmoidoscopia flexível, além de tomografia computadorizada (TC), ultrassom transretal ou ressonância magnética (RM) são recomendados. Para confirmar o diagnóstico, é necessário o exame histológico do tecido removido através de uma biópsia, seguido do estadiamento apropriado (LEVIN et al. 2008; ZAVORAL et al. 2014). Alguns marcadores sorológicos também são sugestivos de CCR, como o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9). Como esses marcadores tem baixa sensibilidade para tumores em estádios iniciais, e pela possibilidade de estarem aumentados em condições não relacionadas ao câncer, os mesmos não são usados como método de rastreamento para os tumores colorretais, porém os valores desses marcadores são avaliados no acompanhamento pós tratamento e na avaliação de prognóstico de tais pacientes (DUFFY et al. 2003; LOCKER et al. 2006).

O tratamento do câncer de reto varia de acordo com o estadiamento do tumor. O estadiamento segue o método TNM, como já descrito para o CCR. No estágio I a cirurgia é recomendada; nos estádios II e III, a radioquimioterapia neoadjuvante seguida de ressecção cirúrgica está recomendada; enquanto no estágio IV é realizada a pesquisa do status KRAS e mutação do gene BRAF para o planejamento do tratamento e



avaliação de inclusão de terapias alvo, como anti-EGFR. Nesse último estágio a ressecção paliativa, metastasectomia e quimioterapia de conversão podem ser consideradas (KOSINSKI 2012).

O principal objetivo do tratamento cirúrgico no câncer de reto é a completa remoção do tumor e do tecido linfático relacionado. Outros objetivos são a continuidade do intestino e a preservação do esfíncter anorretal. A cirurgia para a ressecção de tumores de reto pode ser radical (excisão total do mesorreto) ou não-radical. As opções de cirurgias radicais são a ressecção abdominoperineal, a ressecção interesfincteriana, a ressecção anterior baixa, e as ressecções transanal e transabdominal; enquanto as opções de cirurgia não radical são a excisão transanal e a microcirurgia endoscópica transanal. Essas cirurgias podem ser abertas, laparoscópicas, laparoscópica assistida com a mão, laparoscópica híbrida ou robótica. A escolha do procedimento cirúrgico depende do estágio e a localização do tumor (KOSINSKI 2012; MONSON et al. 2013).

Nos estádios II e III do câncer retal, a radioquimioterapia neoadjuvante é indicada, sendo que a mesma reduz o risco de recorrência local (BOSSET et al. 2006; KAPITEIJN et al. 2001; VAN GIJN et al. 2011), além de mostrar vantagens em relação ao tratamento com a radioquimioterapia pós-operatória (SEBAG-MONTEFIORE et al. 2009; TRAKARNSANGA 2012). A terapia neoadjuvante pode ser a radioterapia de curso curto (short-course radiotherapy [SCRT]) ou a radioquimioterapia de curso longo (long-course chemoradiotherapy [LCCRT]). A SCRT é realizada com doses diária de radiação de 5 Gy durante 5 dias, enquanto a LCCRT

usa doses de 1,8-2,0 Gy durante 5-6 semanas, totalizando uma dose de 45,0-50,4 Gy, com administração concomitante de quimioterapia baseada no uso de 5-fluorouracil (5-FU). Os regimes de quimioterapia mais usados são o 5-FU sozinho ou 5-FU mais Leucovorin. Depois de 6 a 12 semanas a ressecção cirúrgica é realizada (SAUER et al. 2004; BOSSET et al. 2006; GÉRARD et al. 2006; SEBAG-MONTEFIORE et al. 2009). O prognóstico dos pacientes que receberam a radioquimioterapia neoadjuvante é relacionado com o estágio final do tumor e a presença de envolvimento linfonodal no espécime cirúrgico. O grau de regressão tumoral, que é definido pelo grau de fibrose e a porcentagem de células tumorais viáveis é outro fator que afeta o prognóstico (WHEELER et al. 2002; RÖDEL et al. 2005; VECCHIO et al. 2005).

A terapia adjuvante também tem sido altamente recomendada para pacientes com câncer retal estágio II e III. Para os pacientes que receberam a terapia neoadjuvante, a terapia adjuvante é realizada com quimioterapia, a qual tem mostrado efetividade na redução de recorrência local e mortalidade, enquanto as desvantagens estão relacionadas à dificuldade de cicatrização da ferida operatória e à toxicidade no intestino delgado (KROOK et al. 1991; FISHER et al. 1988; GROUP et al. 2007). Diversos regimes de tratamento quimioterápico para tratamento adjuvante de câncer de reto têm sido estudados nos últimos anos. Esses regimes incluem fluorouracil em bolus ou infusional (SMALLEY et al. 2006), o regime Roswell Park (bolus de fluorouracil mais leucovorin semanal) (HALLER et al. 2005), o regime Gramont (fluorouracil mais leucovorin em períodos curtos) (ANDRÉ et al.

2007), capecitabina (HOFHEINZ et al. 2012), ou regimes baseados em oxaliplatina, como FOLFOX (fluorouracil mais leucovorin e oxaliplatina) (CHEESEMAN et al. 2002).

A resposta ao tratamento neoadjuvante pode ser avaliada clinicamente, com o auxílio dos exames de imagem, mas a avaliação mais fidedigna é a anatomopatológica, a qual é realizada no tecido removido cirurgicamente, e é classificada como resposta patológica incompleta quando da presença de células tumorais viáveis ou resposta completa patológica (RCp) na ausência de células tumorais viáveis no espécime cirúrgico. A resposta incompleta é estratificada de acordo com a porcentagem de células tumorais viáveis no espécime cirúrgico. Tem sido descrito que a RCp é alcançada em aproximadamente 15-40% dos casos (JANJAN et al. 1999; MAAS et al. 2010; DE CAMPOS-LOBATO et al. 2011; GARCIA-AGUILAR et al. 2012; HABR-GAMA et al. 2015). Porém, em um estudo recente de base populacional, o qual avaliou 1.384 casos, mostrou uma taxa de RCp de apenas 10% (WASMUTH et al. 2015). A RCp tem sido associada com uma diminuição da recorrência local, melhora da sobrevida livre de doença e aumento na preservação esfinteriana.

Apesar da melhora substancial na sobrevida nas últimas décadas, a resposta à terapia neoadjuvante continua variável e imprevisível, e antes da cirurgia ainda não é possível identificar e separar clinicamente o grupo de pacientes que terá resposta completa daquele que não a terá. Além disso, os mecanismos de resistência à radio e quimioterapia nos tumores de reto são pouco compreendidos (KAPUR 2012).

Avanços futuros em câncer de reto devem focar na identificação de fatores moleculares de significância prognóstica e preditiva, e que possam melhorar o entendimento dos mecanismos de resistência à terapia. Com a identificação e a caracterização de marcadores tumorais de resposta ou não resposta, será possível prever quais pacientes deverão receber a radioquimioterapia neoadjuvante, por obterem benefícios de tal tratamento, talvez evitando a ressecção cirúrgica, e quais pacientes não se beneficiarão do tratamento neoadjuvante, podendo dessa forma serem evitados os efeitos adversos da terapia. Além disso, corroborando com o conceito de “farmacoeconomia” e custos nos serviços de saúde. Para os pacientes resistentes a terapia, o entendimento dos mecanismos de resistência e a busca por novas terapias são fundamentais para a obtenção de avanços relevantes no tratamento e nas taxas de resposta ao tratamento.

### **1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO ANTICÂNCER**

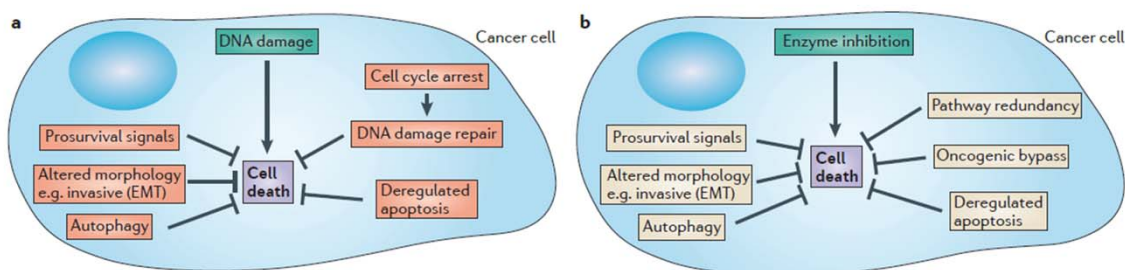
Na busca por terapias anticâncer cada vez mais específicas e eficientes, nas últimas décadas surgiu uma vasta gama de novos tratamentos, principalmente no que diz respeito a drogas mais modernas, terapias-alvo e avanços na radioterapia. Apesar disso, o grande limitante para a cura de muitos tumores ainda é a resistência das células tumorais às tais terapias. A resistência à terapia vem sendo estudada desde os primórdios do uso da quimioterapia, há mais de meio século, e ainda não

está completamente entendido porque mesmo na era da terapia alvo molecular e da medicina personalizada alguns pacientes são curados com uma determinada terapia, enquanto outros apresentam apenas uma resposta parcial ou transitória à essa mesma terapia (GOTTESMAN et al. 2002; GOTTESMAN 2002).

Há dois tipos de resistência à terapia anticâncer: intrínseca, também chamada de inata ou primária, que é a resistência que preexistia nas células tumorais antes de receber o tratamento, e pode estar relacionada à alterações genéticas ou epigenéticas do paciente, do tumor ou do microambiente; e a adquirida, também chamada de evasiva, adaptativa ou resistência secundária, que pode ser desenvolvida durante o tratamento, causada por mutações geradas pelo próprio tratamento, ou por outras respostas adaptativas, como o aumento da expressão de alvos terapêuticos ou ativação de mecanismos compensatórios (KUCZYNSKI et al. 2013; LONGLEY e JOHNSTON 2005). Além disso, os tumores têm um alto grau de heterogeneidade molecular, e com isso a resistência à terapia pode surgir da seleção de uma subpopulação de células resistentes que faziam parte do tumor original (SWANTON 2013).

Mecanismos específicos de resistência parecem estar envolvidos nas diferentes terapias, fato evidenciado pelas diferenças existentes nos mecanismos moleculares de resistência à quimioterapia e à radioterapia. Os mecanismos já descritos envolvidos na resistência às drogas anticâncer incluem aumento do efluxo de drogas, alterações no metabolismo da droga, mutações no alvo da droga, ativação de mecanismos de sobrevivência

celular, inativação de mecanismos de morte celular, alterações epigenéticas, influência do microambiente e presença de células tronco tumorais, as quais são altamente resistentes à maioria dos esquemas terapêuticos. Os mecanismos de resistência à quimioterápicos citotóxicos e à drogas alvo em grande parte sobrepõe-se, sendo que os estudos dos mecanismos de resistência às drogas citotóxicas podem ajudar a entender os mecanismos de resistência às novas terapia alvo moleculares (Figura 5) (HOLOHAN et al. 2013).



**Fonte:** HOLOHAN et al. (2013)

**Figura 5** - Mecanismos de resistência à quimioterápicos citotóxicos e à terapia alvo.

A radioterapia é usada em aproximadamente 50% de todos os pacientes com câncer, seja ela sozinha ou em combinação com outras modalidades de tratamento (DELANEY et al. 2005). Para alguns tipos de tumores a taxa de sobrevida é alta, enquanto para outros, a sobrevida continua sendo baixa. A maioria dos mecanismos responsáveis por essa falha no tratamento seguem inexplicáveis, e não se tem resposta porque tumores com tamanho, estágio e grau similares, que recebem a mesma

dose de radioterapia podem responder de forma tão distinta (BEGG et al. 2011).

O tratamento radioterápico, através do uso da Radiação Ionizante (RI), produz danos no DNA celular, os quais são causados de forma direta pela deposição de energia ou indireta pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*). Esses danos induzidos por RI incluem dano de bases, quebras de fita simples (SSBs - *Single-strand breaks*) e quebras de dupla fita (DSBs - *Double-strand breaks*), sendo esse último o dano mais letal. A RI produz um tipo singular de DSBs de alta complexidade, envolvendo múltiplos sítios de dano. Além disso, os DSBs também podem surgir ocasionalmente de SSBs gerados em locais próximos. Essas lesões, se não reparadas, levam a morte celular por catástrofe mitótica ou apoptose (O'DRISCOLL e JEGGO 2006).

Como o tratamento radioterápico induz morte celular através da quebra de DNA, um dos mecanismos mais importantes e que determinam a resistência celular tumoral a essa terapia é o mecanismo de reparo de DNA. O dano de DNA causado pela RI é seguido da chamada "resposta ao dano de DNA" (*DNA damage response* - DDR). Essa resposta está associada a vias moleculares complexas que têm como objetivo detectar e reparar os danos no DNA (ZHOU e ELLEDGE 2000). Esse mecanismo conta com a participação de proteínas que funcionam como sensores, transdutores e efetores, e o papel de cada um desses grupos de proteínas reflete em diferentes desfechos, como parada do ciclo celular, reparo do DNA, e em caso de dano irreparável, apoptose (SHILOH 2006). Depois que a RI induz

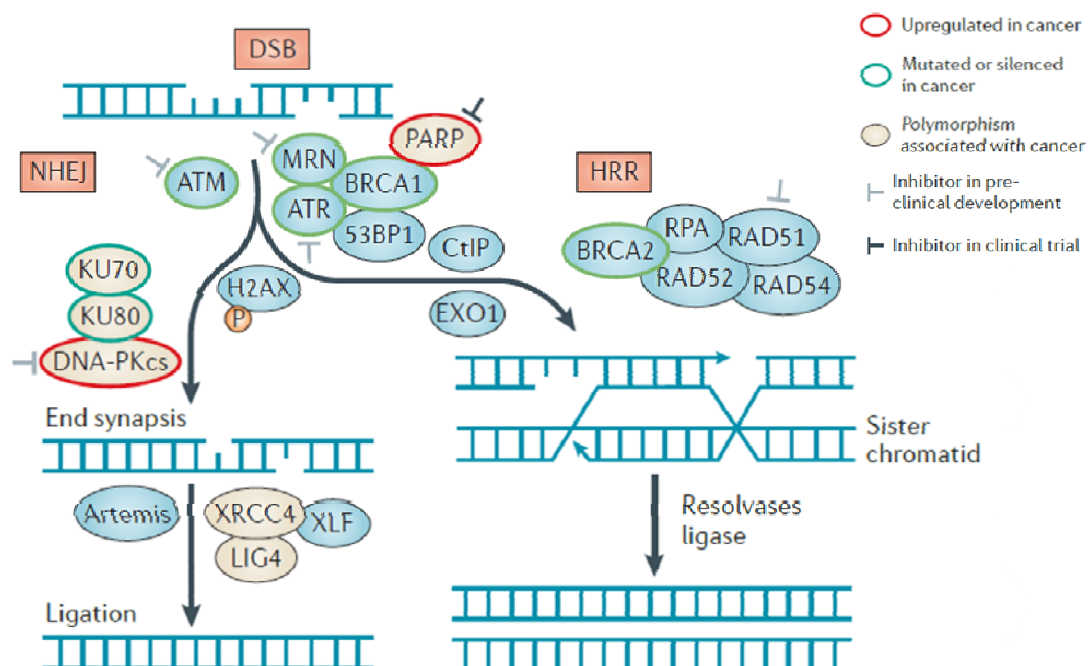
DSBs, moléculas como MRE11, RAD50 e NBS1, que juntas formam o complexo MRN, ligam-se ao sítio de dano e através de sua atividade como nucleases geram regiões de DNA de fita simples, potencializando a sinalização para parada do ciclo celular. Esse processo recruta a proteína ATM (*PI3K-like [PIKK] protein ataxia telangiectasia mutated*), que tem papel central na transdução e amplificação de sinais de *checkpoint* e parada do ciclo celular, através do controle da fosforilação das proteínas H2AX, CHK1, CHK2 e TP53. Além de ATM, a proteína ATR (*Ataxia telangiectasia and RAD3-related*) também tem papel importante na transdução do sinal do DSBs (DUROCHER e JACKSON 2001; D'AMOURS e JACKSON 2002).

Existem diferentes formas de resolução do dano no DNA: no DSBs os principais mecanismos são a recombinação homóloga (HR - *homologous recombination*) e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ - *non-homologous end joining*), sendo que após DSBs induzidos por RI, as extremidades de DNA expostas são preferencialmente ligadas por NHEJ (LÖBRICH e JEGGO 2007); já o reparo de excisão de base (BER - *base excision repair*) é capaz de reparar apenas dano de base e SSBs (ALMEIDA e SOBOL 2007).

O reparo por HR (HRR - *homologous recombination repair*) ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular e requer um molde de DNA (*DNA template*) da cromatina “irmã” ou de outro cromossomo para realizar a ressíntese do DNA danificado. Essa via é capaz de reparar apenas uma pequena proporção do DSBs, mas com alta fidelidade. O HRR é fundamental para a manutenção da estabilidade genômica, e a função dessa



via pode ser comprometida por mutação em um ou mais genes relacionados ao processo. Entre as proteínas envolvidas nesse processo estão BRCA1 e BRCA2 (*Breast cancer susceptibility proteins*) (SHRIVASTAV et al. 2008). Já o reparo por NHEJ está ativo em todas as fases do ciclo celular, apesar de atuar predominantemente nas fases G0 e G1. O NHEJ é o mecanismo responsável pelo reparo rápido de 85% dos DSBs induzidos por RI. As principais proteínas envolvidas no NHEJ são KU70 (XRCC6), KU80 (XRCC5) e DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), que juntas formam o complexo DNA-PK, além de artemis, XRCC4-XLF e ligase 4 (BEUCHER et al. 2009; MAHANEY et al. 2009). O heterodímero formado pelas proteínas Ku70 e Ku80 (Ku70/80) reconhece e liga-se ao local do DSB, atraído e ativado pela DNA-PKcs. Na sequência é recrutada a ligase 4 que processa e religa as extremidades de DNA (VAN GENT e VAN DER BURG 2007). Caso esse mecanismo de reparo não tenha sucesso, p53 é ativado e a célula é direcionada à apoptose (HABRAKEN et al. 2003). Após a atuação do complexo MRN no local do dano, ocorre um agrupamento ordenado de outras proteínas, como RAD52, RAD51, e RAD54, que juntas formam um filamento nucleoproteico para catalisar o pareamento das fitas de DNAs homólogas. A troca de fitas de DNA danificadas é assistida por proteínas parálogas de RAD51 (RAD51C, XRCC2 e XRCC3), as quais colaboram com a organização das estruturas complexas envolvidas nesse processo (Figura 6) (STIFF et al. 2004; JENSEN et al. 2010).



Fonte: Adaptado de CURTIN (2012)

**Figura 6** - DNA DSBs e mecanismos de reparo de DNA.

Algumas proteínas têm papel fundamental na resistência de células tumorais à radioterapia. ATM parece ser essencial no reparo de DSBs por NHEJ, sendo que células que carecem de ATM são radiosensíveis, com defeito na parada do ciclo celular pós dano de DNA, e déficit no reparo desse dano (FORAY et al. 1997; KÜHNE et al. 2004; RIBALLO et al. 2004). Já a expressão de Ku70 e Ku80, tem sido frequentemente encontrada desregulada em tumores, e seu nível de expressão considerado como marcador preditivo de resposta à radioterapia, além de ter relação com a sobrevida (KOMURO et al. 2002; KORABIOWSKA et al. 2006; MAZZARELLI et al. 2005; PARRELLA et al. 2006). Ademais, a deleção de Ku70 em células epiteliais de pulmão de murinos levou a uma diminuição do reparo de DSBs, vista através da fosforilação de H2AX, e consequentemente essas células

foram mais sensíveis à RI quando comparadas as células controle (KOIKE et al. 2013). Enquanto que fibroblastos provenientes de camundongos com deleção de Ku80 se mostraram mais sensíveis à RI, sendo que esse fenótipo foi relacionado a deficiência na religação dos DSBs (WACHSBERGER et al. 1999).

Como a RI é capaz de causar alterações não só a nível nuclear, mas também na membrana plasmática e citoplasma da célula, é razoável pensar que outros componentes celulares também possam estar envolvidos na resposta à RI. Nesse contexto, tem-se relacionado a ação de algumas vias de sinalização intracelular com a resposta à RI (KIRSHNER et al. 2006; BEGG et al. 2011). Recentemente, EGFR foi descrito como importante regulador do mecanismo de reparo de DNA, interferindo de forma direta na resistência celular à terapia (DITTMANN et al. 2005b; HUANG et al. 2011b; LICCARDI et al. 2011; CHOU et al. 2014). O tratamento radioterápico de células tumorais leva a ativação e consequente internalização de EGFR, similar à ocorrida após o estímulo com o EGF (*Epidermal growth factor*) (SCHMIDT-ULLRICH et al. 1997). Após o tratamento com radiação, o EGFR é internalizado e forma um complexo com DNA-PK no núcleo, sendo que essa interação aumenta a atividade de DNA-PK e o reparo de DNA (DITTMANN et al. 2005a, 2008). Além disso, a inibição da translocação de EGFR para o núcleo resulta na inativação de DNA-PK, levando a uma diminuição do reparo do dano de DNA, e aumento da resposta à radiação (DITTMANN et al. 2005a e b). Porém, a clara importância da internalização de EGFR para a radioresistência, as proteínas que estão envolvidas nesse

processo, e o mecanismo de tráfego intracelular de EGFR ainda não são bem entendidos.

Além do mecanismo intrínseco de reparo de DNA, existem outros fatores biológicos que podem influenciar na resposta à radioterapia, sendo que a hipóxia, a capacidade das células sobreviventes repopular, o infiltrado de células inflamatórias e células derivadas da medula óssea no tumor, e a vasculatura estão entre os mais importantes (KIM e TANNOCK 2005; NORDSMARK et al. 2005; AHN et al. 2010; KIOI et al. 2010). A resistência à RI mediada por hipóxia é um dos mecanismos melhor descritos. A base molecular para a morte celular causada por RI depende, em parte, do dano ao DNA induzido pelas ROS. Sendo assim, células tumorais em hipóxia, são protegidas da RI pela falta de oxigenação adequada e, consequentemente pela menor produção de ROS (CULLIS et al. 1987; NG et al. 2013).

#### **1.4 MARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA À TERAPIA EM CÂNCER DE RETO**

Atualmente, mesmo com os avanços na terapia e principalmente nos métodos de rastreamento e diagnósticos do câncer, pacientes com adenocarcinoma de reto que recebem tratamento neoadjuvante com radio e quimioterapia só são identificados como respondedores ou não respondedores à terapia após a cirurgia de ressecção retal. Ainda não é possível identificar e separar clinicamente com fidedignidade o grupo de pacientes que teve resposta completa, daqueles que não responderam ao

tratamento ou tiveram apenas resposta parcial à neoadjuvância. A identificação de marcadores preditivos de resposta à terapia neoadjuvante permitiria separar os dois grupos, respondedores e não respondedores, e dessa forma evitar a ressecção cirúrgica e a morbidade desse procedimento nos pacientes onde o tumor respondeu completamente à radioquimioterapia neoadjuvante, além de possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para os pacientes do grupo que não responde à terapia neoadjuvante convencional.

Esforços de diversos grupos de pesquisa têm se voltado para a busca de marcadores preditivos de resposta a radioquimioterapia em câncer retal, produzindo uma grande diversidade de resultados. Esses trabalhos envolvem estudos de larga escala, como genômica, transcriptômica, epigenômica e proteômica, além de avaliações de alvos específicos, principalmente através de imuno-histoquímica (IHQ).

Trabalhos que avaliaram alterações genômicas que possam ter relação com a resposta ou a não resposta à terapia neoadjuvante apresentaram pouca correlação entre si. Perdas, ganhos ou amplificações encontradas em determinada região cromossômica em um estudo, não foram reproduzidas nos demais trabalhos (GRADE et al. 2009; MOLINARI et al. 2011; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al. 2014). Além disso, uma metanálise que revisou 10 estudos publicados nos últimos 5 anos mostrou que existem genes com polimorfismo germinativo com potencial preditor de resposta à terapia neoadjuvante, porém sem nenhum resultado conclusivo e aplicável à prática clínica (PEZZOLO et al. 2015).

Da mesma forma, diversos estudos que avaliaram o transcriptoma de pacientes respondedores e não respondedores foram recentemente publicados. Alguns destes estudos apresentaram resultados interessantes, encontrando pequenos grupos a partir de 3 genes (CHAN et al. 2013), até assinaturas com 812 genes (GANTT et al. 2014) com capacidade de prever a resposta a terapia neoadjuvante em pacientes com câncer de reto, sendo que a sensibilidade e especificidade variou entre os estudos, chegando a 100% para essa assinatura de 812 genes. Por outro lado, alguns trabalhos mostraram que assinaturas genéticas encontradas diferentemente expressas entre pacientes respondedores e não respondedores apresentam baixa especificidade, principalmente quando testadas em coortes independentes (BRETtingham-MOORE et al. 2011; LOPES-RAMOS et al. 2015).

Em relação ao perfil de metilação, dois estudos encontraram genes diferentemente metilados entre os pacientes com RCp e sem RCp, porém, os resultados não tiveram nenhuma correlação entre estes trabalhos (MOLINARI et al. 2013; HA et al. 2015). Em um estudo que avaliou o perfil proteico nos dois grupos de pacientes em questão, através da técnica de espectrometria de massa foram encontradas 5 proteínas com a expressão relacionada a resistência a terapia, e 3 proteínas correlacionadas com a sensibilidade a terapia neoadjuvante (ALLAL et al. 2004).

Além dos estudos usando técnicas de larga escala, uma diversidade de trabalhos buscaram marcadores preditivos de resposta à terapia em câncer retal usando IHQ, sendo que os resultados mais uma vez, não

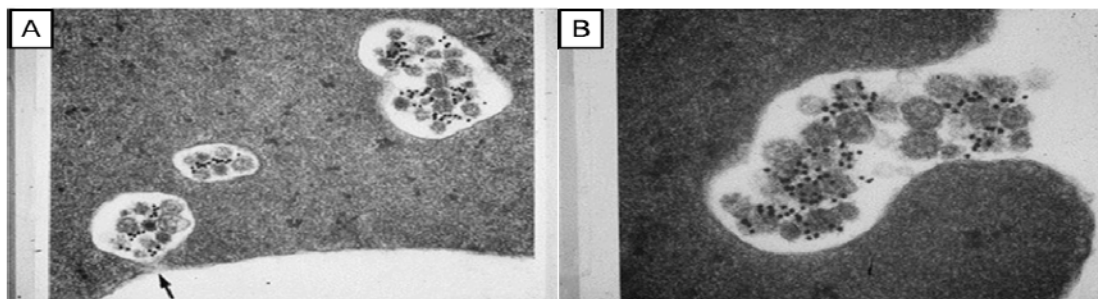
apresentam correlação entre os estudos (GARCÍA-FLÓREZ et al. 2014; HE et al. 2015; SENETTA et al. 2015).

Apesar das técnicas modernas e potentes de detecção de biomarcadores e do grande número de trabalhos publicados tentando fazer a estratificação desses dois grupos de pacientes através de perfis genéticos e proteicos de predição de resposta, até o momento, os potenciais marcadores têm sido mostrados em um número reduzido de trabalhos e com aparentes contradições entre artigos, dessa forma, nenhum biomarcador de resposta à terapia neoadjuvante é usado na prática clínica em pacientes com câncer de reto.

## **1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES E CÂNCER**

As vesículas extracelulares (VEs) - conjunto de partículas liberadas por células e composta de microvesículas e exossomos - derivam de células de diferentes origens em diferentes condições fisiológicas e patológicas e funcionam tanto na sinalização quanto na transferência de moléculas e/ou de frações de membrana (RAPOSO et al. 1996, 1997; ZITVOGEL et al. 1998; THÉRY et al. 1999; VAN NIEL et al. 2001; BLANCHARD et al. 2002; FAURÉ et al. 2006; FEVRIER et al. 2004; OHNO et al. 2013). As VEs podem ser definidas como vesículas membranosas revestidas por uma bicamada lipídica, contendo conjuntos específicos de proteína, lipídios, e ácidos nucleicos (incluindo microRNAs), sendo que o tamanho dos exossomos

varia de 30 e 100nm, enquanto as microvesículas podem chegar a 1µm (Figuras 7 e 8) (GYÖRGY et al. 2011; HENDERSON e AZORSA 2012).

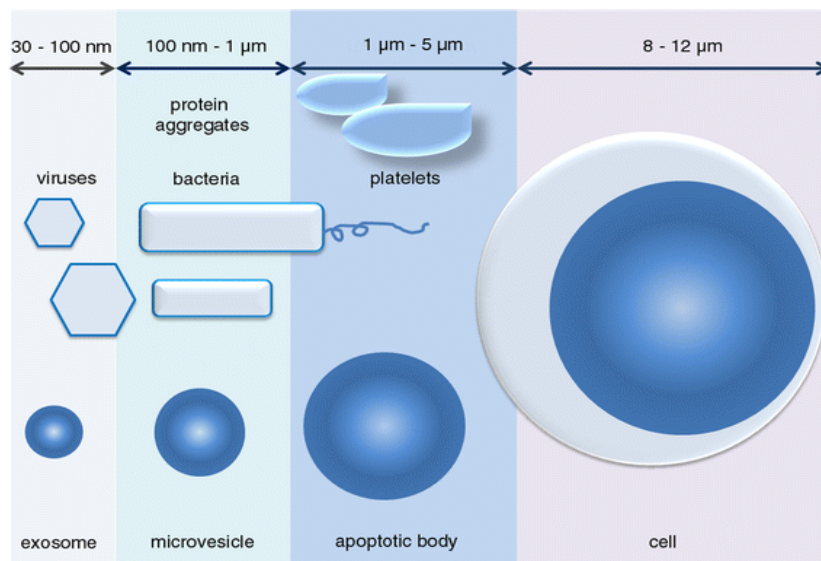


Fonte: JOHNSTONE (1992)

**Figura 7** - Micrografia eletrônica de exossomos em reticulócitos em maturação. **(A)** Marcação por *immunogold* com anticorpo contra receptor de transferrina após 18 horas de incubação o ouro está nos MVBs associado à superfície das vesículas internas. A seta mostra o início da fusão com a membrana plasmática. **(B)** Depois de 36 horas a fusão foi completada e os exossomos liberados.

A biogênese e a secreção de microvesículas e exossomos passam por mecanismos diferentes. As microvesículas surgem do brotamento de protrusões citoplasmáticas diretamente na membrana celular, seguida de sua liberação no espaço extracelular (COCUCCI et al. 2009), dessa forma, a composição de seus marcadores de superfície é inteiramente dependente da composição da membrana de origem (LEE et al. 2012).



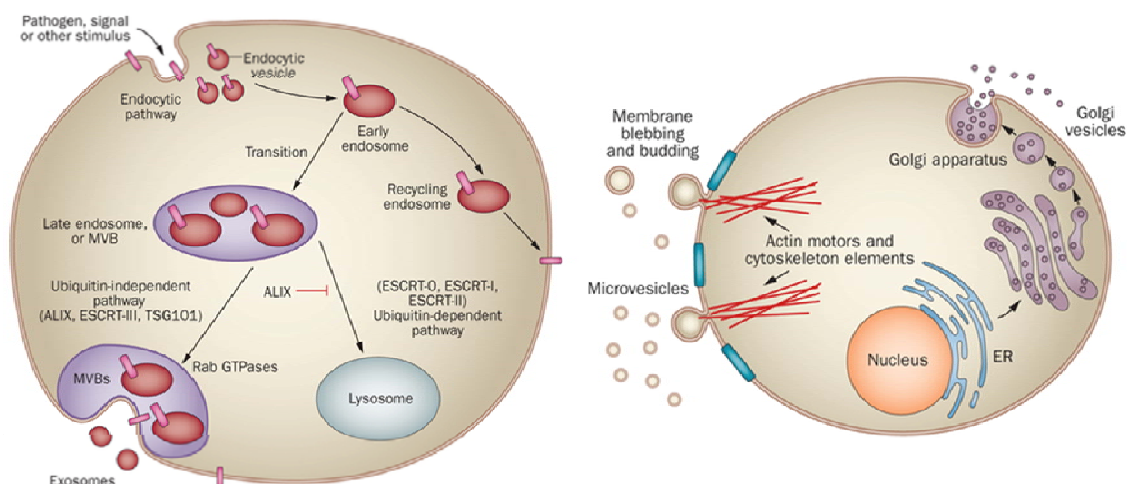


**Fonte:** GYÖRGY et al. (2011)

**Figura 8** - Tamanho médio dos principais tipos de vesículas extracelulares.

Já os exossomos derivam da via de reciclagem endocítica, e passam por um processo mais complexo e não completamente decifrado até o momento. Na endocitose, as vesículas endocíticas são formadas na membrana plasmática e fundem-se para formar os endossomos primários (*early endosomes*). Esses, 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. A partir daí, por sua morfologia esses endossomos passam a chamar-se corpos multivesiculares (MVBs - *Multivesicular bodies*), os quais fundem-se na membrana plasmática para liberar os exossomos no espaço extracelular. Todo o processo de biogênese de exossomos, seleção da carga proteica e secreção envolve o complexo ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), além de uma série de outras proteínas que têm sido descritas nos últimos anos (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) (Figura 9).



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

**Figura 9** - Biogênese de exossomos (esquerda) e microvesículas (direita).

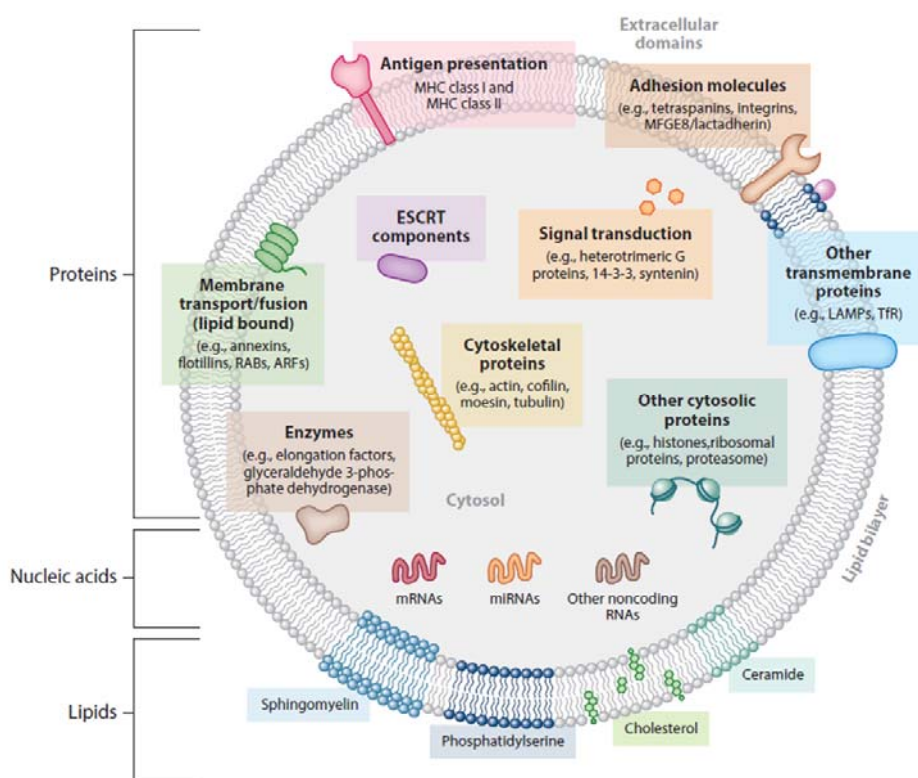
O complexo ESCRT é formado por aproximadamente trinta proteínas, reunidas em 4 complexos (ESCRT-0, -I, -II e -III) com algumas proteínas associadas, entre elas VPS4, VTA1 e ALIX. O complexo ESCRT-0, formado por HRS (*hepatocyte growth factor*), que associado a STAM (*signal transducing adaptor molecule*), Eps15 e Clatrina (os dois últimos não pertencentes ao complexo ESCRT) reconhece e sequestra proteínas transmembrana ubiquitinadas presentes na membrana endossomal (DE GASSART et al. 2003; HURLEY 2008; NICKEL e RABOUILLE 2008; BAIETTI et al. 2012). Além disso, HRS recruta TSG101, proteína do complexo ESCRT-I. Os complexos ESCRT-I e II são responsáveis pela

deformação da membrana em “brotos” menores, com cargo proteico selecionado. O ESCRT-I também está envolvido no recrutamento do ESCRT-III, via ESCRT-II ou ALIX. Na sequência os componentes do ESCRT-III conduzem a cisão das vesículas. No fim do processo, a dissociação e reciclagem do maquinaria ESCRT requer interação com VPS4 (HANSON e CASHIKAR 2012). Apesar de serem descritos como fundamentais na biogênese de exossomos, algumas evidências mostram que ocorre a formação de MVBs e ILVs mesmo sem o funcionamento dos ESCRTs (STUFFERS et al. 2009; THEOS et al. 2006; EDGAR et al. 2014), sugerindo que os MVBs e suas ILVs podem ser formadas de duas maneiras: dependente e independente dos ESCRTs, certamente dependendo do carregamento que é selecionado dentro de uma determinada célula (CARAYON et al. 2011). A seleção de proteínas está também associada a domínios lipídicos da membrana exossomal, onde a ceramida desempenha um papel importante no surgimento de exossomos nos MVBs (TRAJKOVIC et al. 2008). O processo de fusão dos MVBs com a membrana plasmática para liberação dos exossomos para o espaço extracelular é dependente da atividade de Rab27A e Rab27B GTPases, duas proteínas da família Rab (OSTROWSKI et al. 2010).

Rab GTPases (*Ras-related in brain*), pertencem a superfamília Ras de pequenas GTPases. A família Rab é composta por mais de 60 proteínas, muitas das quais são essenciais na regulação do transporte intracelular das vesículas, estando envolvidas desde o brotamento, mobilidade através da interação com o citoesqueleto, até a fusão das vesículas à membrana

(STENMARK e OLKKONEN 2001). A primeira proteína da família Rab descrita como importante na secreção de VEs foi Rab11, onde através de sua inibição, observou-se a diminuição da secreção de exossomos (SAVINA et al. 2002). Estudos subsequentes mostraram a importância de Rab27B e Rab27A (HSU et al. 2010; OSTROWSKI et al. 2010), Rab35 (FRÜHBEIS et al. 2013), Rab7 (BAIETTI et al. 2012), além de Rab2B, Rab5A e Rab9A na secreção de VEs (OSTROWSKI et al. 2010).

Exossomos, em sua composição, são abundantes em proteínas envolvidas em transporte celular e fusão de membranas (flotilinas e anexinas), em proteínas componentes da biogênese dos MVBs (Tsg101 e Alix), em integrinas e tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, e CD82), em proteínas de choque térmico (Hsp70 e Hsp90), em proteínas modificadoras pós-translacional (cinases, fosfatases, e glicosiltransferases), e em lipídios, colesterol, esfingolipídios e ceramidas (MATHIVANAN et al. 2012) (Figura 10). Além disso, recentemente foi descrita a presença de DNA dupla fita dentro de VEs, sugerindo que o mesmo pode ser usado com biomarcador para a detecção de tumores e suas mutações (THAKUR et al. 2014). Existem algumas proteínas que são conhecidamente marcadores de exossomos, como chaperonas, tetraspaninas, moléculas de adesão, Rabs, componentes do citoesqueleto, enzimas metabólicas e a proteína príon celular (PrP<sup>C</sup>) (FÉVRIER e RAPOSO 2004; VELLA et al. 2007; ALAIS et al. 2008; SIMONS e RAPOSO 2009).



**Fonte:** COLOMBO et al. (2014)

**Figura 10** - Conteúdo das vesículas extracelulares.

Tem sido demonstrado extensivamente que uma das principais funções da VEs é a comunicação celular, seja ela autócrina ou parácrina. A interação das VEs com receptores de membrana de células alvo pode modular sinais intracelulares nessas células. Além disso, moléculas intravesiculares, como miRNAs, podem ser transferidos para células alvo e modular seu conteúdo proteico, 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).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que as VEs derivadas de células tumorais (VECTs), contribuem na progressão, invasão e

disseminação do câncer, sendo fundamentais na organização do nicho pré-metastático (CASTELLANA et al. 2009; JUNG et al. 2009; PEINADO et al. 2011; WOLFERS et al. 2001; HOOD et al. 2011). Todos esses efeitos desencadeados pelas VECTs se dão através da modulação nas células alvo de sinais envolvidos em processos de adesão celular, proliferação, sobrevivência, invasão, 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; GHOSH et al. 2010; GRANER et al. 2009; HOOD et al. 2009; RISTORCELLI et al. 2009; MCCREADY et al. 2010; SHELDON et al. 2010; ANTONYAK et al. 2011; PEINADO et al. 2012). Uma série de estudos tem demonstrado detalhadamente os mecanismos de ação das VECTs e seus principais alvos: VECTs derivadas de tumores de ovário e mama modulam a interação entre superfície celular e componentes da matriz extracelular (DOLO et al. 1999; KOUMANGOYE et al. 2011); em glioblastoma e câncer gástrico atuam como fatores de sinalização que aumentam a proliferação de forma autócrina e parácrina (SKOG et al. 2008; QU et al. 2009); VECTs também exercem diversos efeitos diretos e indiretos na sobrevivência de células B na leucemia linfocítica crônica através da modulação de VEGF (GHOSH et al. 2010); outra propriedade das VECTs é a de atuar como carregadores de oncoproteínas entre células, podendo aumentar a sinalização mediada por estas proteínas (AL-NEDAWI et al. 2008; ADAMCZYK et al. 2011; PEINADO et al. 2012). Evidências mostram a relação do câncer com o metabolismo bioenergético, onde células tumorais,

principalmente em situações de hipóxia, mudam seu metabolismo para prover energia (BAYLEY e DEVILLE 2012). Dentro desse contexto, estudos mostraram que a hipóxia é responsável por um grande aumento na secreção de VECTs, o que contribui para a progressão tumoral (GUTWEIN et al. 2005; PARK et al. 2010). Mais recentemente foi demonstrado que VEs derivadas de células de adenocarcinoma ductal de pâncreas carregam a proteína MIF até o fígado, a qual é responsável pelo preparo do nicho pré-metastático nesse órgão (COSTA-SILVA et al. 2015); e que VEs contendo miRNA-105 destroem o endotélio vascular promovendo a formação da metástase (ZHOU et al. 2014). Além disso, tem sido mostrado que as VEs têm um papel importante na resistência à terapia anticâncer (PILZER et al. 2005; KHAN et al. 2009; AZMI et al. 2013). Em relação a radioterapia, foi demonstrado que células irradiadas podem induzir respostas biológicas em células não irradiadas, sem qualquer contato celular direto, através de um mecanismo chamado de “Efeito *Bystander*” (HEI et al. 2011). Em seguida, um trabalho mostrou que as VEs podem ser as responsáveis pelo efeito *bystander* causado pelas células irradiadas nas células não irradiadas (AL-MAYAH et al. 2015). Além disso, VEs derivadas de células estromais podem regular a resistência à terapia em células de câncer de mama através do estímulo de vias de sinalização antivirais (BOELEN et al. 2014). Por outro lado, VECTs também podem induzir imunidade tumoral específica, revertendo o desenvolvimento tumoral, o que representa um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de vacinas antitumorais (CASTELLANA et al. 2009).

Com base no conceito de que as VEs possuem uma “assinatura molecular” de suas células de origem, o mapeamento sistemático das proteínas, lipídios, e ácidos nucleicos das VECTs poderá oferecer um caminho para a identificação de biomarcadores específicos para certos tumores e suas metástases, além de conter moléculas que representam potenciais alvos terapêuticos.

Em relação ao câncer de reto, não há estudos que identifiquem marcadores de VEs originadas desse tipo tumoral e o papel das mesmas na tumorigênese. Já em câncer colorretal, um trabalho recente usando linhagens celulares, mostrou que as VEs secretadas continham mRNAs, miRNAs e “*natural antisense RNAs*” que puderam ser transferidos para células de hepatoma e câncer de pulmão, indicando desta forma, a troca de RNA entre células de diferentes origens e regulação da expressão gênica nas células alvo (CHIBA et al. 2012). VEs derivadas de cânceres de mama e CCR contêm anfirregulina, um ligante de HER1/EGFR, em suas superfícies, sendo que essas VEs atuam de forma autócrina, ligando-se às células que as secretam, aumentando sua capacidade invasiva e contribuindo para a formação de nichos metastáticos (HIGGINBOTHAM et al. 2011). Também mostrou-se que VEs derivadas de células de tumores colorretais foram capazes de iniciar processo de angiogênese por estimularem o crescimento de células endoteliais (HONG et al. 2009). Um estudo que avaliou o número de VEs contidas no plasma de 91 pacientes com CCR, concluiu que nesses pacientes o número de VEs é estatisticamente mais alto que em indivíduos saudáveis (SILVA et al. 2012). Estudos de proteômica mostraram que VEs



provenientes de pacientes com CCR contêm grande quantidade de proteínas, mas não estabeleceram relação com estágio da doença ou prognóstico de tais pacientes (CHOI et al. 2007; MATHIVANAN et al. 2010).

Na tentativa de encontrar marcadores tecido-específicos para VEs secretadas por células de CCR, usou-se A33, proteína expressa exclusivamente no trato gastrointestinal e presente em 95% dos tumores colorretais, para capturar tais vesículas, sendo possível obter exossomos secretados por células de CCR altamente purificados (MATHIVANAN et al. 2010). Porém, até o presente momento, as VEs secretadas especificamente por tumores de reto não foram caracterizadas, e seu papel na tumorigênese e resistência celular tumoral à terapia segue inexplorado.

Diante da baixa taxa de resposta completa à terapia neoadjuvante dos pacientes com adenocarcinoma de reto, da falta de marcadores preditivos de resposta à terapia que possam estratificar os pacientes em grupos de respondedores e não respondedores, da insipiente compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência celular tumoral à terapia anticâncer, e do emergente e importante papel atribuído às VEs no câncer, estabelecemos abordagens experimentais que possam contribuir no tratamento dos pacientes portadores de tumores do reto.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar marcadores e mecanismos celulares de resistência à terapia neoadjuvante em adenocarcinoma de reto e o papel das VEs nesse processo.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Identificar possíveis proteínas envolvidas no processo de resistência à terapia neoadjuvante através do estudo proteômico de biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto;
- 2 Analisar mecanismos envolvidos na resistência à radioquimioterapia neoadjuvante;
- 3 Encontrar potenciais marcadores preditivos de resposta à terapia neoadjuvante nesses tumores;
- 4 Gerar modelo celular de adenocarcinoma de reto resistente à RI e analisar o papel das VEs secretadas por estas células na resistência ao tratamento radioterápico;
- 5 Identificar componentes vesiculares (proteínas) com potencial papel na resistência à terapia anticâncer.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PACIENTES E AMOSTRAS TECIDUAIS

A coorte de pacientes usada neste trabalho foi estabelecida retrospectiva e prospectivamente, baseada nos registros de dados do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo-SP, Brasil, e dos pacientes admitidos pelo serviço de Cirurgia Pélvica depois do projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (nº Aprovação no CEP nº 243.157 (**Anexo 1**)). Foram selecionados pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de reto, estádios II e III, tratados entre 2007 e 2015, que receberam tratamento neoadjuvante padrão da Instituição (5-6 semanas de radioterapia, totalizando uma dose de 45-50,4 Gy, com administração concomitante de quimioterapia baseada em 5-fluorouracil (5-FU) + Leucovorin, operados depois de 6 a 12 semanas). Ainda como critério de seleção, o paciente deveria ter tecido congelado disponível no Biobanco (biópsia e/ou tumor residual pós-ressecção cirúrgica), e ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**). Foram selecionados 26 pacientes, dos quais 21 foram classificados pelo Departamento de Anatomia Patológica da Instituição como SEM RCp, enquanto 5 foram classificados como COM RCp ao tratamento neoadjuvante (**Tabela 1**). O critério utilizado para classificação dos pacientes em RCp foi a ausência de célula tumoral viável na peça cirúrgica ressecada após o

tratamento neoadjuvante. Já os pacientes sem RCp apresentaram células tumorais viáveis na peça cirúrgica, sendo que a resposta parcial foi apresentada em porcentagem de células tumorais viáveis por área avaliada, a qual variou de 2 a 70% (Tabela 1). Todos os tecidos usados nesse trabalho foram revisados por um patologista com experiência, o qual realizou a separação do tecido tumoral do tecido não tumoral.

**Tabela 1** - Características demográficas e clínicas dos pacientes

Paciente	Idade	Gênero	Estádio	Tratamento neoadjuvante	Resposta	% CTV*
1	62	F	II	Rt + Qt	Tumor residual	50%
2	56	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	-
3	56	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	50%
4	36	M	II	Rt + Qt	Tumor residual	3%
5	52	M	II	Rt + Qt	Tumor residual	55%
6	61	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	10%
7	48	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	10%
8	79	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	21%
9	65	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	30%
10	39	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	5%
11	26	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	2%
12	58	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	50%
13	39	F	II	Rt + Qt	Tumor residual	5%
14	52	M	II	Rt + Qt	Tumor residual	5%
15	75	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	-
16	38	M	II	Rt + Qt	Tumor residual	40%
17	38	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	70%
18	55	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	60%
19	69	M	III	Rt + Qt	Tumor residual	50%
20	52	F	II	Rt + Qt	Tumor residual	40%
21	70	F	III	Rt + Qt	Tumor residual	70%
22	58	M	II	Rt + Qt	RP completa	0
23	71	M	III	Rt + Qt	RP completa	0
24	65	M	III	Rt + Qt	RP completa	0
25	52	M	III	Rt + Qt	RP completa	0
26	73	M	II	Rt + Qt	RP completa	0

\* Células tumorais viáveis na peça cirúrgica

### 3.2 LINHAGEM CELULAR

Para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro* deste projeto, foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma de reto SW837 (ATCC<sup>®</sup> CCL-235<sup>™</sup>). As células da linhagem SW837 possuem mutação C→T no códon 248 do gene p53, resultando na substituição Arg→Trp. Para alguns experimentos em específico foi utilizada a linhagem celular SW1463 (ATCC<sup>®</sup> CCL-234<sup>™</sup>) também de adenocarcinoma de reto. Ambas linhagens foram adquiridas junto ao centro de recursos biológicos ATCC<sup>®</sup> (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em meio de cultura Leibovitz's L-15 (Gibco<sup>®</sup> - Life Technologies - nº de catálogo: 41300-039), 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 40ug/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<sup>®</sup> 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). As células cultivadas com meio Leibovitz eram mantidas em garrafas fechadas, seguindo orientações do fabricante de não adicionar CO<sub>2</sub> ao meio. As células eram repicadas sempre que a confluência ultrapassava 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 + EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (0,2g de EDTA para 1L de

PBS 1x) para lavar as células, e tripsina 0,2% (fornecida pronta pelo Instituto Adolfo Lutz) para desprender as células da garrafa.

### **3.3 IRRADIAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR SW837**

As células SW837 foram carenciadas (cultivadas sem SFB 10%), durante 24 horas com o objetivo de sincronizar o ciclo celular das mesmas. Após esse período foi adicionado 10% de SFB e as células mantidas em cultura. Após 20 horas as células foram contadas e passadas para tubos eppendorf 0,7mL, os quais foram posicionados dentro de tubos Falcon de 15mL preenchidos com água estéril. As células foram irradiadas usando o equipamento Clinac® iX *linear accelerator* (Varian). Uma caixa acrílica de 30x30x30 preenchida com água usada para testes dosimétricos foi usada, sendo que as células foram posicionadas a 5 cm de profundidade. Foi usada energia de 6MV, com campo de 15cm x 15cm. A técnica utilizada foi a isométrica, com taxa de dose de 400MU/min. As células SW837 foram submetidas a 3 ciclos sequenciais de radiação ionizante (RI), com um intervalo de 1 semana entre os ciclos. A dose calculada para o isocentro foi de 4Gy, 6Gy e 8Gy, para os ciclos 1, 2 e 3 respectivamente. Imediatamente após a RI,  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 35mm (Corning® - nº de catálogo: 430165) e contadas após 6 dias, enquanto as demais células foram mantidas em cultura em garrafas de 75cm<sup>2</sup> por uma semana, quando o processo foi repetido para o segundo ciclo e depois para o terceiro ciclo de RI. As células que sobreviveram aos 3 ciclos de irradiação foram mantidas

em cultura (e algumas alíquotas congeladas em nitrogênio) como células IR-SW837 (Ionizing Radiation-SW837).

Após a geração de células resistentes, e confirmação dessa resistência, nos experimentos subsequentes as células foram irradiadas estando aderidas nas próprias placas de cultura. O equipamento e os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos acima, gerando a mesma dose descrita para o isocentro. Porém, no lugar do recipiente de acrílico com água, foi utilizado placas de água de 30cm x30cm e 5cm de espessura, posicionadas embaixo e em cima da placa onde estavam as células.

### **3.4 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), e quando foram avaliadas proteínas fosforiladas, também foi adicionado o inibidor de fosfatase (20x) - (Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail - Thermo Scientific™ - nº de catálogo: 78428).

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

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em  $200\mu\text{L}$  do corante (Protein Assay Dye Reagent Concentrate - nº de catálogo:500-0006 - Bio-Rad®) diluído 1:4. Cada amostra foi quantificada em triplicata, sendo utilizado  $1\mu\text{L}$  de cada amostra por poço. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 595nm no equipamento iMark™ *Microplate Reader* (Bio-Rad®). Os dados foram transferidos para uma planilha do programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft®) para determinar a quantidade de proteína de cada amostra. Após quantificação, as amostras foram preparadas com tampão redutor 4x ( $2,46\text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ,  $2,5\text{mL}$  de Tris-HCl 1M pH 6,8,  $10\text{mL}$  de SDS [*sodium dodecyl sulfate*] 10%,  $4,6\text{mL}$  de glicerol,  $40\mu\text{L}$  de EDTA 0,5M pH 8,5,  $1\text{mL}$  de  $\beta$ -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%:  $3,6\text{mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $3\text{mL}$  de *lower buffer* [Tris 181,5g, SDS 4g, pH 8,8 acertado com HCl ou NaOH],  $2,4\text{mL}$  de acrilamida 30% [300g acrilamida, 8,2g NN Metileno, 1L  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ],  $50\mu\text{L}$  de APS 10% [*Ammonium persulfate*][5g APS em  $50\text{mL}$   $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ], e  $25\mu\text{L}$  de Temed [N, N, N',N'-Tetrametiletenodiamina - nº de catálogo: T9281 - Sigma]; gel 10%:  $3\text{mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $3\text{mL}$  de *lower buffer*,  $3\text{mL}$  de acrilamida,  $50\mu\text{L}$  de APS, e  $25\mu\text{L}$  de Temed; e gel 14%:  $1,8\text{mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $3\text{mL}$  de *lower buffer*,  $4,2\text{mL}$  de acrilamida,  $50\mu\text{L}$  de APS, e  $25\mu\text{L}$  de Temed). O gel *stacking* contém  $3\text{mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $1,25\text{mL}$  de *upper buffer* (Tris 60,5g, SDS 4g, pH 6,8 acertado com HCl ou NaOH),  $625\mu\text{L}$  de acrilamida,  $25\mu\text{L}$  de APS e  $10\mu\text{L}$  de Temed). O tampão utilizado para a eletroforese foi o *running buffer* 1x (Diluir o Stock 10x em  $\text{H}_2\text{O}$  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 3µL de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #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 nitrocelulose 0,45µm (*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-Ku70 + Ku80 - *Rabbit Polyclonal* [ab53126 - ABCAM®], na concentração de 1:1000; anti-Rab5C - *Rabbit Polyclonal* [ab137919 - ABCAM®], na concentração de 1:500; anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) - *Rabbit Polyclonal* [#9102 - Cell Signaling®], na concentração de 1:1000; anti-α-Tubulin - *Mouse Monoclonal* [clone B-5-1-2 - Sigma-Aldrich®], na concentração de 1:10.000; anti-Flotillin 1 - *Rabbit Polyclonal* [AB9292 - Chemicon®], na concentração de 1:500; anti-EGF Receptor antibody (D38B1) XT® - *Rabbit Monoclonal* - [#4267 - Cell Signaling®], na concentração de 1:1000; anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) - *Rabbit Polyclonal* [#9101 - Cell Signaling®] na concentração de 1:1000; anti-GPA33 (EPR4240) - *Rabbit Monoclonal* [ab108938 - ABCAM®], na concentração de 1:1000; anti-Rab7 (D95F2) - *Rabbit Monoclonal* [#9367 - Cell Signaling®], na concentração de 1:1000; anti-Tsg101 (4A10) - *Mouse Monoclonal* [ab83 - ABCAM®], na concentração

de 1:1000; anti-VPS4 - *Rabbit Polyclonal* [SAB4200025 - Sigma<sup>®</sup>], na concentração de 1:1000; anti-VPS36 - *Rabbit Polyclonal* [ab76331 - ABCAM<sup>®</sup>], na concentração de 1:1000; anti-Rab27A (1G7) - *Mouse Monoclonal* [H00005873-M02 - ABNova<sup>®</sup>], na concentração de 1:1000; anti-Rab27B - *Rabbit Polyclonal* [HPA019849 - Sigma<sup>®</sup>], na concentração de 1:1000; anti-c-Myc (N-262) - *Rabbit Polyclonal* - (sc764 - *Sant Cruz*) na concentração de 1:500; e anti-*Transferrin Receptor* - *Mouse mAb* - (13-6800 - *Zymed*) na concentração de 1:1000. Os anticorpos foram diluídos em leite (Molico<sup>®</sup>) 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<sup>™</sup> 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).

### 3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

*Fosfo-Histona H2A.X:* Células SW837 não-irradiadas e células SW837 imediatamente após sofrer RI com dose de 6Gy foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas de 12mm (100) (Warner Instruments - CS-12R - nº de catálogo: 64-0702) posicionadas dentro de uma placa 24-wells (Corning® - nº de catálogo: 3527). Foram plaqueadas  $4 \cdot 10^4$  células por poço. Após 24 horas as células foram fixadas com paraformaldeído 4% livre de metanol (PFA - 16% Ultrapure EM Grade, metanol free - Polysciences, Inc - nº de catálogo: 18814) por 20 minutos à temperatura ambiente (TA), lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma-Aldrich® - nº de catálogo: T8787) durante 5 minutos, e bloqueadas com PBS-BSA 5% por 1 hora em TA. As células foram incubadas com o anticorpo anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) - Rabbit mAb - AlexaFluor® 647 conjugate (#9720 - Cell Signalling), diluído 1:100 em PBS-BSA 0.5%, *overnight* à 4°C. Após 3 passos de lavagem com PBS, de 5 minutos cada, as lamínulas foram montadas em lâminas (*Microscope Slides* - Bioslide - nº de catálogo: 217105-1) usando o reagente Fluor-Save (Calbiochem® - nº de catálogo: 345789).

*Localização celular do receptor de EGF:* Células SW837 e/ou IR-SW837 foram plaqueadas em lamínulas de vidro posicionadas dentro de uma placa 24-wells. Foram plaqueadas  $8 \cdot 10^4$  células por poço. Quando as células alcançaram a confluência de 70-80%, as mesmas foram irradiadas com dose única de 6Gy. As células irradiadas foram fixadas nos tempos de

0, 10, 20 e 40 minutos após a RI com PFA livre de metanol a 4% por 20 minutos, em TA. Uma lamínula com células SW837 não-irradiada foi fixada no mesmo momento das demais amostras, conforme descrito acima. As células foram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,5%, e bloqueadas com PBS-BSA 5% por 1 hora em TA. As células foram incubadas com anticorpo anti-EGF Receptor (D38B1) XT<sup>®</sup> - Rabbit mAb - (#4267 - Cell Signaling), diluído 1:50 em PBS-BSA 0.5%, *overnight* à 4°C. Após 3 passos de lavagem com PBS as células foram incubadas com o anticorpo secundário Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 *conjugate*, diluído 1:1000, e DRAQ5<sup>®</sup> (#4084 - Cell Signaling) diluído 1:500, ambos diluídos em PBS-BSA 0.5%, e incubados por 1 hora à TA. Após 3 passos de lavagem com PBS de 5 minutos cada, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio usando o reagente Fluor-Save.

Também foi realizada a imunofluorescência (IF) para localização celular de EGFR em células tratadas com anti-EGFR, seguindo o protocolo a seguir: Foram plaqueadas 80.000 células SW837 em lamínulas dispostas em placas de 24 poços. Após aderir e confluir, em metade das lamínulas as células foram tratadas com 5µg/mL de anti-EGFR Cetuximab durante 4 horas. Após esse tempo as células tratadas e não tratadas com Cetuximab foram irradiadas com dose de 6Gy e fixadas imediatamente ou após 30 minutos. O protocolo de IF seguiu o descrito acima para EGFR.

*Rab5C*: Para a avaliação da expressão de Rab5C por IF foi seguido o protocolo já descrito acima. O anticorpo primário utilizado foi o anti-Rab5C antibody [ab137919 - ABCAM<sup>®</sup>] na diluição de 1:100, incubado *overnight* à

4°C. O anticorpo secundário usado foi o anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor® 546 *conjugate*, diluído 1:1000, além de DRAQ5® (#4084 - Cell Signaling) diluído 1:500. A quantificação foi realizada no programa ImageJ delimitando e mensurando a fluorescência individual de no mínimo 30 células. O cálculo da intensidade foi realizado com base no índice *Corrected Total Cell Fluorescence* (CTCF), usando a seguinte fórmula:

$$\text{CTCF} = \text{Integrated Density} - (\text{area of selected all} \times \text{mean of background reading})$$

Todas as imagens de fluorescência foram adquiridas no microscópio confocal TCS SP5 da marca Leica. As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### 3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica foi realizada em cortes de tecido parafinado, e fixados na formalina com 4 µm de espessura. As lâminas foram identificadas com código de barras e processadas usando o equipamento de IHQ automatizado Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA). Os tecidos foram desparafinizados na solução EZ-PREP (Ventana Medical Systems - nº de catálogo: 950-102) e submetidos a recuperação antigênica usando a solução CC1 (*Cell conditioning 1* - Ventana Medical Systems - nº de catálogo: 950-124), com pH alto, a 96°C. A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos usando o inibidor de Diaminobenzidina (DAB - 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *ultraview universal dab detection kit* - Ventana Medical Systems - nº de catálogo: 760-500), seguido por uma etapa

de lavagem com *wash-buffer* (*Sodium Chloride Sodium Citrate buffer solution* [SSC 10x] - Ventana Medical Systems - nº de catálogo: 950-110). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-Ku70 + Ku80 *antibody* [ab53126 - ABCAM®] na diluição de 1:1000; anti-Rab5C *antibody* [ab137919 - ABCAM®] na diluição de 1:100; anti-Flotillin *antibody* [AB9292 - Millipore®] na diluição de 1:250; e anti-GPA33 *antibody* [ab108938 - ABCAM®] na diluição de 1:500) por 30 minutos. Então as lâminas foram incubadas com HRP Multimer (ultraview universal dab detection kit), e lavadas. Após a incubação com DAB (*ultraview universal dab detection kit*), as lâminas foram lavadas e contracoradas com Hematoxylin II (*ultraview universal dab detection kit*). Por fim as lâminas foram novamente lavadas com *wash-buffer* seguido de água + detergente para remover o LCS (*Liquid CoverSlip* - Ventana Medical Systems - nº de catálogo: 650-010), e água corrente destilada. As lâminas foram desidratadas com etanol, xilenol e montadas com o método *coverslipper* Tissue-Tek® film (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan).

As lâminas foram escaneadas no equipamento Aperio ScanScope® slide scanner e as imagens extraídas usando o programa ImageScope (v10.2.2.2317). A análise foi feita por um patologista, classificando os casos de acordo com positividade, intensidade e localização da marcação.

### 3.7 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Células SW837 e/ou IR-SW837 quando confluentes foram lavadas três vezes com PBS e cultivadas por 48 horas em meio sem SFB. O meio condicionado total (MCT) foi coletado, mantido em gelo e pré-centrifugado 3 vezes para remoção de restos celulares (300x g por 10 minutos, 2.000x g por 10 minutos e 10.000x g por 30 minutos, a 4°C) (Centrifuge 5804R - Eppendorf®). A obtenção das VEs se deu por ultracentrifugação a 100.000x g por 2 horas com o rotor SW28, a 4°C (Optima XE-90 Ultracentrifuge - Beckman-Coulter). O pellet foi ressuspensionado em PBS filtrado e estéril para ser lavado, e na sequência centrifugado novamente a 100.000x g por 2 horas, a 4°C (THÉRY et al. 2006).

Para avaliar a concentração e o tamanho das partículas isoladas, o pellet de VEs foi ressuspensionado em 1 mL 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, usando os seguintes parâmetros: *shutter* de 604, *gain* de 100, *threshold* de 10 e *camera level* de 13.

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.

### 3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As VEs isoladas como descrito previamente foram fixadas em 50µl de PFA livre de metanol a 2%. Cinco µl do pellet ressuspensionado foram depositados nas telas Formvar Carbon Film (FCF200H-Cu - Electron Microscopy Sciences), cobertas e deixado a membrana absorver por 20 minutos em um ambiente seco. Foram colocadas gotas de PBS de 100µl em pedaços de parafilme. As telas foram transferidas para as gotas de PBS com pinça para serem lavadas. Depois, as telas foram transferidas para gotas de 50µl de glutaraldeído a 1% por 5 minutos. Então as telas foram transferidas para gotas de água destilada de 100µl e mantidas por 2 minutos. Esse processo foi repetido até chegar a um total de 8 lavagens. Com o objetivo de contrastar as amostras, as telas foram transferidas para gotas de 50µl de solução de oxalato de urânio, pH 7, por 5 minutos, e então transferidas para uma gota de 50µl de *methyl cellulose-UA* por 10 minutos em gelo para fixar. As telas foram removidas com loops de aço e removido o excesso de fluido movendo suavemente os loops lateralmente em papel filtro nº.1 Whatman, de modo que uma fina película é deixada no lado da tela que contém as VEs. As telas foram secas por 5 a 10 minutos ainda no loop e então observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900), a 80 kV (THÉRY et al. 2006).



### 3.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar morte celular por citometria de fluxo, as células SW837 e IR-SW837 foram tratadas com 10 $\mu$ M de 5-FU por 48 horas. Após contagem, 5x10<sup>5</sup> células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de Binding Buffer 1x (Binding buffer 10x: 0,1 M Hepes [pH 7,4], 1,4 M de NaCl, e 25mM de CaCl<sub>2</sub>; sendo para 20mL: 10mL de Hepes [stock 200mM], 1,63g NaCl [stock 58,44 g/mol], 55,49mg de CaCl<sub>2</sub> [stock 110,98g/mol], e 10mL de água destilada). Foi então adicionado AnexinaV (marcador de apoptose) 1:100 e Iodeto de Propídeo (*PI- propidium iodide*, marcador de morte celular) 1:400 e incubado por 15 minutos. Adicionado mais 300 $\mu$ L de 1x Binding Buffer. Depois de filtrado com filtro de 100 $\mu$ M a porcentagem de células viáveis, em apoptose e mortas em cada uma das amostras foi analisada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II equipado com um sistema de lasers do tipo 4-2-2 e as análises realizadas utilizando o programa BD FACSDiva™ software.

### 3.10 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise proteômica foi realizada por espectrometria de massa, no Instituto LNBio de Campinas-SP, Brasil, sob coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Leme, através de um projeto de colaboração institucional entre o AC Camargo Cancer Center e aquela Instituição. Foram realizadas análises de tecido fresco congelado (biópsia e peça cirúrgica) dos pacientes descritos acima. O material estava armazenado no banco de tumores

(Biobanco) em freezers -140°C. Os tecidos foram homogeneizados com um mini homogeneizador com ponteira adaptável para tubos eppendorf 1,5mL (Dremel®), em tampão STM(HAN et al. 2011) (0,25M de *sucrose*, 10mM Tris-HCL, e 1mM de MgCl<sub>2</sub>) com adição de inibidor de protease. Quando foi analisado o conteúdo proteico total, após homogeneização e centrifugação de 20 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi coletado. Quando foi realizada o enriquecimento de proteínas de membrana, foi seguido o protocolo descrito por Han et al, 2011 (HAN et al. 2011): Adicionar tampão STM 5mL/g de tecido com inibidor de protease; homogeneizar o tecido; centrifugar 5 min, 260x g, a 4°C para remover restos celulares e o núcleo; centrifugar o sobrenadante a 1500x g, por 10 min, a 4°C para peletar proteínas de membrana; adicionar ao pellet 2/3 do volume de STM usado inicialmente e centrifugar a 16.000x g, por 1 hora, a 4°C; lavar o pellet com 1mL de 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> overnight a 4°C; recoletar o pellet centrifugando a 16.000x g, por 1 hora, a 4°C. A membrana purificada foi ressuspensa em 50uL de ácido fórmico 90%. Inicialmente foi realizado um experimento que comparou o perfil de expressão proteica entre biópsia pré-tratamento neoadjuvante com o tumor residual da peça cirúrgica pós-tratamento neoadjuvante em pacientes sem RCp; na sequência foi analisado o perfil de expressão proteica de 5 pacientes com RCp comparando com 15 pacientes sem RCp; além disso foi realizado análise proteômica de VEs de células SW837 comparando com a expressão proteica de VEs de células IR-SW837. As VEs foram isoladas conforme protocolo descrito acima, acrescentado mais um ciclo de lavagem e ultracentrifugação. O pellet seco

de VEs foi congelado no freezer -80°C antes de ser enviado ao LNBio em gelo seco. Foram realizados 3 experimentos independentes com células em diferentes passagens.

A espectrometria de massa foi realizada seguindo o seguinte protocolo:

As amostras ressuspensas em ácido fórmico foram totalmente secas em *speed vac* (Thermo Scientific) e ressuspensas em 20 µL de bicarbonato de amônio a 100 mM. O pH foi verificado e o valor foi de aproximadamente 7,0. A dosagem de proteínas totais das amostras foi determinada pelo método de BCA utilizando-se reativo BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) com leitura em comprimento de onda de 595 nm. Para a digestão das amostras foram utilizados 4 µg de proteínas totais de cada amostra, adicionou-se em todas as amostras ureia em concentração final de 4M e seguiu-se com o protocolo de digestão de proteínas do Laboratório de Espectrometria de Massas (<http://lnbio.cnpem.br/massspectrometry/main/sample-preparation/>). As amostras foram dessalinizadas em coluna C18 e, em seguida, secas em evaporador.

Nanoflow nLC-MS/MS: Uma alíquota contendo 1,6 µg de proteínas foi analisada no espectrômetro de massa *LTQ Velos Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific), acoplado com cromatografia líquida (LC-MS/MS) instrumento da *EASY-nLC system* (Proxeon Biosystem) com uma fonte de íons *nanoelectrospray* Proxeon. Peptídeos foram separados com um gradiente de acetonitrila (2-90%) contendo 0,1% de ácido fórmico em uma coluna

analítica PicoFrit Column (20 cm x ID75  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, New Objective) em fluxo de 300 nL/min durante 212 minutos. A voltagem do *nanoelectrospray* foi ajustada em 2,2 kV e a temperatura em 275°C. Todos os métodos e instrumentos foram estabelecidos em um modo de aquisição de data dependente. Todas as análises foram realizadas em Full scan ( $m/z$  300–1600), e adquiridas no analisador Orbitrap após a obtenção do valor estabelecido de  $1 \times 10^6$ . A resolução do Orbitrap foi ajustada em  $r = 60.000$  e os 20 íons mais intensos, com carga  $\geq 2$ , foram sequencialmente isolados até o valor predefinido de 5.000 e fragmentados utilizando o método de fragmentação de dissociação induzida por colisão (CID) (Energia de colisão normalizada de 35%). Para fragmentação dos peptídeos, estes tiveram contagens de pelo menos 1.000. Exclusão dinâmica foi realizada com uma lista de tamanho de exclusão 500, duração da exclusão de 60 s, e uma contagem de repetição de 1. Foram usadas ativação de  $q = 0,25$  e tempo de ativação de 10 ms (KAWAHARA et al. 2014). Os dados brutos foram processados usando o MaxQuant versão 1.2.7.429 e o espectro MS/MS foi pesquisado usando o *Andromeda search engine* (COX et al. 2011) comparado ao *Uniprot Human Protein Database* (22 de janeiro de 2014). A tolerância de massa máxima inicial permitida foi ajustada em 20 ppm para o íon precursor e para 6 ppm na busca principal e 0,5 Da para os íons fragmentados. A especificidade enzimática foi ajustada para tripsina com no máximo de duas clivagens perdidas. Carbamidometilação de cisteína (57,021464 Da) foi usada como modificação fixa, e oxidação de metionina (15.994915 Da) e acetilação de proteínas N-terminal (42.010565 Da) foram

selecionadas como modificações variáveis. O comprimento mínimo de peptídeo foi determinado como de 7 aminoácidos. Para quantificação de proteínas, um mínimo de duas razões de contagem para LFQ foi estabelecida, e a requantificação e tempo entre corridas teve um espaço de dois minutos. A taxa de descobertas falsas (*The false discovery rates* - FDRs) de peptídeos e proteínas foram ambas estabelecidas em 0,01. A análise de bioinformática foi realizada usando o programa Perseus v.1.2.7.429, o qual está disponível em MaxQuant. Primeiro, dados reversos e os unicamente identificados por entradas do site foram excluídos das análises posteriores. Quantificação foi realizada usando a intensidade de proteína espectral normalizada (*normalized spectral protein intensity* - LFQ *intensity*). Os resultados preliminares obtidos das amostras foram tabulados e não foi usado filtro para valores válidos até a realização de todos os experimentos independentes. Para análise das proteínas diferentemente expressas, os dados foram convertidos em  $\log_2$ , e análise de *Student's t-test* foi aplicado para comparar os dois grupos de amostras. A quantidade de proteína foi calculada com base na média de toda a LFQ *intensity*.

### 3.11 QUANTIFICAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR E DA EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO

Para avaliar a resistência das células IR-SW837 e SW837 à RI, as mesmas foram irradiadas com uma única dose de 6Gy, seguindo o protocolo previamente descrito. Imediatamente após a RI,  $3 \times 10^5$  células de cada condição foram plaqueadas em placas de 35mm em duplicatas para determinar a capacidade de resistência dessas células, além disso, 700 células de cada condição foram plaqueadas em placas de 35mm, também em duplicatas, para avaliar a capacidade de formação de colônia após tratamento com RI. Após 5 dias as células foram tripsinizadas, coradas com solução de *Trypan blue*, e contadas três vezes usando a câmera de Neubauer, para determinar a capacidade de sobrevivência de cada tipo celular à RI. Depois de 14 dias as colônias foram coradas com hematoxilina por 30 minutos e contadas.

Para o experimento onde as células foram tratadas com anti-EGFR (cetuximab), foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células SW837. Após 18 horas em cultura para aderir, as mesmas foram tratadas com 5µg/mL de anti-EGFR Cetuximab (EKE et al. 2013) (Erbix<sup>®</sup> Boehringer Ingelheim Pharma e Merk - 20mL a 5mg/mL stock) durante 4 horas, e na sequência irradiadas com dose de 6Gy. Após 5 dias as células foram tripsinizadas, coradas com solução de *Trypan blue*, e contadas três vezes cada duplicata, usando a câmera de Neubauer.

### 3.12 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 #6813) 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<sup>TM</sup> Microplate Reader (Bio-Rad®).

### 3.13 QUANTIFICAÇÃO DA INVASÃO CELULAR

Câmeras *transwell* (Corning® - nº de catálogo: 3422) com 6,5mm de diâmetro e poros de 8µm foram tratadas com matrigel (200µg/ml; BD *Matrigel Matrix High Concentration* - BD Biosciences) e então  $5 \times 10^4$  células SW837 e IR-SW837 foram incubadas na parte superior da câmera por 12 horas. As células foram carenciadas por 6 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 de 16 horas 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.

### **3.14 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE EGFR**

Células SW837 e IR-SW837 foram plaqueadas em placa de 30mm (Corning® - nº de catálogo: 430165), na quantidade de  $10^6$  células por placa. Após confluir as mesmas foram carenciadas por 4 horas na presença de 10µg/ml de ciclohexamida para inibir a síntese proteica. Após esse período foram estimuladas com 50ng/ml de EGF por 5 minutos. Os extratos celulares foram feitos usando o tampão RIPA e inibidor de protease, no tempo 0, e após 30, 60, 120 e 180 minutos. Até o tempo de serem lisadas, as células permaneceram em cultura à 37°C com meio sem soro e 10µg/ml de ciclohexamida. Foi realizada a quantificação de EGFR por *Western Blot*, usando o anti-EGF Receptor (D38B1) XT® - Rabbit mAb - (#4267 - Cell Signaling), na diluição de 1:1000. Como controle de carregamento foi utilizado o anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody - Rabbit Polyclonal [#9102 -



Cell Signaling®] na diluição de 1:1000. A quantificação foi realizada no ImageJ e o gráfico construído no programa Graphpad Prism 6.0.

### **3.15 TRATAMENTO DE CÉLULAS SW837 COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS IR-SW837**

Foram plaqueadas  $8 \times 10^5$  células SW837 por placa de 60mm (Corning® - nº de catálogo: 430166). Paralelamente, células SW837 e IR-SW837 foram cultivadas em frascos de cultura de  $162 \text{ cm}^2$  até atingirem confluência de 70-80%, quando foram carenciadas por 48 horas. Após esse período o meio condicionado total foi extraído e as VEs isoladas por ultracentrifugação conforme protocolo previamente descrito (usando PBS estéril e filtrado). O pellet de VEs foi ressuspendido em 100µL de PBS filtrado e estéril, e uma alíquota de 10% foi utilizada para quantificação no NTA. A mesma quantidade de VEs ( $1.6 \times 10^3$  partículas/célula) das células SW837 e IR-SW837 foram usadas para tratar as células SW837 aderidas em placas 60mm. Após 24 horas de pré-tratamento com VEs, as células foram irradiadas com uma única dose de 6Gy. Imediatamente após a irradiação  $3 \times 10^5$  células de cada amostra foram plaqueadas em duplicatas em placas de 35mm, enquanto 700 células de cada amostra foram plaqueadas também em duplicatas em placas de 100mm para avaliar a capacidade de formação de colônias. Após 5 dias as células foram tripsinizadas, coradas com Trypan blue e contadas em câmara de Neubauer

para determinar a capacidade de sobrevivência à RI, e depois de 14 dias as colônias foram coradas com hematoxilina por 30 minutos e contadas.

### **3.16 QUANTIFICAÇÃO DO CARGO PROTEICO EM VESÍCULAS EXTRACELULARES**

VEs isoladas de células SW837 e IR-SW837 foram quantificadas usando o equipamento NTA. A mesma quantidade de VEs das duas células foram precipitadas com 15% de ácido tricloroacético 100% (TCA - Trichloroacetic acid), overnight à 4°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 30 minutos à 4°C, sendo que o sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de acetona gelada. Novamente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 30 minutos à 4°C, e o sobrenadante novamente descartado. O tubo foi vertido até secar e na sequência adicionado 20µL de tampão de ureia e 2µL de Tris-base 1M. Após 10 segundos de vortex foi adicionado 10µL de tampão de amostra (4x) por tubo. As amostras foram corridas em gel 10% por eletroforese. O gel foi corado com prata usando o kit PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas Life Science). Foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante: resumidamente, o gel foi fixado com 50% de metanol e corado com 0,8% AgNO<sub>3</sub>, 1,4% NH<sub>4</sub>OH e 0,0756% NaOH. A cor foi revelada com ácido cítrico 0,005% e Formaldeído 0,05%, e a reação foi bloqueada com a adição de metanol 45% e ácido acético a 10%. A quantificação foi realizada no programa ImageJ.

### 3.17 TRANSFEÇÃO CELULAR COM *SMALL INTERFERENCE* RNA

As células IR-SW837 foram transfectadas com *small interfering* RNA (siRNA) para silenciar Rab5C. Foram usadas duas sequências diferentes de siRNA para Rab5C. Sequência 1: *Sense* 5'GGACAGGAGCGGUAUCACAtt3' e *Antisense* 5'UGUGAUACCGCUCCUGUCCag3', (siRNA ID: s11708); Sequência 2: *Sence* 5'GCAAUGAACGUGAACGAAAtt3' e *Antisense* 5'UUUCGUUCACGUUCAU UGCag3', (siRNA ID: s11710) comprados junto a Life Technologies (Ambion® Cat. 4390824). Uma sequência de siRNA *non-targeting* (NT) foi usada como controle negativo (Ambion® Cat. 4390843). As células IR-SW837 foram plaqueadas em placas de 35 mm até alcançarem a confluência de 70-80%. O siRNA stock estava liofilizado na concentração de 5 nmoles, sendo que o mesmo foi ressuspendido em 250µL de nucleasse free water (fornecida junto com o siRNA), deixando o siRNA na concentração de 20 pmoles por µL. Para a padronização, o siRNA foi usado nas concentrações de 100 e 200 pmoles (5 e 10µL do *stock*), sendo que os experimentos posteriores foram realizados com 200 pmoles de siRNA. Em um eppendorf de 1,7mL foi adicionado 250µL de meio Opti-MEM (Gibco® - Life Technologies - nº de catálogo: 22600-134) + 5µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen - nº de catálogo: 11668-019) e incubado por 5 minutos. Em um segundo tubo foi adicionado o siRNA (5 ou 10µL) com 250µL de Opti-MEM. Ao final dos 5 minutos, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 20 minutos. O mesmo procedimento foi

realizado para a sequência NT. Foi removido o meio de cultura das células e adicionado 500µL de Opti-MEM. Depois dos 20 minutos foi adicionado os 500µL de Opti-MEM com siRNA e lipofectamina gotejando lentamente por toda a placa. As células ficaram na estufa por 6 horas para ocorrer a transfecção. Após esse período foi removido o meio Opti-MEM e adicionado meio de cultura com 10% de SFB. Após 48 horas da transfecção foi feito o extrato celular para avaliar a expressão de Rab5C por Western blotting e a eficiência da transfecção. Para avaliar a resistência à RI das células IR-SW837 knockdown para Rab5C, foi seguido o protocolo de irradiação previamente descrito, usando uma dose única de 6Gy. Imediatamente após a RI,  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas 35mm para determinar a capacidade de sobrevivência das mesmas. Após 5 dias as células foram tripsinizadas, coradas com Trypan blue e contadas usando a câmera de Neubauer.

### **3.18 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO**

Células SW837 e IR-SW837 foram plaqueadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> ( $4 \times 10^6$  células por garrafa) e mantidas em cultura até aderir (uma garrafa com célula IR-SW837 e três garrafas com a célula SW837). Em garrafas de 162cm<sup>2</sup> foram plaqueadas  $6 \times 10^6$  células SW837 e IR-SW837 e mantidas em cultura até atingirem confluência de 70-80% (uma garrafa com cada tipo celular). Após confluírem, as células foram carenciadas por 48 horas. O meio condicionado foi coletado, as VEs foram extraídas conforme protocolo já

descrito previamente. As vesículas foram quantificadas e a mesma quantidade de VEs de células SW837 e IR-SW837 foi utilizada para tratar duas garrafas de 75cm<sup>2</sup> contendo células SW837. O tratamento durou 72 horas, e depois desse tempo as células foram coletadas para extração do DNA genômico. As amostras foram as seguintes:

- 1- Célula SW837
- 2- Célula IR-SW837
- 3- Célula SW837 tratada com VEs de SW837
- 4- Célula SW837 tratada com VEs de IR- SW837

As amostras foram quantificadas com o Kit *Qubit® dsDNA BR Assay* no *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Inicialmente, foi feita uma diluição da solução corante fluorescente em um tampão *Qubit® dsDNA BR* em uma concentração 1:200. Para calibrar o equipamento, foram utilizadas duas amostras padrão *Qubit® dsDNA BR* (10µL) adicionadas a 190µL da solução diluída. As soluções de leitura das amostras do estudo foram preparadas com 199µL da solução diluída e 1µL de DNA de cada amostra. Após homogeneização em vórtex e incubadas por 2 minutos, foram realizadas as leituras das amostras no *Qubit® 2.0 Fluorometer*.

Depois da extração do DNA genômico, 500ng do mesmo passou por uma modificação por bissulfito de sódio com o *EZ DNA Methylation Gold Kit®* (Irvine CA, USA) conforme indicado pelo fabricante. Para a análise do perfil de metilação foi utilizada a Plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA). Essa plataforma interroga mais de 450.000 sítios de metilação por amostra com a resolução

de um único nucleotídeo, com uma cobertura de 96% das ilhas CpGs descritas no genoma, além de ilhas CpGs estendidas. Todas as etapas para este procedimento foram realizadas de acordo com especificações do fabricante: O DNA foi desnaturado através da adição de 130µL de CT Conversion Reagent em 20µL de DNA (500ng). O DNA foi convertido durante incubação no termociclador: 16 ciclos de 95°C por 30 segundos e 50°C por 1 hora seguidas de uma etapa de 4°C por 10 minutos. Então foi adicionado 600µL de *M-Binding Buffer* na coluna *Zymo-Spin™ IC Column* e transferido 150µL contendo o DNA. As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima por 30 segundos sendo descartado o resíduo que passou pelas colunas. Cem µL de *M-Wash Buffer* foram adicionados a coluna e o passo de centrifugação e descarte repetidos. O passo de desulfonação do DNA foi realizado pela adição de 200µL de *M-Desulphonation Buffer* e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos, seguidos por centrifugação durante 30 segundos a 5000g e descarte. Em seguida foram realizadas duas etapas adicionais de lavagem com 200µL de *M-Wash Buffer* e centrifugação por 30 segundos a 5000g e descarte. A recuperação do DNA modificado foi realizada pela adição de 12µL de *M-Elution Buffer* na matriz da coluna e centrifugação por 5 minutos a 5000g. Foi utilizado 4µL da amostra para a desnaturação e amplificação do DNA. Inicialmente, foram adicionados ao DNA modificado, 20µL do reagente *Multi-Sample Amplification 1 Mix* e 4µL de NaOH 0,1N. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex por 1600rpm por 1 minuto, centrifugadas a 280xg por 1 minuto e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Foi

adicionado 68µL de *Random Primer Mix* e 75µL de *Multi-Sample Amplification Master Mix* ao mix preparado anteriormente. Após homogeneização por inversão e centrifugação por 280xg por 1 minuto as amostras foram incubadas a 37°C (no Illumina Hybridization Oven) por aproximadamente 20 horas. Para a fragmentação do DNA foi adicionado 50µL de *Fragmentation solution*. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 50xg por 1 minuto. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Para a precipitação do DNA foram adicionados 100µL de *Precipitation Solution* a cada amostra e estas foram homogeneizadas, sendo na sequência incubadas a 37°C por 5 minutos e em seguida centrifugadas a 50xg (22°C) por 1 minuto. Foram então adicionados 300µL de 2-propanol 100% e as amostras foram mantidas a 4°C por 30 minutos e então centrifugadas a 3000xg por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão e a placa permaneceu na posição invertida a temperatura ambiente por uma hora para secagem do *pellet*. Para ressuspensão do DNA foram adicionados 46µL de *Ressuspension, hybridization and wash solution* ao DNA precipitado, a placa foi selada e as amostras mantidas a 48°C por uma hora no Illumina Hybridization Oven. Para a hibridação, a *BeadChip Chamber gasket* foi encaixada em uma *BeadChip Chamber* e então 400µL de *Humidifying Buffer* foram adicionados em cada *HybChamber Reservoir*. A tampa da *BeadChip Chamber* foi fechada e travada, sendo mantida em temperatura ambiente até o momento da adição das *BeadsChips*. As amostras ressuspendidas foram desnaturadas a 95°C por 20 minutos e então mantidas a temperatura

ambiente por mais 30 minutos. Cada *BeadChip* foi colocada no *HybChamber Insert* no momento antes do seu uso e 15µL de cada amostra ressuspensa foi pipetada nas seções especificadas do *BeadChip*. Os insertos contendo as *BeadChip* foram colocados no *Illumina HybChamber* montado anteriormente. As *BeadChip* foram então incubadas a 48°C por pelo menos 16 horas. Para lavagem, as *BeadChips* foram retiradas do forno de hibridação e mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. O selo de cobertura da lâmina foi retirado cuidadosamente e as *BeadChips* foram lavadas com 200mL de PB1 durante 1 minuto. Na etapa de extensão *single-base* a lâmina que passou pelo processo anterior de lavagem foi colocada em uma *Flow-Through Chamber* (mantida a 44°C) e incubada com *Ressuspension, hybridization and wash solution* por 30 segundos por 5 vezes. As seguintes soluções foram posteriormente usadas para incubação: 450µL de *X Stain BeadChip solution 1* por 10 minutos, 450µL de *X Stain BeadChip solution 2* por 10 minutos, 200µL de *Two-Color Extension Master Mix* por 15 minutos, 450µL de formamida 95% /1mM EDTA por 1 minuto; esse último processo foi repetido uma vez e então seguiu-se uma incubação de 5 minutos. Então foi iniciada a rampa de temperatura da *Chamber Rack* (32°C), adicionado 450µL de *X Stain BeadChip solution 3*, incubado por 1 minuto (repetida a última etapa). Quando a temperatura *Chamber Rack* estabilizou em 32°C, foram adicionados 250µL de *Superior Two-Color Master Mix*, seguidos de uma incubação por 10 minutos, adição de 450µL de *X Stain BeadChip solution 3* e incubação por 1 minuto, esse último passo foi repetido por mais uma vez e então após 5 minutos todas as etapas foram reiniciadas por mais



4 vezes. A última etapa da leitura consistiu em uma lavagem em 310mL de PB1 por 10 vezes e uma incubação nesse mesmo reagente por mais 5 minutos, seguida de uma segunda lavagem em *X Stain Bead Chip solution 4* com o mesmo processo acima. As lâminas então foram mantidas em dessecador a vácuo (675mm Hg) por 50-55 minutos. Todas as amostras em questão foram processadas no mesmo *chip* a fim de evitar variação entre experimentos. Procedeu-se o escaneamento das lâminas. A captura das imagens foi realizada no *HiScan Systems* (Illumina). Os dados obtidos da leitura dos canais vermelho e verde são convertidos em um sinal de metilado e não metilado e após a geração desse sinal um valor  $\beta$  entre 0 e 1 foi fornecido, onde o valor 1 significa totalmente metilado. O controle de qualidade dos dados brutos obtidos da leitura dos *array* foi realizado utilizando o programa R versão 3.0.2 (R Core Team, 2013) e o pacote de análise do Bioconductor *WateRmelon* (Pidsley *et al.*, 2013). A checagem do controle de qualidade foi realizada por meio da distribuição dos sinais obtidos para sondas metiladas e não metiladas e do uso de *Multidimensional Scaling* (MDS) *plot*. Após a normalização entre amostras pelo método BMIQ (*Beta-Mixture Quantile Normalization*) foi utilizado o delta-beta ( $\Delta\beta$ )  $< -0.10$  ou  $> +0.10$  para identificar a metilação diferencial entre as linhagens em diferentes condições. As vias de sinalização celular, as quais os genes identificados estavam envolvidos, foram identificadas e analisadas através do programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA<sup>®</sup>).

### 3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos onde foi aplicada a análise estatística foram repetidos no mínimo três vezes. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA). Os grupos experimentais foram comparados usando o Student's *t* test, unpaired *t* test, one sample *t* test, One-way ANOVA ou Two-way ANOVA tests. Os dados foram mostrados como *means* ± SD (média do desvio padrão) ou *mean with* SEM (média do erro padrão).  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 MARCADORES E MECANISMO DE RESISTÊNCIA À TERAPIA NEOADJUVANTE EM ADENOCARCINOMA DE RETO**

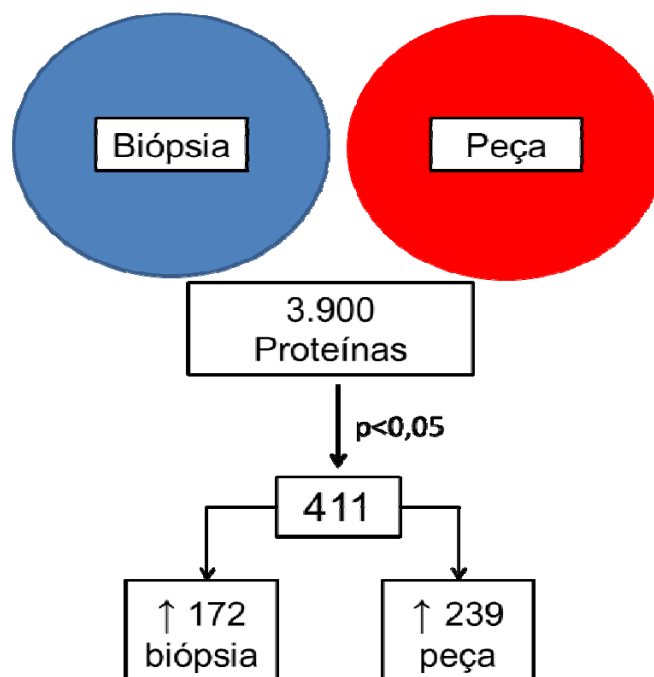
#### **4.1.1 Análise Proteômica de Biópsia e Tumor Residual de Pacientes com Adenocarcinoma de Reto Tratados com Radioquimioterapia Neoadjuvante**

O primeiro objetivo estabelecido nesse trabalho foi identificar mecanismos de resistência à terapia neoadjuvante em adenocarcinomas de reto. Para isso, realizamos inicialmente uma análise proteômica de biópsias pré-tratamento comparadas ao tumor residual de pacientes com adenocarcinoma de reto, removido durante ressecção cirúrgica após o tratamento neoadjuvante, com o intuito de identificar proteínas com alteração importante nos níveis de expressão após a realização da terapia neoadjuvante.

Para essa etapa selecionamos 21 pacientes com adenocarcinoma de reto, estágio clínico II e III, os quais foram submetidos ao tratamento padrão de quimioterapia baseada em 5-Fluorouracil, e radioterapia com dose de 45-50,4 Gy, fracionada durante 5 a 6 semanas, seguida de 6 a 8 semanas de intervalo, até a ressecção cirúrgica. Dos 21 pacientes, 12 possuíam apenas o material da biópsia disponível, 6 pacientes tinham apenas a peça cirúrgica,

enquanto 3 pacientes tinham material disponível tanto da biópsia quanto da peça cirúrgica.

A análise proteômica, realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) de Campinas, comparou através da espectrometria de massas os níveis da expressão proteica de 15 biópsias com o de 9 peças cirúrgicas. Foram consideradas proteínas diferentemente expressas aquelas que através do *Student t test*, tiveram o valor de  $p$  menor que 0,05. Foram identificadas 3900 proteínas, dessas, 411 apresentaram níveis de expressão significativamente diferentes: 239 proteínas apresentaram aumento da expressão no tumor residual da peça cirúrgica em comparação à biópsia, ou seja, essas proteínas passaram a aumentar sua expressão após o tratamento neoadjuvante; por outro lado, 172 proteínas apresentavam expressão maior na biópsia do que no tumor residual (Figura 11). A lista completa com as proteínas diferentemente expressas entre biópsia e peça cirúrgica encontra-se no anexo 3, ordenadas de acordo com o valor de  $p$  (**Anexo 3**).



**Figura 11** - Resumo da análise proteômica entre biópsia e tumor residual na peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto. Foram identificadas 3900 proteínas, sendo 411 com diferença na expressão entre biópsia e peça cirúrgica. 172 proteínas apresentaram aumento da expressão na biópsia, enquanto 239 apresentaram aumento da expressão na peça cirúrgica.

Para identificar proteínas envolvidas no mecanismo de resistência à radio e quimioterapia que possam ser potenciais alvos terapêuticos, em uma segunda análise listamos apenas as proteínas de membrana que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre amostras de biópsia e peça cirúrgica. Além disso, também estão listadas as proteínas de membrana detectadas exclusivamente (pelo cut off de detecção) na peça cirúrgica e que estavam presentes em pelo menos 40% das amostras deste grupo. Já no grupo de proteínas exclusivas de biópsias nenhuma foi identificada em pelo menos 40% das amostras analisadas (**Anexo 4**). Estes resultados serão melhor explorados em projetos subsequentes.

#### 4.1.2 Mecanismo de Resistência a Neoadjuvância em Câncer de Reto

As proteínas que sofreram alteração nos níveis de expressão após o tratamento neoadjuvante podem ser consideradas potenciais marcadores de resistência, além da possibilidade de estarem colaborando nos mecanismos de tal resistência. Diante da identificação de um grande número de proteínas com expressão significativamente diferente, decidimos focar a primeira análise em proteínas envolvidas no reparo de dano de DNA por quebra de dupla fita (*Double-strand breaks* - DSB), mecanismo fundamental para a resistência à radioterapia, além de proteínas de tráfego intracelular, processo responsável pela transmissão intracelular de sinais iniciados na membrana após a radiação ionizante (DITTMANN et al. 2005a; SCHMIDT-ULLRICH et al. 1997). Em relação a via de reparo de DSB, a comparação de biópsias com tumor residual pós-neoadjuvância revelou diferença significativa na expressão das proteínas Ku70 e Ku80, enquanto outras proteínas importantes na via, como DNA-PKc e proteínas da família de Rad23 não apresentaram diferença de expressão. Quando analisamos as proteínas da via de tráfego intracelular, encontramos a proteína Rab5C com diferença de expressão estatisticamente significativa. Essa proteína é uma das isoformas da proteína Rab5, a qual desempenha função essencial no tráfego intracelular, sendo considerada o regulador máster da via endocítica (ZEIGERER et al. 2012).

Para validar os achados da análise proteômica, foram selecionadas biópsias de três pacientes com adenocarcinoma de reto que não tiveram resposta patológica completa após o tratamento neoadjuvante, e os

respectivos tumores residuais ressecados cirurgicamente. Foi realizada a imuno-histoquímica para avaliar a expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C nesses tecidos. As três proteínas apresentaram marcação negativa nas biópsias enquanto todos os tumores residuais apresentaram marcação positiva, confirmando dessa forma que essas proteínas aumentam seus níveis de expressão após o tratamento com radio e quimioterapia neoadjuvante.

Com base nesses resultados, decidimos gerar um modelo celular para estudar o papel dessas proteínas no mecanismo de resistência nos tumores de reto. Para isso, utilizamos a linhagem celular de adenocarcinoma de reto SW837, a qual foi submetida a três ciclos de irradiação ionizante, com dose progressiva, sendo de 4Gy no primeiro ciclo, 6Gy no segundo e 8Gy no terceiro ciclo. As células que resistiram a esse tratamento foram mantidas em cultura e nomeadas de IR-SW837. Estabelecido esse modelo, realizamos uma série de experimentos onde conseguimos identificar a importância das proteínas Ku70, Ku80 e Rab5C na resistência a RI em tumores de reto, resultados que estão detalhados em forma de um artigo científico no **Anexo 8**. Nesse trabalho mostramos que a RI causa um aumento na expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C também no modelo celular IR-SW837. O aumento da expressão de Rab5C faz com que a célula realize a internalização e tráfego de EGFR de forma mais rápida, além de promover a translocação de parte do EGFR para o núcleo, reforçando sua função como fator de transcrição. Esta atividade de EGFR levou a um aumento da expressão de Ku70 e Ku80, importantes proteínas no processo de reparo do

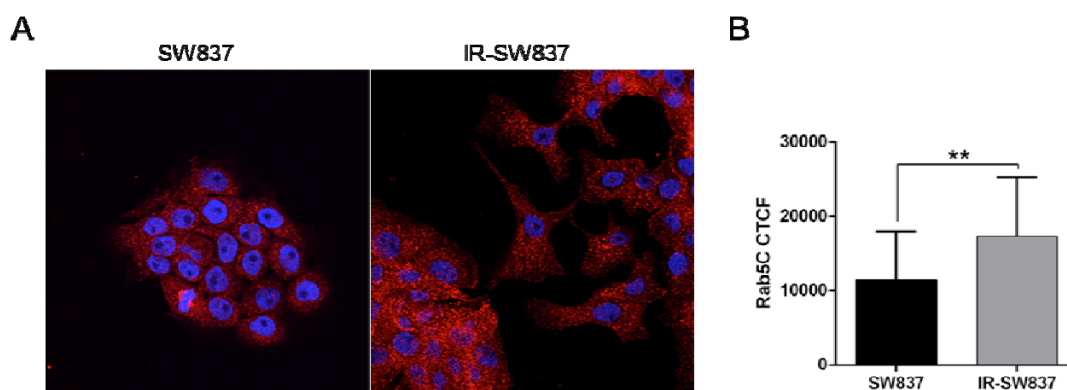
dano no DNA e portanto resultando numa maior resistência celular à RI. Esses dados indicam que abordagens que inibam a endocitose de EGFR e/ou a atividade de Rab5C podem ter efeito radiosensibilizador no tratamento neoadjuvante de pacientes com adenocarcinoma de reto.

Além dos resultados apresentados no artigo do Anexo 8, serão apresentados a seguir experimentos que serviram de base para a elaboração do artigo, resultados que confirmaram através de diferentes métodos os achados apresentados, além de resultados que complementam e trazem novas perspectivas em relação ao mecanismo de resistência de células de câncer retal à radioquimioterapia.

#### **4.1.3 Expressão e Modulação de Rab5C em Células IR-SW837**

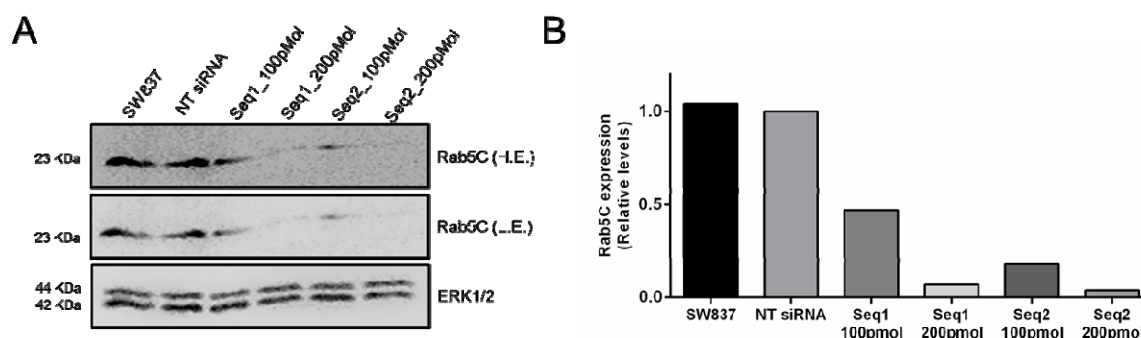
Em nosso modelo *in vitro* de células de adenocarcinoma de reto submetidas à RI, observamos um aumento na expressão de Rab5C, a qual foi apresentada no Anexo 8 através da técnica de WB. Através de um ensaio de imunofluorescência foi confirmado o aumento da expressão de Rab5C em células IR-SW837 quando comparadas às células SW837. A quantificação da fluorescência através do método CTCF (*corrected total cell fluorescence*) mostrou um aumento de aproximadamente 51% na expressão de Rab5C em células IR-SW837 em relação às células SW837 (Figura 12).





**Figura 12** - Expressão de Rab5C por imunofluorescência nas células SW837 e IR-SW837. **A)** Células SW837 e IR-SW837 foram coradas com anti-Rab5C (vermelho) e Draq5 (azul). As imagens foram capturadas em microscópio confocal; **B)** A quantificação da fluorescência foi feita usando o programa ImageJ. O gráfico de barras representa a quantidade de Rab5C medida pelo índice CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*), e mostra a média  $\pm$  SD da fluorescência de no mínimo 30 células. \*\*P < 0.05, unpaired *t* test.

Para realizar o *Knockdown* de Rab5C, inicialmente a técnica de transfecção com siRNA e a dose a ser usada foram padronizadas, bem como a escolha da sequência de siRNA com maior eficiência. Foram utilizadas as sequências 1 e 2 do siRNA (sequências descritas no item 3.16), nas doses de 100 e 200 pmoles, e avaliada a eficiência de inibição da expressão de Rab5C por *Western blotting* (WB), o qual foi realizado com proteínas totais extraídas 48 horas após a transfecção. A sequência 2 do siRNA na dose de 200 pmoles apresentou uma melhor atividade de inibição da expressão de Rab5C no tempo avaliado. Dessa forma, foi estabelecido que os experimentos de *Knockdown* da proteína Rab5C seriam realizados nestas condições (Figura 13).

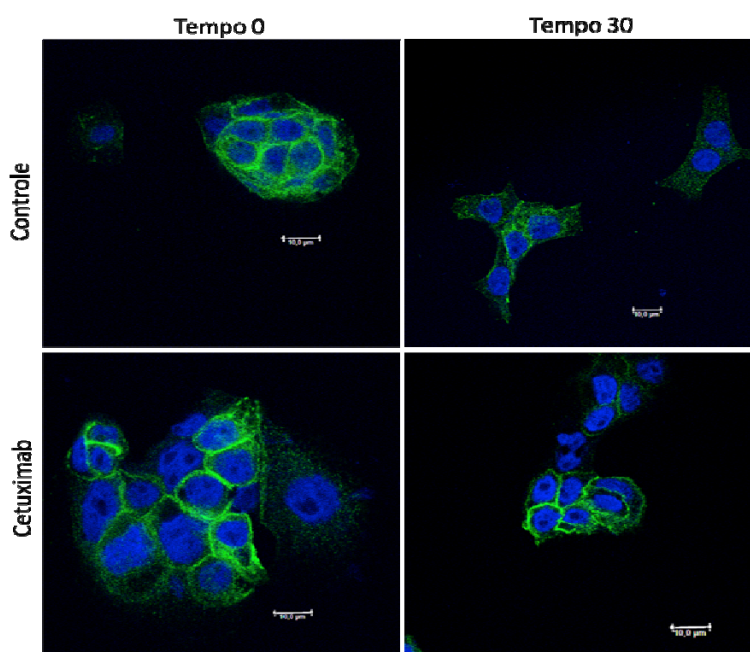


**Figura 13** - Knockdown de Rab5C por siRNA. **A)** Depois de 48 horas de transfecção o extrato celular foi preparado e as proteínas detectadas por Western blotting usando anticorpo específico para Rab5C. A expressão de ERK1/2 foi usada como controle de carregamento (H.E: *high exposition* e L.E: *low exposition*); **B)** A quantificação foi realizada utilizando o programa ImageJ e o gráfico de barras representa os níveis de expressão de Rab5C normalizado por ERK1/2. A amostra non-targeting (NT) foi relativizada para 1 e os demais valores representam níveis relativos comparados a este grupo.

#### 4.1.4 Tratamento com anti-EGFR e Internalização de EGFR em Células SW837

Um dos mecanismos propostos para a resistência dos tumores à RI envolve a internalização de EGRF. Para avaliar a capacidade do Cetuximab, anticorpo anti-EGFR, bloquear a internalização desse receptor desencadeada por RI, células SW837 foram tratadas com 5µg/mL de Cetuximab por 4 horas e então irradiadas com dose de 6Gy. Células tratadas e não tratadas com Cetuximab foram fixadas imediatamente ou depois de 30 minutos da RI. Nas imagens de IF, observamos que após 30 minutos da RI, nas células controle a maior parte do EGFR apresenta localização intracelular. Já nas células tratadas com Cetuximab, nesse mesmo tempo, a fluorescência de membrana ainda é intensa. Esse resultado indica que apesar de não bloquear completamente a internalização

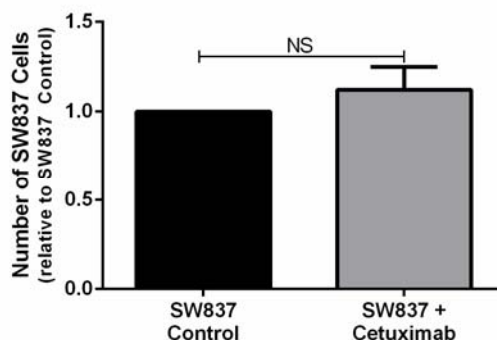
de EGFR, o tratamento com Cetuximab diminuiu consideravelmente a localização intracelular de EGFR após 30 minutos da RI. (Figura 14).



**Figura 14** - Tratamento com anti-EGFR e localização celular de EGFR por IF nas células SW837. Células SW837 tratadas ou não (controle) com 5µg/mL de Cetuximab por 4 horas a 37°C, foram irradiadas com dose de 6Gy e então fixadas imediatamente ou após 30 min. As células foram coradas com anti-EGFR (verde) e Draq5 (azul). Imagens foram obtidas com microscópio confocal (barra de escala = 10 µM).

Com o objetivo de avaliar se o bloqueio, mesmo que parcial, da internalização de EGFR após o tratamento com Cetuximab é capaz de sensibilizar as células SW837 à radioterapia, as células foram tratadas com 5µg/mL de Cetuximab durante 4 horas e após esse período irradiadas com dose de 6Gy. Depois de 5 dias as células foram coradas com *Trypan blue* e contadas. Os resultados mostraram que em nosso modelo experimental *in vitro*, com a dose e os tempos utilizados, o tratamento com Cetuximab não foi capaz de sensibilizar as células SW837 ao tratamento com RI, já que a

contagem de células viáveis não mostrou nenhuma diferença estatística entre as células tratadas e o controle (Figura 15).

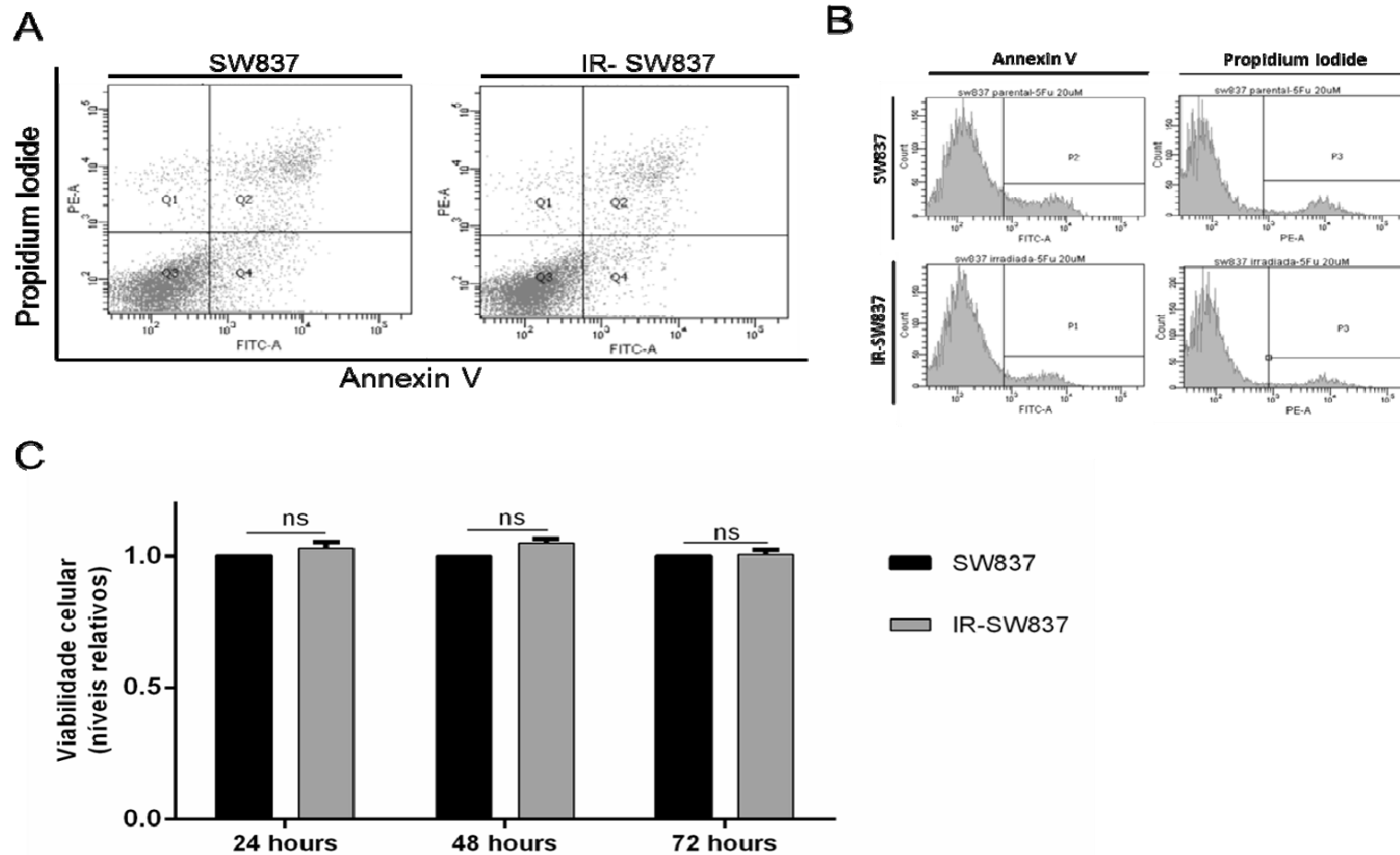


**Figura 15** - Viabilidade celular após RI com e sem tratamento com Cetuximab. Células SW837 tratadas com 5µg/mL de Cetuximab por 4 horas e células não tratadas (controle) foram irradiadas com dose de 6Gy e após 5 dias coradas e contadas. O número de células do controle (SW837) foi ajustada para 1 e os valores da célula SW837 + Cetuximab representam níveis relativos comparados ao controle. O gráfico de barras representa a média normalizada da contagem de células  $\pm$  SD determinada por 3 experimentos independentes. NS (*not significant*) = sem diferença estatística, *unpaired t test*.

#### 4.1.5 Resistência das Células SW837 e IR-SW837 ao Tratamento Quimioterápico

As células irradiadas (IR-SW837), são mais resistentes à um novo tratamento com RI quando comparadas às células SW837 não irradiadas. Por outro lado, as células IR-SW837 não apresentam vantagens proliferativas ou maior capacidade de invasão em relação às células SW837 (resultados mostrados no artigo científico do Anexo 8). Para avaliar se as células IR-SW837 também são mais resistentes ao tratamento quimioterápico, estas e as células SW837 parentais foram tratadas com 10µM de 5-Fluorouracil (5-FU) durante 24, 48 e 72 horas, sendo na sequência quantificada a viabilidade e morte celular por citometria de fluxo.

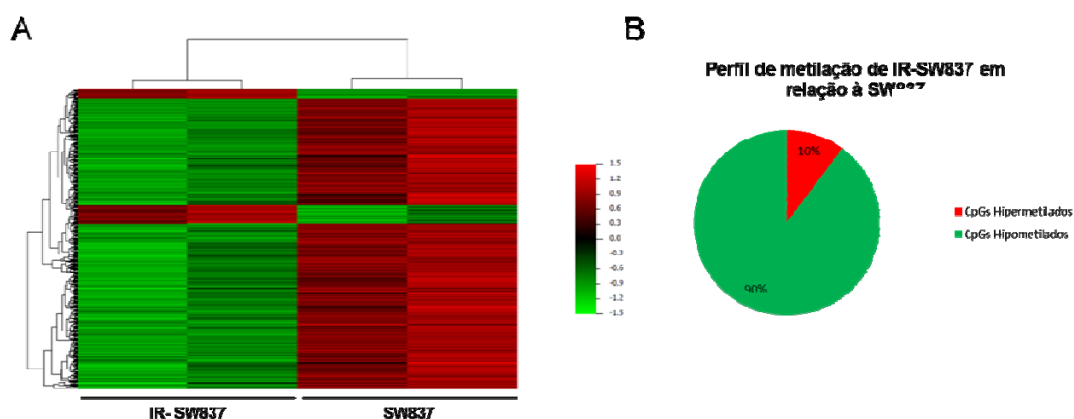
Para tal análise as células foram coradas com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI), marcadores de apoptose e morte celular, respectivamente. Foi observado que em todos os tempos avaliados as células IR-SW837 e SW837 apresentaram porcentagem de células viáveis similares. Esse resultado indica que as células IR-SW837 adquirem um fenótipo de resistência que é específico para a RI, sem nenhuma vantagem na resistência ao tratamento quimioterápico com 5-FU (Figura 16).



**Figura 16** - Tratamento com quimioterápico e viabilidade celular. As células SW837 e IR-SW837 foram tratadas com 10 $\mu$ M de 5-Fluorouracil (5-FU) por 24, 48 e 72 horas, coradas com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI), e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Gráfico *Dotplot* com positividade para PI (PE) no eixo y, e positividade para Anexina V (FITC) no eixo x, em células SW837 e IR-SW837. **B)** Histograma mostrando positividade para Anexina V (primeira coluna) e PI (segunda coluna) em células SW837 e IR-SW837. **C)** A quantificação foi realizada utilizando o programa BD FACSDiva™ software e o gráfico de barras representa a porcentagem de células viáveis normalizada. As amostras de células SW837 nos diferentes tempos foram ajustadas para 1 e os demais valores representam níveis relativos comparados à esses controles. O gráfico de barras representa a média normalizada da porcentagem de células viáveis  $\pm$  SD determinada por 3 experimentos independentes. NS (*not significant*) = sem diferença estatística, *unpaired t test*.

#### **4.1.6 Análise do Perfil de Metilação das Células SW837 e IR-SW837**

Na análise proteômica apresentada nesse trabalho, mostramos que a RI é capaz de modular a expressão de uma grande quantidade de proteínas. As alterações epigenéticas, como a metilação de ilhas CpGs, são mecanismos que sabidamente levam a modulação da expressão gênica, e consequentemente alteram a expressão proteica. Em geral, a hipermetilação resulta no silenciamento do gene afetado, e logo, menor expressão da proteína, enquanto a hipometilação de determinado gene acaba resultando em aumento da expressão da proteína em questão. Além disso, já foi demonstrado que a RI causa alterações epigenéticas no DNA (ANTWIIH et al. 2013). Dessa forma, através de uma plataforma que avalia 450.000 sítios de metilação por amostra, com uma cobertura de 96% das ilhas CpGs descritas no genoma, além de ilhas CpGs estendidas, analisamos o perfil de metilação das células SW837 e IR-SW837, com o objetivo de avaliar as alterações causadas pela RI. Os resultados mostraram que nas células IR-SW837, mais de 90% do DNA avaliado estava hipometilado em relação as células SW837, enquanto somente 10% apresentou hipermetilação nas células IR-SW837 comparadas às células SW837. Esse resultado indica que a RI produz um processo de hipometilação global no DNA da célula irradiada (Figura 17).



**Figura 17** - Perfil de metilação de células SW837 e IR-SW837. **A)** *Heat map* mostrando os resultados de metilação comparativa entre as células SW837 e IR-SW837 em uma duplicata técnica. A cor verde representa sondas hipometiladas em relação à outra amostra, enquanto a cor vermelha representa sondas hipermetiladas em relação à outra amostra. **B)** Gráfico de setores mostrando a porcentagem de sondas hipometiladas (verde) e hipermetiladas (vermelho) nas células IR-SW837 em relação às células SW837.

Para determinar se um gene está hiper ou hipometilado em uma amostra em relação à outra, foi considerada a diferença entre os valores de  $\beta$  de cada amostra, gerando um valor de Delta Beta. Para a obtenção do valor de  $\beta$  os dados obtidos da leitura das imagens realizada no *HiScan Systems* (Illumina) foram convertidos em um sinal de metilado e não metilado e após a geração desse sinal um valor  $\beta$  entre 0 e 1 foi fornecido, onde o valor 1 significa totalmente metilado. Os genes hipermetilados nas células IR-SW837 em comparação às células SW837 foram listados e ordenados do maior valor de Delta Beta para o menor valor. Os genes hipometilados, nessa mesma comparação, também foram listados com base no valor do Delta Beta, porém nesse caso o Delta Beta é negativo, e o ordenamento se deu do menor valor para o maior valor. A seguir listamos os 20 genes hipermetilados e hipometilados (Top 20) nas células IR-SW837 em



comparação com às células SW837 com a maior diferença de Delta Beta entre estas amostras (Tabela 2 e 3). Foram selecionados somente sondas mapeadas em região promotoras (5'UTR, TSS1500 e TSS200) ou próximas ao promotor (1stExon). Além dos genes listados abaixo, é importante destacar que o gene TBC1D16, o qual foi descrito como regulador positivo de Rab5C (VIZOSO et al. 2015) foi encontrado hipometilado em células IR-SW837.

**Tabela 2** - Top 20 genes hipermetilados em célula IR-SW837 comparada à SW837

Probe	HUGO Symb	PROMOTER	SW837	IR-SW837	Delta Beta IR-SW837-SW837
cg10834480	TRAF3IP2	TSS1500	0,260026596	0,720760035	0,460733439
cg08518568	PDGFRL	TSS200	0,301491727	0,756547912	0,455056185
cg26751510	ARSH	TSS200	0,411125301	0,845268514	0,434143213
cg23026754	TNS3	TSS1500	0,30012532	0,725899648	0,425774329
cg04756296	ERI1	TSS1500	0,385005237	0,807732531	0,422727294
cg11341438	SERHL2	TSS1500	0,411324169	0,827357814	0,416033645
cg11163933	CHL1	5'UTR	0,382486471	0,791132419	0,408645949
<b>cg04557677</b>	JAK3	TSS1500	0,292099628	0,681295265	0,389195638
<b>cg10970409</b>	VIPR1	TSS1500	0,219534789	0,601037739	0,38150295
cg26145228	NTNG1	TSS200	0,329402443	0,710335299	0,380932856
cg16158863	FRY	TSS1500	0,382315657	0,762338	0,380022343
cg11953311	ZBTB12	TSS1500	0,3201805	0,696229119	0,376048619
<b>cg08261525</b>	ENOX1	5'UTR	0,322162669	0,696962671	0,374800002
cg21436456	ZNF385D	TSS200	0,236897858	0,607186792	0,370288935
cg12173498	ETV7	TSS1500	0,173820512	0,538460619	0,364640107
cg09829176	PPARA	TSS1500	0,365193338	0,729015141	0,363821803
cg01916632	PDSS2	TSS1500	0,343448159	0,703971686	0,360523527
cg05694052	OR5E4	1stExon	0,262847204	0,620353656	0,357506453
cg19349920	TFDP1	TSS1500	0,40917881	0,7625371	0,35335829
cg08204402	ZDHHC11	TSS1500	0,487315807	0,839845344	0,352529537

Sondas em negrito estão mapeadas em regiões de *enhancers*.

**Tabela 3** - Top 20 genes hipometilados em célula IR-SW837 comparada à SW837

Probe	HUGO Symb	PROMOTER	SW837	IR-SW837	Delta Beta IR-SW837-SW837
<b>cg00021476</b>	<b>GSE1</b>	<b>5'UTR</b>	<b>0,689372432</b>	<b>0,172691313</b>	<b>-0,516681119</b>
<b>cg06677239</b>	<b>WDR27</b>	<b>5'UTR</b>	<b>0,701936969</b>	<b>0,206604293</b>	<b>-0,495332676</b>
cg12002047	FCER2	TSS1500	0,744935278	0,285660611	-0,459274667
cg18192491	HS3ST5	TSS1500	0,852357644	0,395108795	-0,45724885
<b>cg19712291</b>	<b>SPG20</b>	<b>5'UTR</b>	<b>0,818605765</b>	<b>0,364328495</b>	<b>-0,45427727</b>
cg08495813	FAM19A4	5'UTR	0,761016115	0,315050247	-0,445965868
cg10468702	PTGER1	5'UTR	0,871367426	0,42779673	-0,443570696
cg00539564	ARFGAP3	TSS1500	0,677567906	0,234423942	-0,443143964
cg06489008	CST11	1stExon	0,751184081	0,309406648	-0,441777433
cg15639592	FAM222A	5'UTR	0,777223794	0,337514274	-0,43970952
cg24287438	ADCYAP1	TSS1500	0,810887273	0,371970352	-0,438916921
cg04744713	MROH5	TSS200	0,593054365	0,156556191	-0,436498174
cg16927811	FGF6	1stExon	0,721379661	0,285193829	-0,436185832
cg26861460	PARVG	TSS1500	0,632956358	0,200269673	-0,432686685
<b>cg12800028</b>	<b>GPR6</b>	<b>TSS200</b>	<b>0,831467455</b>	<b>0,399452075</b>	<b>-0,43201538</b>
cg00426668	CAPN6	TSS1500	0,67924712	0,247953983	-0,431293137
cg00247334	OXTR	TSS1500	0,71668197	0,285904171	-0,430777799
cg25530583	SLC14A1	5'UTR	0,647608041	0,219623262	-0,427984779
cg04100395	CLEC10A	TSS1500	0,823601356	0,395727813	-0,427873543
cg01728495	C1QB	TSS1500	0,809834379	0,382811772	-0,427022607

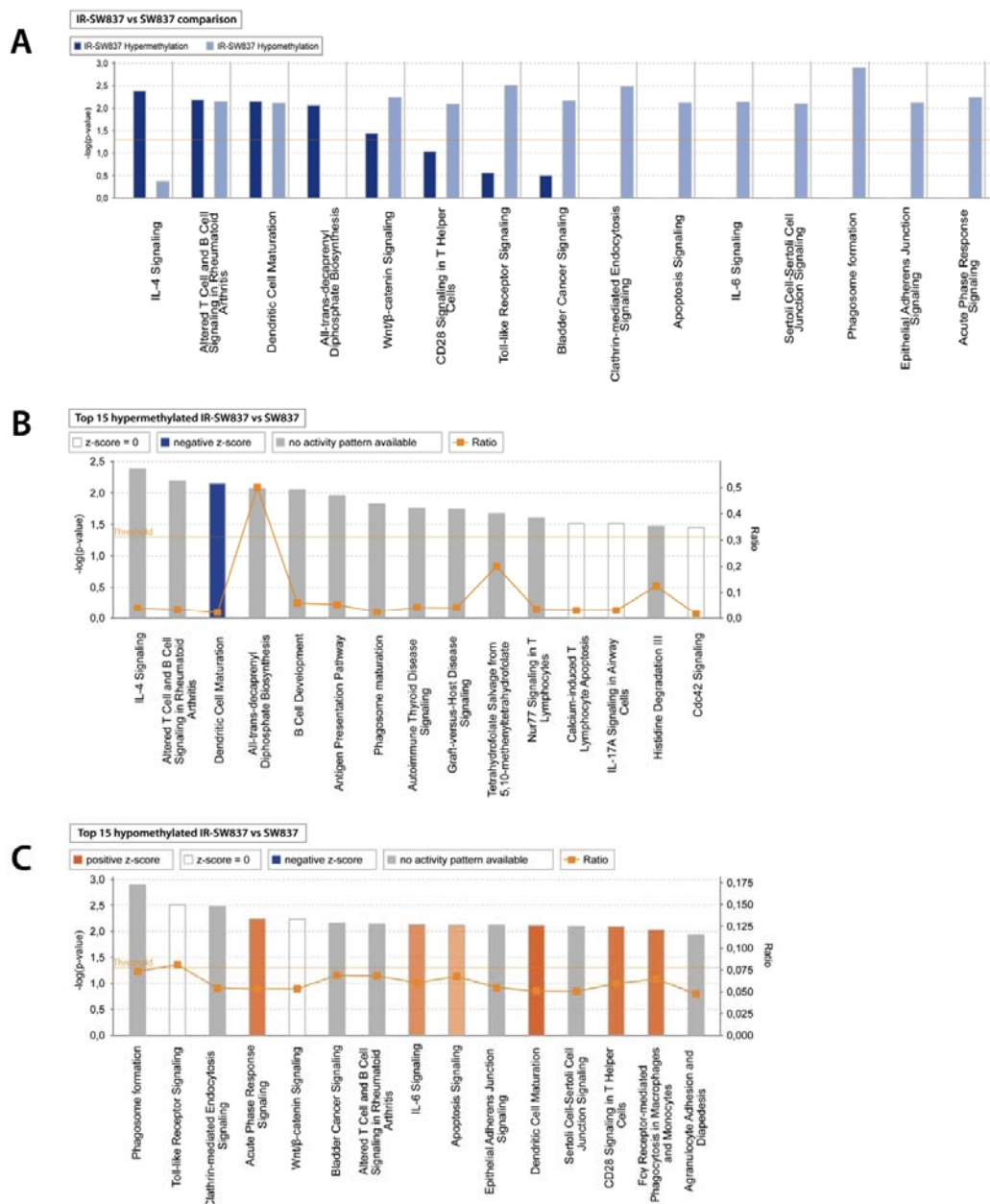
Sondas em negrito estão mapeadas em regiões de *enhancers*.

Entre os genes hiper e hipometilados nas células irradiadas em comparação às células não irradiadas encontramos uma grande variedade de genes, os quais estão envolvidos em diferentes processos celulares. Para avaliar quais vias de sinalização celular foram mais afetadas tanto na hipometilação causada pela RI, como nos 10% de genes hipermetilados, selecionamos os genes com valor de Delta Beta menor que -0,3 para o grupo de genes hipometilados, e valor maior que 0,3 para o grupo de genes

hipermetilados. A lista de genes selecionados foi analisada no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), o qual gerou uma lista das vias com alterações mais significativas, com base no perfil de metilação dos genes envolvidos (Figura 18A). Além disso, essa mesma análise listou as vias hiper e hipometiladas ordenando de forma decrescente pela significância estatística das mesmas (Figura 18B e 18C).

Entre os genes hipometilados destacam-se as vias de formação de fagossomos, sendo essa a mais significativa; sinalização de receptor Toll-like; endocitose mediada por clatrina; resposta de fase aguda; sinalização de  $\beta$ -catenina/Wnt; sinalização de IL-6; entre outras (Figura 18C). O resultado observado no perfil de metilação, apesar de não ter sido realizada a análise de expressão para confirmar, sugere que o fato dos genes estarem hipometilados pode indicar que seu produto proteico está mais expresso, e como consequência promovendo uma maior ativação das vias descritas. Para uma melhor predição da ativação ou inativação das vias hipo ou hipermetiladas, usamos o valor do *z-score*. O *z-score* avalia o estado de ativação dos reguladores *upstream*. Um valor de *z-score*  $\geq 2$  é significativo, indicando que os reguladores *upstream* estão ativados, ou seja, sugere que a via em questão está ativada. Já um valor de *z-score*  $\leq -2$  também é significativo, porém indica que os reguladores *upstream* estão inibidos, sugerindo que a via está inativada. Entre as vias hipometiladas e com *z-score* significativo destacam-se a sinalização de resposta de fase aguda e a via de IL-6. Entre os genes hipermetilados, as vias em destaque são sinalização de IL-4, maturação de células dendríticas, desenvolvimento de

células B, via de apresentação de antígeno, maturação de fagossomos, entre outras (Figura 18B). É importante destacar que a via de maturação de células dendríticas é a única com *z-score* negativo e significativo, o que sugere inativação dessa via. Interessantemente, a maioria das vias dos genes hipermetilados estão relacionadas ao sistema imune, sugerindo que após a RI possa ocorrer diminuição na expressão das proteínas envolvidas nos processos imunológicos e consequentemente diminuição da atividade desse sistema.



**Figura 18** - Análise de vias dos genes hipo e hipermetilados em células IR-SW837 em relação às células SW837. Os genes com valor de Delta Beta menor que -0,3 (hipometilados), e valor maior que 0,3 (hipermetilados) foram analisados no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). **A)** Lista comparando a significância de hiper e hipometilação nas vias com as maiores diferenças; **B)** Lista das vias hipermetiladas nas células IR-SW837 comparadas às células SW837 ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Vias em azul indicam z-score significativamente negativo ( $\leq -2$ ); **C)** Lista das vias hipometiladas nas células IR-SW837 comparadas às células SW837 ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Vias em laranja indicam z-score significativamente positivo ( $\geq 2$ ). O *ratio* indica a quantidade de genes encontrados nesta análise relativa a quantidade total de genes envolvidos na via com base nos bancos de dados do IPA.

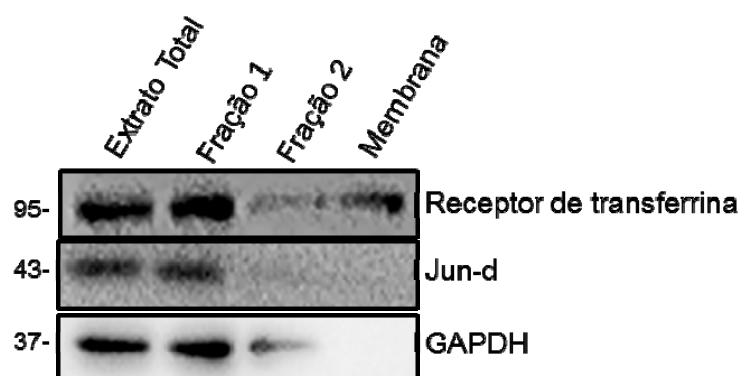
## **4.2 MARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA À TERAPIA NEOADJUVANTE EM ADENOCARCINOMA DE RETO**

Em adenocarcinomas de reto estádios II e III, os pacientes são submetidos à terapia neoadjuvante com radio e quimioterapia, e em seguida são submetidos à ressecção cirúrgica. Na avaliação anatomopatológica da peça cirúrgica de 10 a 45% dos pacientes apresentam resposta completa patológica (RCp), ou seja, ausência de células tumorais viáveis. Sugere-se que estes pacientes que respondem completamente à terapia neoadjuvante, se pudessem ser identificados por outro método, não necessitariam passar pelo procedimento cirúrgico. Porém, ainda não é possível identificar clinicamente os pacientes que obtiveram RCp após receberem o tratamento neoadjuvante. Nesse contexto, visando cumprir um dos objetivos desse trabalho, foi realizada uma análise proteômica de biópsias pré-tratamento neoadjuvante comparando as amostras de pacientes que apresentaram RCp com pacientes que não apresentaram RCp. Através desta análise espera-se encontrar marcadores que possam identificar e separar esses dois grupos de pacientes antes de realizarem a ressecção cirúrgica.

Com o objetivo de encontrar marcadores de resposta e não resposta que além de separar os dois grupos de pacientes tenham potencial terapêutico, utilizamos um protocolo de enriquecimento da fração de membrana celular (HAN et al. 2011) conforme descrito em material e métodos.

Uma abordagem inicial para o estabelecimento do protocolo de fracionamento subcelular foi conduzido na linhagem SW837 e a presença de

proteínas marcadores de cada fração foi avaliada por Western blotting (Figura 19). A fração correspondente a membrana mostra positividade para o receptor de transferrina (membrana) e não se observa contaminação com proteínas de outras frações celulares como JunD e GAPDH, marcadores de núcleo e citoplasma, respectivamente. Desta forma, esta metodologia pareceu adequada para a extração de proteínas de membrana nas biópsias tumorais.

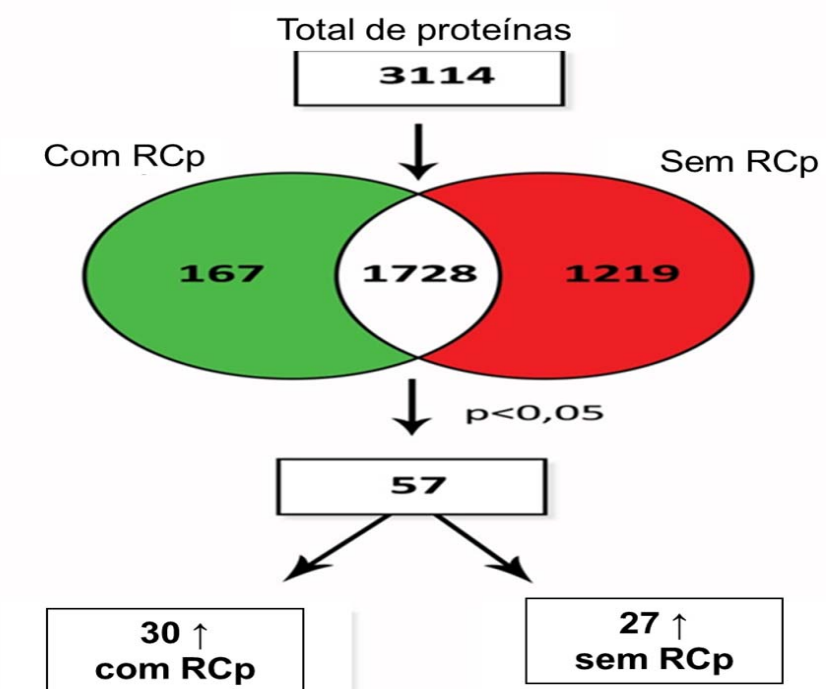


**Figura 19** - Enriquecimento de proteínas da fração de membrana celular. O extrato celular de células SW837 foi processado para separação de frações subcelulares (fração 1, 2 e membrana) conforme protocolo descrito nos materiais e métodos. As proteínas marcadoras de cada fração subcelular foram detectadas por western blotting com anticorpos específicos para o receptor de transferrina, JunD e GAPDH, marcadores de membrana, núcleo e citoplasma, respectivamente.

Para a análise proteômica foram selecionadas biópsias de tumores de 20 pacientes com adenocarcinoma de reto, estádios clínicos II e III dos quais 5 apresentaram resposta completa (RCp) ao tratamento neoadjuvante e 15 não tiveram resposta. Após a realização do protocolo de enriquecimento de proteínas de membrana nestas amostras, a análise proteômica foi conduzida no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) de Campinas, e comparou

através da espectrometria de massa os níveis da expressão proteica nas biópsias tumorais dos pacientes com resposta completa ou sem resposta ao tratamento adjuvante. Foram consideradas proteínas diferentemente expressas aquelas que tiveram o valor de  $p$  menor que 0,05 (*Student t test*). Foram identificadas 3114 proteínas, sendo que 57 apresentaram níveis de expressão significativamente diferentes: 30 proteínas com aumento da expressão no grupo de pacientes com RCp em comparação aos pacientes sem resposta, enquanto 27 proteínas apresentaram aumento da expressão no grupo de pacientes sem resposta quando comparadas ao grupo com RCp (Figura 20). A lista completa com as proteínas diferentemente expressas entre os dois grupos de pacientes encontra-se no anexo 5, ordenadas de acordo com o valor de  $p$  (**Anexo 5**). Além disso foram identificadas 167 proteínas expressas exclusivamente nas biópsias de pacientes com RCp, e 1219 proteínas expressas somente em biópsias de pacientes sem RCp (Figura 20). No anexo 6 estão as proteínas identificadas em apenas um dos grupos de pacientes, sendo que, somente foram consideradas as proteínas que estavam expressas em pelo menos 40% dos pacientes do grupo em questão (**Anexo 6**). Esse resultado mostra que pacientes respondedores e não respondedores à terapia neoadjuvante para câncer de reto apresentam, antes de receber a terapia, um perfil distinto de expressão proteica no tumor.

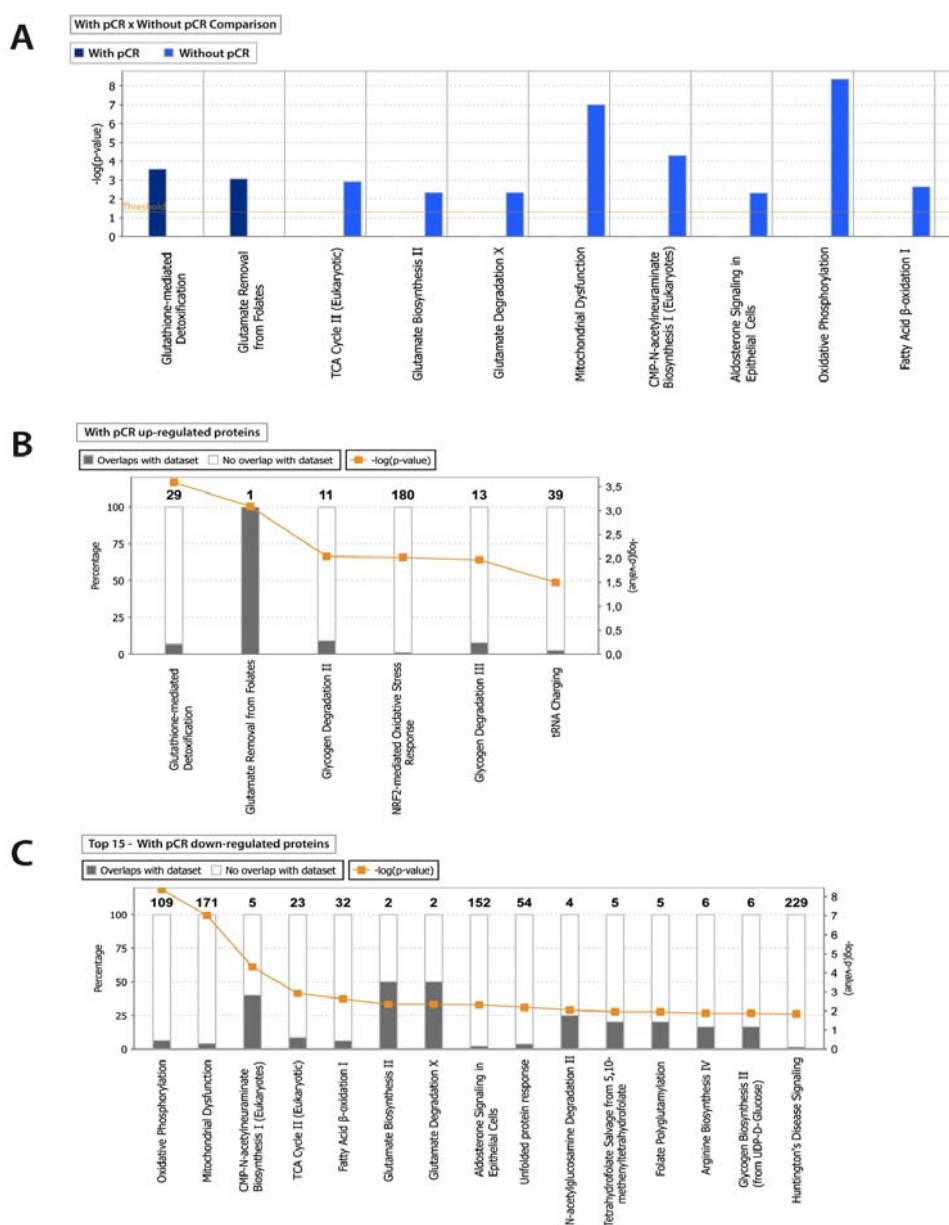




**Figura 20** - Análise proteômica de biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto com RCp e sem RCp. Foram identificadas 3114 proteínas, dessas 1728 comuns aos dois grupos de pacientes. 167 proteínas foram identificadas exclusivamente no grupo com RCp, enquanto 1219 exclusivamente no grupo sem RCp. 57 proteínas tiveram expressão diferente entre os grupos sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Destas 27 proteínas apresentaram aumento da expressão no grupo sem resposta, enquanto 30 proteínas apresentaram aumento de expressão no grupo de pacientes com RCp.

Com o objetivo de aprofundar a análise dos resultados obtidos na proteômica, selecionamos as proteínas com aumento significativo da expressão no grupo com RCp, diminuição significativa da expressão no grupo com RCp ou com expressão exclusiva no grupo sem RCp em pelo menos 40% das amostras e submetemos a uma análise no programa IPA. Uma lista de vias de sinalização celular mais significativas para cada grupo de proteínas foi gerada (Figura 21A).

As proteínas com aumento da expressão no grupo de pacientes com RCp destacam-se as vias de detoxificação mediada por glutathione e degradação de glicogênio (Figura 21B). As proteínas com aumento de expressão ou exclusivas do grupo sem resposta estão vias relacionadas a fosforilação oxidativa, disfunção mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e biossíntese de glicogênio (Figura 21C). Esses resultados sugerem que o perfil de expressão de proteínas dentro de cada grupo pode influenciar na resposta desses tumores à terapia.



**Figura 21** - Análise de vias das proteínas com aumento e diminuição da expressão em biópsias tumorais de pacientes com RCp. As proteínas com diferença de expressão estatisticamente significativa entre os pacientes com e sem RCp, além das proteínas exclusivas de um grupo (presente em mais de 40% das amostras) foram analisados no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). **A)** Lista comparando as vias mais significativas entre as proteínas com aumento e diminuição da expressão no grupo de pacientes com RCp (azul forte = aumento da expressão grupo com RCp, e azul fraco = diminuição da expressão no grupo com RCp); **B)** Lista das principais vias que as proteínas com aumento da expressão em pacientes com RCp estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). **C)** Lista das top 15 vias que as proteínas com diminuição da expressão em pacientes com RCp estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Em cada barra está sinalizado em cinza a quantidade relativa de proteínas encontradas em relação a quantidade total de proteínas envolvidas na via com base nos bancos de dados do IPA.

Apesar do resultado mostrado na Figura 19 apontar que foi possível enriquecer a fração de membrana, com pouca contaminação de outras frações celulares, os resultados obtidos na proteômica mostram um grande número de proteínas citoplasmáticas e nucleares. Isso deve-se ao fato de o protocolo utilizado ser para enriquecimento da fração de membrana e não a purificação de proteínas de tal fração, e além disso pela diferença de sensibilidade entre os métodos, sendo a espectrometria de massa consideravelmente mais sensível do que o *western blotting*.

As proteínas de membrana que apresentaram aumento da expressão estatisticamente significativo no grupo de pacientes com RCp foram: HLA-B e HLA-DRB1, duas proteínas do complexo de histocompatibilidade, a primeira de classe I e a segunda de classe II; mucina-13; e prominina-1 (Quadro 1).

**Quadro 1** - Proteínas de membrana com aumento de expressão no grupo COM RCp

Protein IDs
HLA-B_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, B-59 alpha chain
MUC13_HUMAN Mucin-13
PROM1_HUMAN Prominin-1
HLA-DRB1_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-8 beta chain

Já as proteínas de membrana que apresentaram aumento da expressão estatisticamente significante ou foram detectadas exclusivamente nos pacientes sem RCp foram: EMC4, HV305, BGH3, TCAM2, HLA-DRB4 e VAPA (Quadro 2).

**Quadro 2** - Proteínas de membrana com aumento de expressão ou exclusiva do grupo SEM RCp

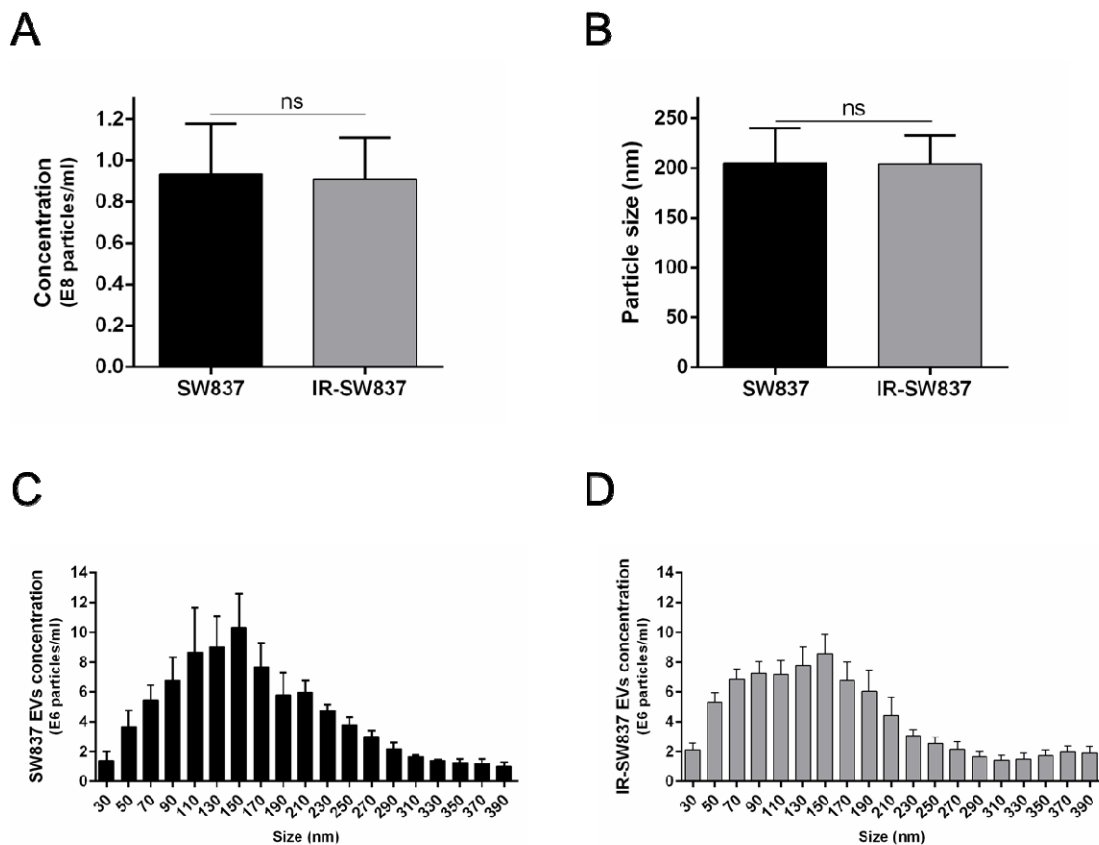
Protein IDs
EMC4_HUMAN ER membrane protein complex subunit 4
HV305_HUMAN Ig heavy chain V-III region BRO
BGH3_HUMAN Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
TCAM2_HUMAN Isoform 2 of TIR domain-containing adapter molecule 2
HLA-DRB4_HUMAN major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
VAPA_HUMAN VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A

### 4.3 O PERFIL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE RETO E SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA À TERAPIA

#### 4.3.1 Concentração, Tamanho e Cargo Proteico das VEs Secretadas por Células de Adenocarcinoma de Reto SW837 e IR-SW837

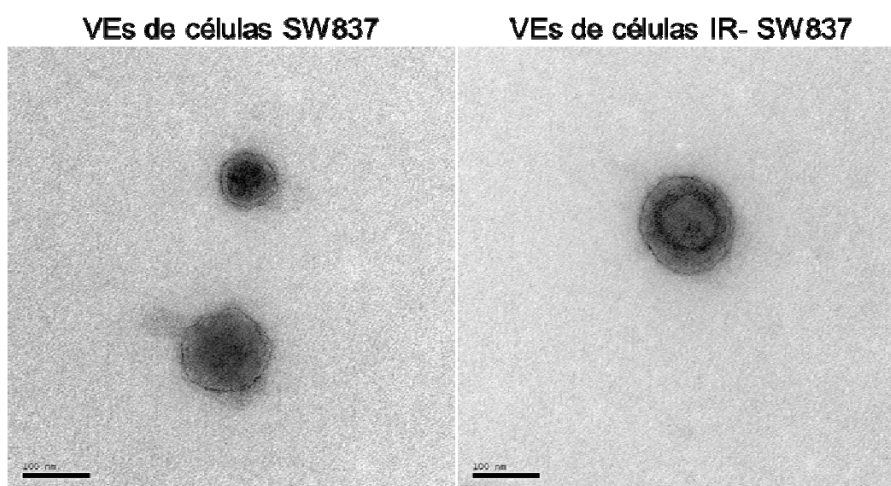
Com o objetivo de caracterizar as VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto e avaliar o efeito da radiação ionizante na quantidade e no tamanho das VEs secretadas por essas células, isolamos as VEs liberadas durante 48 horas pelas células SW837 e IR-SW837, para na sequência analisá-las no equipamento *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). O resultado mostrou que não há diferença na quantidade de VEs secretadas pelas células SW837 e IR-SW837, sugerindo que a RI não afeta a secreção, em termos de quantidade de VEs (Figura 22A). Também foi observado que o tamanho médio das VEs também não sofre alteração na células IR-SW837 em relação às células SW837 (Figura 22B). Na Figura

22C e 22D estão representadas as concentrações de VEs por tamanho das mesmas, nas células SW837 e IR-SW837, respectivamente.



**Figura 22** - Perfil das VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837. Após 48 horas de carecimento, o MCT de células SW837 e IR-SW837 foi coletado e as VEs isoladas conforme protocolo previamente descrito **(A)** O gráfico de barras representa a média  $\pm$  SD da concentração de VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837 (E8 partículas/mL) determinada por 3 experimentos independentes. NS (*not significant*) = sem diferença estatística, *unpaired t test*; **(B)** O gráfico de barras representa a média  $\pm$  SD do tamanho (nm) das VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837 determinada por 3 experimentos independentes. NS (*not significant*) = sem diferença estatística, *unpaired t test*; **(C)** O gráfico de barras representa a média  $\pm$  SEM da concentração por tamanho das VEs secretadas por células SW837 (E6 partículas/mL) determinada por 3 experimentos independentes; **(D)** O gráfico de barras representa a média  $\pm$  SEM da concentração por tamanho das VEs secretadas por células IR-SW837 (E6 partículas/mL) determinada por 3 experimentos independentes.

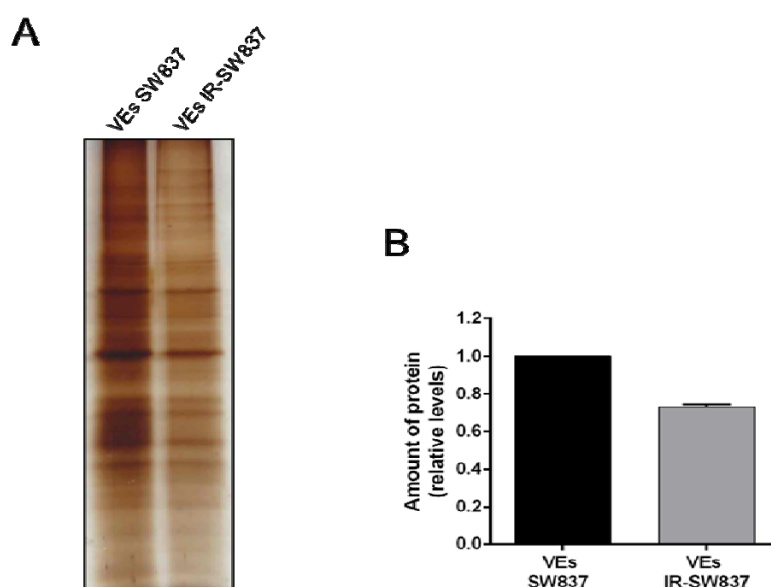
Para melhor caracterizar as partículas isoladas realizamos ensaios de microscopia eletrônica. As imagens mostram que tanto as VEs de células SW837 quanto de células IR-SW837 apresentam o mesmo formato discoide, com tamanhos entre 50 e 150nm. Esse resultado demonstra que com a metodologia utilizada conseguimos isolar VEs com grande pureza. Como o número de VEs que aparecem nas imagens é baixo, não foi possível comparar, de forma mais fidedigna, os tamanhos de VEs de células SW837 e IR-SW837 através desta técnica (Figura 23).



**Figura 23** - Microscopia eletrônica de VEs isoladas de células SW837 e IR-SW837. Células SW837 e IR-SW837 foram carenciadas por 48 horas, o MCT foi coletado e as VEs isoladas por ultracentrifugação. Após fixação e preparação das VEs em telas Formvar Carbon Film as mesmas foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900), a 80 kV. A esquerda imagem representativa das VEs de células SW837, e a direita imagem representativa de VEs de células IR-SW837. Barra de escala = 100nm.

As proteínas são um dos principais componentes das VEs. Durante a biogênese dos exossomos as proteínas são selecionadas e passam a fazer parte do revestimento (estrutura membranosa), bem como podem ser

carregadas no interior dessas VEs. Visando identificar se as VEs de células SW837 e IR-SW837 têm um carregamento proteico diferente, as mesmas foram isoladas e quantificadas. As mesmas quantidades de VEs das duas células foram aplicadas em gel de eletroforese, e na sequência as proteínas foram coradas com prata. O resultado mostrou que as VEs provenientes de células IR-SW837 apresentam um carregamento proteico 27% menor que as VEs secretadas por células SW837 (Figura 24). Esse resultado indica que a RI é capaz de alterar o carregamento proteico das VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto.



**Figura 24** - Carregamento proteico de VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837. As VEs de células SW837 e IR-SW837 foram isoladas e quantificadas por NTA. **A)** A mesma quantidade de VEs foi carregada em um gel e após a eletroforese as proteínas foram coradas com prata seguindo o protocolo do kit PageSilver™ Silver Staining. **B)** A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o programa ImageJ. A quantidade de proteína nas VEs de células SW837 foi ajustada para 1 e a quantidade de proteína nas VEs IR-SW837 representa nível relativo comparado ao primeiro. O gráfico de barras representa a média normalizada da quantidade de proteína determinada por 2 experimentos independentes.

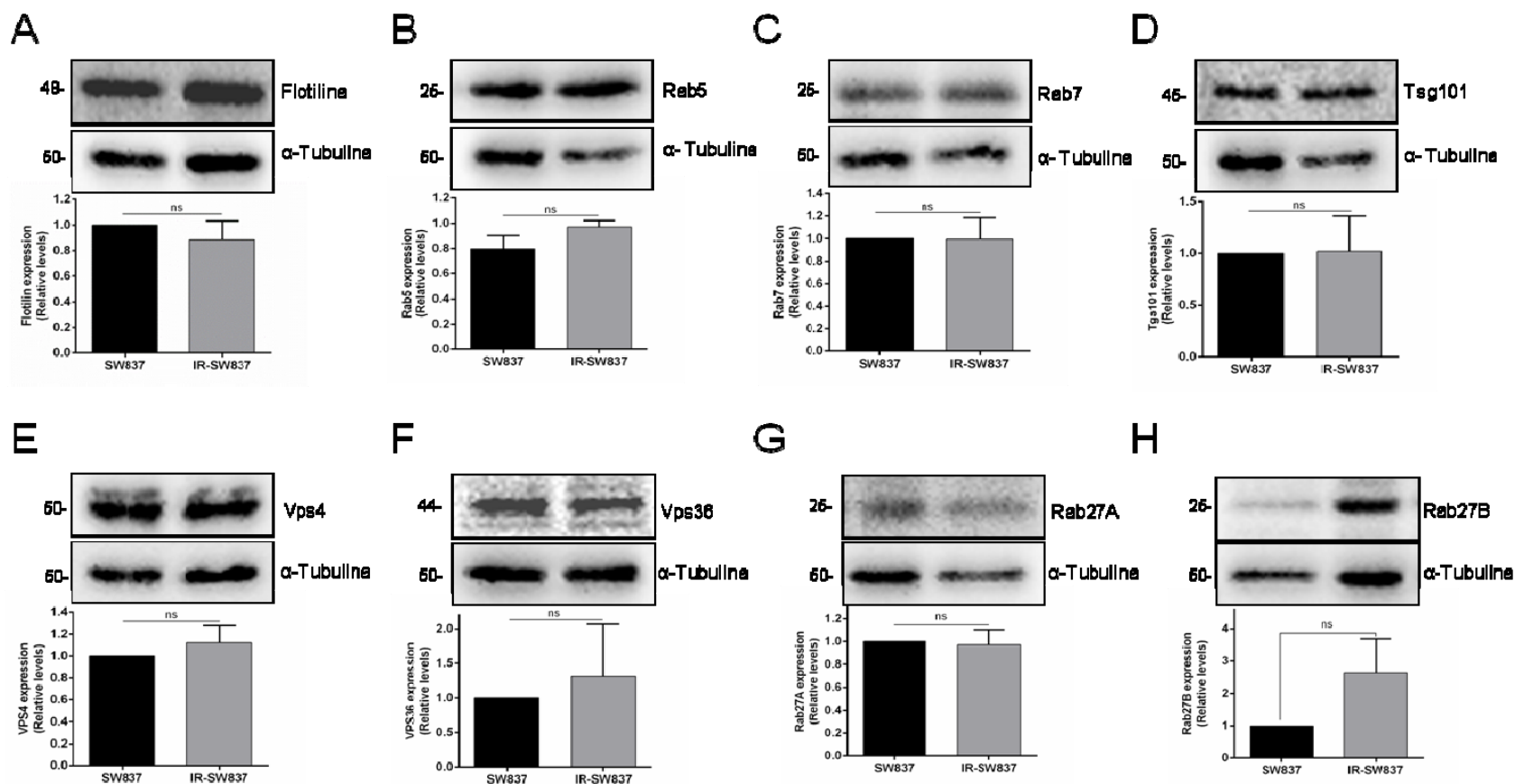


#### 4.3.2 Screening da Expressão das Proteínas Envolvidas na Biogênese e Secreção de VEs em Células SW837 e IR-SW837

Após a observação que as VEs secretadas por células IR-SW837 apresentam um menor carregamento proteico quando comparadas as células SW837, decidimos realizar um *screening* das proteínas envolvidas em etapas importantes da biogênese e secreção das VEs, desde a via endossomal até a formação dos corpos multivesiculares e liberação das VEs para o espaço extracelular. Para isso preparamos extratos celulares de células SW837 e IR-SW837 e através da técnica de WB foi quantificada a expressão das proteínas envolvidas na via. As proteínas flotilina, Rab5, e Rab7, envolvidas na endocitose, formação de *early* endossomos, e *late* endossomos, respectivamente, não apresentaram diferença na expressão entre as células SW837 e IR-SW837 (Figura 25A-C). As proteínas Tsg101, Vps36 e Vps4, componentes do ESCRT-I, ESCRT-II, e ESCRT-III, respectivamente, também não apresentaram diferença de expressão entre as células irradiadas e parentais (Figura 25D-F). A proteína Rab27A, com papel no direcionamento e acoplamento dos corpos multivesiculares na membrana plasmática, não apresentou diferença na sua expressão (Figura 25G), porém a proteína Rab27B, que tem a mesma função de Rab27A, apesar de não ser estatisticamente significativa, apresentou um aumento de sua expressão nas células IR-SW837 quando comparada às células SW837 (Figura 25H).

Interessantemente, apesar do fato das VEs de ambas as células analisadas apresentarem diferente carregamento proteico, não foi observada

nenhuma diferença na expressão das proteínas envolvidas na biogênese ou proteínas do complexo dos ESCRTs. Por outro lado, as células apresentaram diferença na expressão de Rab27B, proteína importante na fase final do processo secretório, porém, esse fato não alterou a quantidade de VEs secretadas pelas células IR-SW837.

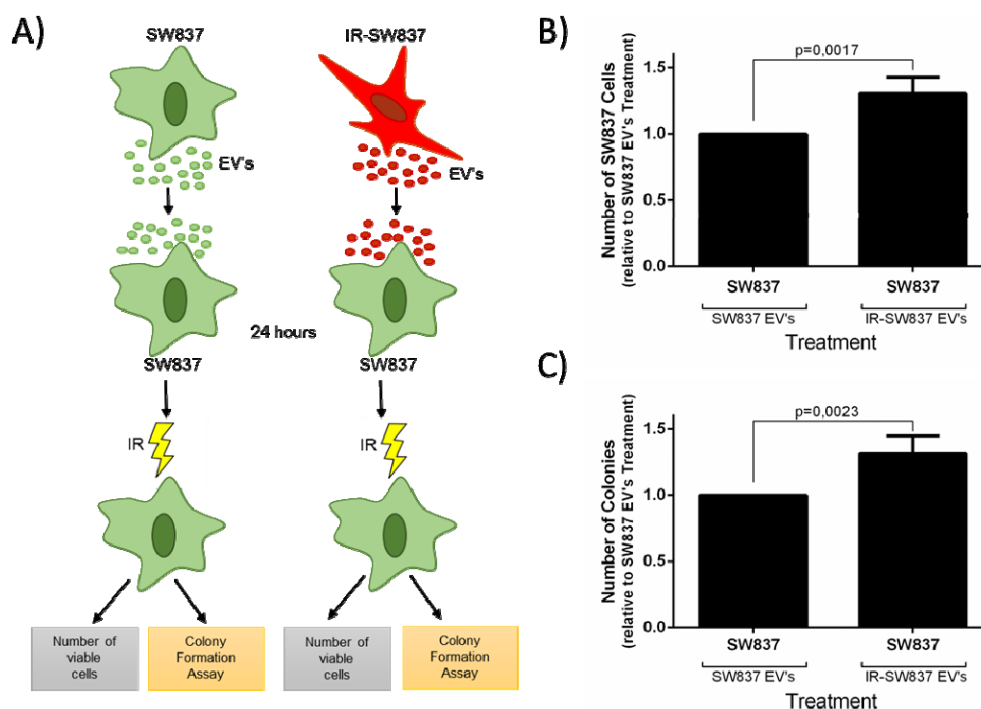


**Figura 25** - Expressão das proteínas envolvidas na biogênese e secreção de VEs nas células SW837 e IR-SW837. Foi preparado o extrato celular de SW837 e IR-SW837 e as proteínas quantificadas através de WB. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o programa ImageJ. A quantidade de proteína nas células SW837 foi ajustada para 1 e a quantidade de proteína nas células IR-SW837 representa níveis relativos comparado ao primeiro. Os gráficos de barras representam a média normalizada da quantidade de proteína  $\pm$  SEM determinada por 3 experimentos independentes. ns (*not significant*) = sem diferença estatística. As proteínas avaliadas foram: Flotiline (**A**), Rab5 (**B**), Rab7 (**C**), Tsg101 (**D**), Vps4 (**E**), Vps36 (**F**), Rab27A (**G**), e Rab27B (**H**).

#### **4.3.3 Células IR-SW837 Transferem Resistência à RI para Células SW837 através das VEs**

O papel das VEs na comunicação intercelular, bem como sua contribuição na tumorigênese e metástase tem se tornado um tema emergente no estudo do câncer. Além disso, o efeito *bystander*, onde células irradiadas transferem características às células não irradiadas sem o contato célula-célula, é um dos fenômenos descritos em modelos de RI. Para determinar se em nosso modelo, as células irradiadas (IR-SW837), têm a capacidade de transmitir o fenótipo de resistência às outras células não irradiadas (SW837), através de VEs, isolamos as VEs das duas células por ultracentrifugação, e tratamos células SW837 parentais com VEs de IR-SW837, ou como controle com VEs de células SW837, por 24 horas. Após o período de tratamento, as células SW837 foram irradiadas com dose de 6Gy e plaqueadas para avaliarmos a sobrevivência após 5 dias e capacidade de formação de colônia após 14 dias (Figura 26A). Células SW837 tratadas com VEs provenientes de células IR-SW837 apresentaram um maior número de células viáveis após 5 dias, além de produzirem um maior número de colônias, quando comparadas às células SW837 tratadas com suas próprias VEs (Figura 26B e 26C). Esse resultado obtido em nosso modelo *in vitro* sugere que em adenocarcinoma de reto, as VEs podem ter papel importante na transferência de resistência a radioterapia de uma célula a outra. Dessa forma, descobrir quais os mecanismos, bem como os componentes proteicos envolvidos na transmissão dessa característica permitiria uma

melhor compreensão do papel das VEs, bem como explorá-las como marcadores ou alvos terapêuticos nesses tumores.



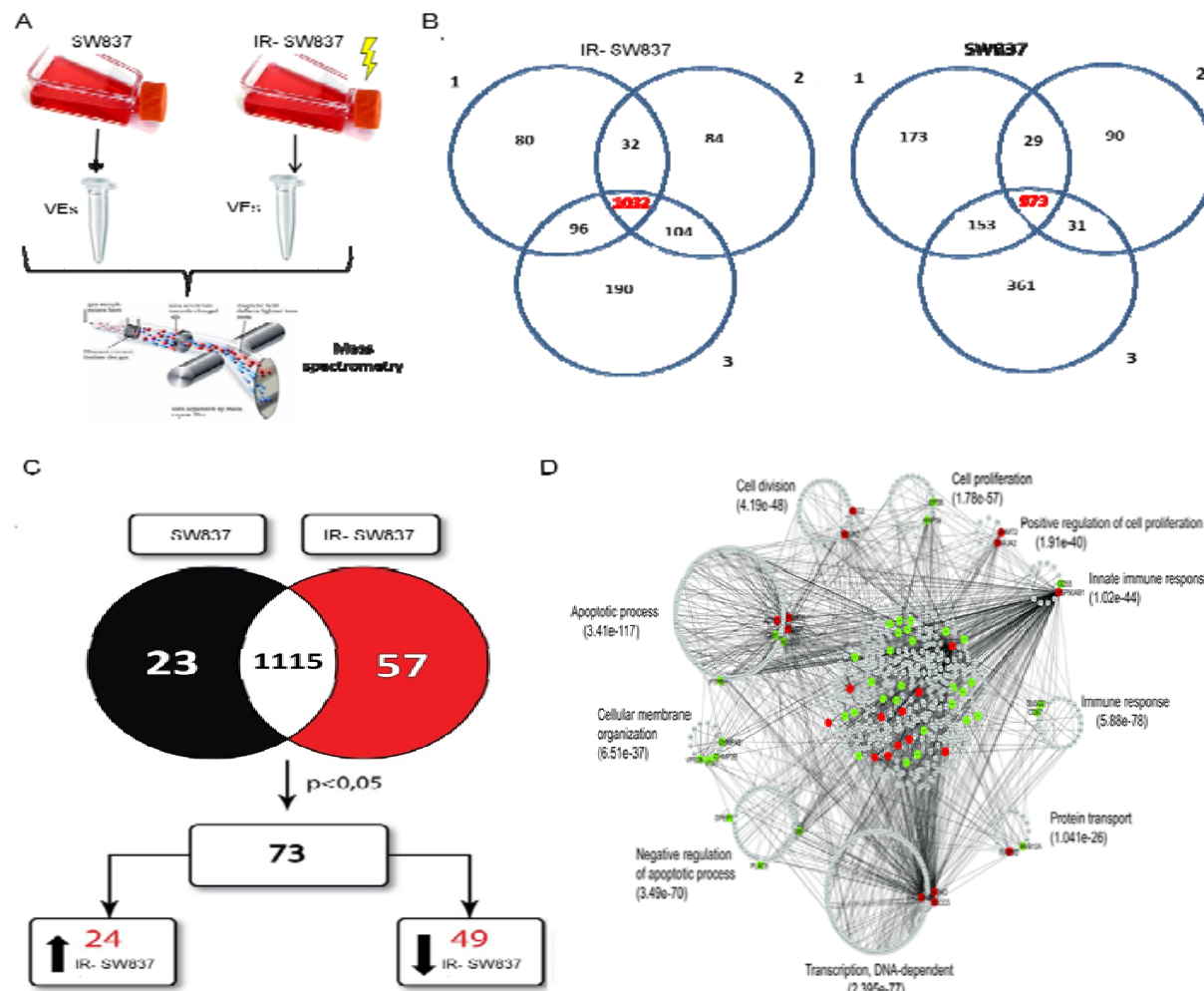
**Figura 26** - Transferência de resistência à RI através de VEs **(A)** Esquema mostrando o desenho experimental do ensaio. VEs (EVs) isoladas de células SW837 (verde) e IR-SW837 (vermelho) foram usadas para tratar células SW837 por 24h. Após esse período as células foram irradiadas com 6Gy e plaqueadas para avaliar viabilidade e capacidade de formar colônias; **(B)** Viabilidade celular das células SW837 tratadas com VEs de SW837 ou IR-SW837, 5 dias após IR com 6Gy. O número de células do controle (SW837 +VEs SW837) foi ajustada para 1 os valores de SW837 + VEs IR-SW837 representam níveis relativos comparados ao controle. O gráfico de barras representa a média normalizada da contagem de células  $\pm$  SD determinada por 3 experimentos independentes.  $p=0,0017$ , *one-sample t test*. **(C)** Quantidade de colônias (eficiência de plaqueamento) formadas pelas células SW837 tratadas com VEs de SW837 ou IR-SW837 14 dias após RI com 6Gy. O número de colônias do controle (SW837 +VEs SW837) foi ajustada para 1 os valores de SW837 + VEs IR-SW837 representam níveis relativos comparados ao controle. O gráfico de barras representa a média normalizada da contagem de colônias  $\pm$  SD determinada por 3 experimentos independentes.  $p=0,0023$ , *one-sample t test*.

#### **4.3.4 Análise Proteômica de VEs Secretadas por Células SW837 e IR-SW837**

As VEs secretadas por células da linhagem de adenocarcinoma de reto SW837 com e sem RI não mostraram diferença na quantidade secretada, mas apresentaram uma diferença no carregamento proteico dessas VEs. Além disso, as VEs de células IR-SW837 foram capazes de transmitir a resistência à RI para células não irradiadas. Com base nesses resultados, decidimos realizar uma análise proteômica das VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837 com o objetivo de identificar possíveis alterações no perfil proteico das VEs após as células serem submetidas a RI, e dessa forma encontrar proteínas vesiculares que possam estar envolvidas na transferência de resistência à RI para células não irradiadas.

As VEs de células SW837 e IR-SW837 foram isoladas conforme protocolo já descrito anteriormente, porém, acrescentando um passo extra de lavagem com PBS por ultracentrifugação para aumentar a pureza das VEs isoladas (Figura 27A). Realizamos três experimentos independentes, dessa forma foram analisadas através de espectrometria de massa três amostras de cada tipo celular, as quais apresentaram alta correlação quanto ao número de proteínas encontradas em cada uma das análises (Figura 27B). Foram identificadas 1115 proteínas comuns às VEs das células parentais e irradiadas, 23 proteínas foram encontradas exclusivamente em VEs de células SW837, enquanto 57 proteínas foram encontradas exclusivamente em VEs de células IR-SW837. Foram encontradas ainda 73 proteínas com diferença de expressão estatisticamente significativa entre as

VEs de células SW837 e IR-SW837 ( $p \leq 0,05$ ). Destas, 24 proteínas estavam com aumento da expressão nas VEs de células IR-SW837, enquanto 49 proteínas estavam com diminuição da expressão nas VEs de células IR-SW837, quando comparadas às células SW837 (Figura 27C). Através de um *Network* de interação proteína-proteína, podemos observar os processos biológicos que as proteínas com aumento da expressão (pontos vermelhos) e com diminuição de expressão (pontos verdes) nas VEs de células IR-SW837 estão envolvidas. Entre os processos biológicos com proteínas que diminuíram a expressão nas VEs após a RI estão a resposta imunológica, a proliferação celular e os reguladores negativos de apoptose; enquanto processos biológicos como divisão celular, transcrição e reguladores positivos de proliferação tiveram proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837 (Figura 27D).



**Figura 27** - Análise proteômica de VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837.

**A)** Esquema mostrando o desenho experimental: após 48h de careciamento, o MCT das células SW837 e IR-SW837 foi removido e as vesículas isoladas por ultracentrifugação (3x). O pellet seco contendo as VEs foi quantificado e submetido à análise proteômica por espectrometria de massa;

**B)** Diagrama de Venn mostrando a correlação dos achados entre os 3 experimentos realizados independentemente;

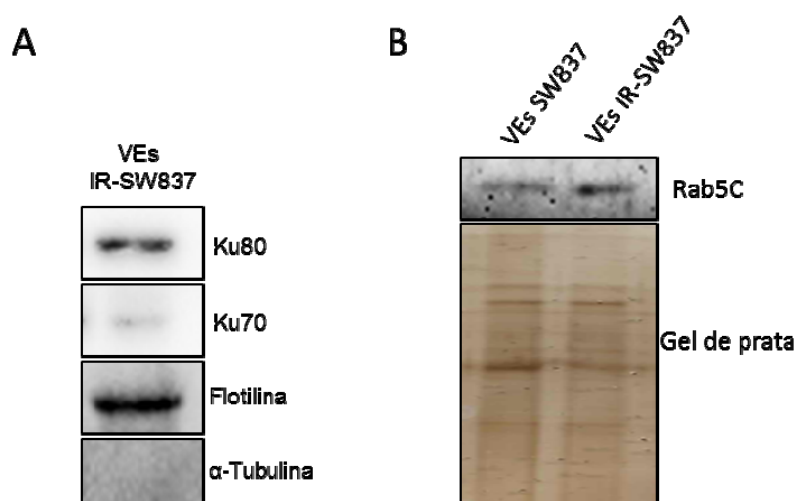
**C)** Diagrama mostrando um resumo dos achados na proteômica: 1.115 proteínas comuns às VEs de células SW837 e IR-SW837; 23 proteínas exclusivas de VEs de células SW837; 57 exclusivas de VEs de células IR-SW837; 73 proteínas tiveram diferença de expressão estatisticamente significativa entre as amostras ( $p \leq 0.05$ ); 24 com aumento da expressão e 49 com diminuição da expressão em VEs de células IR-SW837;

**D)** Network de interação proteína-proteína construído no IIS software. Os processos biológicos enriquecidos ( $p \leq 0.05$ ) entre proteínas *up-regulated* (vermelho), proteínas *down-regulated* (verde) e ao fundo proteínas intermediárias (cinza) do banco de dados IIS estão retratadas em uma network através da junção de proteínas envolvidas em cada processo formando um círculo.



O Anexo 7 contém a lista completa de todas as proteínas com diferença de expressão estatisticamente significativa entre as VEs de células SW837 e IR-SW837, bem como as proteínas que foram identificadas exclusivamente em um dos grupos. Entre as proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837 quando comparadas as VEs de células SW837, e com o menor valor de  $p$ , estão duas proteínas metiltransferases (NSUN2 e GLYM), duas proteínas ligadas a reparo de DNA (Ku70 [XRCC6] e Ku80 [XRCC5]), além de Rab5C. Estas 3 últimas são proteínas que já demosstramos nesse trabalho serem importantes para a resistência a terapia em adenocarcinoma de reto.

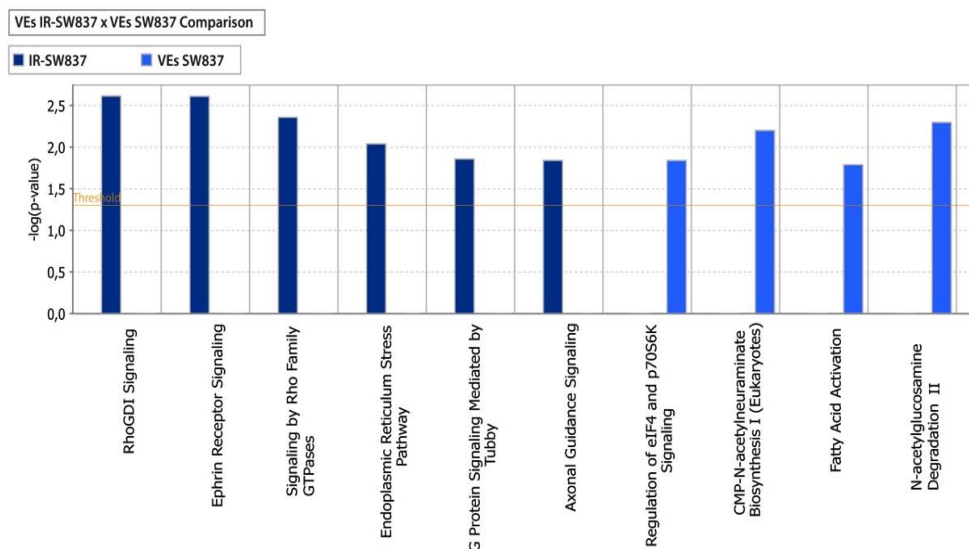
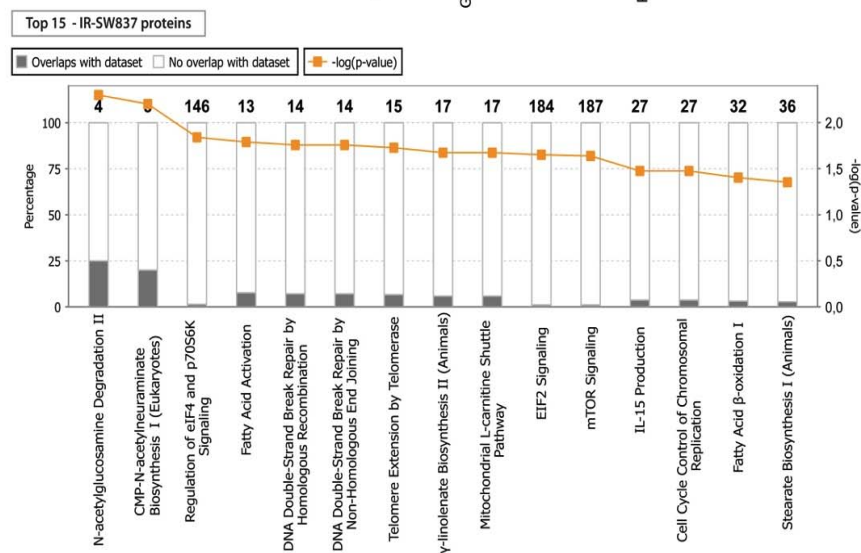
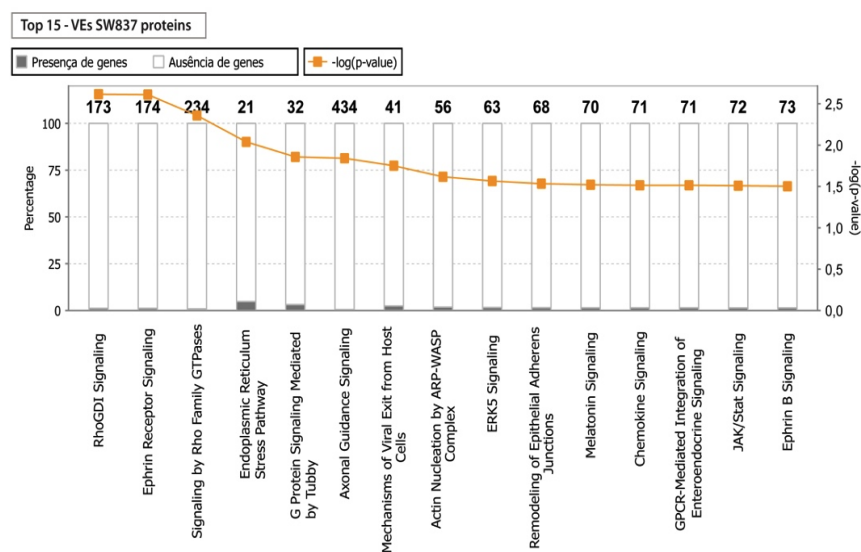
Para validar esse achado da proteômica, isolamos as VEs de células IR-SW837 e observamos através de WB que as proteínas Ku70 e Ku80 estão realmente expressas nessas VEs. Como marcador de VEs utilizamos a proteína flotilina e como marcador de extrato celular utilizamos tubulina. Como é possível observar, apenas a flotilina foi detectada, confirmando a pureza das VEs analisadas (Figura 28A). A expressão de Rab5C foi comparada entre as VEs de células SW837 e IR-SW837. O resultado confirmou os dados obtidos na proteômica, onde Rab5C aumenta sua expressão em VEs de células IR-SW837 em comparação às VEs de células SW837. Como controle de carregamento utilizamos a técnica de corar as proteínas com prata (gel de prata) (Figura 28B).



**Figura 28** - Validação da expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C em VEs por WB. **A)** As VEs de células IR-SW837 foram isoladas, as proteínas precipitadas com TCA 15% e quantificadas por Bradford. Através de WB foram analisadas as expressões das proteínas usando anticorpos específicos para Ku70 e Ku80, além de flotilina e tubulina como marcadores de VEs e conteúdo celular, respectivamente. **B)** As VEs de células SW837 e IR-SW837 foram isoladas, as proteínas precipitadas com TCA 15% e quantificadas por Bradford. Através de WB foi analisada a expressão da proteína Rab5C usando anticorpo específico para mesma. Um  $\mu$ l de cada amostra foi aplicado em gel para ser corado com prata e utilizado como controle de carregamento.

A análise das vias nas quais as proteínas com diferente expressão entre VEs de células SW837 e IR-SW837 estão envolvidas foi realizada utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Os resultados mostram que as proteínas com diferente expressão entre as VEs das duas células fazem parte de vias de sinalização diferentes (Figura 29A). As proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837 estão preferencialmente envolvidas em vias como degradação de N-acetilglucosamina, regulação da sinalização de eIF4 e p70S6K, ativação de ácidos graxos, sinalização de EIF2, sinalização de mTOR, produção de IL-

15,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, e destacadamente as vias de reparo de quebra de dupla fita de DNA por recombinação homóloga e reparo por NHEJ (Figura 29B). Já as proteínas com diminuição da expressão nas VEs de células irradiadas estão envolvidas em vias como sinalização de RhoGDI, sinalização de receptores ephrin e sinalização da família Rho de GTPases (Figura 29C).

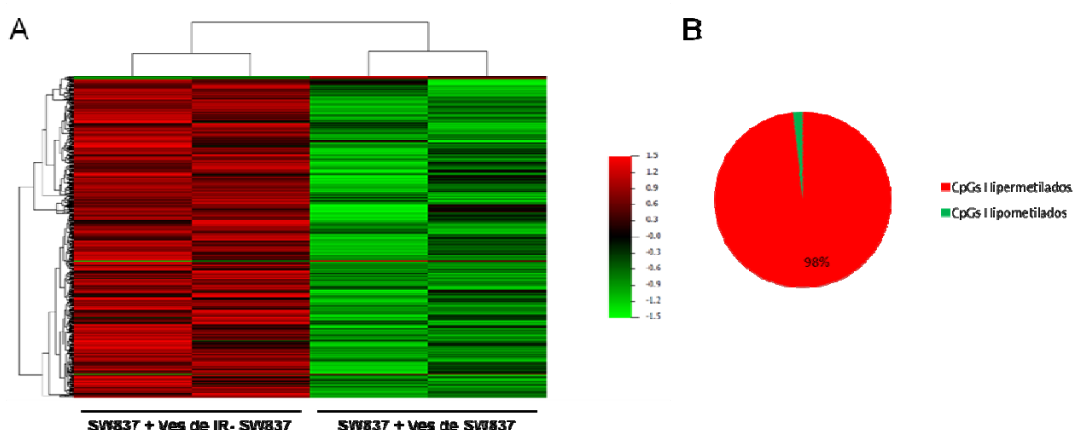
**A****B****C**

**Figura 29** - Análise de vias para as proteínas com aumento e diminuição da expressão em VEs de células IR-SW837 em relação às VEs células SW837. As proteínas com diferença de expressão estatisticamente significativa entre as VEs das duas células foram analisadas no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). **A)** Lista com as principais vias que as proteínas de VEs de células SW837 e IR-SW837 estão envolvidas (azul forte = aumento da expressão em VEs IR-SW837, e azul fraco = diminuição da expressão em VEs IR-SW837); **B)** Lista das top 15 vias que as proteínas com aumento da expressão em VEs de célula IR-SW837 estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). **C)** Lista das top 15 vias que as proteínas com diminuição da expressão em VEs de células IR-SW837 estão envolvidas, ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Em cada barra está sinalizado em cinza a quantidade relativa de proteínas encontradas em nossa análise em relação a quantidade total de proteínas envolvidas na via com base nos bancos de dados do IPA.

#### **4.3.5 Análise do Perfil de Metilação das Células SW837 Tratadas com VEs de Células IR-SW837**

Quando comparamos a expressão proteica entre VEs de células IR-SW837 com as VEs das células SW837 observamos o aumento significativo de 24 proteínas. NSUN2, uma metiltransferase, foi a proteína com o menor valor de  $p$  encontrado. Além disso, entre os 10 menores valores de  $p$  encontramos a proteína GLYM, outra metiltransferase. Com base nesse resultado, realizamos o tratamento de células SW837 com VEs de células IR-SW837 durante 72 horas, e após esse tempo o DNA foi extraído para análise do perfil de metilação das células tratadas. Como controle foi utilizado células SW837 tratadas com suas próprias VEs. As células SW837 tratadas com VEs de células irradiadas (IR-SW837), apresentaram um perfil de hipermetilação em 98% das sondas em relação as células SW837 tratadas com VEs delas mesmas (SW837), enquanto apenas 2% das sondas mostraram hipometilação nessa mesma comparação (Figura 30A e 30B).

Este resultado sugere que as VEs isoladas de células IR-SW837 são capazes de mudar o perfil de metilação de células SW837 não irradiadas, sendo essas mudanças em sua imensa maioria de hipermetilação.



**Figura 30** - Perfil de metilação de células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 e SW837. **A)** *Heat map* mostrando os resultados de metilação comparativa entre as células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 e às tratadas com VEs de células SW837 em uma duplicata técnica. A cor verde representa sondas hipometiladas em relação a outra amostra, enquanto a cor vermelha representa sondas hipermetiladas em relação a outra amostra. **B)** Gráfico de setores que mostra a porcentagem de sondas hipometiladas (verde) e hipermetiladas (vermelho) nas células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 em relação às tratadas com VEs de células SW837.

Abaixo estão listados os 20 genes hipermetilados e hipometilados (Top 20) com a maior diferença de Delta Beta entre as células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 em comparação com às células SW837 tratadas com VEs de células SW837 (Tabelas 4 e 5). Foram selecionados somente sondas mapeadas em região promotoras (5'UTR, TSS1500 e TSS200) ou próximas ao promotor (1stExon).

**Tabela 4** - Top 20 genes hipermetilados em células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 comparadas às tratadas com VEs de células SW837

Probe	HUGO Symb	PROMOTER	SW837+Ves de SW837	SW837+Ves de IR-SW837	Delta Beta SW837+VEs IR-SW837/ SW837+Ves SW837
cg08128228	POU2F1	5'UTR	0,106970994	0,409635316	0,302664322
cg13626624	SCRT2	5'UTR	0,13435356	0,414212238	0,279858678
cg16146432	EGFEM1P	TSS200	0,204226578	0,457282753	0,253056175
cg03909902	PRDM4	5'UTR	0,201467102	0,448841958	0,247374856
cg01994308	PLAG1	5'UTR	0,407181598	0,640526737	0,233345139
cg13566059	TFDP3	TSS200	0,467195106	0,695644884	0,228449778
cg08206623	CDKN1C	TSS1500	0,417932127	0,629188785	0,211256658
cg01162053	SLC23A2	TSS1500	0,4915417	0,699213342	0,207671643
<b>cg09700085</b>	SLC6A20	1stExon	0,246765039	0,444989213	0,198224175
<b>cg15871371</b>	FOXP1	5'UTR	0,586302641	0,784165843	0,197863202
cg09661984	SNORD115-46	TSS1500	0,415913552	0,612815107	0,196901555
<b>cg27562023</b>	RPH3AL	5'UTR	0,535036653	0,731004349	0,195967696
cg05629721	PSMB8	5'UTR	0,173648646	0,369014268	0,195365622
cg16078269	ZBTB7C	TSS1500	0,604749402	0,797694386	0,192944984
cg20982606	UNG	TSS1500	0,231369631	0,423998029	0,192628398
cg26519141	ATP10A	TSS1500	0,534569082	0,724570982	0,1900019
cg24552697	ARHGAP29	5'UTR	0,671812689	0,861150028	0,189337339
cg19863639	IL2RG	TSS1500	0,519257392	0,707443492	0,1881861
cg00555094	NANP	TSS1500	0,577531764	0,765673278	0,188141515
cg18432105	MYH2	TSS1500	0,679620821	0,867472239	0,187851418

Sondas em negrito estão mapeadas em regiões de *enhancers*.

**Tabela 5** - Top 20 genes hipometilados em células SW837 tratadas com VEs de células IR-SW837 comparadas às tratadas com VEs de células SW837

Probe	HUGO Symb	PROMOTER	SW837+Ves de SW837	SW837+Ves de IR-SW837	Delta Beta SW837+VEs IR-SW837/ SW837+Ves SW837
cg27242549	ZC3H8	5'UTR	0,492501387	0,2423983	-0,250103088
cg02732134	DNMBP	5'UTR	0,544089019	0,312565345	-0,231523674
cg25906151	ASNS	TSS1500	0,514701792	0,342439017	-0,172262775
cg25046584	TIAM1	TSS1500	0,567547829	0,409843241	-0,157704588
cg16303562	MSR1	TSS200	0,791773073	0,658417981	-0,133355092
cg07638884	ROBO2	TSS1500	0,528883144	0,409383719	-0,119499426
cg18969004	HCG27	TSS1500	0,333684548	0,214473605	-0,119210943
cg08397459	PRSS54	TSS200	0,588424915	0,470458348	-0,117966567
cg25644323	ST3GAL6	TSS1500	0,616469213	0,499374798	-0,117094416
cg09879107	CNR1	5'UTR	0,387542633	0,271039538	-0,116503095
cg14387505	AHSP	TSS1500	0,332413902	0,216966489	-0,115447413
cg18242712	DBX1	TSS1500	0,342307867	0,232722874	-0,109584993
cg20811856	TMEM51	TSS1500	0,264757503	0,156391036	-0,108366467
cg25613170	TBKBP1	TSS200	0,41984711	0,313104959	-0,106742151
cg11812810	TTC9	TSS1500	0,266506795	0,160369428	-0,106137367
cg07319143	SYPL2	TSS1500	0,40449742	0,300467758	-0,104029663
cg14228484	CNNM4	1stExon	0,475854369	0,373939353	-0,101915016
cg27615468	FAM127B	TSS1500	0,682210538	0,782222441	0,100011903
cg16597665	RNF2	TSS1500	0,777130371	0,877144655	0,100014284
cg22157173	ATP11A	3'UTR	0,717497948	0,817513533	0,100015585

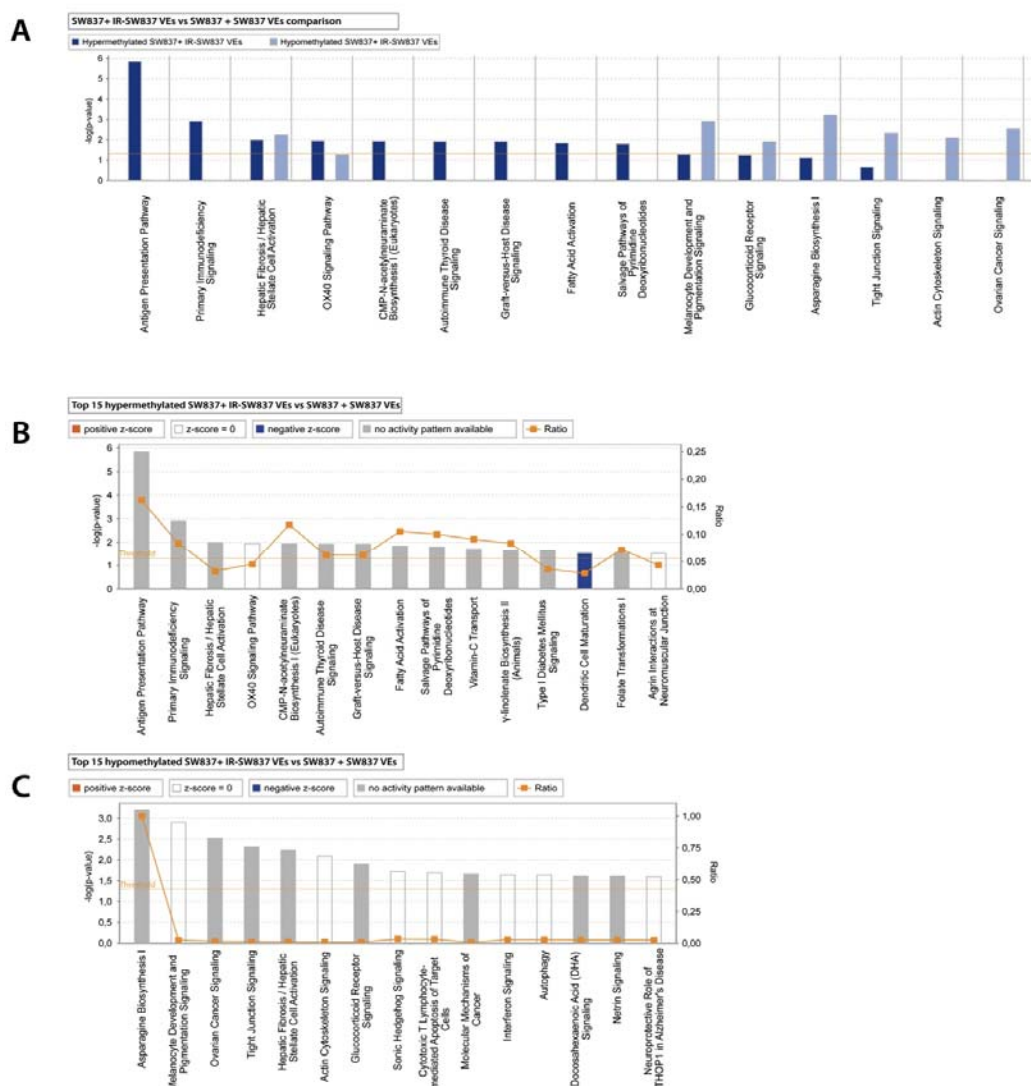
Com o objetivo de avaliar quais vias de sinalização celular foram mais afetadas tanto na hipermetilação causada pelo tratamento com VEs de células irradiadas, como nos 2% de genes hipometilados por tais VEs, selecionamos os genes com valor de Delta Beta maior que 0,15 para o grupo de genes hipermetilados, e valor menor que -0,15 para o grupo de genes hipometilados e submetemos à análise pelo programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). O resultado dessa análise é mostrado em uma lista



das vias de sinalização celular que apresentaram as alterações mais significantes com base no perfil de metilação dos genes envolvidos nas mesmas (Figura 31A). Além disso as vias com alterações mais significativas específicas do grupo de genes hipermetilados está ordenada de forma decrescente de acordo com a significância (Figura 31B). Da mesma forma para o grupo de genes hipometilados (Figura 31C).

No grupo de genes hipermetilados destacam-se as vias de apresentação de antígeno, sinal de imunodeficiência primária, maturação de células dendríticas, entre outros. Com base nos valores de *z-score*, e análise dos reguladores *upstream* a via de maturação de células dendríticas encontra-se inativada. Interessantemente, o tratamento com VEs de células IR-SW837 promoveu nas células SW837 a hipermetilação de genes envolvidos em diversas vias imunológicas, o que sugere uma possível diminuição da expressão de proteínas envolvidas nesses processos e inativação dessas vias. Para confirmar tais hipóteses, experimentos adicionais, como de expressão destas proteínas deverão ser realizados.

Já na lista de genes hipometilados, as vias em destaque são biossíntese de asparagina, sinalização de *tight junction*, sinalização de citoesqueleto de actina, sinalização de interferon, autofagia e vias mais gerais como por exemplo mecanismos moleculares do câncer.



**Figura 31** - Análise de vias relacionadas aos genes hipo e hipermetilados em células SW837 tratadas com VEs IR-SW837 em relação às células SW837 tratadas com VEs SW837. Os genes com valor de Delta Beta menor que -0,15 (hipometilados), e valor maior que 0,15 (hipermetilados) foram analisados no programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). **A)** Lista comparando a significância de hiper e hipometilação nas vias com as maiores diferenças; **B)** Lista das vias hipermetiladas nas células SW837 tratadas com VEs IR-SW837 comparadas às células SW837 tratadas com VEs SW837 ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). Vias em azul indicam z-score significativamente negativo ( $\leq -2$ ); **C)** Lista das vias hipometiladas nas células SW837 tratadas com VEs IR-SW837 comparadas às células SW837 tratadas com VEs SW837 ordenando a partir da via mais significativa (da esquerda para a direita). O *ratio* indica a quantidade de genes encontrados nesta análise relativa a quantidade total de genes envolvidos na via com base nos bancos de dados do IPA.

#### **4.4 A PROTEÍNA A33 COMO MARCADOR DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL EM CÂNCER COLORRETAL E MARCADOR DE VES PROVENIENTE DESTE TECIDO**

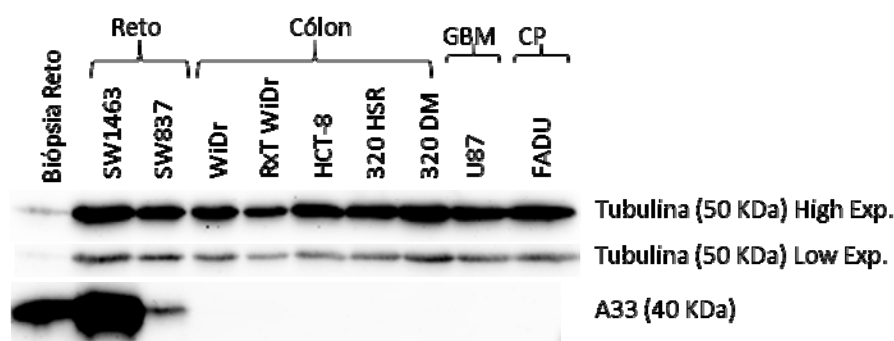
##### **4.4.1 Expressão da Proteína A33 em Diferentes Linhagens Celulares e em VEs Provenientes de Célula de Adenocarcinoma de Reto**

Outro objetivo desse trabalho foi isolar VEs provenientes exclusivamente do tecido colorretal, para dessa forma analisa-las separadamente e melhor compreender o papel das mesmas nestes tumores. Para isso ser possível, é necessário encontrar uma proteína tecido-específico, ou seja, uma proteína expressa exclusivamente no tecido colorretal. Além disso, essa proteína deve ser secretada em VEs, e localizar-se na membrana das mesmas, permitindo assim a captura de tais VEs.

A proteína A33 foi descrita como sendo eficaz para a captura e purificação de VEs provenientes de células de tecido colorretal (MATHIVANAN et al. 2010). A33 é uma glicoproteína de membrana de 43KDa, homóloga a superfamília de imunoglobulinas, a qual é composta de em um domínio transmembrana e um domínio intracelular curto com quatro sítios de acetilação (HEATH et al. 1997; RITTER et al. 1997). Análises de imuno-histoquímica mostraram que A33 é expressa em células epiteliais da região pilórica do estômago, intestino delgado, cólon e reto. Também foi descrita sua expressão em 95% dos tumores colorretais (GARINCHESA et al. 1996; WELT et al. 1990). A função de A33 ainda não é completamente entendida, mas tem sido associada a processos imunológicos, proliferação e

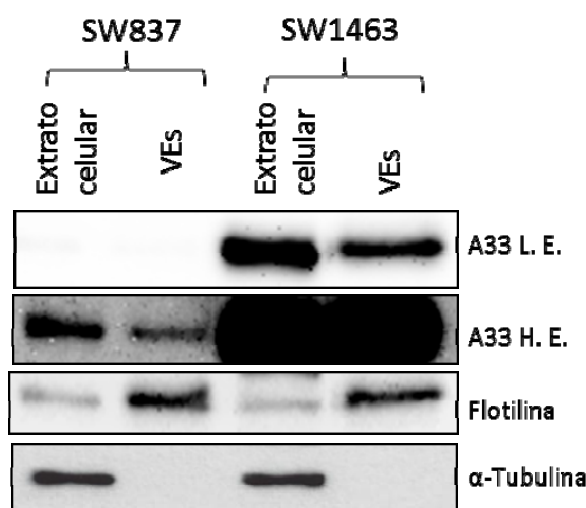
reparo da mucosa do cólon em modelo animal de colite (PEREIRA-FANTINI et al. 2010).

Para confirmar a expressão de A33 exclusivamente em tecido colorretal, além de comparar a diferença da expressão dessa proteína entre o cólon e o reto, utilizamos duas linhagens celulares de adenocarcinoma de reto (SW837 e SW1463), quatro linhagens de tumores de cólon (WiDr, HCT8, 320 HSR e 320 DM), uma de glioblastoma (U87), uma linhagem de tumor de cabeça e pescoço (FaDu), além de uma biópsia de um paciente diagnosticado com adenocarcinoma de reto. Em análise por *Western blotting*, encontramos a expressão de A33 apenas nas duas linhagens de adenocarcinoma de reto testadas (SW837 e SW1463) e na biópsia do paciente com adenocarcinoma de reto. Surpreendentemente não foi observada a expressão dessa proteína nas linhagens de câncer de cólon (WiDr, HCT8, 320 HSR e 320 DM). Como esperado, nas linhagens de glioblastoma (U87) e de tumor de cabeça e pescoço (FaDu) não foi identificada a expressão de A33 (Figura 32). Com base nesse resultado, a proteína A33 mostrou-se um marcador aparentemente tecido específico, podendo ser usada para isolar e estudar vesículas provenientes de tecido retal.



**Figura 32** - Express6o de A33 em bi6psia de adenocarcinoma de reto e diferentes linhagens celulares. Foram preparados extratos de uma bi6psia de adenocarcinoma de reto, das linhagens de adenocarcinoma de reto SW1463 e SW837, das linhagens de tumores de c6lon WiDr (parental e irradiada), HCT-8, 320HSR, 320DM, da linhagem de glioblastoma U87 e da linhagem de tumor de cabe6a e pesco6o FaDu, e as prote6inas detectadas por *Western blotting* usando anticorpo espec6fico para A33, al6m de  $\alpha$ -tubulina como controle de carregamento.

Para avaliar se as VEs secretadas por linhagens celulares de adenocarcinoma de reto t6m expressam a prote6ina A33, isolamos as VEs das c6lulas SW837 e SW1463 e atrav6s de *Western blotting* quantificamos a express6o dessa prote6ina. As VEs de ambas as linhagens de adenocarcinoma de reto expressam a prote6ina A33, por6m as VEs secretadas pelas c6lulas SW1463 apresentaram uma quantidade expressivamente maior de A33 em compara66o 6s c6lulas SW837. Vale ressaltar que essa mesma diferen6a 6 observada na express6o de A33 quando avaliada em extrato celular dessas duas c6lulas. Como marcador e normalizador de VEs foi utilizada a prote6ina flotilina, e como marcador e normalizador de extrato celular utilizamos a prote6ina  $\alpha$ -tubulina (Figura 33).



**Figura 33** - Expressão de A33 em VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto. Foram isoladas VEs de células SW837 e SW1463, bem como extratos celulares dessas duas linhagens. As proteínas foram detectadas por *Western blotting* usando anticorpo específico para A33, além de anti-flotilina como marcador e controle de carregamento para as VEs, e anti- $\alpha$ -tubulina como marcador e controle de carregamento do extrato celular. (H.E: *high exposition* e L.E: *low exposition*)

Estes resultados mostrando que a proteína A33 é expressa predominantemente em linhagens celulares de adenocarcinoma de reto, além de ser abundantemente secretada em VEs, abre a possibilidade, de em projetos futuros, usarmos o plasma de pacientes com adenocarcinoma de reto para isolar VEs secretadas pelo epitélio retal. O isolamento de VEs secretadas especificamente pelo tecido retal poderia fornecer informações importantes a respeito do tumor, bem como contribuir no diagnóstico, acompanhamento da progressão, e como marcador de resposta a terapia anticâncer.

#### **4.4.2 Expressão da Proteína A33 em Tumores Colorretais e Relação com o Grau de Diferenciação Tumoral**

Depois de avaliar a expressão de A33 em linhagens celulares, foram selecionadas lâminas com tecido tumoral de 12 casos de câncer colorretal diagnosticados entre 2000 e 2007 no AC Camargo Cancer Center, para realizar IHQ e analisar a expressão de A33 em tumores de diferentes graus de diferenciação. Os casos foram distribuídos de acordo com o grau de diferenciação tumoral, sendo: bem, moderadamente e pouco diferenciado, além de adenocarcinoma mucinoso. Para confirmar os achados nos 12 casos, foi realizada a IHQ para A33 em 194 casos de câncer colorretal organizados em um TMA (*Tissue Microarray*). Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista experiente para confirmar o grau de diferenciação dos tumores, bem como a marcação para A33. Os dados obtidos com esse trabalho deram origem a um artigo científico, o qual já foi submetido para publicação e encontra-se no anexo 9. Abaixo está descrito de forma resumida os principais achados do trabalho.

Como a proteína A33 é expressa especificamente no trato digestivo e tumores colorretais, a mesma tem sido estudada como um potencial alvo terapêutico para melhorar a resposta ao tratamento e a sobrevida nos pacientes com CCR metastático. Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm testado a eficácia do anticorpo anti-A33 como um alvo terapêutico nos pacientes em questão. Inicialmente, ensaios pré-clínicos foram promissores (WELT et al. 1996), porém, ensaios clínicos não confirmaram os resultados positivos (BENDELL et al. 2014). O nosso trabalho revelou que amostras de

tumores bem diferenciados e uma fração dos tumores moderadamente diferenciados apresentam marcação de membrana forte e homogênea para A33, enquanto os tumores pouco diferenciados e mucinosos apresentam marcação fraca e por vezes citoplasmática e nuclear para A33. Os tumores moderadamente diferenciados apresentam marcação variada para A33, desde forte e homogênea, até heterogênea e fraca.

Como os participantes dos ensaios clínicos realizados até o momento usando anti-A33 não foram selecionados de acordo com a marcação positiva desta proteína, isso poderia explicar os dados inconsistentes de resposta a tal tratamento. Assim sendo, esse trabalho sugere que em ensaios clínicos futuros os pacientes com CCR metastático devem ser selecionados com base na expressão de membrana de A33 para receber tal terapia (**Anexo 9**).



## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 MARCADORES E MECANISMO DE RESISTÊNCIA À TERAPIA NEOADJUVANTE EM ADENOCARCINOMA DE RETO**

A RI induz uma série de alterações a nível de DNA, de forma direta pela deposição de energia, e indireta através das espécies reativas de oxigênio (O'DRISCOLL e JEGGO 2006), levando à importantes alterações na expressão gênica e consequentemente na expressão de proteínas. Estudos prévios já mostraram que em linhagens celulares a RI promove alteração de expressão em uma grande quantidade de genes (LEE et al. 2010), além de uma significativa alteração na expressão de proteínas (JUNG et al. 2012). Estudo recente avaliou tecidos de CCR pré e pós-tratamento radioterápico e encontrou aumento da expressão em 30 genes relacionados ao reparo de dano no DNA (HUANG et al. 2011a). Porém, até o momento não existem resultados a partir de técnicas de larga escala que avaliem tecido tumoral de adenocarcinoma de reto pré e pós-tratamento neoadjuvante buscando encontrar genes ou proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência à radioterapia.

Na primeira parte desse trabalho foi realizada uma análise proteômica para comparar o perfil de expressão proteica entre biópsias tumorais pré-tratamento e tumores residuais presentes após radioquimioterapia neoadjuvante de pacientes com adenocarcinoma de reto em estádios II e III.

Nossas análises encontraram um grande número de proteínas que aumentam e que diminuem sua expressão significativamente após o tratamento neoadjuvante. Essas proteínas não só podem ser biomarcadores como também podem estar atuando nos diversos processos celulares desencadeados pelo tratamento. As proteínas que modificam sua expressão podem estar atuando nos mecanismos que levaram a resistência ao tratamento pelas células tumorais.

Entre as diversas proteínas com alteração na expressão depois da neoadjuvância, decidimos direcionar nossa análise para aquelas envolvidas no reparo do dano de DNA, processo fundamental para a resistência celular à RI (HUBER et al. 2013), e proteínas envolvidas no tráfico intracelular, importante mecanismo de transmissão dos sinais de membrana para o interior da célula. Nesse estudo observamos que os tumores de reto resistentes ao tratamento neoadjuvante com radioquimioterapia expressam altos níveis de Ku70 e Ku80, proteínas envolvidas nos mecanismos de reparo de DSB de DNA, além de Rab5C, proteína com funções no tráfico intracelular. Trabalhos prévios mostraram que altos níveis de expressão de Ku70 e Ku80 correlacionam-se com pior prognóstico em pacientes com câncer de reto, enquanto a baixa expressão destas proteínas foi associada a uma melhora significativa na sobrevida (KOMURO et al. 2002). As proteínas Ku70 e Ku80 são ainda mais abundantes em tumores de pele não-melanoma (PARRELLA et al. 2006) e CCR (MAZZARELLI et al. 2005) quando comparados aos respectivos tecidos não tumorais e sua alta expressão também está associada com a tumorigênese dos tumores de

mama (ABDELBAQI et al. 2013). Por sua vez, a proteína Rab5 também tem expressão aumentada em câncer de mama (WANG et al. 2011), e sua isoforma Rab5A é mais expressa em tumores de ovário (ZHAO et al. 2010), pulmão (LI et al. 1999) e mama (CHEN et al. 2012) quando comparados aos respectivos tecidos não tumorais. Porém, não são ainda conhecidas alterações nos níveis de expressão da isoforma Rab5C em tumores humanos.

Com o objetivo de gerar um modelo de célula de adenocarcinoma de reto resistente a radioterapia, submetemos a linhagem celular SW837 a três ciclos de RI. As células geradas denominadas IR-SW837 confirmaram o fenótipo de maior resistência a RI como previamente descrito (GURYEV et al. 2009) e tornaram-se modelo neste estudo. As células IR-SW837 mostraram, ao menos temporariamente (12 passagens), uma mudança de morfologia para um fenótipo mais fusiforme, semelhante à morfologia já observada anteriormente para células de carcinoma de endométrio (TSUKAMOTO et al. 2007). Apesar de estudos prévios mostrarem que a RI em outras células promove um aumento da capacidade de invasão (GUERRA et al. 2008; JADHAV e MOHANAM 2006) e proliferação (LIANG et al. 2011), em nosso modelo as células IR-SW837 não apresentaram nenhuma destas características quando comparada às células parentais (SW837).

Um dos danos de DNA mais letais induzido por RI é a quebra de dupla fita de DNA (DSBs), sendo que a principal via de reparo desse dano é a via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (O'DRISCOLL e

JEGGO 2006). A NHEJ é realizada pelo complexo DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), o qual é composto pelo heterodímero formado por Ku70 e Ku80, por DNA-PKcs (subunidade catalítica), além do complexo formado por DNA ligase IV e XRCC4. Se os danos no DNA não são reparados as células morrem por catástrofe mitótica ou apoptose (BEGG et al. 2011). Por esta razão, a atividade dos mecanismos de reparo de DNA determinam a resposta à RI e é essencial para a sobrevivência celular (HUBER et al. 2013; JEGGO e LAVIN 2009). Nesse trabalho nós demonstramos que as células IR-SW837 aumentaram os níveis de expressão de Ku70, Ku80 e Rab5C quando comparadas às parentais. Em concordância com estes dados, estudos *in vitro* têm mostrado que a diminuição da expressão de Ku70 e Ku80 leva a uma diminuição da atividade de reparo de DSBs e sensibiliza células de diferentes tipos tumorais à RI (HU et al. 2013; KOIKE et al. 2011; LI et al. 2013; VANDERSICKEL et al. 2010). Além disso, a inibição de DNA-PK efetivamente sensibiliza células tumorais e enxertos de tumores humanos implantados em camundongos à radioterapia (VEUGER et al. 2003; COWELL et al. 2005).

Estudos anteriores apontam dados muito interessantes relacionados a via de sinalização não clássica de EGFR, indicando que após estímulo o EGFR pode ser internalizado e translocar-se para o núcleo, onde atua como fator de transcrição ou coativador, promovendo a transcrição de genes relacionados a diferentes processos celulares, como por exemplo o reparo de DNA (LIN et al. 2001; LO e HUNG 2007). Um desses estímulos é a RI, que promove a ligação de EGFR à DNA-PK, aumentando sua atividade de

reparo do DNA (DITTMANN et al. 2008; SCHMIDT-ULLRICH et al. 1997). Já o bloqueio da translocação nuclear de EGFR induzida por RI suprime a atividade de DNA-PK e sensibiliza as células à RI (DITTMANN et al. 2005b; HUANG et al. 1999). Em nosso modelo, células parentais SW837 tratadas por RI ou células IR-SW837 apresentam maior internalização de EGFR, e um aumento da expressão das proteínas de reparo de DNA Ku70 e Ku80. Como consequência o aumento da resistência à RI das células IR-SW837 é mostrada por maior sobrevivência celular e maior capacidade clonogênica.

Uma série de estudos tem mostrado que a translocação de EGFR para o núcleo é importante para a resistência tumoral à terapia. Em câncer de mama, pacientes com EGFR nuclear tiveram uma pior sobrevida global quando comparadas às pacientes com EGFR não detectável no núcleo (HADŽISEJDIĆ et al. 2010; LO et al. 2005). Resultados similares foram observados em uma coorte de 221 pacientes com câncer de ovário (XIA et al. 2009). Em carcinomas de orofaringe, EGFR nuclear foi correlacionado com a ausência total ou parcial de resposta à primeira linha de quimioterapia, maiores taxas de recorrência e pior sobrevida livre de doença em 5 anos comparado aos tumores com baixos níveis de EGFR no núcleo (PSYRRI et al. 2005). Apesar das fortes evidências já publicadas mostrando a relação entre EGFR, reparo de DNA e resistência à RI, o mecanismo completo, bem como os potenciais reguladores desse processo seguem desconhecidos.

Estudos recentes demonstraram a importância de proteínas da família Rab no tráfico endomembrana, na internalização de receptores e no tráfico

intracelular (CHEN et al. 2014; WANDINGER-NESS e ZERIAL 2014; WHEELER et al. 2015). Dentre 60 membros da família Rab, Rab5 é conhecida por ser reguladora máster da via endocítica (BUCCI et al. 1995; ZEIGERER et al. 2012), sendo responsável pelo controle da fusão homotípica de endossomos (GORVEL et al. 1991), o movimento vesicular nos microtúbulos (HOEPFNER et al. 2005), e a internalização e tráfego de receptores de superfície transdutores de sinais (BARBIERI et al. 2000). Rab5 também tem papel essencial e específico na internalização e tráfego de EGFR (CHEN et al. 2009). São conhecidas três isoformas diferentes de Rab5: Rab5A, Rab5B e Rab5C, as quais são codificadas por genes distintos (GURKAN et al. 2005) e são funcionalmente diferentes (CHEN et al. 2014; CHIARIELLO et al. 1999). Interessantemente, em nosso estudo, a análise proteômica que comparou biópsia pré-tratamento com tumor residual pós-tratamento radioquimioterápico revelou um aumento significativo apenas da isoforma Rab5C.

Nos últimos anos Rab5C tem sido apontada como ligante de EGFR, e essa associação pode ter implicações relevantes na terapia anticâncer. Primeiro foi descrito que Rab5C ativada pela sinalização de EGFR é crucial para promover a associação intracelular dessas duas proteínas; o silenciamento por siRNA do mRNA de Rab5C aboliu a associação entre essas proteínas, bloqueou a reciclagem de integrinas  $\beta 1$  induzidas por EGF, bem como a atividade invasiva de células de câncer de mama (ONODERA et al. 2012). Mais recentemente Rab5C foi descrita como sendo alvo de TBC1D16 em melanomas, resultando em uma importante regulação

de EGFR. Esse mecanismo foi associado com o aumento da progressão do melanoma, pior prognóstico clínico e maior sensibilidade à inibidores de BRAF e MEK (VIZOSO et al. 2015).

Com base nessas evidências inibimos a expressão de Rab5C nas células IR-SW837 e mostramos que essa proteína é essencial para a internalização e tráfego de EGFR em células de adenocarcinoma de reto. Existem dois pontos que sugerem a importância de Rab5C na internalização de EGFR: primeiro, as células IR-SW837 resistentes a RI apresentaram aumento nos níveis de expressão de Rab5C e internalizam o EGFR mais rapidamente que as células SW837; e segundo, quando a expressão de Rab5C foi abolida por siRNA nas células IR-SW837 a internalização de EGFR ficou diminuída quando comparada aquela das células IR-SW837. Finalmente, a deleção de Rab5C nas células IR-SW837 promoveu uma diminuição na expressão de Ku70 e Ku80, e diminuição da capacidade de resistência à RI. Juntos esses resultados apontam para o papel de Rab5C na internalização de EGFR e a atividade desse último como fator de transcrição regulando positivamente a expressão das proteínas de reparo de DNA Ku70 e Ku80. Adicionalmente, os resultados indicam pela primeira vez, o papel central desse mecanismo na resistência de células de câncer de reto à RI.

Nesse sentido, nossos resultados podem ser úteis para um melhor entendimento do porquê a maioria dos tumores de reto resistem ao tratamento radioterápico, além de possibilitar o estudo de novas estratégias terapêuticas baseadas nas proteínas-alvo essenciais para a resistência

tumoral ao tratamento neoadjuvante. EGFR parece ter um papel central no processo de sobrevivência celular após RI (HUANG et al. 1999), tornando-se, em teoria, um potencial alvo terapêutico no tratamento neoadjuvante de tumores de reto em combinação com a radioquimioterapia convencional. O anticorpo anti-EGFR (Cetuximab), como tratamento neoadjuvante, tem sido usado de forma exitosa em pacientes com tumores de cabeça e pescoço avançado com metástase locorregional. Quando tratados concomitantemente com alta dose de radioterapia mais cetuximab estes apresentaram melhora do controle locorregional e redução da mortalidade, sem aumento dos efeitos tóxicos associados à radioterapia (BONNER et al. 2006). Um ensaio clínico randomizado de fase 3 confirmou que os pacientes que receberam cetuximab mais radioterapia apresentaram um aumento significativo da sobrevida global em 5 anos quando comparados com aqueles pacientes tratados somente com radioterapia (BONNER et al. 2010).

Por outro lado, em tumores de reto, a terapia neoadjuvante com cetuximab não mostrou resultados conclusivos. Radioquimioterapia mais cetuximab aumentou de forma significativa a resposta radiológica e a sobrevida global em pacientes com câncer de reto e *KRAS/BRAF* selvagem comparada à radioquimioterapia sozinha. Apesar disso, o *end point* primário de resposta completa não foi alcançado (DEWDNEY et al. 2012). Uma busca retrospectiva das mutações em *KRAS* e *NRAS* em *exons* não avaliados no estudo prévio de Dewdney et al. (2012) mostrou a presença de mutação em 13% dos pacientes inicialmente classificados como *KRAS/BRAF* selvagem. Após a reclassificação dos pacientes selvagens, em



uma média de acompanhamento de 63,8 meses, a adição de cetuximab foi associada com um aumento numérico, mas não estatisticamente significativa nas taxas de resposta completa, na sobrevida livre de doença em 5 anos e na sobrevida global em 5 anos (SCLAFANI et al. 2014).

Baseado em nossos resultados, a translocação nuclear de EGFR parece ter um papel importante na radioresistência, porém os ensaios clínicos usando cetuximab como terapia neoadjuvante em câncer de reto não atingiram os objetivos pré-determinados. Uma razão para isso pode estar relacionada com o fato de que mesmo sendo eficiente para bloquear a cascata de sinalização de EGFR, o tratamento com cetuximab não é capaz de bloquear completamente a internalização desse receptor, sendo que após a RI parte do EGFR internaliza e transloca para o núcleo mesmo na presença de cetuximab (DITTMANN et al. 2005b). De fato, nossos dados apontam que células SW837 tratadas com cetuximab e na sequência submetidas à RI apresentam apenas um bloqueio parcial na internalização de EGFR. Resultado semelhante já havia sido observado em um estudo prévio de Dittmann et al. (DITTMANN et al. 2005b). Nossos resultados também mostraram que o tratamento com cetuximab não sensibilizou as células SW837 à RI, fato que pode ser explicado pela ineficiência de tal tratamento no bloqueio completo da internalização de EGFR. Essa observação está de acordo com resultados aquém do esperado observados em pacientes tratados durante a neoadjuvância com cetuximab (DEWDNEY et al. 2012). Acredita-se que mesmo com uso desse anticorpo durante a radioterapia, parte do EGFR pode ser internalizado e translocado para o

núcleo contribuindo para a resistência das células tumorais de reto à radioterapia.

Essas evidências sugerem que uma potencial terapia neoadjuvante para tumores de reto poderia ser a inibição da endocitose de EGFR. Nesse sentido, um estudo recente mostrou que o bloqueio da endocitose de EGFR em células de câncer de pulmão leva a uma diminuição na viabilidade celular pelo aumento da apoptose, indicando que a endocitose de EGFR pode ser um alvo terapêutico em câncer de pulmão ou em outros tumores com EGFR selvagem. De acordo com o que se está discutindo neste trabalho, estudo anterior mostrou que a proteína Rab25 tem um papel importante na endocitose de EGFR (JO et al. 2014). Infelizmente, uma limitação relevante desta abordagem é o fato de não existirem drogas aprovadas para uso clínico com capacidade de bloquear a endocitose específica de EGFR.

Nossos resultados também apontaram Rab5C como um potencial alvo terapêutico para tumores de reto. Inibidores das proteínas da família Rab têm sido desenvolvidos nos últimos anos com base em *high throughput screening*. Estudos preliminares descreveram a especificidade de um inibidor de Rab7 (HONG et al. 2010; AGOLA et al. 2012), porém um estudo mais recente mostrou que esse composto é um Pan inibidor de GTPases, tendo como alvo não somente as proteínas Rab, mas também as proteínas da família Ras e Rho (HONG et al. 2015). Certamente, antes de ser considerado para ensaios clínicos, um inibidor alvo-específico deverá ser desenvolvido e estudado.

Em resumo, nossos resultados até aqui discutidos indicam que inibidores da endocitose de EGFR e da atividade de Rab5C poderiam ter efeitos radiosensibilizadores no tratamento neoadjuvante de câncer de reto, o que poderia resultar em grandes benefícios aos pacientes portadores destes tumores.

Quando testamos a resistência das células SW837 e IR-SW837 ao tratamento quimioterápico com 5-FU não observamos diferença de resistência entre as duas células. Esse resultado reforça ainda mais a hipótese de que ao selecionar células através de repetidos ciclos de RI, geramos uma célula com fenótipo específico de resistência a radioterapia, pois além de não serem mais resistentes ao quimioterápico 5-FU, essas células não adquiriram vantagens proliferativas ou invasivas. Vale reforçar que essa característica é específica de nosso modelo *in vitro* ou das células de câncer de reto pois outros estudos mostraram resultados diferentes dos observados no nosso estudo, sendo que nestes casos a RI promoveu aumento da capacidade de invasão (GUERRA et al. 2008; JADHAV e MOHANAM 2006) e proliferação (LIANG et al. 2011) em células de outro tipos tumorais.

Na avaliação proteômica dos tecidos de pacientes com adenocarcinoma de reto pré e pós-tratamento radioquimioterápico observamos uma grande quantidade de proteínas com expressão significativamente diferente após o paciente receber a RI. Um dos mecanismos melhor descrito de modulação e controle da expressão gênica é a metilação de ilhas CpGs. Dessa forma, decidimos avaliar as alterações

no perfil de metilação causadas pela RI em nosso modelo celular *in vitro* de câncer de reto. As alterações epigenéticas podem levar à diminuição da expressão dos genes quando esses são metilados, ou o aumento da expressão, normalmente quando os genes são desmetilados. Os resultados obtidos mostraram que a RI promove alterações predominantemente de hipometilação em relação às células não irradiadas, fenômeno observado em 90% dos 450.000 sítios avaliados os 10% restantes sofreram hipermetilação do DNA. Estudos anteriores já haviam descrito que a RI é capaz de produzir alterações epigenéticas nas células e modulação diferencial da expressão dos genes modificados (BAE et al. 2015), promovendo alterações funcionais em processos celulares como apoptose e ciclo celular (ANTWIH et al. 2013). Nesses estudos, as alterações epigenéticas foram avaliadas poucas horas ou dias após a RI, mostrando os efeitos agudos do tratamento. Diferentemente, em nosso estudo, avaliamos o perfil de metilação das células pelo menos 6 passagens após sofrerem a RI, dessa forma, nossos resultados evidenciam que a RI é capaz de promover alterações epigenéticas nas células, e essas permanecem por longos períodos.

Um estudo recente mostrou que a RI provocou alterações epigenéticas que levaram a mudanças na expressão de genes importantes na resposta imune em tumores colorretais (CACAN et al. 2015). Nossos resultados de comparação de padrões de metilação em IR-SW837 comparadas às células SW837, indicam 6 genes que já foram descritos por suas funções no sistema imune. Os genes TRAF3IP2 e JAK3, importantes

reguladores do sistema imune (WANG et al. 2013a; WU et al. 2013a) foram hipermetilados, enquanto outros 4 genes foram hipometilados com a RI: FCER2, um gene regulador de IgE (SHARMA et al. 2014); FAM19A4, gene ativador de macrófagos (WANG et al. 2014); o gene CLEC10A, também envolvido na atividade dos macrófagos (TU et al. 2014); além do gene C1QB, importante para o funcionamento do sistema do complemento (SPIELMAN et al. 2002). Interessantemente, entre os genes hipometilados após a RI, encontramos o SPG20, o qual foi descrito como sendo fundamental para a internalização de EGFR (BAKOWSKA et al. 2007), processo importante para a resistência das células de câncer retal à RI *in vitro* já discutido anteriormente. Ademais, nossos resultados mostraram que a RI causa hipometilação do gene TBC1D16, que sabidamente é ativado por hipometilação, e regula Rab5C, processo que leva a progressão do melanoma via sinalização de EGFR (VIZOSO et al. 2015). Esse resultado corrobora ainda mais com os nossos achados nos ensaios funcionais descritos previamente.

Após análise dos genes hipo e hipermetilados através do programa IPA, identificamos que algumas vias de sinalização celular foram mais significativamente afetadas. Entre os genes hipometilados, e portanto com proteínas mais expressas, encontramos a via de formação de fagossomos, na qual atuam uma série de proteínas que também tem papel importante no tráfego intracelular e vesicular (EGAMI et al. 2011; LI et al. 2003); a endocitose mediada por clatrina, que já foi descrita como uma das vias de internalização de EGFR (DE ANGELIS CAMPOS et al. 2011); a resposta de

fase aguda, que já foi demonstrada ser ativada por RI (DING et al. 2013); além da sinalização de IL-6, interessante descrita como sendo promotora de reparo de DNA e por prevenir a apoptose em células de câncer de pulmão (CHEN et al. 2015). Entre os genes hipermetilados, a análise das vias mostrou alteração em vários genes relacionados ao sistema imune como a sinalização de IL-4, desenvolvimento de células B, via de apresentação de antígeno, e maturação de células dendríticas, sendo que essa última mostrou-se significativamente inativada pela análise do *z-score*.

De maneira geral, os resultados observados na análise de metilação de células de adenocarcinoma de reto com e sem RI corroboram com os achados descritos anteriormente relacionados ao tráfego de EGFR e de proteínas da via endocítica. Porém, as observações em relação às alterações causadas pela RI em genes ligados ao sistema imune devem ser investigadas com mais profundidade em estudos posteriores, pois podem ter importante repercussão na resposta imunológica de pacientes tratados com radioterapia.

## **5.2 MARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA À TERAPIA NEOADJUVANTE EM ADENOCARCINOMA DE RETO**

O segundo objetivo desse trabalho foi avaliar biópsias pré-tratamento de pacientes com adenocarcinoma de reto respondedores e não respondedores a terapia neoadjuvante para encontrar marcadores preditivos de resposta ao tratamento radioquimioterápico ou possíveis alvos

terapêuticos. Como em nossa análise buscamos preferencialmente por marcadores localizados na membrana celular, pelo potencial terapêutico dos mesmos, utilizamos um protocolo de fracionamento subcelular e enriquecimento da fração de membrana. O protocolo em questão, quando testado em linhagem celular e mostrou-se eficaz no enriquecimento desta fração subcelular. A análise proteômica que comparou um grupo de pacientes com RCp com um grupo de pacientes sem RCp encontrou 57 proteínas com expressão significativamente diferente entre esses grupos. Vinte e sete proteínas apresentaram aumento da expressão no grupo sem resposta, e 30 proteínas apresentaram expressão diminuída nesse grupo quando comparado aos pacientes com RCp.

Entre as proteínas de membrana que apresentam maior expressão no grupo com RCp estão: HLA-B e HLA-DRB1, duas proteínas do complexo de histocompatibilidade, sendo a primeira de classe I, com papel central no sistema imune por apresentar antígenos derivados do retículo endoplasmático (MORANDI et al. 2014), e a segunda de classe II, que além de apresentar antígenos de origem extracelular, tem papel na resposta imune contra células tumorais (HU et al. 2014). Chama a atenção que pacientes com RCp apresentaram aumento na expressão de HLA-DRB1, a qual, segundo estudos previamente publicados, pode estar contribuindo com o sistema imune no combate às células tumorais (HU et al. 2014). As proteínas MUC13, proteína relacionada com progressão de tumores de cólon (GUPTA et al. 2014) e agressividade de tumores de ovário (SUNG et al. 2014) e PROM1, que tem sido utilizada como marcador de células tronco

tumorais (PELLACANI et al. 2013) também apresentaram-se aumentadas em amostras responsivas a tratamento. Já as proteínas de membrana que estão mais expressas no grupo de pacientes sem RCp são: EMC4, proteína do complexo de membrana do retículo endoplasmático; HV305, uma Ig cadeia pesada; BGH3, proteína envolvida na ativação de plaquetas e trombogênese (KIM et al. 2009); TCAM2, proteína adaptadora de receptor *Toll-like*; HLA-DRB4, outra proteína do complexo de histocompatibilidade, a qual já foi relacionada a pacientes com alto risco de desenvolver leucemia linfocítica aguda (DORAK et al. 2002); e VAPA (*VAMP-associated protein A*), que tem papel na ativação da via de Ras (WEBER-BOYVAT et al. 2014).

As proteínas, potenciais marcadores do grupo de pacientes com RCp e do grupo sem RCp, deverão ser validadas em um trabalho subsequente para avaliar o real potencial das mesmas como marcadores de resposta à terapia em câncer de reto.

Quando avaliamos através do programa IPA as vias mais significativas no grupo de proteínas com aumento da expressão no grupo de pacientes com RCp encontramos a via de detoxificação mediada por glutathione em primeiro lugar de significância. A detoxificação de glutathione é descrita como fundamental para manter a integridade celular contra danos no DNA por catalisar a conjugação de glutathione com uma grande variedade de substratos eletrofílicos exógenos e endógenos (SCHNEKENBURGER et al. 2014). Também foi demonstrado que a baixa atividade colônica da detoxificação de glutathione (GRUBBEN et al. 2006) e a menor capacidade de detoxificação de metabólitos carcinogênicos provenientes da dieta (COLES



et al. 2001) estão associadas a um alto risco para desenvolver CCR. Outra via importante nesse grupo de pacientes é a via do metabolismo de glicogênio. O aumento do metabolismo do glicogênio foi observado em diferentes tipos tumorais (ZOIS et al. 2014) e a RI promove seu acúmulo que está diretamente associado a radioresistência em linhagens celulares de câncer de pulmão e mama (MATTHEWS et al. 2015). Como observamos que a via de degradação de glicogênio aparece significativa apenas em pacientes com RCp sugere-se que a maior degradação de glicogênio esteja contribuindo para sensibilizar as células tumorais à radioterapia.

No grupo de proteínas com aumento de expressão ou de exclusividade do grupo sem resposta, a via mais significativa foi a de fosforilação oxidativa. Estudos prévios demonstraram que a fosforilação oxidativa está relacionada à resistência de câncer de cólon a quimioterapia (VELLINGA et al. 2015), que é fundamental para o crescimento de células tumorais no linfoma de Hodgkin (BIRKENMEIER et al. 2015), além de diminuir a liberação de fatores pró-apoptóticos, protegendo células tumorais da terapia anticâncer (YADAV et al. 2015). Também relacionada ao metabolismo das células tumorais, identificamos uma disfunção mitocondrial que contribui para a proliferação celular e tumorigênese (MODICANAPOLITANO e SINGH 2004), além de estar relacionada a resistência a quimioterapia (GUARAGNELLA et al. 2014). Foi demonstrado ainda que a disfunção mitocondrial está associada com a radioresistência em adenocarcinoma de esôfago (LYNAM-LENNON et al. 2014). Diferentemente dos pacientes com RCp onde a via de degradação de glicogênio estava

destacada, nos pacientes sem resposta a via de síntese de glicogênio está aumentada, e provavelmente promovendo efeitos contrários aos discutidos no caso dos pacientes com RCp, e contribuindo para a resistência tumoral à terapia. A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos também já foi relacionada à promoção de tumores ligados a obesidade (KHASAWNEH et al. 2009), além de ser demonstrado que é capaz de promover proliferação de células tumorais através da fosforilação oxidativa (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ et al. 2015).

Chama a atenção que nos pacientes com RCp as proteínas relacionadas a detoxificação de produtos carcinogênicos que permite manter a integridade do DNA parecem favorecer a resposta a terapia. Por sua vez, proteínas com aumento da expressão em tumores resistentes a RI estão envolvidas em vias do metabolismo energético, onde podem contribuir para a resistência tumoral à terapia. Dessa forma, sugerimos que tais vias sejam exploradas separada e detalhadamente em projetos que se sigam a esse.

Em relação aos trabalhos já publicados na literatura com abordagens semelhantes à usada em nosso estudo podemos destacar alguns achados. Um estudo que comparou a expressão proteica por espectrometria de massa em grupos de pacientes similares aos avaliados em nosso trabalho, entretanto nenhuma das proteínas encontras diferentemente expressas coincidiram nos dois trabalhos. O estudo em questão fez análise proteômica de tecido pré-tratamento de 17 pacientes com câncer de reto, sendo 7 com RCp, 7 com resposta parcial e 3 com doença residual microscópica. A expressão das proteínas tropomodulina, proteína *heat shock* 42, beta-

tubulina, anexina V e calsenilina mostrou correlação com resistência a terapia, enquanto a expressão das proteínas keratina tipo I, *notch 2 protein homolog* e *DNA repair protein RAD51L3* apresentou correlação com sensibilidade à terapia neoadjuvante (ALLAL et al. 2004).

Estudos que buscam marcadores preditivos de resposta à terapia em câncer retal, usando IHQ, e os resultados apresentam uma variedade de potenciais biomarcadores. Um painel que permitiu avaliar a expressão de proteínas envolvidas na apoptose (MIB, Ciclina E, p21, p27, p53, survivina, Bcl-2 e BAX), mostrou relação da expressão das mesmas com a resposta a terapia neoadjuvante (HUERTA et al. 2010). Um trabalho que usou material de 130 pacientes, identificou as proteínas Bcl-2,  $\beta$ -catenina, VEGF e *apoptotic protease activating factor 1* como marcadores preditivos de resposta à terapia (GARCÍA-FLÓREZ et al. 2014). Usando amostra de 172 pacientes com tumor de reto, um estudo mostrou que a superexpressão da proteína DNAJC12 é um fator negativo de predição de resposta ao tratamento neoadjuvante (HE et al. 2015). Além disso, outros estudos mostraram que a expressão de c-Met e YKL-40 (SENETTA et al. 2015),  $\beta$ -catenina nuclear (WANG et al. 2013b), e de HER2 (MENG et al. 2014), podem ser marcadores preditivos de ausência de resposta ao tratamento neoadjuvante em câncer de reto. Alguns trabalhos têm explorado as proteínas já sabidamente envolvidas no mecanismo de reparo de DNA, fundamental para gerar resistência à radioterapia neoadjuvante, porém nenhum estudo é conclusivo em relação a utilidade da expressão das proteínas do complexo MRN e DNA-PK, além de ATM na predição de

resposta ao tratamento (SHIN et al. 2014). Kuremsky e colaboradores, numa metanálise, revisaram 1204 artigos publicados, e identificaram 36 possíveis biomarcadores de resposta à terapia neoadjuvante em câncer de reto, porém apenas 6 desses marcadores estavam presentes em pelo menos 5 artigos (p53, EGFR, *thymidylate synthase*, ki-67, p21 e bax/bcl-2), e os resultados desses artigos se mostraram inconsistentes (KUREMSKY et al. 2009). Mais uma vez, nenhum desses marcadores de resposta encontrados nesses estudos apresentou alteração em nossa coorte de pacientes.

Estudos de larga escala, usando outras abordagens metodológicas, têm sido realizados com objetivos semelhantes, ou seja de encontrar marcadores de resposta à terapia neoadjuvante em câncer de reto. Em análise genômica observou-se que ganhos nas regiões cromossômicas 7q32-q36 e 7q11-q31, além da amplificação de 20q11-q13 estavam associados de forma significativa à resposta ao tratamento neoadjuvante com radioquimioterapia (GRADE et al. 2009). Também através de análise genômica foi possível observar que pacientes não respondedores à neoadjuvância apresentaram maior número de alterações genéticas principalmente localizadas em 12 regiões cromossômicas (2q21, 3q29, 7p22-21, 7q21, 7q36, 8q23-24, 10p14-13, 13q12, 13q31-34, 16p13, 17p13-12 e 18q23), sugerindo que alterações cromossômicas podem ser úteis na predição de resposta a terapia neoadjuvante em tumores de reto (MOLINARI et al. 2011). Outro estudo observou que casos com del(17p) apresentavam pouca resposta ao tratamento neoadjuvante, enquanto a presença de

del(1p) estava presente mais frequentemente em pacientes respondedores (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al. 2014). Além disso, em um trabalho que utilizou 95 amostras de pacientes com adenocarcinoma de reto, 58 sondas foram capazes de prever resposta patológica completa com 76% de sensibilidade e 97% de especificidade (CHEN et al. 2011). Pezzolo e colaboradores analisaram 10 trabalhos publicados nos últimos 5 anos que mostraram genes com polimorfismo germinativo com potencial preditor de resposta à terapia neoadjuvante, porém sem nenhum resultado conclusivo e aplicável à prática clínica (PEZZOLO et al. 2015).

Uma série de estudos que avaliam o transcriptoma dos tumores de pacientes e sua resposta a terapia tem sido publicada nos últimos anos. Um deles identificou 54 genes com diferente expressão entre os grupos, e que podem separar pacientes respondedores de não respondedores com 78% de sensibilidade e 86% de especificidade (GHADIMI et al. 2005). Outro estudo identificou 33 genes que podem separar pacientes respondedores de não respondedores com 82,4% de acurácia (WATANABE et al. 2006). Em um trabalho que encontrou 95 genes diferentemente expressos entre pacientes com resposta parcial e resposta completa à radioquimioterapia, a acurácia para prever a resposta foi de 84% nas amostras inicialmente analisadas, e de 87% nas amostras de validação (KIM et al. 2007). A avaliação de 43 biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto, permitiu identificar 42 genes, os quais puderam classificar respondedores com 71% de especificidade, e não respondedores com 86% (RIMKUS et al. 2008). Em outro trabalho, 17 genes também foram capazes de separar os pacientes

com câncer de reto em pacientes respondedores em comparação aos não respondedores à terapia neoadjuvante (NISHIOKA et al. 2011). Em um estudo com 31 pacientes, estágio II e III de câncer retal, sendo 8 com RCp e 23 sem RCp, foram identificados 3 genes capazes de prever a resposta à terapia, sendo que os 3 podem ser conectados pelo gene UBC, sugerindo que ubiquitinação é um mecanismo envolvido na determinação da resposta ao tratamento (CHAN et al. 2013). Um trabalho que usou sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma de reto, coletado antes do tratamento neoadjuvante, fez a extração de RNA, purificação, e obtenção de cDNA e cRNA, e a análise encontrou 8 genes diferentemente expressos entre o grupo de respondedores e não respondedores, sendo que o gene FALZ foi capaz de prever resposta com 80% de sensibilidade e 85,7% de especificidade (PALMA et al. 2013). Ainda em análise transcriptômica, o RNA de 33 biópsias frescas foi extraído e avaliado por *microarray*, assinaturas de 812 e 183 genes foram capazes de separar os pacientes entre respondedores e não respondedores, sendo que a classificação usando a assinatura de 812 genes foi capaz de classificar não respondedores com sensibilidade e especificidade de 100%, enquanto a assinatura de 183 genes, apresentou sensibilidade de 33% e especificidade de 100% (GANTT et al. 2014). Por outro lado, dois estudos mostraram que assinaturas genéticas encontradas diferentemente expressas entre pacientes respondedores e não respondedores, apresentam baixa especificidade, principalmente quando testadas em uma coorte independente, concluindo dessa forma, que as assinaturas gênicas preditivas

de resposta disponíveis atualmente, não possuem acurácia superior àquela dos parâmetros clínicos e de imagem usados na prática clínica diária (BRETtingham-MOORE et al. 2011; LOPES-RAMOS et al. 2015).

O perfil de metilação de amostras de pacientes com câncer de reto identificou apenas o gene TIMP3 diferentemente metilado entre pacientes que responderam ao tratamento e os que não responderam (MOLINARI et al. 2013). Usando amostra de 45 pacientes com câncer de reto, foi ainda avaliado o perfil global de metilação gênica que apontou 7 regiões hipermetiladas associados com resposta a terapia neoadjuvante. Estudos funcionais *in vitro*, mostraram que a metilação do gene KLHL34 pode prever sensibilidade à radioquimioterapia neoadjuvante (HA et al. 2015).

Mesmo com os grandes esforços realizados nos últimos anos, das mais diversas e modernas abordagens metodológicas utilizadas e do grande número de trabalhos publicados, até o momento nenhum biomarcador de resposta à radioquimioterapia neoadjuvante em câncer de reto apresentou potencial para ser utilizado na prática clínica e dessa forma auxiliar na escolha do melhor tratamento disponível à esses pacientes.

### **5.3 O PERFIL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE RETO E SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA À TERAPIA**

Como tem sido extensivamente demonstrado nos últimos anos, as VEs derivadas de células tumorais contribuem na progressão, invasão e disseminação do câncer (CASTELLANA et al. 2009; HOOD et al. 2011; JUNG et al. 2009), além de carregarem uma “assinatura molecular” de suas células de origem. Apesar do grande número de trabalhos que mostram o papel das VEs em diferentes tipos de tumores, até o momento não se conhece o papel das VEs no câncer de reto. Dessa forma, o terceiro objetivo desse trabalho foi analisar o papel das VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto e de que forma elas se correlacionam com a resistência ao tratamento radioterápico além de identificar proteínas vesiculares marcadoras da resistência à essa terapia.

Inicialmente foi realizada a caracterização das VEs secretadas por células SW837 e IR-SW837 através da análise de sua concentração e tamanho. Os resultados evidenciaram que a RI não altera a quantidade e o tamanho das VEs. Um estudo que avaliou a quantidade de VEs secretadas por linhagens celulares de glioblastoma mostrou que 48 horas após a RI as células aumentam a quantidade de VEs secretadas de forma significativa (ARSCOTT et al. 2013). É importante ressaltar que em nosso trabalho a análise da quantidade de VEs secretadas foi realizada nas células IR-SW837 algumas passagens após sofrer os 3 ciclos de RI, sendo que dessa



forma, diferentemente do trabalho de Arscott e colaboradores nós não avaliamos as possíveis alterações agudas na secreção de VEs ocorridas logo após a RI. Entretanto, as VEs das células irradiadas têm um menor cargo proteico que as células não irradiadas, evidenciando possíveis alterações na biogênese e no *sorting* de proteínas que irão compor essas VEs. Estes dados estão de acordo com a literatura onde se demonstrou que células submetidas à RI apresentam alterações na expressão gênica (LEE et al. 2010) e no perfil de expressão de proteínas (JUNG et al. 2012), que a RI muda o conteúdo proteico e o perfil molecular de mRNA das VEs secretadas (JELONEK et al. 2015), portanto, corroborando com os nossos resultados que mostram alteração no carregamento proteico das VEs de células irradiadas.

Para melhor compreender as alterações discutidas acima, avaliamos a expressão das proteínas envolvidas na biogênese de VEs (exossomos). A flotilina, proteína envolvida na endocitose (OTTO e NICHOLS 2011), Rab5, que está relacionada aos *early* endossomos (GORVEL et al. 1991), e Rab7, envolvida na formação dos *late* endossomos (BUCCI et al. 2000), não apresentaram diferenças na expressão entre as células SW837 e IR-SW837. Sabe-se que a formação dos MVBS depende essencialmente do complexo dos ESCRTs (DE GASSART et al. 2004). Tsg101, proteína componente do ESCRT-I (BABST et al. 2000), Vps36 componente do ESCRT-II (BABST et al. 2002), e Vps4 componente do ESCRT-III (DAVIES et al. 2009), bem como as proteínas Rab27A e Rab27B que têm função de direcionamento e acoplamento dos MVBs na membrana plasmática (OSTROWSKI et al. 2010)

também não apresentaram diferença de expressão entre as células SW837 e IR-SW837.

Com algumas evidências de que a RI muda o perfil das VEs secretadas, o objetivo seguinte do trabalho foi determinar se VEs secretadas por células irradiadas (IR-SW837) têm a capacidade de transmitir o fenótipo de resistência às células não irradiadas (SW837). De fato, os resultados apontam que as VEs são capazes de transmitir a resistência à RI às células parentais, sugerindo que VEs provenientes de células de adenocarcinoma de reto submetidas a RI, podem ter papel importante na resistência a radioterapia, transmitindo esse fenótipo de uma célula a outra. Estudos prévios já haviam mostrado a capacidade das VEs influenciarem na resistência celular à terapia: a secreção de survivina por exossomos mostrou efeitos de supressão da eficácia da radiação em modelos celulares (KHAN et al. 2009); em modelo de câncer de ovário os exossomos influenciaram no desenvolvimento da resistência à cisplatina (SAFAEI et al. 2005); já em linhagem celular de mama Her-2 positiva, a resistência ao trastuzumab foi relacionada a secreção aumentada de exossomos expressando Her-2, sendo que esses têm a capacidade de sequestrar a droga, diminuindo sua disponibilidade para as células tumorais (CIRAVOLO et al. 2012). Também foi demonstrado que as VEs têm a capacidade de promover efeito *bystander*, ou seja, transmitir efeitos gerados pela RI à células não irradiadas (AL-MAYAH et al. 2012). Mais recentemente um trabalho apontou que as VEs estão associadas aos efeitos de longa duração da RI em células não irradiadas, e que tal efeito é produzido por proteínas e RNAs contidos nas

VEs, os quais são responsáveis por iniciar e perpetuar os efeitos da RI nas células não irradiadas (*naïve*) (AL-MAYAH et al. 2015). Além disso, a irradiação de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço também altera o perfil de expressão de proteínas nos exossomos (ARSCOTT et al. 2013).

É importante ressaltar que no microambiente tumoral composto por diferentes tipos celulares, as VEs têm importante papel na comunicação entre essas células. Nesse sentido, foi demonstrado que VEs secretadas por células estromais promovem a resistência à terapia em células de câncer de mama pelo estímulo de sinais antivirais nesta última (BOELEN et al. 2014).

Diante dos resultados que mostraram que as VEs de células irradiadas possuem a capacidade de transmitir resistência às células não irradiadas, decidimos realizar uma avaliação do conteúdo proteico das VEs provenientes de células SW837 e IR-SW837, com o objetivo de encontrar diferenças que poderiam explicar os efeitos observados nos experimentos descritos previamente. Em uma análise realizada por espectrometria de massa encontramos 73 proteínas com diferença de expressão ( $p \leq 0,05$ ) entre as VEs de células SW837 e IR-SW837. Vinte e quatro proteínas com aumento da expressão nas VEs de células IR-SW837, e 49 proteínas com diminuição da expressão nas VEs de células IR-SW837, quando comparadas às células SW837, além de dezenas de proteínas encontradas exclusivamente em VEs provenientes de apenas um dos tipos celulares (com e sem RI). O resultado obtido mostra que a RI é capaz de mudar o conteúdo proteico das VEs mesmo depois de várias passagens em cultura.

Quando analisamos as proteínas com aumento ou diminuição da expressão nas VEs de células irradiadas através de uma *network* de interação proteína-proteína, observamos que os processos biológicos que cada grupo de proteínas está envolvido são diferentes. Entre os processos biológicos os quais proteínas que diminuíram a expressão nas VEs após a RI estão envolvidos estão a resposta imunológica, a proliferação celular e os reguladores negativos de apoptose; enquanto processos biológicos como divisão celular, transcrição e reguladores positivos de proliferação estão relacionados às proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837. É interessante observar que após a RI proteínas envolvidas na resposta imunológica diminuíram sua expressão em VEs. Este dado está de acordo com o resultado apresentado anteriormente onde a RI causa hipermetilação em diversos genes de vias relacionadas ao sistema imune, o que poderia levar a uma diminuição da atividade desse sistema.

Como em nosso trabalho não exploramos as repercussões funcionais da diminuição de proteínas ligadas ao sistema imune em VEs de células irradiadas, podemos apenas sugerir que essa alteração observada nas VEs poderia ser um reflexo do que acontece na célula após a RI. Porém, estudos têm mostrado que as VEs têm papel importante na modulação do sistema imune, atuando como ativadoras ou como supressoras da resposta imune. Um trabalho mostrou que células NK (*natural killer cells*) incubadas com VEs Hsp-70 positivas, derivadas de células tumorais foram induzidas a secretar *granzyme B*, que inibe apoptose em tumores colorretais e de pâncreas (GASTPAR et al. 2005). Também foi demonstrado que células tumorais

expostas ao estresse secretam exossomos significativamente mais imunogênicos (CHEN et al. 2006; DAI et al. 2005). Por outro lado, estudos mostraram que VEs derivadas de células tumorais tem potencial de suprimir a resposta imune através da inibição da atividade de células T e NK, além de estimular as células supressoras derivadas de mielócitos (MDSCs, *myeloid-derived supressor cells*) (BOBRIE et al. 2011; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ et al. 2013). Nesse mesmo sentido foi demonstrado que VEs secretadas por células de melanoma murino B16 suprimem a expressão de classe II dependente de INF em macrófagos, o que afeta a apresentação de antígeno para células T CD4<sup>+</sup> (POUTSIAKA et al. 1985). Mais recentemente foi descrito que exossomos derivados de células de glioma também são capazes de suprimir a resposta imune (HELLWINKEL et al. 2015).

Quando avaliamos as proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837 no programa IPA encontramos uma predominância das vias de reparo de DSBs de DNA tanto por HR quanto por NHEJ. Inicialmente esse achado reflete o estado da célula, o qual já demonstramos aqui, após a RI aumenta a expressão de proteínas ligadas ao reparo de DNA, principalmente Ku70 e Ku80. Porém é interessante ressaltar que as VEs de células IR-SW837 foram capazes de transferir resistência às células não irradiadas, o que poderia sugerir que tais proteínas transferidas por VEs poderiam estar colaborando em atividades de reparo ao dano de DNA em células alvo. Outra via encontrada é de ativação e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, que além de promover a proliferação de células tumorais através da fosforilação oxidativa (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ et al. 2015) também induz a

resistência à cisplatina em tumores de ovário (BAUERSCHLAG et al. 2015). Proteínas da via de mTOR também estavam aumentadas nas VEs derivadas de células IR-SW837. É interessante observar que essa via também está relacionada a resistência a radioterapia, sendo demonstrado que a inibição da mesma radiosensibiliza células de tumores de próstata (CHANG et al. 2014, 2015), endométrio (MIYASAKA et al. 2015) e mama (KUGER et al. 2014). A sinalização de IL-15 também foi encontrada entre as vias alteradas pelo RI, em concordância com isso, sabe-se que células da pele submetidas a RI aumentam a expressão de IL-15 (MOHAMADZADEH et al. 1995), que é um importante regulador do sistema imune e descrita como citocina pró-inflamatória com potencial tumorigênico (ZAROGOULIDIS et al. 2014). Portanto, nosso dado mostrando que a resistência tumoral a RI pode ser transferida a outra célula por exossomos é apoiado pelos dados de proteômica onde todas as vias encontradas modificadas nos exossomos oriundos de células irradiadas guardam alguma relação com a tumorigênese e/ou resistência celular. Interessantemente, os dados de proteômica das VEs reforçam aqueles encontrados nas biopsias de adenocarcinoma de reto onde Ku70, Ku80 e Rab5C são encontradas com alta expressão.

A análise da proteômica das VEs também apontou alta expressão de NSUN2 e GLYM, ambas proteínas metiltransferases. Dessa forma decidimos avaliar se o tratamento com VEs de células irradiadas é capaz de promover alguma alteração no perfil de metilação das células SW837. Os resultados mostraram que o tratamento com VEs de células irradiadas promoveu hipermetilação em 98% das sondas em comparação ao tratamento com VEs

de células não irradiadas. Esse resultado descreve por primeira vez a capacidade de VEs de células irradiadas produzirem efeitos epigenéticos, nesse caso de metilação, no DNA de células alvo.

A análise através do programa IPA mostrou que os genes hipermetilados pelas VEs de células IR-SW837 estão envolvidos em vias relacionadas ao sistema imune, como a apresentação de antígeno, sinalização de imunodeficiência primária e maturação de células dendríticas, sendo que com base na análise dos reguladores *upstream*, sugere-se que essa última via encontra-se inativada. Estes resultados nos permitem inferir que as VEs de células irradiadas promovem metilação de genes ligados ao sistema imune, podendo suprimir tais vias nas células alvo. O mecanismo de apresentação de antígeno tem papel importante no reconhecimento das células tumorais por parte das células do sistema imune, sendo que defeitos na apresentação de antígenos está ligada à resistência tumoral ao sistema imunológico, já demonstrado em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (LÓPEZ-ALBAITERO et al. 2006), em CCR (AHN et al. 2015) e osteossarcomas (ENDO-MUNOZ et al. 2010). A imunodeficiência primária também está relacionada ao câncer (DE MIRANDA et al. 2011), sendo que a ligação entre os dois pode ser a via de reparo de DNA, a qual produz rearranjos genéticos complexos que modificam os receptores de células B e T (REVY et al. 2005). A maturação de células dendríticas foi a única via que apresentou *z-score* significativamente negativo, evidenciando inativação dos reguladores *upstream*, e logo inativação da via. As células dendríticas são importantes apresentadoras de antígenos e ativadoras de

células T, com importante papel na resposta imune contra as células tumorais (MANTIA-SMALDONE e CHU 2013). Dada a importância destas células no combate ao tumor, uma terapia usando uma vacina de células dendríticas já está sendo testada em melanoma (CARRENO et al. 2015), câncer renal (RANIERI et al. 2007), câncer de ovário (TANYI e CHU 2012), fígado (SUN et al. 2015), próstata (WU et al. 2013b), entre outros tumores.

É interessante observar que tanto as células diretamente irradiadas quanto aquelas tratadas com VEs de células irradiadas apresentaram hipermetilação de vias relacionadas ao sistema imune. Esse resultado sugere que tanto de forma direta, quanto através das VEs, a RI poderia estar levando a uma menor atividade imunológica e dessa forma diminuindo a capacidade desse sistema de destruir as células tumorais. Porém, para confirmar a importância desse mecanismo na resistência tumoral, experimentos adicionais deverão ser realizados.

Tal hipótese pode ser importante para um melhor entendimento dos mecanismos de radioresistência, os quais cada vez mais parecem ser multifatoriais e dependentes de diferentes vias de sinalização celular.



#### **5.4 A PROTEÍNA A33 COMO MARCADOR DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL EM CÂNCER COLORRETAL E MARCADOR DE VES PROVENIENTE DESTE TECIDO**

Ainda como objetivo desse trabalho, buscamos identificar uma proteína com expressão exclusiva em tecido colorretal ou especificamente retal, possibilitando o isolamento e estudo de VEs secretadas por células tumorais do reto. Com base em estudos prévios (JIMENEZ et al. 2010; MATHIVANAN et al. 2010), decidimos avaliar a expressão da proteína A33 em diversas linhagens celulares de câncer de reto, cólon, cabeça e pescoço e glioblastoma. Surpreendentemente, A33 estava expressa apenas nas linhagens de adenocarcinoma de reto, não sendo detectada por WB em linhagens de câncer de cólon, cabeça e pescoço e glioblastoma. Nenhum resultado semelhante foi reportado na literatura até o momento, mas o dado obtido em nosso estudo pode servir como base de uma investigação mais ampla, a qual pode determinar se A33 é preferencialmente expresso em tumores de reto em relação aos de tumores de cólon, podendo dessa forma ser um marcador específico deste tipo de tumor. A33 também foi identificada em VEs secretadas por duas linhagens de adenocarcinoma de reto, resultado que corrobora com dados previamente publicados (MATHIVANAN et al. 2010). Tendo este resultado como base, estudos futuros permitirão isolar VEs que sejam A33 positivas e provenientes especificamente de tecido colorretal (preferencialmente do reto), e dessa forma avalia-las como potenciais biomarcadores. Nesse sentido, uma série de trabalhos tem

revelado o papel das VEs como biomarcadores de câncer de mama (SADOVSKA et al. 2015), de fígado (MOHANKUMAR e PATEL 2015), de carcinoma de ovário (SZAJNIK et al. 2013), de câncer de próstata (DIJKSTRA et al. 2014), além dos tumores colorretais (MATSUMURA et al. 2015), porém nenhum deles utilizou métodos que separem VEs secretadas por um tecido específico ou mais adequadamente do tecido tumoral. Portanto, a literatura carece de abordagens que permitam isolamento de VEs tumor específicas de líquidos extracorpóreos.

Nossos dados apontam ainda que a expressão de A33 está diretamente relacionada ao grau de diferenciação dos tumores colorretais. Através de IHQ observamos em tumores bem diferenciados uma forte marcação de A33 na membrana, enquanto que em tumores pouco diferenciados ou mucinosos a marcação de membrana estava ausente ou fraca. Tumores moderadamente diferenciados apresentaram marcação heterogênea de A33. Como foi descrito que A33 está expresso em 95% dos tumores colorretais (GARINCHESA et al. 1996), nas últimas décadas essa proteína tem sido avaliada como potencial alvo terapêutico em CCR metastático. Um modelo de xenotransplante em camundongos utilizando a linhagem celular de CCR SW1222 foi avaliado em estudos pré-clínicos, e os resultados mostraram regressão tumoral após tratamento com anticorpos anti-A33 marcados com  $^{125}\text{I}$ - ou  $^{131}\text{I}$  (BARENDSSWAARD et al. 1994). Em ensaios clínicos fases I e II, anticorpos monoclonais de A33 marcados com  $^{131}\text{I}$ - e  $^{125}\text{I}$  apresentaram efeitos antitumorais sem toxicidade intestinal (WELT et al. 1994, 1996). Um segundo ensaio clínico de fase I usando anticorpos

anti-A33 humanizado (huA33) avaliou a distribuição do anticorpo, a farmacocinética, e a captação do anticorpo pelo tumor em pacientes com CCR, mostrando uma rápida e seletiva distribuição do anticorpo no tumor, além da difusão para o centro de extensas áreas de necrose tumoral (SCOTT et al. 2005). Radioquimioterapia usando  $^{131}\text{I}$ -huA33 em combinação com capecitabina também foi testada em ensaio clínico de fase I. Os resultados mostraram que o anticorpo anti-A33 pode ser combinado com a radioquimioterapia de forma segura (HERBERTSON et al. 2014). Mais recentemente um novo anti-A33 (*fully-human monoclonal antibody* KRN330) foi testado em um ensaio clínico de fase I e os resultados estabeleceram a máxima dose tolerável de 3 mg/kg uma vez por semana em pacientes com CCR metastático (INFANTE et al. 2013). Em 2014, um estudo fase I/II usando o anticorpo KRN330 mais irinotecano como segunda linha de tratamento para pacientes com CCR metastático foi conduzido. Pacientes que apresentaram progressão de doença após tratamento combinado 5-fluorouracil mais oxaliplatina ou capecitabina mais oxaliplatina (FOLFOX/CapOx) receberam doses intravenosas de KRN330 mais irinotecano de forma escalonada padrão 3 + 3. A taxa de resposta objetiva foi de 4,5 %, e a taxa de controle de doença alcançou 45,5%. Porém, a taxa de resposta objetiva pré-especificada no início do trabalho não foi alcançada (BENDELL et al. 2014).

É importante ressaltar que nenhum dos ensaios clínicos mencionados acima avaliou a expressão de A33 nos tumores dos pacientes incluídos nos estudos, nem descreveu o grau de diferenciação tumoral dos mesmos.

Dessa forma, a falta de resposta ao tratamento com o anticorpo KRN330 pode ser explicada pelo fato de que parte dos pacientes incluídos nos estudos poderiam ter tumores moderadamente ou pouco diferenciados, ou tumores mucinosos, os quais apresentam baixos níveis de expressão de A33. Em realidade, é esperado que apenas os pacientes que apresentem expressão homogênea e de membrana de A33 possam ter respostas positivas ao tratamento com o anti-A33, o que em nossa coorte representa aproximadamente 80% dos pacientes, enquanto pacientes com expressão baixa e heterogênea de A33 teriam respostas terapêuticas menos favoráveis.

Um dos passos essenciais para a avaliação do potencial terapêutico de um anticorpo é a especificidade *in vivo*. Por essa razão, são necessários estudos futuros para determinar se a resposta ao tratamento com anti-A33 pode ser predita pela marcação da proteína A33 nos tecidos. Com esses resultados, a seleção de pacientes poderia ser utilizada em ensaios clínicos, e dessa forma realizar uma avaliação mais rigorosa do potencial terapêutico do tratamento com anti-A33.

## 6 CONCLUSÕES

- A radioquimioterapia neoadjuvante promove uma importante alteração no perfil de expressão proteica nos tumores de pacientes com adenocarcinoma de reto;
- Entre as proteínas que aumentam a expressão após o tratamento radioquimioterápico estão as proteínas de reparo de dano de DNA, Ku70 e Ku80, e a proteína de tráfico intracelular Rab5C;
- Como mecanismo de resistência do adenocarcinoma de reto à terapia neoadjuvante mostramos em modelos celulares que Rab5C modula a internalização de EGFR promovida por RI, o que também é essencial para regular a expressão de Ku70 e Ku80 e a resistência celular à RI. Esses achados indicam que EGFR e Rab5C são potenciais alvos terapêuticos para sensibilizar células de câncer de reto resistentes ao tratamento neoadjuvante;
- O tratamento com cetuximab não sensibilizou as células de adenocarcinoma de reto à RI em um modelo *in vitro*, fato que pode ser explicado pela ineficiência de tal tratamento no bloqueio completo da internalização e do tráfego de EGFR;
- A RI promoveu a hipometilação de 90% do DNA avaliado na linhagem celular de adenocarcinoma de reto, sendo que entre as vias mais alteradas estão aquelas relacionadas a formação de fagossomos, a

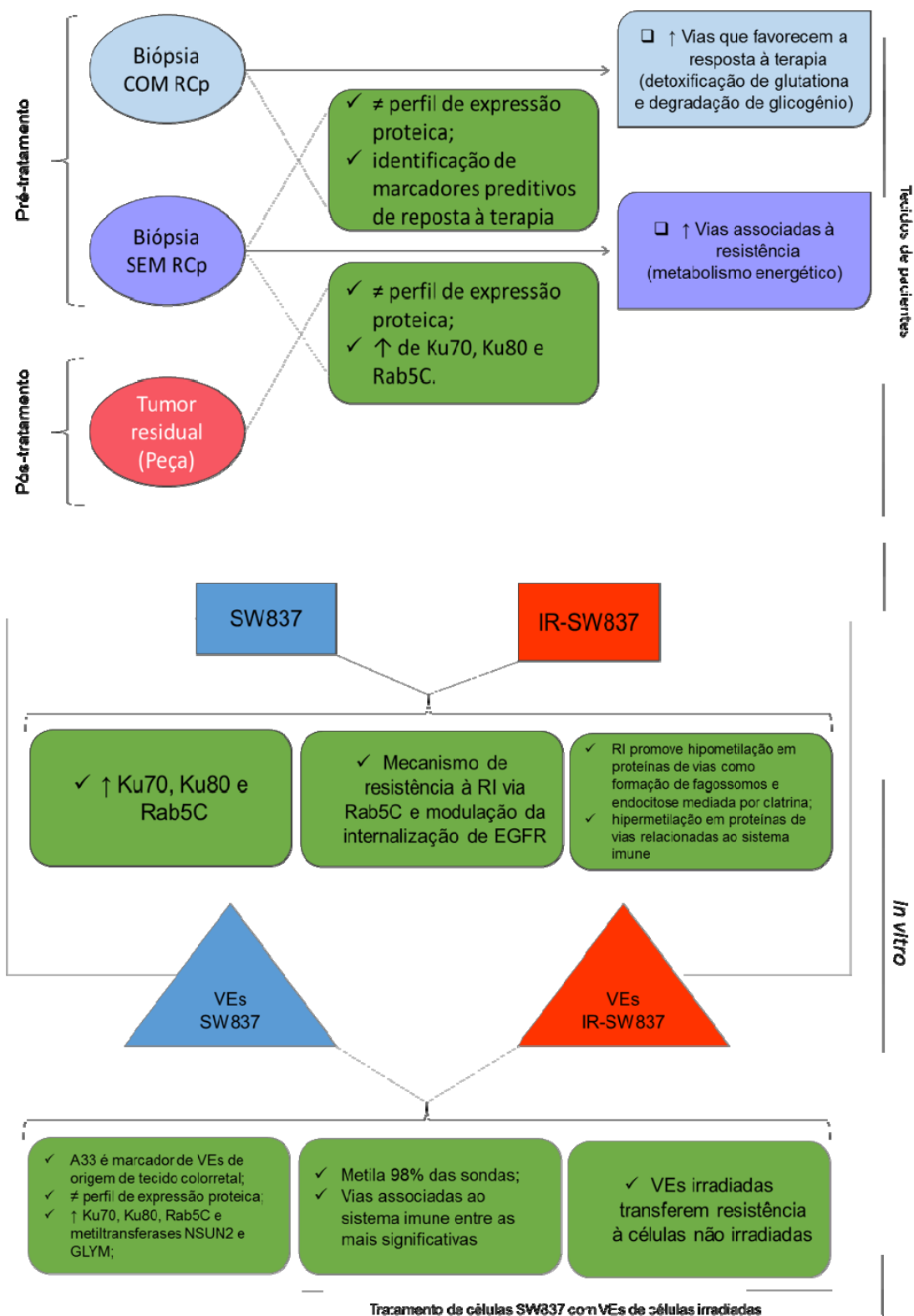
endocitose mediada por clatrina, a resposta de fase aguda e a sinalização de IL-6;

- Os 10% de genes hipermetilados por RI nas células de adenocarcinoma de reto estão envolvidos em vias como a sinalização de IL-4, o desenvolvimento de células B, a via de apresentação de antígeno e maturação de células dendríticas, todas relacionadas ao sistema imune;
- Dois genes hipometilados pela RI, SPG20 e TBC1D16, são importantes para a internalização de EGFR e para a regulação de Rab5C e modulação de EGFR, respectivamente;
- Pacientes com adenocarcinoma de reto com RCp ao tratamento neoadjuvante apresentam um perfil de expressão proteica na biópsia pré-tratamento diferente dos pacientes sem resposta, sendo que tais proteínas podem ser exploradas como marcadores preditivos de resposta ao tratamento radioquimioterápico nestes pacientes;
- Nos pacientes com RCp as proteínas com aumento da expressão estão atuando em vias que favorecem a resposta à terapia, como a detoxificação de glutatona e degradação de glicogênio, enquanto as proteínas com aumento da expressão em pacientes sem RCp estão envolvidas em vias do metabolismo energético do tumor as quais são conhecidas por contribuem para a resistência tumoral à terapia;
- A RI não altera a quantidade e o tamanho médio das VEs secretadas por células de adenocarcinoma in vitro, porém é capaz de alterar o carregamento proteico nas mesmas;

- As VEs de células de adenocarcinoma de reto irradiadas apresentam um perfil proteico diferente daquele das VEs de células não irradiadas;
- As proteínas com aumento da expressão em VEs de células irradiadas têm relação com a tumorigênese e/ou resistência tumoral a terapia, evidenciado pelas vias nas quais as mesmas estão envolvidas: reparo de DSBs de DNA por HR e NHEJ,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, sinalização de mTOR e sinalização de IL-15;
- As proteínas Ku70, Ku80 e Rab5C, além das metiltransferases NSUN2 e GLYM apresentam maior expressão em VEs de células irradiadas quando comparadas às VEs de células não irradiadas;
- VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto resistentes a RI são capazes de transmitir esta resistência às células não irradiadas, sugerindo que as VEs podem ter papel importante na resistência a radioterapia nestes tumores;
- O tratamento com VEs de células irradiadas promove metilação em 98% das sondas em comparação ao tratamento com VEs de células não irradiadas;
- Os genes hipermetilados pelas VEs de células IR-SW837 estão envolvidos em vias relacionadas ao sistema imune, como a apresentação de antígeno, sinalização de imunodeficiência primária e maturação de células dendríticas, fenômeno semelhante ao já observado nas células diretamente irradiadas;

- A proteína A33 é expressa exclusivamente em linhagens celulares do trato gastrointestinal, preferencialmente pelas células de adenocarcinoma de reto;
- A33 está presente em VEs secretadas por células de adenocarcinoma de reto, indicando que essa proteína pode ser usada para isolar VEs específicas do tecido colorretal;
- A expressão de A33 está relacionada ao grau de diferenciação dos tumores colorretais, onde tumores bem diferenciados apresentam alta expressão de A33 na membrana, enquanto tumores pouco diferenciados e mucinosos tem baixa expressão citoplasmática ou nuclear de A33;
- A seleção de pacientes para receber a terapia com anti-A33 em ensaios clínicos deve ser feita através da avaliação da expressão de membrana de A33.





**Figura 34** - Resumo esquemático das conclusões do trabalho.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

Abdelbaqi K, Di Paola D, Rampakakis E, Zannis-Hadjopoulos M. Ku protein levels, localization and association to replication origins in different stages of breast tumor progression. **J Cancer** 2013; 4:358-70.

Adamczyk KA, Klein-Scory S, Tehrani MM, et al. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. **Life Sci** 2011; 89:304-12.

Agola JO, Hong L, Surviladze Z, et al. A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. **ACS Chem Biol** 2012; 7:1095-108.

Ahn E, Kim H, Han KT, Sin J-I. A loss of antitumor therapeutic activity of CEA DNA vaccines is associated with the lack of tumor cells' antigen presentation to Ag-specific CTLs in a colon cancer model. **Cancer Lett** 2015; 356:676-85.

Ahn G-O, Tseng D, Liao C-H, Dorie MJ, Czechowicz A, Brown JM. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:8363-8.

Alais S, Simoes S, Baas D, et al. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. **Biol Cell** 2008; 100:603-15.

Allal AS, Kähne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond M A. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. **Proteomics** 2004; 4:2261-9.

Al-Mayah A, Bright S, Chapman K, et al. The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. **Mutat Res** 2015; 772:38-45.

Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, Carter DR, Kadhim MA. Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. **Radiat Res** 2012; 177:539-45.

Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:695-711.

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.

Alvarez J A, Baldonado RF, Bear IG, Alvarez P, Jorge JL. Anaerobic liver abscesses as initial presentation of silent colonic cancer. **HPB (Oxford)** 2004; 6:41-2.

André T, Quinaux E, Louvet C, et al. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. **J Clin Oncol** 2007; 25:3732-8.

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 USA** 2011; 108:4852-7.

Antwi D A., Gabbara KM, Lancaster WD, Ruden DM, Zielske SP. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. **Epigenetics** 2013; 8:839-8.

Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, et al. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. **Transl Oncol** 2013; 6:638-48.

Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. **Cancer Metastasis Rev** 2013; 32:623-42.

Babst M, Katzmann D, Snyder WB, Wendland B, Emr S. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. **Dev Cell** 2002; 3:283-9.

Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. **Traffic** 2000; 1:248-58.

Bae J-H, Kim J-G, Heo K, Yang K, Kim T-O, Yi JM. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer. **BMC Genomics** 2015; 16:1-12.

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

Bakowska JC, Jupille H, Fatheddin P, Puertollano R, Blackstone C. Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. **Mol Biol Cell** 2007; 18:1683-92.

Barbieri MA, Roberts RL, Gumusboga A, et al. Epidermal growth factor and membrane trafficking: EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a. **J Cell Biol** 2000; 151:539-50.

Barendswaard E, Welt S, Scott A, Graham M, Old L. Therapy of human colon cancer transplants in nu/nu mice with 125I- and 131I-monoclonal antibody A33. *Proc Am Assoc Cancer Res.* **Anais...**

Bauerschlag DO, Maass N, Leonhardt P, et al. Fatty acid synthase overexpression: target for therapy and reversal of chemoresistance in ovarian cancer. **J Transl Med** 2015; 13:146.

Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger D A., Virnig B A. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: A population-based study. **Gastroenterology** 2005; 128:819-24.

Bayley J-P, Devilee P. The Warburg effect in 2012. **Curr Opin Oncol** 2012; 24:62-7.

Beck DE. Colorectal cancer. **Rev Gastroenterol Mex** 2009; 8:2-3.

Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:239-53.

Bendell JC, Lenz H-J, Ryan T, et al. Phase 1/2 study of KRN330, a fully human anti-A33 monoclonal antibody, plus irinotecan as second-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer. **Invest New Drugs** 2014; 32:682-90.

Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, et al. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. **EMBO J** 2009; 28:3413-3427.

Birkenmeier K, Dröse S, Wittig I, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. **Int J Cancer** 2015 Nov 23. [Epub ahead of print]

Blanchard N, Lankar D, Faure F, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. **J Immunol** 2002; 168:3235-41.

Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic** 2011; 12:1659-68.

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.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2006; 354:567-78.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. **Lancet Oncol** 2010; 11:21-8.

Bosset J, Collette L, Callais G, et al. Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:1114-23.

Brettingham-Moore KH, Duong CP, Greenawalt DM, et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2011; 17:3039-47.

Bucci C, Lutcke A, Steele-Mortimer O, et al. Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. **FEBS Lett** 1995; 366:65-71.

Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, Van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. **Mol Biol Cell** 2000; 11:467-80.

Cacan E, Greer SF, Garnett-Benson C. Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. **Int J Oncol** 2015; 47:2264-75.

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

Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. **Science** 2015; 348:803-8.

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.

Chan J, Kinsella MT, Willis JE, et al. A Predictive Genetic Signature for Response to Fluoropyrimidine-Based Neoadjuvant Chemoradiation in Clinical Stage II and III Rectal Cancer. **Front Oncol** 2013; 3:288.

Chang L, Graham PH, Hao J, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. **Cell Death Dis** 2014; 5:e1437.

Chang L, Graham PH, Ni J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. **Crit Rev Oncol Hematol** 2015; 507-17.

Cheeseman SL, Joel SP, Chester JD, et al. A “modified de Gramont” regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer. **Br J Cancer** 2002; 87:393-9.

Chen PI, Kong C, Su X, Stahl PD. Rab5 isoforms differentially regulate the trafficking and degradation of epidermal growth factor receptors. **J Biol Chem** 2009; 284:30328-38.

Chen PI, Schauer K, Kong C, Harding AR, Goud B, Stahl PD. Rab5 isoforms orchestrate a “division of labor” in the endocytic network; Rab5c modulates rac-mediated cell motility. **PLoS One** 2014; 9:1-9.

Chen Q, Liu W, Zhao Z, Xie Y, Han B. [Expression and significance of Rab5a and APPL1 in breast cancer]. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi** 2012; 34:838-41.

Chen W, Wang J, Shao C, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. **Eur J Immunol** 2006; 36:1598-607.

Chen Y, Zhang F, Tsai Y, et al. IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. **Radiat Oncol** 2015; 10:227.

Chen Z, Liu Z, Li W, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:689-99.

Chiariello M, Bruni CB, Bucci C. The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. **FEBS Lett** 1999; 453:20-4.



Chiba M, Kimura M, Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. **Oncol Rep** 2012; 28:1551-8.

Choi D-S, Lee J-M, Park GW, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. **J Proteome Res** 2007; 6:4646-55.

Chou RH, Wang YN, Hsieh YH, et al. EGFR Modulates DNA Synthesis and Repair through Tyr Phosphorylation of Histone H4. **Dev Cell** 2014; 30:224-37.

Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. **J Cell Physiol** 2012; 227:658-67.

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

Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. **Mutat Res** 2001; 482:3-10.

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.

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.

Cowell IG, Durkacz BW, Tilby MJ. Sensitization of breast carcinoma cells to ionizing radiation by small molecule inhibitors of DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated. **Biochem Pharmacol** 2005; 71:13-20.

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res** 2011; 10:1794-805.

Cullis PM, Jones GD, Symons MC, Lea JS. Electron transfer from protein to DNA in irradiated chromatin. **Nature** 1987; 330:773-4.

Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:801-17.

D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:317-27.

Dai S, Wan T, Wang B, et al. More efficient induction of HLA-A\*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA) - Specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7554-63.

Davies BA, Azmi IF, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 ATPase activity by ESCRT-III. **Biochem Soc Trans** 2009; 37:143-5.

De Angelis CAC, Rodrigues MA, De Andrade C, De Goes AM, Nathanson MH, Gomes DA. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 412:341-6.

De Campos-Lobato L, Stocchi L, Da Luz MA, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant treatment for rectal cancer decreases distant recurrence and could eradicate local recurrence. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:1590-8.

De Gassart A, Geminard C, Fevrier 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.

De Miranda NFCC, Björkman A, Pan-Hammarström Q. DNA repair: The link between primary immunodeficiency and cancer. **Ann N Y Acad Sci** 2011; 1246:50-63.

Decanini-Terán CO, González-Acosta J, Obregón-Méndez J, Vega-de Jesús M. [Rectal cancer: diagnosis, screening and treatment]. **Cir Cir** 2011; 79:481-7.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer** 2005; 104:1129-37.

Dewdney A, Cunningham D, Tabernero J, et al. Multicenter randomized phase II clinical trial comparing neoadjuvant oxaliplatin, capecitabine, and preoperative radiotherapy with or without cetuximab followed by total mesorectal excision in patients with high-risk rectal cancer (EXPERT-C). **J Clin Oncol** 2012; 30:1620-7.

Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. **J Urol** 2014; 191:1132-8.

Ding LH, Park S, Peyton M, et al. Distinct transcriptome profiles identified in normal human bronchial epithelial cells after exposure to gamma-rays and different elemental particles of high Z and energy. **BMC Genomics** 2013; 14:372.

Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. **J Biol Chem** 2005; 280:31182-9.

Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. **Mol Cancer** 2008; 7:69.

Dittmann K, Mayer C, Rodemann H-P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. **Radiother Oncol** 2005; 76:157-61.

Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, et al. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. **Clin Exp Metastasis** 1999; 17:131-40.

Dorak MT, Oguz FS, Yalman N, et al. A male-specific increase in the HLA-DRB4 (DR53) frequency in high-risk and relapsed childhood ALL. **Leuk Res** 2002; 26:651-6.

Duffy M, Van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. **Eur J Cancer** 2003; 39:718-27.

Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? **Curr Opin Cell Biol** 2001; 13:225-31.

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

Egami Y, Fukuda M, Araki N. Rab35 regulates phagosome formation through recruitment of ACAP2 in macrophages during Fc R-mediated phagocytosis. **J Cell Sci** 2011; 124:3557-67.

Eke I, Schneider L, Forster C, Zips D, Kunz-Schughart LA., Cordes N. EGFR/JIP-4/JNK2 Signaling attenuates cetuximab-mediated radiosensitization of squamous cell carcinoma cells. **Cancer Res** 2013; 73:297-306.

Endo-Munoz L, Cumming A, Sommerville S, Dickinson I, Saunders NA. Osteosarcoma is characterised by reduced expression of markers of osteoclastogenesis and antigen presentation compared with normal bone. **Br J Cancer** 2010; 103:73-81.

Fan XJ, Wan XB, Yang ZL, et al. Snail promotes lymph node metastasis and Twist enhances tumor deposit formation through epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. **Hum Pathol** 2013; 44:173-80.

Fauré J, Lachenal G, Court M, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. **Mol Cell Neurosci** 2006; 31:642-8.

Fazeli MS, Keramati MR. Rectal cancer : a review. **Med J Islam Repub Iran** 2015; 31:29:171.

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

Février B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:9683-8.

Fisher B, Wolmark N, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80:21-9.

Foray N, Priestley A, Alsbeih G, et al. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. **Int J Radiat Biol** 1997; 72:271-83.

Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. **PLoS Biol** 2013; 11:e1001604.

Gantt GA, Chen Y, DeJulius K, Mace AG, Barnholtz-Sloan J, Kalady MF. Gene expression profile is associated with chemoradiation resistance in rectal cancer. **Color Dis** 2014; 16:57-66.

Garcia-Aguilar J, Shi Q, Thomas C, et al. A phase II trial of neoadjuvant chemoradiation and local excision for T2N0 rectal cancer: preliminary results of the ACOSOG Z6041 trial. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:384-91.

García-Flórez LJ, Gómez-Álvarez G, Frunza AM, Barneo-Serra L, Martínez-Alonso C, Fresno-Forcelledo MF. Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in rectal cancer. **J Surg Res** 2014; 4:1-7.

Garinchesa P, Sakamoto J, Welt S, Real F, Rettig W, Old L. Organ-specific expression of the colon cancer antigen A33, a cell surface target for antibody-based therapy. **Int J Oncol** 1996; 9:465-71.

Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. **Cancer Res** 2005; 65:5238-47.

Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: Results of FFCD 9203. **J Clin Oncol** 2006; 24:4620-5.

Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. **J Clin Oncol** 2005; 23:1826-38.

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.

González-González M, Garcia J, Alcazar JA, et al. Association between the cytogenetic profile of tumor cells and response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. **Medicine (Baltimore)** 2014; 93:e153.

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. **Cell** 1991; 64:915-25.

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

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:48-58.

Grade M, Gaedcke J, Wangsa D, et al. Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 193:19-28.

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

Group QC, Gray R, Barnwell J, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. **Lancet** 2007; 370:2020-9.

Grubben MJAL, Van den Braak CCM, Nagengast FM, Peters WHM. Low colonic glutathione detoxification capacity in patients at risk for colon cancer. **Eur J Clin Invest** 2006; 36:188-92.

Guaragnella N, Giannattasio S, Moro L. Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance. **Biochem Pharmacol** 2014; 92:62-72.



Guerra LE, Smith RM, Kaminski A, Lagios MD, Silverstein MJ. Invasive local recurrence increased after radiation therapy for ductal carcinoma in situ. **Am J Surg** 2008; 196:552-5.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med** 2015; 21:1350-6.

Gupta BK, Maher DM, Ebeling MC, et al. Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. **J Gastroenterol** 2014; 49:1378-91.

Gurkan C, Lapp H, Alory C, Su AI, Hogenesch JB, Balch WE. Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. **Mol Biol Cell** 2005; 16:3847-64.

Guryev DV, Osipov AN, Lizunova EY, Vorobyeva NY, Boeva OV. Ionizing radiation-induced genomic instability in CHO cells is followed by selection of radioresistant cell clones. **Bull Exp Biol Med** 2009; 147:596-8.

Gutiérrez-Vázquez C, Villarroja-Beltri C, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. **Immunol Rev** 2013; 251:125-42.

Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, et al. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2492-501.

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.

Ha YJ, Kim CW, Roh SA, et al. Epigenetic regulation of KLHL34 predictive of pathologic response to preoperative chemoradiation therapy in rectal cancer patients. **Int J Radiat Oncol** 2015; 91:650-8.

Habraken Y, Jolois O, Piette J. Differential involvement of the hMRE11/hRAD50/NBS1 complex, BRCA1 and MLH1 in NF-kappaB activation by camptothecin and X-ray. **Oncogene** 2003; 22:6090-9.

Habr-Gama A, São Julião GP, Perez RO. Nonoperative Management of Rectal Cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** 2015; 29:135-51.

Hadžisejdić I, Mustać E, Jonjić N, Petković M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. **Mod Pathol** 2010; 23:392-403.

Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: Final report of intergroup 0089. **J Clin Oncol** 2005; 23:8671-8.

Han CL, Chen JS, Chan EC, et al. An informatics-assisted label-free approach for personalized tissue membrane proteomics: case study on colorectal cancer. **Mol Cell Proteomics** 2011; 10:M110.003087.

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

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

He HL, Lee YE, Chen HP, et al. Overexpression of DNAJC12 predicts poor response to neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. **Exp Mol Pathol** 2015; 98:338-45.

Heath JK, White SJ, Johnstone CN, et al. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:469-74.

Hei TK, Zhou H, Chai Y, Ponnaiya B, Ivanov VN. Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. **Curr Mol Pharmacol** 2011; 4:96-105.

Hellwinkel JE, Redzic JS, Harland TA, et al. Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. **Neuro Oncol** 2015 Sep 18. pii: nov170. [Epub ahead of print].

Henderson MC, Azorsa DO. The Genomic and Proteomic Content of Cancer Cell-Derived Exosomes. **Front Oncol** 2012; 2:1-9.

Herbertson R A, Tebbutt NC, Lee F-T, et al. Targeted chemoradiation in metastatic colorectal cancer: a phase I trial of <sup>131</sup>I-huA33 with concurrent capecitabine. **J Nucl Med** 2014; 55:534-9.

Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD, et al. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. **Curr Biol** 2011; 21:779-86.

Hoepfner S, Severin F, Cabezas A, et al. Modulation of Receptor Recycling and Degradation by the Endosomal Kinesin KIF16B. **Cell** 2005; 121:437-50.

Hofheinz R, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2012; 13:579-88.

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

Hong BS, Cho J-H, Kim H, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. **BMC Genomics** 2009; 10:556.

Hong L, Simons P, Waller A, et al. A small molecule pan-inhibitor of Ras-superfamily GTPases with high efficacy towards Rab7. **Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143553/>> [2015 Dez 15]

Hong L, Guo Y, BasuRay S, et al. A Pan-GTPase Inhibitor as a Molecular Probe. **PLoS One** 2015; 10:e0134317.

Hood JL, Pan H, Lanza GM, Wickline S A. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. **Lab Invest** 2009; 89:1317-1328.

Hood JL, San Roman S, Wickline S A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. **Cancer Res** 2011; 71:3792-801.

Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. **J Cell Biol** 2010; 189:223-32.

Hu JM, Li L, Chen YZ, et al. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 methylation changes promote the occurrence and progression of Kazakh ESCC. **Epigenetics** 2014; 9:1366-73.

Hu L, Wu QQ, Wang WB, et al. Suppression of Ku80 correlates with radiosensitivity and telomere shortening in the U2OS telomerase-negative osteosarcoma cell line. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2013; 14:795-9.

Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Res** 1999; 59:1935-40.

Huang M-Y, Wang J-Y, Chang H-J, Kuo C-W, Tok T-S, Lin S-R. CDC25A, VAV1, TP73, BRCA1 and ZAP70 gene overexpression correlates with radiation response in colorectal cancer. **Oncol Rep** 2011a; 25:1297-306.

Huang W-C, Chen Y-J, Li L-Y, et al. Nuclear Translocation of Epidermal Growth Factor Receptor by Akt-dependent Phosphorylation Enhances Breast Cancer-resistant Protein Expression in Gefitinib-resistant Cells. **J Biol Chem** 2011b; 286:20558-68.

Huber SM, Butz L, Stegen B, et al. Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. **Front Physiol** 2013; 4 AUG:1-14.

Huerta S, Hrom J, Gao X, et al. Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer. **Dig Liver Dis** 2010; 42:679-84.

Hugen N, Van de Velde CJH, De Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. **Ann Oncol** 2014; 25:651-7.

Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. **Curr Opin Cell Biol** 2008; 20:4-11.

Imperiale T, Hansohoff D. Risk for colorectal cancer in persons with a family history of adenomatous polyps: a systematic review. **Ann Intern Med** 2012; 15:703-9.

Infante JR, Bendell JC, Goff LW, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-A33 fully-human monoclonal antibody, KRN330, in patients with advanced colorectal cancer. **Eur J Cancer** 2013; 49:1169-75.

Jadhav U, Mohanam S. Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: modulation of in vitro invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells. **Int J Oncol** 2006; 29:1525-31.

Janjan N, Khoo V, Abbruzzese J, et al. Tumor down staging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999; 44:1027-38.

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.

Jeggo P, Lavin MF. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? **Int J Radiat Biol** 2009; 85:1061-81.

Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, et al. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Pol** 2015; 62:265-72.

Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. **Nature** 2010; 467:678-83.

Jimenez CR, Knol JC, Meijer G A., Fijneman RJ A. Proteomics of colorectal cancer: Overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers. **J Proteomics** 2010; 73:1873-95.

Jo U, Park KH, Whang YM, et al. EGFR endocytosis is a novel therapeutic target in lung cancer with wild-type EGFR. **Oncotarget** 2014; 5:1265-78.

Johnstone RM. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. **Biochem Cell Biol** 1992; 70:179-90.

Jung S, Lee S, Lee J, et al. Protein expression pattern in response to ionizing radiation in MCF-7 human breast cancer cells. **Oncol Lett** 2012; 3:147-54.

Jung T, Castellana D, Klingbeil P, et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. **Neoplasia** 2009; 11:1093-105.

Kapiteijn E, Marijnen C, Nagtegaal I, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. **N Engl J Med** 2001; 345:638-46.

Kapur P. Predictive Biomarkers for Response to Therapy in Advanced Colorectal/Rectal Adenocarcinoma. **Cri Rev Oncog** 2012; 17:361-7.

Kawahara R, Lima RN, Domingues RR, et al. Deciphering the role of the ADAM17-dependent secretome in cell signaling. **J Proteome Res** 2014; 13:2080-93.

Khan S, Aspe JR, Asumen MG, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. **Br J Cancer** 2009; 100:1073-86.

Khasawneh J, Schulz MD, Walch A, et al. Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:3354-9.

Kim H-J, Kim P-K, Bae SM, et al. Transforming growth factor-beta-induced protein (TGFB1p/beta ig-h3) activates platelets and promotes thrombogenesis. **Blood** 2009; 114:5206-15.

Kim I-J, Lim S-B, Kang HC, et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:1342-53.

Kim J, Tannock I. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:516-25.

Kim M-J, Lee HS, Kim JH, et al. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. **BMC Cancer** 2012; 12:347.

Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. **J Clin Invest** 2010; 120:694-705.

Kirshner J, Jobling MF, Pajares MJ, et al. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress. **Cancer Res** 2006; 66:10861-9.

Koike M, Yutoku Y, Koike A. Establishment of ku70-deficient lung epithelial cell lines and their hypersensitivity to low-dose x-irradiation. **J Vet Med Sci** 2011; 73:549-54.

Koike M, Yutoku Y, Koike A. The defect of Ku70 affects sensitivity to X-Ray and radiation-induced caspase-dependent apoptosis in lung cells. **J Vet Med Sci** 2013; 75:415-20.



Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. **Cancer** 2002; 95:1199-205.

Korabiowska M, Voltmann J, Honig JF, et al. Altered expression of DNA double-strand repair genes Ku70 and Ku80 in carcinomas of the oral cavity. **Anticancer Res** 2006; 26:2101-5.

Kosinski L. Shifting concepts in rectal cancer management. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:173-202.

Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. **PLoS One** 2011; 6:e24234.

Krook J, Moertel C, Gunderson L, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. **N Engl J Med** 1991; 324:709-15.

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

Kuger S, Cörek E, Polat B, Kämmerer U, Flentje M, Djuzenova CS. Novel PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 radiosensitizes breast cancer cell lines under normoxic and hypoxic conditions. **Breast Cancer (Auckl)** 2014; 8:39-49.

Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. **Cancer Res** 2004; 64:500-8.

Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2009; 74:673-88.

Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ A. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. **Hum Mol Genet** 2012; 21:125-34.

Lee YS, Oh J-H, Yoon S, et al. Differential gene expression profiles of radioresistant non-small-cell lung cancer cell lines established by fractionated irradiation: tumor protein p53-inducible protein 3 confers sensitivity to ionizing radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 77:858-66.

Levin B, Lieberman D A., McFarland B, et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. **Gastroenterology** 2008; 134:1570-95.

Li H, Marple T, Hasty P. Ku80-deleted cells are defective at base excision repair. **Mutat Res Mol Mech Mutagen** 2013; 745-746:16-25.

Li M, Li J, Zhao A, Gu J. Colorectal cancer or colon and rectal cancer? Clinicopathological comparison between colonic and rectal carcinomas. **Oncology** 2007; 73:52-7.

Li N, Mak A, Richards DP, et al. Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. **Proteomics** 2003; 3:536-48.

Li Y, Meng X, Feng H, Zhang G, Liu C, Li P. Over-expression of the RAB5 gene in human lung adenocarcinoma cells with high metastatic potential. **Chin Med Sci J** 1999; 14:96-101.

Liang X, So YH, Cui J, et al. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. **J Radiat Res** 2011; 52:380-6.

Liccardi G, Hartley J, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. **Cancer Res** 2011; 71:1103-14.

Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nat Cell Biol** 2001; 3:802-8.

Lo H-W, Hung M-C. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. **Br J Cancer** 2007; 96 Suppl:R16-R20.

Lo H-W, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang S-F, Hung M-C. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Cancer Res** 2005; 65:338-48.

Löbrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:861-9.

Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:5313-27.

Longley D, Johnston P. Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol** 2005; 205:275-92.

Lopes-Ramos C, Koyama FC, Habr-Gama A, et al. Comprehensive evaluation of the effectiveness of gene expression signatures to predict complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and guide surgical intervention in rectal cancer. **Cancer Genet** 2015; 208:319-26.

López-Albaitero A, Nayak JV, Ogino T, et al. Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL. **J Immunol** 2006; 176:3402-9.

Lynam-Lennon N, Maher SG, Maguire A, et al. Altered mitochondrial function and energy metabolism is associated with a radioresistant phenotype in oesophageal adenocarcinoma. **PLoS One** 2014; 9:e100738.

Maas M, Nelemans P, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. **Lancet Oncol** 2010; 11:835-44.

Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. **Biochem J** 2009; 417:639-50.

Mantia-Smaldone GM, Chu CS. A review of dendritic cell therapy for cancer: progress and challenges. **Biodrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther** 2013; 27:453-68.

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

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

Mathivanan S, Lim JWE, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. **Mol Cell Proteomics** 2010; 9:197-208.

Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. **Br J Cancer** 2015; 113:275-81.

Matthews Q, Isabelle M, Harder SJ, et al. Radiation-induced glycogen accumulation detected by single cell raman spectroscopy is associated with radioresistance that can be reversed by metformin. **PLoS One** 2015; 10:e0135356.

Mayers JR, Audhya A. Vesicle formation within endosomes: An ESCRT marks the spot. **Commun Integr Biol** 2012; 5:50-6.

Mazzarelli P, Parrella P, Seripa D, et al. DNA end binding activity and Ku70/80 heterodimer expression in human colorectal tumor. **World J Gastroenterol** 2005; 11:6694-700.

McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. **BMC Cancer** 2010; 10:294.

Meng X, Wang R, Huang Z, et al. Human epidermal growth factor receptor-2 expression in locally advanced rectal cancer: Association with response to neoadjuvant therapy and prognosis. **Cancer Sci** 2014; 105:818-24.

Ministério da Saude. Instituto Nacional do Cancer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014-Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, et al. PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1- $\alpha$ /VEGF pathway in endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 2015; 138:174-80.

Modica-Napolitano JS, Singh KK. Mitochondrial dysfunction in cancer. **Mitochondrion** 2004; 4:755-62.

Mohamadzadeh M, Takashima A, Dougherty I, Knop J, Bergstresser PR, Cruz PD Jr.. Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. **J Immunol** 1995; 155:4492-6.

Mohankumar S, Patel T. Extracellular vesicle long noncoding RNA as potential biomarkers of liver cancer. **Brief Funct Genomics** 2015; Dec 3. [Epub ahead of print]

Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. **Radiat Oncol** 2011; 6:161.

Molinari C, Casadio V, Foca F, et al. Gene methylation in rectal cancer: predictive marker of response to chemoradiotherapy? **J Cell Physiol** 2013; 228:2343-9.

Monson J, Weiser M, Buie W, Chang G, Rafferty J. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). **Dis Colon Rectum** 2013; 56:535-50.

Morandi F, Fainardi E, Rizzo R, Rouas-Freiss N. The role of HLA-class Ib molecules in immune-related diseases, tumors, and infections. **J Immunol Res** 2014; 2014:231618.

Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature** 2012; 487:330-7.

[NIH] National Cancer Institute. **Colorectal cancer - patient version**. Available from: <URL:<http://www.cancer.gov/types/colorectal>> [2015 dez 10].

[NIH] National Cancer Institute. **SEER Stat Fact Sheets: colon and rectum cancer**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>> [2015 dez 10].

Nawaz M, Camussi G, Valadi H, et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. **Nat Rev Urol** 2014; 11:688-701.

Ng WL, Huang Q, Liu X, Zimmerman M, Li F, Li CY. Molecular mechanisms involved in tumor repopulation after radiotherapy. **Transl Cancer Res** 2013; 2:442-8.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 10:148-55.

Nishioka M, Shimada M, Kurita N, et al. Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. **Cancer Genomics Proteomics** 2011; 8:87-92.

Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. **Radiother Oncol** 2005; 77:18-24.

O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. **Nat Rev Genet** 2006; 7:45-54.

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

Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, et al. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance  $\alpha 1$  integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. **J Cell Biol** 2012; 197:983-96.

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; sup pp 1-13.

Otto GP, Nichols BJ. The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond. **J Cell Sci** 2011; 124:3933-40.

Palma P, Cuadros M, Conde-Muñoz R, et al. Microarray profiling of mononuclear peripheral blood cells identifies novel candidate genes related to chemoradiation response in rectal cancer. **PLoS One** 2013; 8:e74034.

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.

Panwanker A. Unusual infections associated with colorectal cancer. **Rev Infect Dis** 1988; 10:347-64.

Park JE, Tan HS, Datta A, et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. **Mol Cell Proteomics** 2010; 9:1085-99.

Parrella P, Mazzarelli P, Signori E, et al. Expression and heterodimer-binding activity of Ku70 and Ku80 in human non-melanoma skin cancer. **J Clin Pathol** 2006; 59:1181-5.



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.

Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. **Semin Cancer Biol** 2011; 21:139-46.

Pellacani D, Oldridge EE, Collins AT, Maitland NJ. Prominin-1 (CD133) expression in the prostate and prostate cancer: a marker for quiescent stem cells. **Adv Exp Med Biol** 2013; 777:167-84.

Pereira-Fantini PM, Judd LM, Kalantzis A, et al. A33 antigen-deficient mice have defective colonic mucosal repair. **Inflamm Bowel Dis** 2010; 16:604-12.

Pezzolo E, Modena Y, Corso B, Giusti P, Gusella M. Germ line polymorphisms as predictive markers for pre-surgical radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: a 5-year literature update and critical review. **Eur J Clin Pharmacol** 2015; 71:529-39.

Pihl E, Hughes E, McDermott F, Johnson W, Katrivessis H. Lung recurrence after curative surgery for colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 1987; 30:417-9.

Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: Roles in complement resistance, immunity and cancer. **Springer Semin Immunopathol** 2005; 27:375-87.

Poutsiaka DD, Schroder EW, Taylor DD, Levy EM, Black PH. Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. **J Immunol** 1985; 134:138-44.

Prahalad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. **Nature** 2012; 483:100-3.

Psyrrri A, Yu Z, Weinberger PM, et al. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5856-62.

Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. **Dig Liver Dis** 2009; 41:875-80.

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

Ranieri E, Gigante M, Storkus WJ, Gesualdo L. Translational mini-review series on vaccines: dendritic cell-based vaccines in renal cancer. **Clin Exp Immunol** 2007; 147:395-400.

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

Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. **Mol Biol Cell** 1997; 8:2631-45.

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.

Revy P, Buck D, Le Deist F, De Villartay JP. The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. **Adv Immunol** 2005; 87:237-95.

Riballo E, Kühne M, Rief N, et al. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to  $\gamma$ -H2AX foci. **Mol Cell** 2004; 16:715-24.

Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6:53-61.

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.

Ritter G, Cohen LS, Nice EC, et al. Characterization of posttranslational modifications of human A33 antigen, a novel palmitoylated surface glycoprotein of human gastrointestinal epithelium. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 236:682-6.

Rödel C, Martus P, Papadoupoulos T, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:8688-96.

Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquível L, Marín-Hernández A, et al. Mitochondrial free fatty acid  $\beta$ -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol** 2015; 65:209-21.

Sadovska L, Eglītis J, Linē A. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets in breast cancer. **Anticancer Res** 2015; 35:6379-90.

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

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:1731-40.

Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. **J Cell Sci** 2002; 115:2505-15.

Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. **Oncogene** 1997; 15:1191-7.

Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: From detoxification toward cancer prevention and diagnosis. **Front Pharmacol** 2014; 5:170.

Sclafani F, Gonzalez D, Cunningham D, et al. RAS mutations and cetuximab in locally advanced rectal cancer: results of the EXPERT-C trial. **Eur J Cancer** 2014; 50:1430-6.

Scott AM, Lee FT, Jones R, et al. A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4810-7.

Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, et al. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. **Lancet** 2009; 373:811-20.

Senetta R, Duregon E, Sonetto C, et al. YKL-40/c-met expression in rectal cancer biopsies predicts tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy: a multi-institutional study. **PLoS One** 2015; 10:e0123759.

Sharma V, Michel S, Gaertner V, et al. A role of FCER1A and FCER2 polymorphisms in IgE regulation. **Allergy** 2014; 69:231-6.

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.

Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. **Trends Biochem Sci** 2006; 31:402-10.

Shin JS, Tut TG, Ho V, Lee CS. Predictive markers of radiotherapy-induced rectal cancer regression. **J Clin Pathol** 2014; 67:859-64.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Res** 2008; 18:134-47.

Silva J, Garcia V, Rodriguez M, et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2012; 51:409-18.

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

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.

Smalley SR, Benedetti JK, Williamson SK, et al. Phase III trial of fluorouracil-based chemotherapy regimens plus radiotherapy in postoperative adjuvant rectal cancer: GI INT 0144. **J Clin Oncol** 2006; 24:3542-7.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. Cólon e reto; p.102-7.

Spielman L, Winger D, Ho L, Aisen PS, Shohami E, Pasinetti GM. Induction of the complement component C1qB in brain of transgenic mice with neuronal overexpression of human cyclooxygenase-2. **Acta Neuropathol** 2002; 103:157-62.

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

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo P A. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. **Cancer Res** 2004; 64:2390-6.

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

Sun TY, Yan W, Yang CM, et al. Clinical research on dendritic cell vaccines to prevent postoperative recurrence and metastasis of liver cancer. **Genet Mol Res** 2015; 14:16222-32.

Sung HY, Park AK, Ju W, Ahn J-H. Overexpression of mucin 13 due to promoter methylation promotes aggressive behavior in ovarian cancer cells. **Yonsei Med J** 2014; 55:1206-13.

Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer Res** 2012; 72:4875-82.

Szajnik M, Derbis M, Lach M, et al. Exosomes in plasma of patients with ovarian carcinoma: potential biomarkers of tumor progression and response to therapy. **Gynecol Obstet (Sunnyvale)** 2013;Suppl 4:3.

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.

Tamas K, Walenkamp A. ME, De Vries EGE, et al. Rectal and colon cancer: not just a different anatomic site. **Cancer Treat Rev** 2015; 41:671-9.

Tanyi JL, Chu CS. Dendritic cell-based tumor vaccinations in epithelial ovarian cancer: a systematic review. **Immunotherapy** 2012; 4:995-1009.

Terry PD, Miller AB, Rohan TE. Prospective cohort study of cigarette smoking and colorectal cancer risk in women. **Int J Cancer** 2002; 99:480-3.

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; 10:343-354.

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:Unit 3.22.

Théry C, Regnault A, Garin J, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. **J Cell Biol** 1999; 147:599-610.

Torre L A, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science** 2008; 319:1244-7.

Trakarnsanga A. Treatment of locally advanced rectal cancer: controversies and questions. **World J Gastroenterol** 2012; 18:5521.

Tsai H, Hsieh J, Yu F, et al. Perforated colonic cancer presenting as intra-abdominal abscess. **Int J Colorectal Dis** 2007; 22:15-9.

Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. **Gynecol Oncol** 2007; 107:500-4.

Tu TH, Joe Y, Choi H-S, Chung HT, Yu R. Induction of heme oxygenase-1 with hemin reduces obesity-induced adipose tissue inflammation via adipose macrophage phenotype switching. **Mediators Inflamm** 2014; 2014:1-10.

van Gent DC, van der Burg M. Non-homologous end-joining, a sticky affair. **Oncogene** 2007; 26:7731-40.

van Gijn W, Marijnen C, Nagtegaal I, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. **Lancet Oncol** 2011; 12:575-82.



van Niel G, Raposo G, Candalh C, et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. **Gastroenterology** 2001; 121:337-49.

Vandersickel V, Mancini M, Slabbert J, et al. The radiosensitizing effect of Ku70/80 knockdown in MCF10A cells irradiated with X-rays and p(66)+Be(40) neutrons. **Radiat Oncol** 2010; 5:30.

Vavra P, Nowakova J, Ostruszka P, et al. Colorectal cancer liver metastases: laparoscopic and open radiofrequency-assisted surgery. **Videosurg Other Miniinvasive Tech** 2015; 205-12.

Vecchio F, Valentini V, Minsky B, et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Physics** 2005; 62:752-60.

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.

Vellinga TT, Borovski T, De Boer VCJ, et al. SIRT1/PGC1 $\alpha$ -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. **Clin Cancer Res** 2015; 21:2870-9.

Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GCM, Durkacz BW. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Cancer Res** 2003; 63:6008-15.

Vizoso M, Ferreira HJ, Lopez-Serra P, et al. Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR. **Nat Med** 2015; 21:741-50.

Wachsberger PR, Li WH, Guo M, et al. Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts. **Radiat Res** 1999; 151:398-407.

Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014; 6:a022616.

Wang H, Brown J, Gao S, et al. The role of JAK-3 in regulating TLR-mediated inflammatory cytokine production in innate immune cells. **J Immunol** 2013a; 191:1164-74.

Wang L, Zhang X-M, Li Z, et al. Overexpression of nuclear  $\beta$ -catenin in rectal adenocarcinoma is associated with radioresistance. **World J Gastroenterol** 2013b; 19:6876-82.

Wang W, Li T, Wang X, et al. FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages. **Cell Mol Immunol** 2015; 12:615-24.

Wang Y, Li H, Li Y, Min J. [The expression and clinical significance of RABEX-5 and RAB5 in breast cancer]. **Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban** 2011; 42:185-9.

Wasmuth HH, Rekstad LC, Tranø G. The outcome and the frequency of pathological complete response after neoadjuvant radiotherapy in curative resections for advanced rectal cancer: a population-based study. **Color Dis** 2015; Jul 22.

Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. **Cancer Res** 2006; 66:3370-4.

Weber-Boyvat M, Kentala H, Lilja J, et al. OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. **Exp Cell Res** 2014; 3:1-14.

Wei EK, Giovannucci E, Wu K, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. **Int J Cancer** 2010; 108:433-42.

Welt S, Divgi C, Old L. Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. **J Clin Oncol** 1994; 12:1561-1571.

Welt S, Divgi CR, Real FX, et al. Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33. **J Clin Oncol** 1990; 8:1894-906.

Welt S, Scott A. M, Divgi CR, et al. Phase I/II study of iodine 125-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. **J Clin Oncol** 1996; 14:1787-97.

Wheeler DB, Zoncu R, Root DE, Sabatini DM, Sawyers CL. Identification of an oncogenic RAB protein. **Science** 2015; 350:211-7.

Wheeler J, Warren B, Mortensen N, et al. Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation: a proposal for a modified staging system. **Dis Colon Rectum** 2002; 45:1051-6.

Wilkes G, Hartshorn K. Clinical update: colon, rectal, and anal cancers. **Semin Oncol Nurs** 2012; 28:1-22.

Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nat Med** 2001; 7:297-303.

Wu B, Gong J, Yuan S, Zhang Y, Wei T. Patterns of evolutionary selection pressure in the immune signaling protein TRAF3IP2 in mammals. **Gene** 2013a; 531:403-10.

Wu K, Meng J, Baihetiya A, Wang Y. [Clinical efficacy and relative factors of dendritic cell-based tumor vaccination for prostate cancer: a systematic review and meta-analysis]. **Zhonghua Nan Ke Xue** 2013b; 19:545-50.

Wu C, Goldberg RM. Colorectal cancer in 2012: Revisiting landmark trials and identifying new therapies. **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:71-2.

Xia W, Wei Y, Du Y, et al. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. **Mol Carcinog** 2009; 48:610-7.

Yadav N, Kumar S, Marlowe T, et al. Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. **Cell Death Dis** 2015; 6:e1969.

Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. **Gut** 2012; 61:847-854.

Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? **Am J Gastroenterol** 2011; 106:1911-21; quiz 1922.

Zarogoulidis P, Lampaki S, Yarmus L, et al. Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer. **J Cancer** 2014; 5:765-73.

Zavoral M, Suchanek S, Majek O, et al. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3825-34.

Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, et al. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. **Nature** 2012; 485:465-70.

Zhao Z, Liu X-F, Wu H-C, et al. Rab5a overexpression promoting ovarian cancer cell proliferation may be associated with APPL1-related epidermal growth factor signaling pathway. **Cancer Sci** 2010; 101:1454-62.

Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature** 2000; 408:433-9.

Zhou W, Fong MY, Min Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. **Cancer Cell** 2014; 25:501-15.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nat Med** 1998; 4:594-600.

Zois CE, Favaro E, Harris AL. Glycogen metabolism in cancer. **Biochem Pharmacol** 2014; 92:3-11.

## Anexo 1 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

### Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 11 de abril de 2013.

À

**Dra. Vilma Regina Martins.**

**Aluno: Antuani Rafael Baptistella.**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1764/13**

**“Identificação e caracterização das vesículas extracelulares secretadas por células de câncer retal e sua relação com a resposta ao tratamento neoadjuvante”.**

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 09/04/2013, aprovaram a realização do estudo em referência, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 6.0) 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 os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Endoscopia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma de Estudo.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Antônio Hugo José Fróis Marques Campos**  
**2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

-1/1



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Identificação e caracterização das vesículas extracelulares secretadas por células de câncer retal e sua relação com a resposta ao tratamento neoadjuvante

**Pesquisador:** Vilma Regina Martins

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 14445513.7.0000.5432

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

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 243.157

**Data da Relatoria:** 09/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

Apesar de algumas similaridades, o câncer de reto apresenta características que o diferenciam do câncer de cólon, resultando em tratamentos e prognósticos distintos. O câncer de reto, nos estádios II e III, é tratado com radioquimioterapia neoadjuvante seguido de cirurgia, e a resposta ao tratamento neoadjuvante entre os pacientes é variável e imprevisível. Até o presente, para avaliar a resposta ao tratamento neoadjuvante é necessária a intervenção cirúrgica, onde ocorre a remoção de tecido, e através da histopatologia, é determinada a resposta patológica ao tratamento. A identificação de fatores moleculares de significância prognóstica e preditiva tem grande importância, pois permitirão o uso de cada terapêutica especificamente nos pacientes que serão beneficiados com tal tratamento. Recentemente foi descrita a relação de vesículas extracelulares (VEs) secretadas por células com o processo tumorigênico, tendo essas VEs importante papel no crescimento do tumor bem como invasão e metástase. Além disso, estas vesículas podem conter marcadores moleculares de prognóstico e resposta a terapia. As VEs secretadas por tumores de reto são pouco caracterizadas, e seu papel no processo tumoral é ainda desconhecido.

**Objetivo da Pesquisa:**

- Identificação e caracterização das vesículas extracelulares secretadas por linhagens celulares de tumores de reto e o papel das mesmas na resistência ao tratamento radio e quimioterápico;

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

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

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

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

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



- Identificação e caracterização das vesículas extracelulares secretadas no sangue por células de tumores de reto de pacientes como fator preditivo de resposta patológica à radioquimioterapia neoadjuvante.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pacientes do estudo não terão benefício direto ou imediato. Além disso, não estarão expostos a riscos desnecessários além daqueles pertinentes ao exame de retossigmoidoscopia e coleta de sangue periférico, aos quais o paciente já iria ser submetido independente de participar ou não do estudo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Altamente relevante e importante para a instituição. Ainda mais que lançará mão da colaboração já firmada entre o HACC e o instituto LNBio de Campinas.

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

Os termos obrigatórios foram apresentados ao CEP adequadamente.

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

Não há pendências ou inadequações a serem esclarecidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Análise da Comissão de Pesquisa (COPE): Aprovado.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

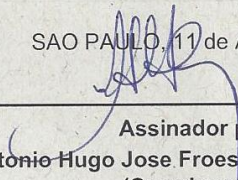
Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

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



SAO PAULO, 11 de Abril de 2013

  
Assinador por:  
**Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos**  
(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 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo

Fundação Antonio Prudente – Centro Internacional de Pesquisa (CIPE)

Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 01509-900 - São Paulo – SP - Fone: 2189-5150

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Documento de identidade nº: \_\_\_\_\_ Sexo: M/F Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ Compl. \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

---

#### DADOS SOBRE O ESTUDO

O presente estudo, intitulado "Identificação e caracterização das vesículas extracelulares secretadas por células de câncer retal e sua relação com a resposta ao tratamento neoadjuvante", é um projeto de pesquisas do Centro Internacional de Pesquisas e Ensino do Hospital AC Camargo e do Departamento do Departamento de Cirurgia Pélvica do mesmo hospital.

---

#### EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

##### Justificativas da pesquisa

Micropartículas são pequenas estruturas produzidas pelas células das pessoas, sejam elas saudáveis ou acometidas por alguma doença. Estudos iniciais sugerem que estas micropartículas possam ter algum papel no desenvolvimento do câncer. No entanto, mais estudos devem ser feitos para que o papel destas micropartículas seja melhor compreendido. Neste projeto, investigaremos as micropartículas em amostras de sangue de pacientes com tumores de reto, com o objetivo de conhecer melhor a sua função nesta doença. Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos a você, mas talvez sejam úteis no futuro, permitindo um diagnóstico mais informativo e um maior conhecimento a respeito desta doença.

##### Objetivos da pesquisa

Avaliar se micropartículas encontradas no sangue de pacientes com câncer de reto são um fator preditivo para a resposta ao tratamento de radioterapia e quimioterapia.



#### **Procedimentos que serão utilizados e propósitos**

Para participar do estudo você (a paciente) deverá ter:

- Diagnóstico de câncer de reto.

Caso você concorde em participar deste estudo, será feita uma coleta de quinze mililitros (15mL) de sangue por um profissional treinado. Esta coleta deverá ocorrer quando você for fazer coleta de sangue para outros exames solicitados pelo seu médico, portanto você não terá despesas adicionais decorrentes da participação nesta pesquisa, e deste modo não será ressarcida de gastos com transporte ou alimentação no dia da coleta de sangue. Este será um procedimento absolutamente normal de coleta de sangue, geralmente tem uma duração de menos de 3 minutos e não há necessidade de uso de qualquer tipo de anestesia. O sangue coletado será processado para a separação de plasma e de células brancas. O plasma ficará armazenado até a sua utilização, em freezers apropriados, localizados no Centro de Pesquisas (sob responsabilidade da Dra. Vilma Regina Martins). As células brancas vão ficar armazenadas no banco de tumores do Hospital AC Camargo (sob a responsabilidade do Dr. Antônio Hugo JFM Campos, MD, PhD). Havendo sobra de material, este poderá ser utilizado para outros estudos futuros visando a maior compreensão do câncer humano. Você pode optar, neste momento, pelo direito de ser contactado para fornecer autorização para cada nova pesquisa que venha a fazer uso do seu material biológico ou autorizar o uso futuro do mesmo sem a necessidade de um novo contato.

Você tem a absoluta liberdade de participar ou não deste estudo sem que isto acarrete qualquer comprometimento ou alteração em seu tratamento. Caso você concorde em participar, não haverá nenhum gasto extra para você ou para a sua seguradora de saúde. Do mesmo modo, a sua participação é uma colaboração voluntária, e não haverá nenhuma forma de remuneração. Você pode desistir de participar deste estudo em qualquer momento, mesmo que você já tenha assinado este termo. Sua desistência em participar do estudo, assim como seu pedido de retirada de qualquer material armazenado, podem ser feitos a qualquer momento, e não irão trazer qualquer prejuízo ao seu tratamento. Todas as informações obtidas são sigilosas e não serão usadas para nenhum outro fim que não os objetivos desta pesquisa. Sua identidade será sempre preservada.

Se você concordar em participar, este Termo de Consentimento deverá ser assinado em 2 vias, sendo que uma via permanecerá com você e a outra com o pesquisador responsável.

#### **Complicações e riscos esperados**

Os riscos e complicações físicas associadas com a participação neste estudo são decorrentes da coleta de sangue, que será feita por profissional treinado seguindo procedimento padrão. É pouco provável que a coleta de sangue cause desconforto prolongado. Porém, se isto ocorrer, este deve ser bastante leve conseqüente apenas de uma picada de uma agulha. Todas as perguntas aqui feitas, e também o método de coleta que será utilizado neste estudo foram previamente empregados em outros projetos feitos neste e em outros hospitais do Brasil e do exterior. Todos os dados aqui levantados serão usados apenas para pesquisa científica, visando a melhor compreensão do câncer de reto. Todos os dados serão mantidos confidenciais e sua identidade será preservada em qualquer forma de divulgação científica dos mesmos.

#### **Benefícios que poderão ser obtidos**

A sua participação neste estudo não irá te trazer nenhum benefício pessoal direto. Contudo, os resultados podem contribuir para o maior entendimento dos marcadores de resposta ao tratamento em câncer de reto, e desta forma podem ajudar outras pessoas no futuro.

Por favor, responda sim ou não às questões a seguir:

Foi garantido a você o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento?

SIM NÃO

Ficou esclarecida a você a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do seu tratamento neste hospital?

SIM NÃO

Ficou esclarecido que não haverá ressarcimento ou qualquer tipo de pagamento referente à realização deste estudo?

SIM NÃO

Ficou esclarecido que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

SIM NÃO

Ficou esclarecido que a sua identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial, sob guarda do pesquisador principal, e que os dados serão utilizados somente para análises estatísticas e posteriormente para publicações científicas, sem qualquer informação que possa identificar o participante?

SIM NÃO

Ficou esclarecido a você os possíveis riscos e complicações associadas com a participação neste estudo, decorrentes da coleta de sangue?

SIM NÃO



## CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

De acordo com a Resolução nº 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde, item 5: “o consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco é formalizado através de TCLE, por meio do qual o sujeito da pesquisa deve se manifestar expressamente quanto às seguintes alternativas, excludentes entre si: I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa”.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecida dos riscos e benefícios deste estudo, consinto em participar, na qualidade de paciente, deste projeto de pesquisa, e opto pela alternativa marcada abaixo:

( ) Quero ser contatada para fornecer novo consentimento a cada pesquisa futura que venha a fazer uso do meu material biológico.

( ) Dispensar ser contatada para fornecer novo consentimento a cada pesquisa futura que venha a fazer uso do meu material biológico.

Ainda de acordo com esta mesma resolução, item 5b: “o TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo sujeito da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto às suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo”.

Deste modo, garantimos que você terá acesso, a qualquer momento, a todos os resultados gerados a partir das análises de sua amostra de sangue. Do mesmo modo é seu direito obter orientação, quando cabível, incluindo aconselhamento genético, se achados aplicáveis forem obtidos a partir da sua amostra.

Em casos de dúvidas e para ter acesso aos resultados da pesquisa, assim como às orientações quanto às implicações dos resultados obtidos, contatar o pesquisador principal, Dra. Vilma Regina Martins no Centro de Pesquisas do Hospital do Câncer A.C. Camargo pelo telefone 2189-5000 (ramal 2973). Se o pesquisador principal não fornecer as informações e/ou esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - AC Camargo/SP pelo telefone 2189-5000 (ramais 2069 ou 5020), de segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.

São Paulo, de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

## 1. Identificação

Local de Atendimento		
Nome do Paciente:	Idade:	Sexo:
Registro Hospitalar:	CPF:	RG:
Endereço:		Telefone:

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA COLETA, DEPÓSITO, ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO PARA PESQUISAS**

Para obter um maior conhecimento sobre o câncer e doenças relacionadas, os médicos e pesquisadores deste Hospital desenvolvem pesquisa clínica e científica, buscando oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. O material biológico retirado é destinado para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico. O restante do material retirado pode ser armazenado para novos exames, caso seja considerado necessário. Caso contrário, é descartado, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

**Estamos solicitando a sua permissão para coleta, depósito, armazenamento e utilização do resto de tecidos e/ou fluídos retirados de você que não são mais necessários para o seu diagnóstico. A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu procedimento, nem tampouco, em aumento no tempo ou extensão da mesma. Para aumentar o valor científico de seu material biológico e a possibilidade de que ele forneça informações importantes para o melhor conhecimento do câncer, gostaríamos de coletar também dados de idade, sexo, diagnóstico, tratamento e história familiar e fatores associados (como fumo, consumo de álcool, etc). Estas informações serão coletadas de modo a preservar a sua identidade e privacidade.**

Seu material biológico será depositado no Biobanco do Hospital A.C. Camargo. Todo material depositado no Biobanco é codificado e apenas o seu gerente (Dr. Antônio Hugo José Fróes de Marques Campos, patologista, CRM-SP 110.240) tem acesso irrestrito à sua identidade. Caso sejam realizadas pesquisas genéticas utilizando seu material armazenado, e estas pesquisas indiquem alterações que envolvam riscos futuros para você ou seus familiares, você poderá ser informado, se esse for o seu desejo, inclusive, recebendo aconselhamento genético gratuito, quando aplicável.

Este material poderá ser usado em pesquisas futuras. Os projetos de pesquisa que utilizarem este material serão previamente apresentados à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital. Sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. **Você possui o direito de ser consultado para fornecer sua autorização sempre que sua amostra for utilizada, ou pode escolher dispensar a necessidade de ser consultado para fornecer sua autorização caso novas pesquisas venham a utilizar a sua amostra. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita sempre de modo a manter o seu anonimato.**

Você possui o direito de ter acesso gratuito:

- a) às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado;
- b) às informações obtidas à partir de seu material biológico humano utilizado;
- c) às informações genéticas obtidas à partir do seu material biológico humano utilizado, inclusive, aquelas que impliquem em riscos para doenças não preveníveis ou riscos familiares;
- d) ao aconselhamento genético, quando aplicável;
- e) às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade de conservação e integridade de seu material biológico, e as medidas para garantir a privacidade e confidencialidade.

Como este é um biobanco institucional, o seu gerente tem a responsabilidade de colocar você em contato com o(s) pesquisador(es) responsável(is) pelo(s) projeto(s) de pesquisa científica que tiveram acesso ao seu material biológico. Este(s), de acordo com a legislação, tem a responsabilidade de garantir seus direitos expressos nos itens “b”, “c” e “d” acima descritos.

Caso o material biológico não tenha critérios de qualidade para utilização em pesquisa, o mesmo será descartado seguindo a Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto, e de modo a garantir a sua privacidade e direito ao anonimato.

A autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito ao gerente do Biobanco desta instituição, sem prejuízo ou perda de benefícios.

Não existem quaisquer benefícios diretos ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes de pesquisas realizadas nesta Instituição.

**Sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.**

Caso haja questões a esclarecer sobre este Termo de Consentimento para Coleta, Depósito, Armazenamento e Utilização de Material Biológico Humano para Pesquisas, por gentileza entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone 2189-5000 ramal 5020. Para mais informações sobre o Biobanco do Hospital A C Camargo, você pode acessar nossa página institucional ([www.accamargo.org.br/biobanco](http://www.accamargo.org.br/biobanco)). Para falar com o gerente do Biobanco, você pode escrever para [ahcampos@hcancer.org.br](mailto:ahcampos@hcancer.org.br) ou telefonar para 2189-5000, ramais 5103/5185/2785. O Biobanco do Hospital A C Camargo está localizado no Departamento de Anatomia Patológica, Ed. Hilda Jacob. Como esta é uma área de acesso restrito, caso queira marcar uma entrevista, por favor, entre em contato com antecedência pelo email ou telefones fornecidos acima.

**Questões relativas ao procedimento a que você será submetido ou ao seu tratamento nesta Instituição devem ser encaminhadas ao seu médico. Você receberá 1 (uma) via deste documento.**

**Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste. Por favor, rubrique cada uma das folhas deste documento.**

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente o texto. Declaro receber neste ato uma das duas vias deste documento, datada e assinada por mim e pelo Responsável Institucional do Biobanco-Gerente, assim como pelo responsável pela aplicação do TCLE, e::

1.Eu (escrever Sim ou Não)..... **consinto (concordo)** que tecidos, sangue e outros fluídos corporais, quando não necessários para o meu diagnóstico, possam ser coletados, guardados e usados pelo Biobanco do

Hospital A C Camargo e seus colaboradores, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

2 Se a resposta anterior for **SIM**, minha informação e amostra poderão ser usadas em testes genéticos que podem identificar risco de doenças genéticas para mim ou meus familiares. Neste caso **(escrever Sim ou Não)**,.....quero ser informado da descoberta.

3 Se você respondeu **SIM** à primeira questão, por favor escolha uma das opções a seguir:

( ) Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas futuras sobre o câncer e doenças relacionadas, sem a necessidade de ser contactado para fornecer novas autorizações.

( ) Em caso de novas pesquisas que venham a fazer uso do meu material biológico, quero ser contactado para fornecer ou não autorização. Neste caso, após o meu óbito **(escrever SIM ou NÃO)** ....., **é meu desejo (concordo)** que outras pessoas possam consentir com o uso ou o descarte do material biológico e ter acesso à minha informação genética.

3.1. Se a resposta anterior for SIM, queira por gentileza indicar abaixo o nome de até 02 (duas) pessoas de seu convívio e confiança, que possam exercer as atividades supra mencionadas:

Nome: \_\_\_\_\_ Telefone: \_ ( \_\_ ) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Telefone: \_ ( \_\_ ) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Por fim, você será comunicado sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas ou da decisão de interrupção da pesquisa, quando for o caso, como também sobre o fechamento ou a transferência do Biobanco do Hospital A. C. Camargo.

Por expressão de verdade firmo o presente Termo.

São Paulo.....,de.....de 20\_\_.

Assinatura: .....  
Nome:

RG:

CPF:



Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos  
Biobanco do Hospital A C Camargo

.....  
Nome:  
Responsável pela aplicação do TCLE

*Prestador de Serviço de Saúde: Fundação Antonio Prudente, mantenedora do Hospital A. C. Camargo- Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer, CNPJ/MF sob nº 60.961.968/0001-06, com sede na Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – Capital/SP, CEP 01509-010 Fone(11) 2189-5000*



**Anexo 3 - Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto**

<b>Proteínas com aumento da expressão no tumor residual da peça cirúrgica</b>		
<b>Protein IDs</b>	<b>t-test p value</b>	<b>Fold Change</b>
KPYM_HUMAN Pyruvate kinase PKM	2,77E-06	2,71207808
AK1A1_HUMAN Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	4,50E-06	2,26959254
1433Z_HUMAN 14-3-3 protein zeta/delta	1,13E-05	2,65001929
ACTN4_HUMAN Alpha-actinin-4	2,56E-05	2,23618762
RAP2B_HUMAN Ras-related protein Rap-2b	4,09E-05	2,41075233
1433E_HUMAN 14-3-3 protein epsilon	6,14E-05	2,44428116
GNAI2_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	6,43E-05	2,33759231
RINI_HUMAN Ribonuclease inhibitor	7,42E-05	2,87289379
RS26_HUMAN 40S ribosomal protein S26	0,0001309	3,22202025
CCD47_HUMAN Coiled-coil domain-containing protein 47	0,000171737	2,14368744
VPS35_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 35	0,000179093	2,25003553
H0YKD8_HUMAN 60S ribosomal protein L28	0,000206972	2,18024577
RAB1B_HUMAN Ras-related protein Rab-1B	0,000212493	4,70672519
PP1A_HUMAN Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	0,000220009	2,49220939
APT_HUMAN Adenine phosphoribosyltransferase	0,000251297	2,8105498
EF2_HUMAN Elongation factor 2	0,000268622	1,71381922
PRS10_HUMAN 26S protease regulatory subunit 10B	0,000282218	2,07451211
AMPL_HUMAN Cytosol aminopeptidase	0,000297144	2,03466006
E7ETB3_HUMAN Aspartyl aminopeptidase	0,000327279	4,08748628
K6PL_HUMAN 6-phosphofructokinase, liver type	0,000349778	2,57468934
RRAS_HUMAN Ras-related protein R-Ras	0,000356646	3,90907233
WDR1_HUMAN WD repeat-containing protein 1	0,000373191	1,8337254
ARP2_HUMAN Actin-related protein 2	0,000407452	1,56570631
VATA_HUMAN V-type proton ATPase catalytic subunit A	0,000416815	2,06001795
2AAA_HUMAN Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	0,000443254	2,48595249
PUR2_HUMAN Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	0,000498305	2,60546778
IQGA1_HUMAN Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0,000571388	2,42501812
RL9_HUMAN 60S ribosomal protein L9	0,000593299	2,82947757
HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	0,00059509	1,94463656
CLUS_HUMAN Isoform 2 of Clusterin	0,000632124	10,8831382
CBR1_HUMAN Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,000646131	2,32309045
1433B_HUMAN Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha	0,000719533	2,17138774
RAB14_HUMAN Ras-related protein Rab-14	0,000875267	2,59902571
PDIA1_HUMAN Protein disulfide-isomerase	0,000929898	2,3610564

SYG_HUMAN Glycine--tRNA ligase	0,000932793	2,5695995
ATLA3_HUMAN Atlastin-3	0,00096498	2,2323649
TBA1B_HUMAN Tubulin alpha-1B chain	0,00107397	1,90289302
ABHDB_HUMAN Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11	0,00107557	3,58477402
ACTN1_HUMAN Isoform 4 of Alpha-actinin-1	0,00109065	2,55088579
TBA1C_HUMAN Tubulin alpha-1C chain	0,00109677	3,23990548
RAB1A_HUMAN Ras-related protein Rab-1A	0,00110475	2,27366711
CLH1_HUMAN Clathrin heavy chain 1	0,00115493	5,09010218
GELS_HUMAN Gelsolin	0,00117301	2,12492302
COMT_HUMAN Catechol O-methyltransferase	0,00120513	2,69450708
TBB4B_HUMAN Tubulin beta-4B chain	0,00124821	1,91752775
LDHA_HUMAN Isoform 3 of L-lactate dehydrogenase A chain	0,00130817	2,07735526
ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1	0,00156083	1,76303596
UBP5_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	0,00166458	3,77972045
J3KR44_HUMAN Ubiquitin thioesterase OTUB1	0,00171275	3,30232471
GANAB_HUMAN Neutral alpha-glucosidase AB	0,00184341	2,27868841
PRS8_HUMAN 26S protease regulatory subunit 8	0,00184922	3,23739334
STX12_HUMAN Syntaxin-12	0,00185649	3,24335886
CY24B_HUMAN Cytochrome b-245 heavy chain	0,00188775	2,48841619
NIBL1_HUMAN Niban-like protein 1	0,0019346	2,10576266
GBLP_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	0,0020299	2,21634339
SYVC_HUMAN Valine--tRNA ligase	0,00204988	3,13616467
CNDP2_HUMAN Cytosolic non-specific dipeptidase	0,00211377	3,43321793
PRS6B_HUMAN 26S protease regulatory subunit 6B	0,00217111	2,76977796
PRAF3_HUMAN PRA1 family protein 3	0,00218356	2,27543992
SYNC_HUMAN Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,00220814	2,07411743
RAB18_HUMAN Ras-related protein Rab-18	0,00225209	2,27122583
NAMPT_HUMAN Nicotinamide phosphoribosyltransferase	0,00232161	2,31748456
1433T_HUMAN 14-3-3 protein theta	0,00232603	2,21939346
ABD12_HUMAN Isoform 2 of Monoacylglycerol lipase ABHD12	0,00236226	1,74713822
VAMP3_HUMAN Vesicle-associated membrane protein 3	0,00238058	2,39488526
APOA4_HUMAN Apolipoprotein A-IV	0,00241548	4,06160168
TERA_HUMAN Transitional endoplasmic reticulum ATPase	0,00244618	1,58943612
RAB7A_HUMAN Ras-related protein Rab-7a	0,00248712	1,88096926
RAB21_HUMAN Ras-related protein Rab-21	0,00250665	2,00536404
XRCC6_HUMAN X-ray repair cross-complementing protein 6	0,00264152	2,46174704
APOE_HUMAN Apolipoprotein E	0,0026882	3,42318064
PSMD3_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	0,00269038	2,06356288
E9PN11_HUMAN Rho-related GTP-binding protein RhoC (Fragment)	0,00290374	2,99432979
LYN_HUMAN Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase Lyn	0,00321186	2,46530135
FABP5_HUMAN Fatty acid-binding protein, epidermal	0,00345426	2,98610627
TTL12_HUMAN Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	0,00366246	3,43499687

CAPG_HUMAN Macrophage-capping protein	0,00374204	3,35567861
A1AT_HUMAN Alpha-1-antitrypsin	0,00376596	2,51669282
HNRPF_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	0,00404833	2,01796566
EF1G_HUMAN Elongation factor 1-gamma	0,00426574	1,68091106
FOLR2_HUMAN Folate receptor beta	0,00431464	5,95630426
COPB_HUMAN Coatamer subunit beta	0,00447118	4,48616221
ARP3_HUMAN Actin-related protein 3	0,00452694	1,47545513
ARC1B_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	0,0045562	1,77173872
SYAC_HUMAN Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,00461934	3,80819318
PYGB_HUMAN Glycogen phosphorylase, brain form	0,00470188	2,09681572
TBL2_HUMAN Transducin beta-like protein 2	0,00484523	1,82713178
B5MDF5_HUMAN GTP-binding nuclear protein Ran	0,0048599	1,72935033
GDIR2_HUMAN Rho GDP-dissociation inhibitor 2	0,00497185	4,41768636
UBA1_HUMAN Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	0,00503479	1,88722328
SYRC_HUMAN Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,00539469	2,10660375
VAT1_HUMAN Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	0,00566293	1,97341812
GSTP1_HUMAN Glutathione S-transferase P	0,00569513	2,3843793
SAC1_HUMAN Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	0,00582532	1,94617481
CLIC1_HUMAN Chloride intracellular channel protein 1	0,00582742	2,06260754
I3L504_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	0,00583896	2,27695291
PROF1_HUMAN Profilin-1	0,00599566	2,68417805
K1C16_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 16	0,00609814	2,70275722
AP2A1_HUMAN AP-2 complex subunit alpha-1	0,00629756	2,41181802
ARPC2_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	0,00648525	1,99152451
Q5T5C7_HUMAN Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,00679522	2,06122082
STAT1_HUMAN Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	0,00687751	2,20669761
TYPH_HUMAN Thymidine phosphorylase	0,0069627	3,09365618
PUR6_HUMAN Multifunctional protein ADE2	0,00730623	1,83142267
K6PP_HUMAN 6-phosphofructokinase type C	0,00735435	2,57983333
PUR9_HUMAN Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	0,00763627	1,71279049
PP2AA_HUMAN Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	0,0077629	1,9476146
CDC42_HUMAN Cell division control protein 42 homolog	0,00785681	1,60507423
SRPR_HUMAN Signal recognition particle receptor subunit alpha	0,00791549	1,96181123
APOA1_HUMAN Apolipoprotein A-I	0,00794925	2,33747992
HSPB1_HUMAN Heat shock protein beta-1	0,00811954	2,73988733
ENPL_HUMAN Endoplasmic	0,00825007	2,59353217
KV302_HUMAN Ig kappa chain V-III region SIE	0,00831287	2,02661457
TBB2A_HUMAN Tubulin beta-2A chain	0,00835974	3,44914273
CON_P04259	0,00911423	2,56979828
ENOA_HUMAN Alpha-enolase	0,00924532	1,82690444
GFPT1_HUMAN Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	0,00973977	2,40295283
AMPB_HUMAN Aminopeptidase B	0,0101303	1,7830965

TBB5_HUMAN Tubulin beta chain	0,0104395	1,85932075
SYDC_HUMAN Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	0,0107677	1,60248039
ACSF3_HUMAN Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial	0,010835	4,48616045
TEBP_HUMAN Prostaglandin E synthase 3	0,0108671	1,99517338
G6PI_HUMAN Glucose-6-phosphate isomerase	0,0109764	2,2721602
PIP_HUMAN Prolactin-inducible protein	0,0111708	4,224879
PRS7_HUMAN 26S protease regulatory subunit 7	0,0115619	3,10931637
ACSL5_HUMAN Isoform 2 of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	0,0117751	1,96464976
1433G_HUMAN 14-3-3 protein gamma	0,011801	2,37650935
SYTC_HUMAN Isoform 2 of Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,0119475	1,95051543
COPA_HUMAN Isoform 2 of Coatomer subunit alpha	0,0120031	2,93678027
UGDH_HUMAN UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,0123841	2,30987469
FAS_HUMAN Fatty acid synthase	0,0124661	2,1578837
TMED5_HUMAN Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	0,0128461	2,53163659
EPIPL_HUMAN Epiplakin	0,013395	11,174524
TBA4A_HUMAN Tubulin alpha-4A chain	0,0137529	1,8442028
SYEP_HUMAN Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	0,0140395	1,77533381
HNRPQ_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	0,0140564	1,49670954
DESP_HUMAN Desmoplakin	0,0142114	3,93157347
PDXK_HUMAN Pyridoxal kinase	0,0143933	1,60436763
RHOA_HUMAN Transforming protein RhoA	0,014737	1,73222402
LKHA4_HUMAN Leukotriene A-4 hydrolase	0,0148823	4,19514303
E7EV01_HUMAN Calpain-5	0,015004	1,75525286
RL22_HUMAN 60S ribosomal protein L22	0,015201	1,77154578
DHB11_HUMAN Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	0,0153033	1,71233156
ROA2_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	0,0153588	1,5415609
TCPH_HUMAN T-complex protein 1 subunit eta	0,0154246	1,69104501
REEP5_HUMAN Receptor expression-enhancing protein 5	0,015519	1,69753103
RAB3D_HUMAN Ras-related protein Rab-3D	0,0157093	1,50477436
PGAM1_HUMAN Phosphoglycerate mutase 1	0,0161701	1,73569471
HS90A_HUMAN Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	0,0162854	1,75482967
MPPB_HUMAN Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	0,0162934	1,83630118
SYMC_HUMAN Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,0165527	1,72946263
CRYAB_HUMAN Alpha-crystallin B chain	0,0172464	8,93112957
E7EU23_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor beta	0,018458	1,6263656
OLFM4_HUMAN Olfactomedin-4	0,0188401	4,10791216
TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain	0,01889	1,92241669
CD38_HUMAN ADP-ribosyl cyclase 1	0,0189688	2,38121013
ILVBL_HUMAN Acetolactate synthase-like protein	0,0194444	1,67878151
CSK_HUMAN Tyrosine-protein kinase CSK	0,0198208	2,17498779
TAGL2_HUMAN Transgelin-2	0,0202678	1,65050677

PA1B2_HUMAN Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	0,0204306	1,74387036
Q3KQZ2_HUMAN Synaptogyrin	0,0204738	1,8256583
MLEC_HUMAN Malectin	0,0206768	3,80460271
PRS6A_HUMAN 26S protease regulatory subunit 6A	0,0206848	1,6646059
SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	0,0210376	1,80184929
K1C14_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 14	0,0212015	2,08486038
CAN1_HUMAN Calpain-1 catalytic subunit	0,0215215	1,94739672
PSD13_HUMAN Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	0,021582	1,66656931
CATD_HUMAN Cathepsin D	0,0216675	2,64495367
PLSL_HUMAN Plastin-2	0,0216983	3,01896533
RL5_HUMAN 60S ribosomal protein L5	0,0225178	1,64793259
COR1B_HUMAN Coronin-1B	0,0226223	1,64633644
6PGL_HUMAN 6-phosphogluconolactonase	0,0228146	1,61178921
DHRS7_HUMAN Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	0,0234223	2,26048847
PLAK_HUMAN Junction plakoglobin	0,0234284	3,11207368
LAC2_HUMAN Ig lambda-2 chain C regions	0,0235729	1,77135529
RAB5C_HUMAN Isoform 2 of Ras-related protein Rab-5C	0,0236255	1,5034968
RAB6A_HUMAN Ras-related protein Rab-6A	0,0237106	1,56227658
HNRPC_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	0,0240337	2,25558103
SCR2_HUMAN Lysosome membrane protein 2	0,0248092	3,25755531
CO3_HUMAN Complement C3	0,0249671	1,99809242
E9PF82_HUMAN Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	0,0250395	3,43065594
ZA2G_HUMAN Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,0251043	18,3457308
XRCC5_HUMAN X-ray repair cross-complementing protein 5	0,0258312	1,58687873
RHOG_HUMAN Rho-related GTP-binding protein RhoG	0,0271846	1,58912305
A2MG_HUMAN Alpha-2-macroglobulin	0,027399	2,17247002
STX7_HUMAN Syntaxin-7	0,0275535	1,67981226
SND1_HUMAN Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	0,027731	1,544112
C163A_HUMAN Isoform 2 of Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	0,0281764	3,10960859
RL13A_HUMAN 60S ribosomal protein L13a	0,0284018	1,64038185
J3KQ18_HUMAN D-dopachrome decarboxylase	0,0291255	1,79861519
RAB10_HUMAN Ras-related protein Rab-10	0,0295011	1,7812929
SYLC_HUMAN Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,03074	1,95818092
PSME1_HUMAN Proteasome activator complex subunit 1	0,0307627	1,42013765
PSA_HUMAN Puromycin-sensitive aminopeptidase	0,0308487	1,86941742
CD177_HUMAN CD177 antigen	0,0309214	2,48453139
Q5W0H4_HUMAN Translationally-controlled tumor protein	0,031228	3,27428415
HNRH2_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	0,0315135	1,53011993
HS90B_HUMAN Heat shock protein HSP 90-beta	0,032265	1,85870759
TBB4A_HUMAN Tubulin beta-4A chain	0,0323902	2,66412005
GMDS_HUMAN GDP-mannose 4,6 dehydratase	0,0326322	3,81322107

CYFP1_HUMAN Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	0,032717	1,58071321
AL9A1_HUMAN 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	0,0333269	2,19855161
ASSY_HUMAN Argininosuccinate synthase	0,0335611	2,0015201
RL10_HUMAN 60S ribosomal protein L10	0,0337641	2,09131985
PSA1_HUMAN Isoform Long of Proteasome subunit alpha type-1	0,0337871	1,84323743
IF4A1_HUMAN Eukaryotic initiation factor 4A-I	0,0338403	1,47696489
AL5AP_HUMAN Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	0,0340051	2,59686858
B0UXB6_HUMAN Abhydrolase domain-containing protein 16A	0,0343569	1,5375922
SYIC_HUMAN Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,0345984	1,76516013
NAGK_HUMAN Isoform 2 of N-acetyl-D-glucosamine kinase	0,034619	1,84546876
KPRP_HUMAN Keratinocyte proline-rich protein	0,0346235	5,47772972
G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,035967	2,16861833
ANXA1_HUMAN Annexin A1	0,0361334	2,13158305
RL24_HUMAN 60S ribosomal protein L24	0,0361613	1,82978711
GNAI3_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	0,0379175	1,56016447
K1C10_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10	0,0379865	3,06496079
TCPZ_HUMAN T-complex protein 1 subunit zeta	0,0381462	1,69567275
RTN3_HUMAN Isoform 3 of Reticulon-3	0,0392752	3,03263555
IGHG2_HUMAN Ig gamma-2 chain C region	0,0393277	2,50268336
PYGL_HUMAN Glycogen phosphorylase, liver form	0,0401118	5,21985721
SMD3_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	0,0406169	1,79499468
VTA1_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	0,0407572	1,61620547
PABP1_HUMAN Polyadenylate-binding protein 1	0,0416066	1,71364369
KCY_HUMAN UMP-CMP kinase	0,0422688	2,00370055
RL35_HUMAN 60S ribosomal protein L35	0,042642	3,39487131
VPS4B_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	0,0439862	1,67750646
FMNL_HUMAN Isoform 3 of Formin-like protein 1	0,0440272	2,08250398
EIF3A_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0,0440962	1,84132329
ILEU_HUMAN Leukocyte elastase inhibitor	0,0441979	4,08861447
KINH_HUMAN Kinesin-1 heavy chain	0,0452141	1,45717924
DYN2_HUMAN Dynamin-2	0,0455674	1,63601703
QPCTL_HUMAN Glutaminy-peptide cyclotransferase-like protein	0,0458571	2,13607798
B0YIW2_HUMAN Apolipoprotein C-III	0,0460225	3,73438037
1433S_HUMAN 14-3-3 protein sigma	0,0462976	3,53555848
SGPL1_HUMAN Sphingosine-1-phosphate lyase 1	0,0469635	2,41078743
H3BND4_HUMAN Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	0,0470474	2,10128346
XPO1_HUMAN Exportin-1	0,0479339	1,66182231
A16A1_HUMAN Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	0,04805	1,45020706
DSG2_HUMAN Desmoglein-2	0,0483825	1,63477579

<b>Proteínas com diminuição da expressão no tumor residual da peça cirúrgica</b>		
<b>Protein Ids</b>	<b>t-test p value</b>	<b>Fold Change</b>
QCR7_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 7	1,28E-07	11,14723352
QCR2_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	2,11E-07	8,335517033
QCR1_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	6,37E-07	9,239662508
UCRI_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	8,20E-07	12,31724736
CISD1_HUMAN CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	2,40E-06	17,39516272
CX6B1_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 6B1	3,04E-06	26,46176522
H0UI06_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	9,95E-06	4,034220645
COX5B_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	1,91E-05	7,1017032
COX5A_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	4,93E-05	4,740609233
QCR6_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	4,99E-05	5,614123751
ODP2_HUMAN Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	9,26E-05	5,212308697
NDUB1_HUMAN Isoform 2 of NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	0,000174966	2,255555191
ADT2_HUMAN ADP/ATP translocase 2	0,0001927	2,757324327
NDUB7_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	0,000241606	2,748613507
MIRO1_HUMAN Isoform 3 of Mitochondrial Rho GTPase 1	0,000283008	2,049024205
NDUA8_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0,00036238	6,178692059
SPIT1_HUMAN Kunitz-type protease inhibitor 1	0,000378001	2,550142142
TIM23_HUMAN Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23	0,000436142	2,73481851
NDUS1_HUMAN Isoform 2 of NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	0,000649594	2,620838917
CYC_HUMAN Cytochrome c	0,000722425	2,964335039
CCHL_HUMAN Cytochrome c-type heme lyase	0,000767019	3,997556831
MARH5_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase MARCH5	0,00087079	3,139292943
F210A_HUMAN Protein FAM210A	0,000893916	2,850201028
CC90B_HUMAN Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	0,001152	1,755483653
NUCB1_HUMAN Nucleobindin-1	0,00126239	2,527586063
NDK3_HUMAN Nucleoside diphosphate kinase 3	0,00127256	2,26915706
FACE1_HUMAN CAAX prenyl protease 1 homolog	0,00128347	2,154339485
CON__P02769	0,00141054	12,29563602
QCR9_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 9	0,00154848	2,264060576
NDUAB_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	0,00155695	2,127804481
VDAC3_HUMAN Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	0,00164967	2,542173519
B4DLN1_HUMAN Mitochondrial dicarboxylate carrier	0,00167775	2,30442156

CH10_HUMAN 10 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,00169128	6,655145546
LACTB_HUMAN Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	0,00174072	3,543111902
NDUB3_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	0,00187832	2,364721488
ECSIT_HUMAN Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	0,0019003	2,003006959
IGF1R_HUMAN Insulin-like growth factor 1 receptor	0,00199773	2,630473734
QCR8_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 8	0,00207802	3,050471141
ABCBA_HUMAN ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial	0,00217878	2,959469457
ETFD_HUMAN Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	0,00222786	4,208462876
STML2_HUMAN Stomatin-like protein 2, mitochondrial	0,00225317	3,134426942
ATP5I_HUMAN ATP synthase subunit e, mitochondrial	0,00238006	4,210175711
TPD54_HUMAN Isoform 7 of Tumor protein D54	0,00268304	2,07437104
TSN6_HUMAN Tetraspanin-6	0,00277739	2,909834557
OCAD1_HUMAN OCIA domain-containing protein 1	0,00299279	2,251772971
ACAD9_HUMAN Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	0,00308294	1,610113467
ATP5H_HUMAN ATP synthase subunit d, mitochondrial	0,00319071	1,970560401
NDUBA_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	0,00339538	2,185944548
SSBP_HUMAN Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	0,0034701	2,5139624
MUL1_HUMAN Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1	0,00366699	2,722799969
CD97_HUMAN CD97 antigen	0,00391015	2,208221739
NDUS3_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron- sulfur protein 3, mitochondrial	0,00414509	1,654696999
USMG5_HUMAN Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	0,0042018	2,312798393
SGMR1_HUMAN Sigma non-opioid intracellular receptor 1	0,00423707	2,675636925
NDUBB_HUMAN Isoform 2 of NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	0,00424187	2,210162113
SQRD_HUMAN Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0,00426495	2,717113434
MCATL_HUMAN Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein CACL	0,00451354	2,575412007
TPC_HUMAN Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	0,00455336	2,078654515
PHB_HUMAN Prohibitin	0,00518281	2,222967296
CP27A_HUMAN Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial	0,00574517	2,384018276
H0Y886_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial (Fragment)	0,00586802	2,497804416
ZNT9_HUMAN Zinc transporter 9	0,00591334	1,797300121
SFXN1_HUMAN Sideroflexin-1	0,0059492	2,360353363
NDUS8_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron- sulfur protein 8, mitochondrial	0,00679685	2,007759218
J3KPS0_HUMAN DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12, isoform CRA_c	0,00716072	2,243433729
S2540_HUMAN Solute carrier family 25 member 40	0,00722782	1,948889769
ACPM_HUMAN Acyl carrier protein, mitochondrial	0,00739374	2,983789113
T176B_HUMAN Transmembrane protein 176B	0,007992	2,84524551



CON__P02754	0,0080349	14,57945425
COX2_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 2	0,00804248	2,325871622
TIDC1_HUMAN Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial	0,00825045	2,288813231
BT2A1_HUMAN Isoform 2 of Butyrophilin subfamily 2 member A1	0,00831189	2,834163642
VKORL_HUMAN Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1	0,00847519	2,303334561
VDAC2_HUMAN Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0,00881158	2,160949723
NOMO1_HUMAN Nodal modulator 1	0,00888599	2,609843938
MIMIT_HUMAN Mimitin, mitochondrial	0,00908542	2,293163042
ZDH20_HUMAN Probable palmitoyltransferase ZDHHC20	0,00938974	2,275887851
B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin	0,00969358	8,076060275
NU1M_HUMAN NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	0,0101838	2,568594086
DBNL_HUMAN Isoform 3 of Drebrin-like protein	0,0102258	1,926865133
FUND2_HUMAN FUN14 domain-containing protein 2	0,0103863	3,375955077
CTNA1_HUMAN Catenin alpha-1	0,0107669	2,271154628
PYRD_HUMAN Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	0,0107973	3,022460539
GND_HUMAN Isoform 3 of Glia-derived nexin	0,010843	8,625434817
PHB2_HUMAN Prohibitin-2	0,010976	2,257879409
DEFM_HUMAN Peptide deformylase, mitochondrial	0,0114414	3,346069174
M17L2_HUMAN Mpv17-like protein 2	0,0114535	1,957515568
CHP1_HUMAN Calcineurin B homologous protein 1	0,011773	2,226804659
GPDM_HUMAN Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	0,0118761	2,491529049
ATPO_HUMAN ATP synthase subunit O, mitochondrial	0,0130083	3,01463066
ICAM1_HUMAN Intercellular adhesion molecule 1	0,0136305	2,264339278
MTCH2_HUMAN Mitochondrial carrier homolog 2	0,0138034	2,727773842
AGK_HUMAN Acylglycerol kinase, mitochondrial	0,013848	2,94130633
BGH3_HUMAN Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	0,0154919	1,653162262
YC029_HUMAN Uncharacterized protein DKFZp762I1415	0,0156891	3,133602812
NDUV1_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	0,0158505	1,954670373
TIM9_HUMAN Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	0,0160006	7,209474166
HDGF_HUMAN Isoform 3 of Hepatoma-derived growth factor	0,0165172	2,429223679
ADT3_HUMAN ADP/ATP translocase 3	0,0167182	2,241461814
NDUB9_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	0,0169309	2,102692043
MGST2_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 2	0,0169681	1,881745003
UBAC2_HUMAN Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	0,0172598	1,838966857
SPG7_HUMAN Paraplegin	0,0183263	1,564064292
ACBP_HUMAN Acyl-CoA-binding protein	0,0183661	2,877695022
MRP4_HUMAN Multidrug resistance-associated protein 4	0,0183795	2,098935003
AATM_HUMAN Aspartate aminotransferase, mitochondrial	0,018542	1,663657924

PGH2_HUMAN Prostaglandin G/H synthase 2	0,0186233	25,93038038
CON__P02666	0,0193541	7,82177617
SEC62_HUMAN Translocation protein SEC62	0,019387	1,791538791
PGRC1_HUMAN Membrane-associated progesterone receptor component 1	0,0194177	2,458133025
COX6C_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 6C	0,0201232	2,832903696
SFXN4_HUMAN Sideroflexin-4	0,0202011	1,783864833
VMP1_HUMAN Vacuole membrane protein 1	0,0209698	1,922968987
CMC1_HUMAN Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	0,0209889	2,008819884
SAM50_HUMAN Sorting and assembly machinery component 50 homolog	0,0220373	2,054661436
ATP5L_HUMAN ATP synthase subunit g, mitochondrial	0,0227018	1,675742927
TPSN_HUMAN Isoform 3 of Tapasin	0,0232579	2,304394003
ODO2_HUMAN Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	0,0234659	1,95699119
J3KNA0_HUMAN Mitochondrial inner membrane protein OXA1L	0,0239821	1,951252542
GHITM_HUMAN Growth hormone-inducible transmembrane protein	0,0245864	2,010837037
DHB8_HUMAN Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	0,0250702	1,666237357
COX41_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	0,0251478	2,335491637
J3QTA6_HUMAN Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 6, mitochondrial	0,0252926	3,287792463
MCU_HUMAN Calcium uniporter protein, mitochondrial	0,0257988	1,663570304
NCLN_HUMAN Nicalin	0,0262706	1,738671839
CCD51_HUMAN Coiled-coil domain-containing protein 51	0,0268173	2,185790996
GOLP3_HUMAN Golgi phosphoprotein 3	0,0269766	1,878556105
TXTP_HUMAN Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0,0270517	2,097121624
COX20_HUMAN Isoform 2 of Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	0,0277103	2,196421263
C9JJ19_HUMAN 28S ribosomal protein S34, mitochondrial	0,028161	2,16452302
RON_HUMAN Macrophage-stimulating protein receptor	0,0284491	2,443256249
CD36_HUMAN Platelet glycoprotein 4	0,0294647	2,253252367
TOM22_HUMAN Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	0,029513	1,928375623
T10B_HUMAN Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 B	0,030822	2,629315628
MCUR1_HUMAN Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	0,0308895	1,862255071
F213A_HUMAN Redox-regulatory protein FAM213A	0,0311783	2,070985131
H0Y7A7_HUMAN Calmodulin (Fragment)	0,0313221	4,684408287
CNNM3_HUMAN Metal transporter CNNM3	0,032077	1,984158359
ADT1_HUMAN ADP/ATP translocase 1	0,032083	1,610163737
PRDX3_HUMAN Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	0,0321127	1,464358932
BINCA_HUMAN Isoform 2 of Bcl10-interacting CARD protein	0,0322317	1,655559725
H0Y8C3_HUMAN Mitochondrial carrier homolog 1 (Fragment)	0,0322346	2,51582681

CPT1A_HUMAN Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	0,0329642	1,969033209
CY1_HUMAN Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	0,033639	2,104879261
BCS1_HUMAN Mitochondrial chaperone BCS1	0,0336584	1,755287816
P5CR2_HUMAN Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	0,034359	3,307074045
DERL2_HUMAN Derlin-2	0,0345276	2,49095896
H0Y368_HUMAN Dolichol-phosphate mannosyltransferase (Fragment)	0,0351829	1,673617905
DOPP1_HUMAN Dolichyldiphosphatase 1	0,0354179	1,761526358
HAX1_HUMAN HCLS1-associated protein X-1	0,0363617	1,586372856
H0Y3Z8_HUMAN Uncharacterized protein (Fragment)	0,0382054	1,639781263
IKIP_HUMAN Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	0,0382119	2,130093018
GRAM4_HUMAN GRAM domain-containing protein 4	0,0385691	2,087120047
FAAH1_HUMAN Fatty-acid amide hydrolase 1	0,0396769	1,720672788
NDUS5_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	0,0414509	2,286727439
TI17B_HUMAN Isoform 2 of Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-B	0,0415496	1,94174021
CH60_HUMAN 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,0415747	1,624215486
NDUB6_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	0,0419875	1,766775073
GLYG_HUMAN Glycogenin-1	0,0426011	2,124021361
PSB9_HUMAN Proteasome subunit beta type-9	0,0430955	1,861610639
NUCB2_HUMAN Nucleobindin-2	0,0433969	1,749499041
FUT4_HUMAN Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4	0,0436442	2,246356136
MDHM_HUMAN Malate dehydrogenase, mitochondrial	0,0439094	1,384805737
COCA1_HUMAN Collagen alpha-1(XII) chain	0,0444253	1,61185833
RM44_HUMAN 39S ribosomal protein L44, mitochondrial	0,0452136	1,235889357
PRG2_HUMAN Bone marrow proteoglycan	0,0456227	1,833920422
RAGP1_HUMAN Ran GTPase-activating protein 1	0,0457267	1,608583226
CHCH2_HUMAN Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2, mitochondrial	0,045805	5,682428421
NDUAC_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	0,0470759	2,179413931
NDUA5_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	0,0473535	2,060765346
NU4M_HUMAN NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	0,0486969	1,615797716
CON__P02662	0,0490822	6,442339694

**Anexo 4 - Lista de proteínas de membrana diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto**

Proteínas de membrana com diminuição da expressão no tumor residual da peça cirúrgica					
Protein ID	GeneID	Entrez Gene Name	t-test p value	Fold Change (B-P)	% Pacientes
P08069	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	0,001998	2,63	46,7
Q9UJZ1	STML2	stomatin (EPB72)-like 2	0,002253	3,13	100
O43657	TSN6	tetraspanin 6	0,002777	2,91	46,7
P48960	CD97	CD97 molecule	0,00391	2,21	100
Q99720	SGMR1	sigma non-opioid intracellular receptor 1	0,004237	2,68	40
Q7KYR7-1	BT2A1	butyrophilin, subfamily 2, member A1	0,008312	2,83	33
Q15155	NOMO1	NODAL modulator 1	0,008886	2,61	100
Q5W0Z9	ZDH20	zinc finger, DHHC-type containing 20	0,00939	2,28	53,3
P61769	B2MG	beta-2-microglobulin	0,009694	8,08	100
P35221	CTNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	0,010767	2,27	100
P05362	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	0,013631	2,26	100
O15439	MRP4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0,01838	2,1	80
O00264	PGRC1	progesterone receptor membrane component 1	0,019418	2,46	100
Q96GC9	VMP1	vacuole membrane protein 1	0,02097	1,92	40
Q04912	RON	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	0,028449	2,44	66,7
P16671	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	0,029465	2,25	60
O00519	FAAH1	fatty acid amide hydrolase	0,039677	1,72	66,7

Proteínas de membrana com aumento da expressão no tumor residual da peça cirúrgica					
Protein ID	GeneID	Entrez Gene Name	t-test p value	Fold Change (P-B)	% Pacientes
P61225	RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	4,09E-05	2,41	100
P04899	GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	6,43E-05	2,34	100
P61160	ARP2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	0,000407	1,57	100
P38606	VATA	ATPase, H <sup>+</sup> transporting,	0,000417	2,06	100

		lysosomal 70kDa, V1 subunit A			
Q00610	CLH1	clathrin, heavy chain (Hc)	0,001155	5,09	100
Q15836	VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3	0,002381	2,39	100
E9PN11	E9PN1 1	ras homolog family member C	0,002904	2,99	88,9
P14207	FOLR2	folate receptor 2 (fetal)	0,004315	5,96	66,7
P61158	ARP3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	0,004527	1,48	100
Q9Y4P3	TBL2	transducin (beta)-like 2	0,004845	1,83	88,9
Q99536	VAT1	vesicle amine transport 1	0,005663	1,97	100
P15924	DESP	desmoplakin	0,014211	3,93	100
P28907	CD38	CD38 molecule	0,018969	2,38	66,7
Q14165	MLEC	malectin	0,020677	3,8	100
P14923	PLAK	junction plakoglobin	0,023428	3,11	100
Q14108	SCRB2	scavenger receptor class B, member 2	0,024809	3,26	100
O15400	STX7	syntaxin 7	0,027554	1,68	88,9
Q86VB7- 2	C163A	CD163 molecule	0,028176	3,11	77,8
P20292	AL5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	0,034005	2,6	88,9
P04083	ANXA1	annexin A1	0,036133	2,13	100
P01859	IGHG2	immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker)	0,039328	2,5	100
P50570	DYN2	dynamamin 2	0,045567	1,64	100
Q14126	DSG2	desmoglein 2	0,048383	1,63	88,9

**Proteínas de membrana expressas exclusivamente em tumor residual de peça cirúrgica**

ProteinID	geneID	Entrez Gene Name	% Pacientes
P33897	ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	66,7
P35321	SPR1A	small proline-rich protein 1A	55,6
P12821	ACE	angiotensin I converting enzyme	44,4
Q02487	DSC2	desmocollin 2	44,4
Q30201	HFE	hemochromatosis	44,4
Q96CX2	KCD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	44,4

**Anexo 5 - Lista de proteínas diferentemente expressas na proteômica de biópsias de pacientes com adenocarcinoma de reto com e sem RCp ao tratamento neoadjuvante.**

<b>Proteínas com aumento da expressão em pacientes COM RCp</b>		
<b>Protein IDs</b>	<b>t-test p value</b>	<b>FOLD CHANGE</b>
IF4G1_HUMAN Isoform 9 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	0,001197	3,458972
SYNC_HUMAN Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,002276	3,10755
CAPG_HUMAN Macrophage-capping protein	0,004719	2,702568
E7EU23_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor beta	0,004767	1,570472
SNAAL_HUMAN Alpha-soluble NSF attachment protein	0,005246	1,650157
2B18_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-8 beta chain	0,008036	8,460591
CBR1_HUMAN Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,009903	2,707737
PUR9_HUMAN Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	0,013956	1,699037
UN93B_HUMAN Protein unc-93 homolog B1	0,016236	1,815946
ITCH_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	0,017531	2,34209
MYO1B_HUMAN Unconventional myosin-Ib	0,018086	1,752861
PDCD6_HUMAN Programmed cell death protein 6	0,020026	1,743901
ELNE_HUMAN Neutrophil elastase	0,022545	2,568422
GCP3_HUMAN Gamma-tubulin complex component 3	0,025647	2,71476
PROM1_HUMAN Prominin-1	0,027286	5,890251
SYRC_HUMAN Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,027348	1,672143
GLCE_HUMAN D-glucuronyl C5-epimerase	0,03046	1,813486
EIF3A_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0,034038	2,289734
GGH_HUMAN Gamma-glutamyl hydrolase	0,035752	2,665232
GSTP1_HUMAN Glutathione S-transferase P	0,039129	1,57808
IPO4_HUMAN Isoform 2 of Importin-4	0,040332	3,109486
K6PL_HUMAN 6-phosphofructokinase, liver type	0,040688	1,69942
CAP7_HUMAN Azurocidin	0,040956	2,621695
MUC13_HUMAN Mucin-13	0,044776	1,645791
PLBL1_HUMAN Phospholipase B-like 1	0,045225	2,725535
B1AVU8_HUMAN Saposin-D	0,045706	2,313253
LRBA_HUMAN Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	0,04675	3,327178
1B59_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, B-59 alpha chain	0,047105	1,803557
B0YIW2_HUMAN Apolipoprotein C-III	0,047834	4,423179
J3KNB4_HUMAN Cathelicidin antimicrobial peptide	0,049402	2,283712

<b>Proteínas com aumento da expressão em pacientes SEM RCp</b>		
<b>Protein IDs</b>	<b>t-test p value</b>	<b>FOLD CHANGE</b>
AT2A2_HUMAN Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	0,001071	1,991183
H0UI06_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	0,007338	2,252132

SUCA_HUMAN Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	0,008698	2,685957
SIAS_HUMAN Sialic acid synthase	0,012433	1,235328
BGH3_HUMAN Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	0,015761	1,9225
DHE3_HUMAN Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	0,01981	1,647354
DDRKG_HUMAN DDRKG domain-containing protein 1	0,020998	2,95364
CEPT1_HUMAN Choline/ethanolaminephosphotransferase 1	0,021008	1,596466
ECHA_HUMAN Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	0,021202	2,249141
EFTU_HUMAN Elongation factor Tu, mitochondrial	0,02206	2,32734
NDUB3_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	0,02414	2,036639
GHC1_HUMAN Mitochondrial glutamate carrier 1	0,025794	2,009912
MDHM_HUMAN Malate dehydrogenase, mitochondrial	0,026129	2,03161
COX2_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 2	0,026788	2,165942
OST48_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	0,027457	1,910464
HV305_HUMAN Ig heavy chain V-III region BRO	0,028563	2,051285
H2AZ_HUMAN Histone H2A.Z	0,028905	15,60611
CH10_HUMAN 10 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,03104	6,352361
E7EUV1_HUMAN Mucin-2	0,031995	45,41787
GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein	0,033379	1,829284
TCAM2_HUMAN Isoform 2 of TIR domain-containing adapter molecule 2	0,035421	1,725787
RPN1_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	0,037056	1,551008
GRP75_HUMAN Stress-70 protein, mitochondrial	0,042079	2,685144
ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0,043099	1,772869
QCR6_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	0,043411	1,867451
EMC4_HUMAN ER membrane protein complex subunit 4	0,04397	2,379293
LMAN2_HUMAN Vesicular integral-membrane protein VIP36	0,049955	1,488682

**Anexo 6 – Lista de proteínas de membrana diferentemente expressas na proteômica de biópsia e peça cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma de reto**

<b>Proteínas expressas exclusivamente em biópsia de pacientes COM RCp</b>			
<b>Protein IDs</b>	<b>GeneID</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>% pacientes</b>
Q9Y285	SYFA	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	40,0
Q7L8L6	FAKD5	FAST kinase domains 5	40,0
Q9C005	DPY30	dpy-30 homolog (C. elegans)	40,0
P06737	PYGL	phosphorylase, glycogen, liver	40,0

<b>Proteínas expressas exclusivamente em biópsia de pacientes SEM RCp</b>			
<b>Protein IDs</b>	<b>GeneID</b>	<b>Entrez Gene Name</b>	<b>% pacientes</b>
O60220	TIM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	93,3
Q9Y5J6	T10B	translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog B (yeast)	66,7
O14548	COX7R	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	46,7
O14561	ACPM	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	46,7
O76021	RL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	46,7
J3KR54	J3KR54	isovaleryl-CoA dehydrogenase	46,7
Q6UB35	C1TM	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	46,7
P0DJI8	SAA1	serum amyloid A1	40,0
P35900	K1C20	keratin 20	40,0
Q9ULV4-3	COR1C	coronin, actin binding protein, 1C	40,0
P07814	SYEP	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	40,0
P46976	GLYG	glycogenin 1	40,0
P07108-6	ACBP	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)	40,0
P13762	DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	40,0
P51689	ARSD	arylsulfatase D	40,0
Q05682	CALD1	caldesmon 1	40,0
Q2TB90	HKDC1	hexokinase domain containing 1	40,0
E9PHG5	E9PHG5	cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1	40,0
Q7Z7M9	GALT5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	40,0
Q86T03-2	TM55B	transmembrane protein 55B	40,0
Q99895	CTRC	chymotrypsin C (caldecrin)	40,0
Q9BRT2	UQCC2	ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 2	40,0



Q9P0L0-2	VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa	40,0
Q9UJ70-2	NAGK	N-acetylglucosamine kinase	40,0
Q9Y584	TIM22	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	40,0

**Anexo 7 – Lista de proteínas diferentemente expressas na análise proteômica de VEs de células SW837 e IR-SW837, bem como as proteínas identificadas exclusivamente em um dos grupos.**

<b>Proteínas com aumento da expressão em VEs de células IR-SW837</b>		
<b>Protein Ids</b>	<b>t-test p value</b>	<b>FOLD CHANGE</b>
NSUN2_HUMAN tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	0,000226	2,01
RFA3_HUMAN Replication protein A 14 kDa subunit	0,000417	2,04
ALDH2_HUMAN Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	0,002984	1,50
RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30	0,004693	1,97
HS90B_HUMAN Heat shock protein HSP 90-beta	0,006593	1,71
HS90A_HUMAN Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	0,008467	1,75
RM49_HUMAN 39S ribosomal protein L49, mitochondrial	0,009563	1,39
GLYM_HUMAN Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0,014205	1,63
PSMD1_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	0,014644	1,94
XRCC6_HUMAN X-ray repair cross-complementing protein 6	0,016763	1,78
ACTC_HUMAN Actin, alpha cardiac muscle 1	0,017824	2,88
XRCC5_HUMAN X-ray repair cross-complementing protein 5	0,018093	1,92
B0YIW6_HUMAN Archain 1, isoform CRA_a	0,02218	1,15
RAB5C_HUMAN Isoform 2 of Ras-related protein Rab-5C	0,023489	1,35
SND1_HUMAN Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	0,025086	1,71
RCC2_HUMAN Protein RCC2	0,031929	1,27
PSMD6_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	0,036947	2,05
PGES2_HUMAN Prostaglandin E synthase 2	0,038143	1,66
GGH_HUMAN Gamma-glutamyl hydrolase	0,040177	1,62
NONO_HUMAN Non-POU domain-containing octamer-binding protein	0,040981	1,56
SEPT7_HUMAN Septin-7	0,043234	1,35
CPT1A_HUMAN Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	0,043815	1,65
SYFA_HUMAN Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	0,044767	2,11
DNJA2_HUMAN DnaJ homolog subfamily A member 2	0,04745	1,83

<b>Proteínas com diminuição da expressão em VEs de células IR-SW837</b>		
<b>Protein Ids</b>	<b>t-test p value</b>	<b>FOLD CHANGE</b>
TRFM_HUMAN Melanotransferrin	0,000371	3,48
PPB1_HUMAN Alkaline phosphatase, placental type	0,00049	4,26
PPBN_HUMAN Alkaline phosphatase, placental-like	0,001092	3,78
SUSD2_HUMAN Sushi domain-containing protein 2	0,003765	2,42
CLIC3_HUMAN Chloride intracellular channel protein 3	0,004126	1,99
RAP2B_HUMAN Ras-related protein Rap-2b	0,005617	2,19
E9PSI1_HUMAN Transmembrane 9 superfamily member 1	0,006216	1,73
FOLR1_HUMAN Folate receptor alpha	0,006839	2,57
CD97_HUMAN CD97 antigen	0,007439	1,35

PLAC8_HUMAN Placenta-specific gene 8 protein	0,007687	6,83
1B53_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, B-53 alpha chain	0,009164	2,01
5NTD_HUMAN 5'-nucleotidase	0,009218	5,44
B4E0Y9_HUMAN Serine/threonine-protein kinase MST4	0,009808	1,84
PTTG_HUMAN Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	0,011113	1,24
VPS28_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	0,011167	2,24
TMC5_HUMAN Transmembrane channel-like protein 5	0,013123	4,52
H9KV70_HUMAN Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	0,013341	1,74
MUC13_HUMAN Mucin-13	0,014063	4,04
ES8L3_HUMAN Isoform 3 of Epidermal growth factor receptor kinase substrate	0,015243	4,09
NICA_HUMAN Nicastrin	0,016908	1,32
NRP1_HUMAN Neuropilin-1	0,017848	1,99
PTPRJ_HUMAN Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	0,018615	3,51
AL1A3_HUMAN Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	0,019539	2,55
CLCA4_HUMAN Calcium-activated chloride channel regulator 4	0,019802	5,17
STXB1_HUMAN Isoform 2 of Syntaxin-binding protein 1	0,019959	3,71
PTPRH_HUMAN Receptor-type tyrosine-protein phosphatase H	0,020675	2,91
CIB1_HUMAN Calcium and integrin-binding protein 1	0,020736	3,36
E9PR17_HUMAN CD59 glycoprotein	0,022031	2,79
SDCB2_HUMAN Syntenin-2	0,022512	1,45
LASP1_HUMAN LIM and SH3 domain protein 1	0,022737	1,53
CHM4B_HUMAN Charged multivesicular body protein 4b	0,024428	2,28
EHD1_HUMAN EH domain-containing protein 1	0,024428	2,97
MB12A_HUMAN Multivesicular body subunit 12A	0,024792	2,34
S12A2_HUMAN Solute carrier family 12 member 2	0,025068	1,77
MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	0,0262	1,40
ES8L2_HUMAN Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like	0,029419	2,61
MDR1_HUMAN Multidrug resistance protein 1	0,030257	4,24
DAF_HUMAN Isoform 7 of Complement decay-accelerating factor	0,032421	4,74
RAP1B_HUMAN Ras-related protein Rap-1b	0,033061	1,72
TSN8_HUMAN Tetraspanin-8	0,037316	2,96
DCD_HUMAN Dermcidin	0,038528	2,27
EPS8_HUMAN Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	0,039497	3,70
ES8L1_HUMAN Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like	0,041718	4,14
CLIC5_HUMAN Chloride intracellular channel protein 5	0,043367	4,33
STX3_HUMAN Syntaxin-3	0,046255	3,01
B8A4K4_HUMAN UPF0574 protein C9orf169	0,046406	2,17
DPEP1_HUMAN Dipeptidase 1	0,046858	2,75
CHM2B_HUMAN Charged multivesicular body protein 2b	0,04763	1,45
VTA1_HUMAN Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	0,048467	2,15

Proteínas expressas exclusivamente em VEs de células IR-SW837	
Protein Name	
ADAS_HUMAN Alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	
PSD12_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	
PRP4_HUMAN U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	
CIAO1_HUMAN Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1	
S10A9_HUMAN Protein S100-A9	
CAN2_HUMAN Calpain-2 catalytic subunit	
PYRG1_HUMAN CTP synthase 1	
CSRP1_HUMAN Cysteine and glycine-rich protein 1	
PSA2_HUMAN Proteasome subunit alpha type-2	
PSB4_HUMAN Proteasome subunit beta type-4	
AL1B1_HUMAN Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	
MCM4_HUMAN DNA replication licensing factor MCM4	
RBMX_HUMAN RNA-binding motif protein, X chromosome	
RAGP1_HUMAN Ran GTPase-activating protein 1	
PSMD8_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	
GUAA_HUMAN GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	
RPAB3_HUMAN DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	
LAMB2_HUMAN Laminin subunit beta-2	
EIF3B_HUMAN Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	
SYMC_HUMAN Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	
RT35_HUMAN 28S ribosomal protein S35, mitochondrial	
DSC2_HUMAN Desmocollin-2	
RON_HUMAN Macrophage-stimulating protein receptor	
TBB2A_HUMAN Tubulin beta-2A chain	
DECR_HUMAN 2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	
MAON_HUMAN NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	
VATF_HUMAN Isoform 2 of V-type proton ATPase subunit F	
DDX46_HUMAN Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	
CLYBL_HUMAN Citrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial	
MIMIT_HUMAN Mimitin, mitochondrial	
NPL4_HUMAN Isoform 2 of Nuclear protein localization protein 4 homolog	
STT3B_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	
DHB8_HUMAN Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	
ARC1A_HUMAN Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	
RAD50_HUMAN Isoform 2 of DNA repair protein RAD50	
G5EA30_HUMAN CUG triplet repeat, RNA binding protein 1, isoform CRA_c	
SEH1_HUMAN Isoform B of Nucleoporin SEH1	
J3KR44_HUMAN Ubiquitin thioesterase OTUB1	
CG055_HUMAN Isoform 2 of UPF0562 protein C7orf55	
EIF3C_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	
CSN8_HUMAN COP9 signalosome complex subunit 8	
AN32E_HUMAN Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	
TMM43_HUMAN Transmembrane protein 43	
MTND_HUMAN 1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	
RM01_HUMAN 39S ribosomal protein L1, mitochondrial	
B4DLH4_HUMAN Hematological and neurological-expressed 1-like protein	
BCCIP_HUMAN BRCA2 and CDKN1A-interacting protein	
NDRG3_HUMAN Protein NDRG3	
NAGK_HUMAN Isoform 2 of N-acetyl-D-glucosamine kinase	
ACSL5_HUMAN Isoform 2 of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	
DLGP4_HUMAN Disks large-associated protein 4	
PM14_HUMAN Pre-mRNA branch site protein p14	

TBL2_HUMAN	Transducin beta-like protein 2
LSM4_HUMAN	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4
COPG1_HUMAN	Coatomer subunit gamma-1
MTCH2_HUMAN	Mitochondrial carrier homolog 2
ZNT1_HUMAN	Zinc transporter 1

Proteínas expressas exclusivamente em VEs de células SW837	
Protein Name	
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subuA136:A149nit 2
CLD3_HUMAN	Claudin-3
TNFI5_HUMAN	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 15
FINC_HUMAN	Isoform 15 of Fibronectin
H13_HUMAN	Histone H1.3
E2AK2_HUMAN	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase
SPB5_HUMAN	Serpin B5
GNAQ_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
B4DNW0_HUMAN	Aminoacylase-1
G3V1K3_HUMAN	Paraoxonase 2, isoform CRA_a
CYTM_HUMAN	Cystatin-M
CD276_HUMAN	CD276 antigen
STAM1_HUMAN	Signal transducing adapter molecule 1
CHM4C_HUMAN	Charged multivesicular body protein 4c
SUCB2_HUMAN	Isoform 2 of Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial
MY15B_HUMAN	Unconventional myosin-XVB
SH3G1_HUMAN	Endophilin-A2
RM04_HUMAN	39S ribosomal protein L4, mitochondrial
TAOK3_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase TAO3
H3BTB6_HUMAN	COX assembly mitochondrial protein 2 homolog
MCTS1_HUMAN	Isoform 3 of Malignant T-cell-amplified sequence 1
A4D1W8_HUMAN	Ependymin related protein 1 (Zebrafish), isoform CRA_b
CHMP3_HUMAN	Charged multivesicular body protein 3

## **Anexo 8 - Artigo científico: “Rab5C increases resistance to ionizing radiation in rectal cancer”**

Artigo Submetido

### **Rab5C enhances resistance to ionizing radiation in rectal cancer**

Antuani Rafael Baptistella<sup>a,f</sup>, Marcos Vinicios Salles Dias<sup>a,f</sup>, Fernanda Giudice<sup>a,f</sup>, Bruna Roz Rodrigues<sup>a,f</sup>, Petrus Paulo Combas Eufrazio da Silva<sup>b</sup>, Edson Kuatelela Cassinela<sup>a,f</sup>, Tonielli Cristina Lacerda<sup>a,f</sup>, Fabio Marchi<sup>a,f</sup>, Adriana Franco Paes Leme<sup>c</sup>, Maria Dirlei Begnami<sup>d,f</sup>, Samuel Aguiar Junior<sup>e,f,1</sup>, Vilma Regina Martins<sup>a,f,1</sup>.

<sup>a</sup> International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Medical Physics, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;

<sup>c</sup> Brazilian Biosciences National Laboratory – LNBio, Campinas, Brazil;

<sup>d</sup> Department of Anatomic Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;

<sup>e</sup> Department of Pelvic Surgery, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;

<sup>f</sup> National Institute for Science and Technology in Oncogenomics – INCITO (CNPq/MCT/FAPESP), São Paulo, Brazil.

<sup>1</sup>Corresponding authors:

Vilma Regina Martins; E-mail: [vmartins@cipe.accamargo.org.br](mailto:vmartins@cipe.accamargo.org.br)

Samuel Aguiar Junior; E-mail: [samuel.aguiar.jr@gmail.com](mailto:samuel.aguiar.jr@gmail.com)

Address: Rua Taguá, 440 – CEP: 01508-010, Liberdade – São Paulo/SP

Phone: 55 11 2189 5000, ×2973; Fax: 55 11 2189 5152

**Short Title:** Rab5C enhances resistance to ionizing radiation

**Keywords:** Rectal cancer, neoadjuvant therapy, Rab5C, EGF receptor, DNA repair, therapy resistance.

**Conflicts of interest:** The authors have no conflicts to disclose.

## **Anexo 9 – Artigo Científico “Heterogeneous expression of A33 in colorectal cancer: possible explanation for A33 antibody treatment failure”**

Artigo submetido

### **Heterogeneous expression of A33 in colorectal cancer: possible explanation for A33 antibody treatment failure.**

Antuani Rafael Baptistella<sup>a,d</sup>, Marcos Vinicios Salles Dias<sup>a,d</sup>, Samuel Aguiar Junior<sup>b,d</sup>, Maria Dirlei Begnami<sup>c,d,1</sup>, Vilma Regina Martins<sup>a,d,1</sup>.

<sup>a</sup> International Research Center, AC Camargo Cancer Center, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Pelvic Surgery, AC Camargo Cancer Center, Brazil;

<sup>c</sup> Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, Brazil;

<sup>d</sup> National Institute for Science and Technology in Oncogenomics – INCITO (CNPq/MCT/FAPESP), São Paulo, Brazil

<sup>1</sup> Corresponding authors: Vilma Regina Martins, [vmartins@cipe.accamargo.org.br](mailto:vmartins@cipe.accamargo.org.br) and Maria Dirlei Begnami, [mariadirlei@cipe.accamargo.org.br](mailto:mariadirlei@cipe.accamargo.org.br)

Address: Rua Taguá, 440 – CEP: 01508-010, Liberdade – São Paulo/SP

Phone 55 11 2189 5000 r. 2973 and Fax 55 11 2189 5152

**Short Title:** Heterogeneous A33 expression in colorectal cancer

**Keywords:** Colorectal Cancer, A33 antibody, anticancer agent, immunotherapy, immunohistochemistry.

**Conflicts of interest:** The authors disclose no conflicts.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank Marina França de Resende from the Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, Brazil, for help performing IHC staining. This work was supported by grants from FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (VRM 2009/14027-2) and National Institute for Science and Technology in Oncogenomics (INCITO). A fellowship from FAPESP was awarded to A.R.B (2013/04913-0).